



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Πρόεδρος: Καθηγητής Πέτρος Σφηκάκης

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Αθανάσιος Γ. Τζιούφας

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ
ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΑΥΞΗΣΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ**

Διδακτορική Διατριβή

Αιμίλιος Κακλαμάνος

ΙΑΤΡΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2017

Στοιχεία ταυτότητας της διδακτορικής διατριβής

Ημερομηνία ορισμού συμβουλευτικής επιτροπής: 09/04/2014

Ημερομηνία κατάθεσης θέματος: 11/07/2014

Ημερομηνία κατάθεσης της διδακτορικής διατριβής: 26/05/2017

Ημερομηνία υποστήριξης της διδακτορικής διατριβής: 21/06/2017

Βαθμός: Άριστα

Συμβουλευτική επιτροπή

Ε. Καψογεώργου, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Αθηνών

Γ. Κόλλιας, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Αθηνών

Μ. Κουτσιλιέρης, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Αθηνών

Επιβλέπουσα

Ε. Καψογεώργου, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Αθηνών

7μελής Εξεταστική Επιτροπή:

Α. Γ. Τζιούφας, Καθηγητής Ιατρικής σχολής Αθηνών

Γ. Κόλλιας, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Αθηνών

Μ. Κουτσιλιέρης, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Αθηνών

Μ. Βουλγαρέλης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Αθηνών

Ε. Καψογεώργου, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Αθηνών

Κ. Μαυραγάνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Αθηνών

Α. Φιλίππου, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής σχολής Αθηνών

Θέμα διδακτορικής διατριβής

Μελέτη του ρόλου των μεσεγγυματικών κυττάρων στη σωματική αύξηση και τον καρκίνο

ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἵστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ αὐτοῦ ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρῆσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδίκῃ εἴρξειν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὁσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὁκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄδ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπιῆς κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἡγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποίεοντι, καὶ μὴ ξυγχέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιορκοῦντι, τάναντία τουτέων.

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών δε συνιστά αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα.

N. 5343/1932 άρθρο 202

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στα εργαστήρια του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμιγκ» την περίοδο 2014-2017, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γ. Κόλλια, τον οποίο και θέλω να ευχαριστήσω θερμά για την επιστημονική υποστήριξη αλλά και τη φιλική διάθεση, την εμπιστοσύνη και το αμείωτο ενδιαφέρον που επέδειξε όλα αυτά τα χρόνια κατά την επίβλεψη της διατριβής.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Α. Τζιούφα, που υποστήριξε την πραγματοποίηση της παρούσας διατριβής, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής μου, την επίκουρη καθηγήτρια κα. Ε. Καψογεώργου και τον καθηγητή κ. Μ. Κουτσιλιέρη, για την καλή τους διάθεση και το χρόνο που διέθεσαν κατά την παρακολούθηση της συγκεκριμένης μελέτης.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη της επταμελούς επιτροπής για το χρόνο που διέθεσαν.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους και φίλους από το εργαστήριο στο οποίο τόσα χρόνια εργαστήκαμε και αγωνιστήκαμε πλάι πλάι στο Φλέμιγκ. Κυρίως θα ήθελα να ευχαριστήσω το Μανώλη Ρ., για την αρχική καθοδήγηση και υποστήριξη στα πρώτα μου βήματα στο χώρο της βασικής έρευνας αλλά και τη διαρκή συνεργασία και φιλία μας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια και τους στενούς μου φίλους για τη διαρκή υποστήριξη και ενθάρρυνση καθ'όλη τη διάρκεια της διδακτορικής αυτής διατριβής.

Περιεχόμενα

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	4
1 Μεσέγχυμα - μεσεγχυματικά κύτταρα	4
1.1 Ορισμός	4
1.2 Εμβρυική προέλευση του μεσεγχύματος και των μεσεγχυματικών κυττάρων και ιστών.....	5
1.3 Ο ρόλος των μεσεγχυματικών κυττάρων στη φυσιολογία	9
1.4 Ο ρόλος των μεσεγχυματικών κυττάρων στη νόσο.	15
1.5 Πειραματικά πρότυπα (μοντέλα) ποντικών για τη μελέτη των μεσεγχυματικών κυττάρων στη φυσιολογία και τη νόσο.....	26
1.6 Συμπεράσματα	30
Βιβλιογραφία	30
2 Σωματική αύξηση.....	40
2.1 Γενικά.....	40
2.2 Ο άξονας εκλυτική ορμόνη της αυξητικής ορμόνης – αυξητική ορμόνη – ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας (GHRH – GH – Igf-1)	40
2.3 Αυξητική ορμόνη	42
2.3.1 Γενικά – παραγωγή της αυξητικής ορμόνης.....	42
2.3.2 Δράσεις της αυξητικής ορμόνης.....	44
2.4 Πειραματικά πρότυπα ποντικών για τη μελέτη της φυσιολογίας της σωματικής αύξησης και της αυξητικής ορμόνης.....	50
2.4.1 Πειραματικά πρότυπα έλλειψης – ανεπάρκειας της αυξητικής ορμόνης	51
2.4.2 Πειραματικά πρότυπα υπερέκφρασης της αυξητικής ορμόνης	54
2.5 Συμπεράσματα	55
Βιβλιογραφία	56
3 Καρκίνος.....	66
3.1 Γενικά.....	66
3.2 Καρκίνος του παχέος εντέρου	67
3.2.1 Γενικά	67
3.2.2 Κυτταρικοί πληθυσμοί που συμμετέχουν στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου... ..	69
3.2.3 Μοριακοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου... ..	72
3.2.4 Ο ρόλος της κυκλοοξυγενάσης-2 (Cox-2) στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου... ..	75
3.3 Πειραματικά πρότυπα ποντικών για τη μελέτη του καρκίνου του παχέος εντέρου.....	79

3.4	Συμπεράσματα	85
	Βιβλιογραφία	86
II.	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	95
1.	Στόχοι της διδακτορικής διατριβής	95
2.	Ο εκτεταμένος φαινοτυπικός χαρακτηρισμός ενός νέου διαγονιδιακού ποντικού αποκαλύπτει πλειοτροπικές διαταραχές στη φυσιολογία λόγω της μεσεγχυματικής έκφρασης του μινι-γονιδίου της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης	98
2.1.	Εισαγωγή	98
2.2.	Αποτελέσματα	100
2.2.1.	Δημιουργία των διαγονιδιακών ποντικών TgC6hrp55 και αξιολόγηση της έκφρασης του διαγονιδίου	101
2.2.2.	Οι διαγονιδιακοί ποντικοί TgC6hrp55 παρουσιάζουν ενισχυμένη σωματική αύξηση συνοδευόμενη από αλλαγές σε διάφορες παραμέτρους της φυσιολογίας τους	102
2.2.3.	Ο φαινότυπος των TgC6hrp55 ποντικών είναι ανεξάρτητος από τον TNF, τον TNFR1 και την ενσωμάτωση του διαγονιδίου	107
2.2.4.	Το <i>hGH</i> minigene εκφράζεται στους TgC6hrp55 ποντικούς οδηγώντας σε τοπική και συστηματική παραγωγή ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης και καταστολή της ενδογενούς αυξητικής ορμόνης	109
2.2.5.	Η φαρμακολογική παρεμπόδιση της σηματοδότησης μέσω της αυξητικής ορμόνης αντιστρέφει τα περισσότερα από τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των TgC6hrp55 ποντικών	111
2.3.	Συζήτηση	114
2.4.	Υλικά και μέθοδοι	119
2.4.1.	Ποντικοί	119
2.4.2.	Δημιουργία των διαγονιδιακών ποντικών TgC6hrp55	119
2.4.3.	Q-PCR	120
2.4.4.	Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός	121
2.4.5.	Αλγόριθμος της διαδικασίας φαινοτυπικού χαρακτηρισμού στην German Mouse Clinic	122
2.4.6.	Ιστοπαθολογική ανάλυση	126
2.4.7.	Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης	126
2.4.8.	Αναγνώριση του σημείου ενσωμάτωσης του διαγονιδίου	127
2.4.9.	Ανίχνευση της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης και του IGF-1 του ποντικού	127
2.4.10.	Θεραπεία με πεγβισομάντη	127
2.4.11.	Στατιστική ανάλυση	128
	Βιβλιογραφία	128
2.5.	Συμπληρωματικές εικόνες	132

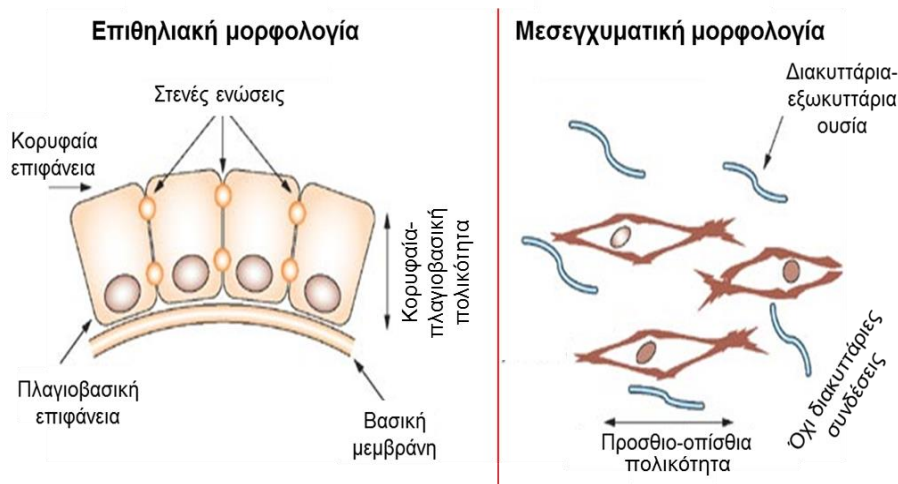
3. Συμπληρωματικά αποτελέσματα: Μελέτη του ρόλου της μεσεγχυματικής κυκλοοξυγενάσης-2 στον καρκίνο του εντέρου	138
3.1. Εισαγωγή	138
3.2. Αποτελέσματα	140
3.2.1. Η γενετική απαλοιφή της κυκλοοξυγενάσης-2 από τα μεσεγχυματικά κύτταρα οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή της τόσο σε απομονωμένους εντερικούς μυοϊνοβλάστες όσο και σε επίπεδο ολικού ιστού.....	140
3.2.2. Οι $APC^{min/+} ColVICre, Cox2^{ff/ff}$ ποντικοί εμφανίζουν σημαντικά μικρότερο αριθμό πεπτικών όγκων συνοδευόμενο από ηπιότερη κλινική εικόνα και σημαντική επιμήκυνση της διάρκειας ζωής τους	141
3.2.3. Οι $APC^{min/+} ColVICre, Cox2^{ff/ff}$ ποντικοί εμφανίζουν σημαντικά μικρότερο αριθμό πεπτικών όγκων ήδη από τα αρχικά στάδια της νόσου	143
3.2.4. Η αδρανοποίηση της Cox-2 στους εντερικούς μυοϊνοβλάστες των $APC^{min/+}$ ποντικών οδηγεί σε μείωση του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται σε ενεργό πολλαπλασιασμό στις εντερικές κρύπτες χωρίς να επηρεάζει την απόπτωσή τους	145
3.2.5. Η αδρανοποίηση της Cox-2 στους εντερικούς μυοϊνοβλάστες των $APC^{min/+}$ ποντικών δεν επηρεάζει ούτε την αγγείωση των όγκων ούτε τη διήθησή τους από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος	147
3.2.6. Η αδρανοποίηση της Cox-2 στους εντερικούς μυοϊνοβλάστες επηρεάζει το σηματοδοτικό μονοπάτι της β-κατενίνης καθώς και την έκφραση διαφόρων δεικτών των βλαστοκυττάρων	149
3.3. Συζήτηση	153
3.4. Υλικά και μέθοδοι	155
3.4.1. Ποντικοί.....	155
3.4.2. Μέτρηση όγκων και απομόνωση σπληνών	156
3.4.3. Ιστοπαθολογική ανάλυση	156
3.4.4. Εκτίμηση του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης των επιθηλιακών κυττάρων.....	157
3.4.5. Q-PCR.....	158
3.4.6. Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (FACS).....	158
3.4.7. Στατιστική ανάλυση.....	159
Βιβλιογραφία	160
III. Περίληψη της διδακτορικής διατριβής.....	163
IV. Summary of PhD thesis.....	169
Παράρτημα 1: Αγγλικό πρωτότυπο του II-2	174

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 Μεσέγχυμα - μεσεγχυματικά κύτταρα

1.1 Ορισμός

Στα σπονδυλωτά ζώα στα οποία ανήκει και ο άνθρωπος απαντώνται δύο κύριοι τύποι ιστών, το επιθήλιο και το μεσέγχυμα, τα οποία παρουσιάζουν σημαντικές λειτουργικές και φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ τους. (Hay, 2005) (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1. Κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά των επιθηλιακών και μεσεγχυματικών κυττάρων.

Η επιθηλιακή μορφολογία χαρακτηρίζεται από κορυφαία-πλαγιοβασική πολικότητα, επαφή με μία βασική μεμβράνη και σχηματισμό εκτεταμένων διακυττάρια συνδέσεων συμπεριλαμβανομένων των οστενών ενώσεων. Η μεσεγχυματική μορφολογία χαρακτηρίζεται από μια προσθιο-οπίσθια πολικότητα, απουσία (πολλές φορές πλήρης) διακυττάρια συνδέσεων και παραμονή σε μια λιγότερο δομημένη εξωκυττάρια ουσία.

[Μετάφραση και τροποποίηση της εικόνας από τους (Turley et al., 2008)]

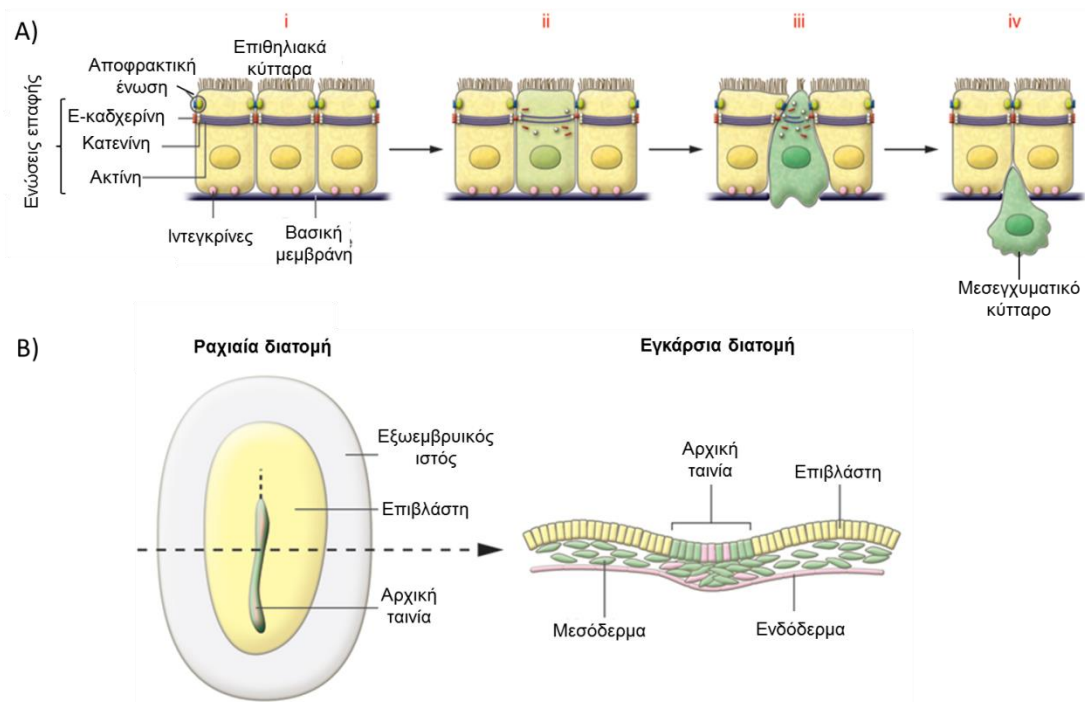
Από τη μία, τα επιθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν πολωμένο σχήμα με διαφορετική (φαινοτυπικά και λειτουργικά) κορυφαία και πλαγιοβασική επιφάνεια ενώ συνδέονται μεταξύ τους και με το περιβάλλον τους μέσω εξειδικευμένων μεμβρανικών δομών όπως οι αποφρακτικές ενώσεις – στενές ενώσεις, οι ενώσεις πρόσφυσης, οι ενώσεις επαφής, τα δεσμοσώματα, τα ημιδεσμοσώματα και οι ενώσεις επικοινωνίας, σχηματίζοντας έτσι στιβάδες κυττάρων. Η κορυφαία-πλαγιοβασική πολικότητα των κυττάρων αυτών αντανακλάται και στον τρόπο με τον οποίο οργανώνεται ο κυτταροσκελετός τους αλλά και τα διάφορα μόρια προσκόλλησης έτσι ώστε, για παράδειγμα, οι συνδέσεις με τα γειτονικά κύτταρα να πραγματοποιούνται κατά κανόνα μέσω των πλαγίων επιφανειών του κυττάρου ενώ η βασική επιφάνειά του είναι ειδικά διαμορφωμένη ώστε να συνδέεται με τη βασική μεμβράνη του ιστού.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα επιθηλιακά κύτταρα δεν αποκολλώνται από την επιθηλιακή στιβάδα αλλά έχουν ωστόσο τη δυνατότητα να μετακινούνται εντός αυτής (Schock and Perrimon, 2002; Thiery and Sleeman, 2006).

Από την άλλη, τα μεσεγχυματικά κύτταρα δε σχηματίζουν κάποια οργανωμένη κυτταρική στιβάδα, ούτε παρουσιάζουν κορυφαία-πλαγιοβασική πολικότητα σε ότι αφορά τη δομή αλλά και την κατανομή των μορίων προσκόλλησης και του κυτταροσκελετού τους. Συνήθως παρουσιάζουν επίμηκες ατρακτοειδές σχήμα (με προσθιο-οπίσθια πολικότητα), με εστιακές μονάχα επαφές με τα γειτονικά τους κύτταρα ενώ απουσιάζουν οι στενές διακυττάρειες συνδέσεις, γεγονός το οποίο τους επιτρέπει να έχουν μεγάλη κινητικότητα τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (σε καλλιέργεια) (Pittenger and Martin, 2004; Thiery and Sleeman, 2006; Thompson et al., 2005). Ταυτόχρονα παρουσιάζουν μεγάλη πλαστικότητα ιδίως κατά την κίνησή τους είτε αυτή πραγματοποιείται μεμονωμένα είτε σε ομάδες (Friedl, 2004).

1.2 Εμβρυική προέλευση του μεσεγγύματος και των μεσεγχυματικών κυττάρων και ιστών

Το μεσέγγυμα δημιουργείται κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης από το βλαστίδιο μέσω ενός μηχανισμού που ονομάζεται Επιθηλιακή–Μεσεγχυματική Μετάβαση (Epithelial-Mesenchymal Transition). Κατά την διαδικασία αυτή, κύτταρα της επιβλάστης υφίσταται διάφορες βιοχημικές και δομικές αλλαγές με αποτέλεσμα να χάνουν τα αρχικά χαρακτηριστικά τους και να αποκτούν χαρακτηριστικά μεσεγχυματικού κυττάρου όπως αυτά που αναφέραμε παραπάνω (Kalluri and Neilson, 2003; Kalluri and Weinberg, 2009). Έπειτα, κατά τη διαδικασία της γαστριδίωσης και με την υποχώρηση της αρχικής ταινίας, το μεσέγγυμα αυτό συμπυκνώνεται ώστε να σχηματίσει το μεσόδερμα και το ενδόδερμα του εμβρύου (Εικόνα 1.2) (Bellairs, 1986; Ferrer-Vaquer et al., 2010; Hay, 2005; Stern, 2004).



Εικόνα 1.2.

A) Επιθηλιακή –Μεσεγχυματική Μετάβαση

(i) Φυσιολογικό επιθήλιο. Τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα περιλαμβάνουν ενώσεις επαφής που αποτελούνται από E-καδχερίνη σε συνεργασία με δακτυλίους κατενίνης και ακτίνης. Επίσης, στην κορυφαία επιφάνεια των κυττάρων απαντώνται και οι αποφρακτικές ενώσεις. Τέλος, οι ιντεγκρίνες στη βάση του κυττάρου αλληλεπιδρούν με συστατικά της βασικής μεμβράνης. **(ii) Απώλεια τη διακυττάριας πρόσφυσης.** Τα μόρια τα οποία προάγουν την επιθηλιακή –μεσεγχυματική μετάβαση καταστέλλουν τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν για συστατικά τόσο των ενώσεων επαφής όσο και των αποφρακτικών ενώσεων, προκαλώντας έτσι απώλεια της πολικότητας του κυττάρου. **(iii) Διάσπαση της βασικής μεμβράνης και κορυφαία συστολή.** Η εκτεταμένη αναμόρφωση του κυτταροσκελετού ευνοεί την αποκόλληση του κυττάρου επάγοντας τη συστολή των ενώσεων στην κορυφαία επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων και την αποδιοργάνωση της βασικής μεμβράνης. **(iv) Κυτταρική αποκόλληση και εισβολή.** Η έκφραση υποδοχέων της ιντεγκρίνης και η διαρκής ενεργοποίηση μεταλλοπρωτεασών ευνοεί τη μετανάστευση μέσω της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και την εισβολή στους παρακείμενους ιστούς.

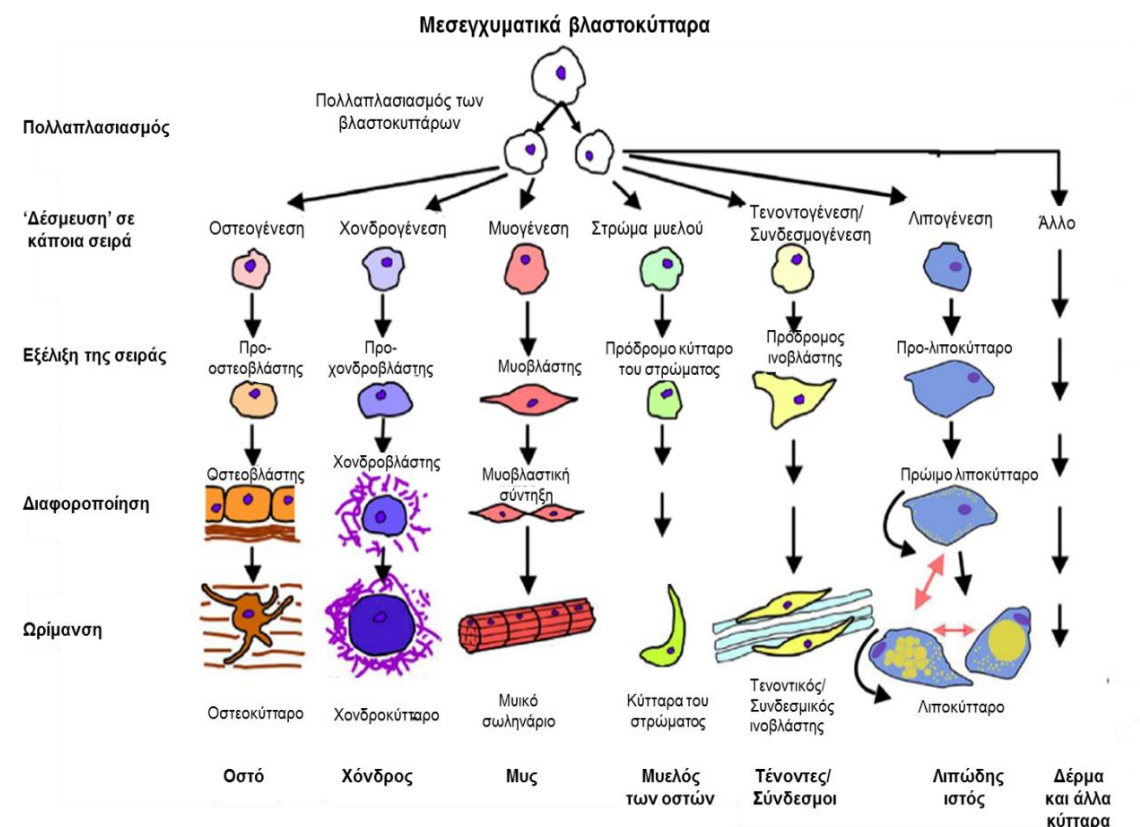
B) Ο σχηματισμός των βλαστικών δερμάτων κατά τη διαδικασία της γαστριδίουσης.

Σχηματική αναπαράσταση εμβρύου κότας, αντιπροσωπευτική για όλους τους αμνιωτικούς οργανισμούς (πτηνά, ερπετά και θηλαστικά). Η ραχιαία και η εγκάρσια διατομή ελήφθησαν στο επίπεδο που υποδεικνύουν οι διακεκομμένες γραμμές. Το μεσόδερμα (πράσινο) και το ενδόδερμα (ροζ) στρέφονται προς το εσωτερικό της αρχικής ταινίας μέσω της διαδικασίας της Επιθηλιακής-Μεσεγχυματικής Μετάβασης ενώ τα κύτταρα του εκτοδέρματος παραμένουν επιθηλιακά (κίτρινα).

[Μετάφραση και τροποποίηση της εικόνας από τους (Acloque et al., 2009)]

Από τις δομές αυτές αναπτύσσονται εν συνεχεία, μέσω διαφόρων σταδίων και μηχανισμών οι οποίοι ξεφεύγουν του παρόντος κειμένου, μια σειρά από λιγότερο (μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα) ή περισσότερο (οστεοβλάστες, χονδροβλάστες, λιποκύτταρα, μυοβλάστες, ινοβλάστες, μυοϊνοβλάστες κλπ.) διαφοροποιημένα κύτταρα (Pinchuk et al., 2010). Τα κύτταρα αυτά συμμετέχουν στο σχηματισμό διαφόρων ιστών όπως τα οστά, οι χόνδροι, ο λιπώδης ιστός, οι τένοντες, οι σύνδεσμοι και οι μυες ή συμμετέχουν στη δημιουργία του συνδετικού ιστού αλλά και του

στρώματος που συναντώνται σε διάφορα όργανα (Εικόνα 1.3) (Augello and De Bari, 2010; Caplan, 1991; Dominici et al., 2006; Pittenger et al., 1999).



Εικόνα 1.3. Διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων σε εξειδικευμένα κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης.

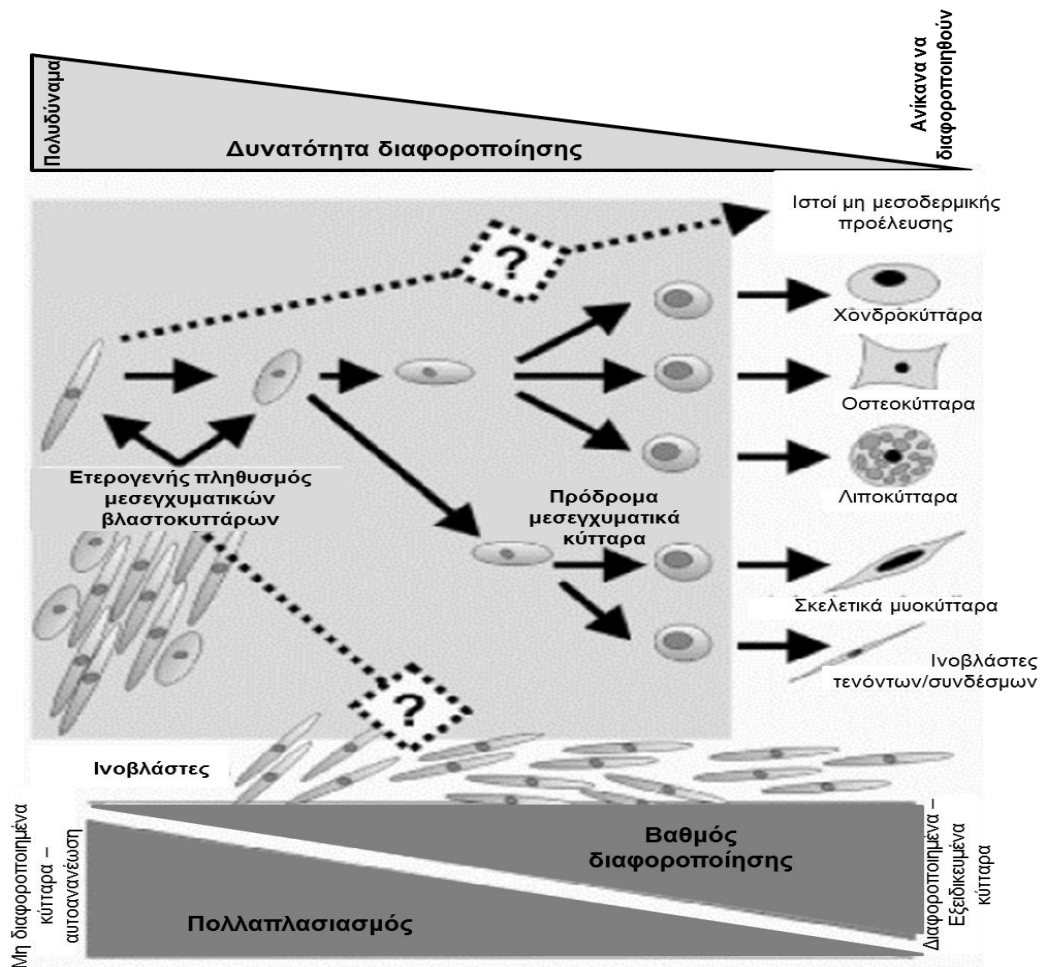
Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα διαφοροποιούνται σε εξειδικευμένα κύτταρα με συγκεκριμένες λειτουργίες (οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα, μυοκύτταρα, λιποκύτταρα). Παράλληλα μπορούν να διαφοροποιηθούν και σε κύτταρα τα οποία απαντώνται σε διάφορους ιστούς χωρίς να έχουν τόσο 'περιορισμένες' λειτουργίες όπως για παράδειγμα οι ινοβλάστες, τα κύτταρα του στρώματος κλπ.

[Πηγή: http://www.frontiersin.org/files/Articles/52511/fimmu-04-00201-HTML/image_m/fimmu-04-00201-g002.jpg]

Η παρουσία και ανανέωση των διαφοροποιημένων μεσεγχυματικών κυττάρων στους διάφορους ιστούς πραγματοποιείται είτε μέσω του τοπικού πολλαπλασιασμού τους είτε μέσω της διαφοροποίησης μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων τα οποία είτε προέρχονται από τον ίδιο ιστό είτε μεταναστεύουν από άλλες θέσεις (κυρίως από το μυελό των οστών) κάτω από συγκεκριμένα ερεθίσματα, όπως για παράδειγμα κατά την επούλωση ενός τραύματος (Stappenbeck and Miyoshi, 2009).

Ο όρος «μεσεγχυματικά κύτταρα», στη βιβλιογραφία, συνήθως δεν αναφέρεται στα πλήρως διαφοροποιημένα και με εξειδικευμένη – ιστο-εξαρτώμενη λειτουργία κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης όπως τα οστεοκύτταρα, τα χονδροκύτταρα, τα λιποκύτταρα και τα μυϊκά κύτταρα, αλλά κυρίως σε κύτταρα τα οποία δεν έχουν τόσο

ιστο-εξειδικευμένο ρόλο και τα οποία παρουσιάζουν κάποια πλαστικότητα ως προς τη δυνατότητά τους να διαφοροποιούνται περαιτέρω σε άλλα κύτταρα ως απάντηση σε διάφορα ερεθίσματα (πχ τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, οι ινοβλάστες και οι μυοϊνοβλάστες). Σε αυτά λοιπόν τα κύτταρα αναφέρεται η παρούσα εργασία όταν χρησιμοποιείται ο όρος «μεσεγχυματικά κύτταρα». Βέβαια, ακόμη και αυτά τα κύτταρα παρουσιάζουν τεράστια ποικιλομορφία, τόσο μορφολογική όσο και λειτουργική, καθώς όλο και πιο συχνά αναγνωρίζονται και περιγράφονται νέοι ‘υποτύποι’ μεσεγχυματικών κυττάρων ακόμη και εντός του ίδιου ιστού. Για παράδειγμα στον αρθρικό υμένα (ή αλλιώς συνόβιο) έχουν περιγραφεί τουλάχιστον δύο διαφορετικοί υποπληθυσμοί ινοβλαστών (αυτοί που βρίσκονται πιο επιφανειακά και αυτοί που βρίσκονται ακριβώς ενδότερα από τους πρώτους) (Croft et al., 2016), ενώ αντίστοιχα και στον υποβλεννογόνο του εντέρου απαντώνται αρκετοί διαφορετικοί υποπληθυσμοί μεσεγχυματικών κυττάρων (Powell et al., 2011; Roulis and Flavell, 2016). Επίσης στη βιβλιογραφία επικρατεί προβληματισμός για το κατά πόσον τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα μπορούν να θεωρηθούν ‘καθαρά’ βλαστοκύτταρα (Lindner et al., 2010) ή για το κατά πόσον τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα αποτελούν όντως έναν ξεχωριστό πληθυσμό σε σύγκριση με άλλα μεσεγχυματικά κύτταρα όπως οι ινοβλάστες οι οποίοι επίσης παρουσιάζουν δυνατότητα (έστω και περιορισμένη) διαφοροποίησης προς άλλους κυτταρικούς τύπους (Εικόνα 1.4) (Haniffa et al., 2009; Lindner et al., 2010). Γι’αυτό το λόγο, πολλές φορές οι όροι «μεσεγχυματικό βλαστοκύτταρο», «μεσεγχυματικό κύτταρο του στρώματος» και «μεσεγχυματικό κύτταρο» χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία περιγράφοντας το ίδιο επί της ουσίας κύτταρο.



Εικόνα 1.4. Η ποικιλομορφία των μεσεγχυματικών κυττάρων.

Οι διάφοροι τύποι μεσεγχυματικών κυττάρων παρουσιάζουν διαφορές τόσο ως προς τη δυνατότητα αλλά και το βαθμό διαφοροποίησής τους προς άλλους κυτταρικούς τύπους όσο και ως προς τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού τους.

[Μετάφραση και τροποποίηση από τους (Lindner et al., 2010)]

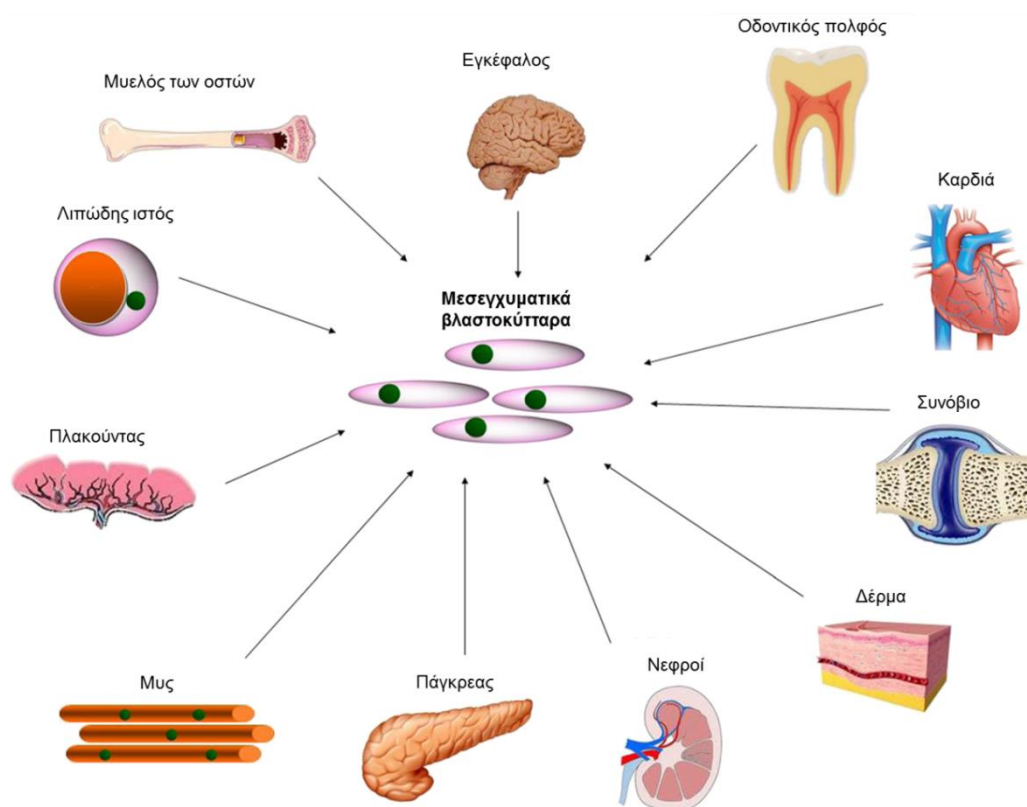
1.3 Ο ρόλος των μεσεγχυματικών κυττάρων στη φυσιολογία

Ο όρος ‘μεσέγχυμα’ προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις *μέσος/διάμεσος* και *έγχυση* και πρωτοχρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει έναν πιο χαλαρά δομημένο ιστό ο οποίος γέμιζε τα κενά μεταξύ άλλων - γνωστής δομής και λειτουργίας - ιστών όπως οι μύες και το επιθήλιο (Roulis and Flavell, 2016). Από την αρχική αυτή περιγραφή μέχρι και σήμερα, οι γνώσεις μας για το ρόλο του μεσεγχύματος έχουν γιγαντωθεί.

Ήδη κατά τη διαδικασία της εμβρυογένεσης, τα μεσεγχυματικά κύτταρα παίζουν πρωταρχικό ρόλο σε σημαντικές διαδικασίες όπως η γαστριδίωση, η δημιουργία της βλαστικής στοιβάδας, η δημιουργία των σωμιτών και η δημιουργία της νευρικής ακρολοφίας. Μέσω των διαδικασιών αυτών, και σε συνεργασία πολλές φορές με

επιθηλιακούς ιστούς, το μεσέγχυμα παίζει σημαντικότερο ρόλο στη μορφογένεση του εμβρύου (Ferrer-Vaquier et al., 2010; Hay, 2005).

Ακόμη και μετά τη γέννηση όμως, τα μεσεγχυματικά κύτταρα συνεχίζουν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δομή και τη λειτουργία όλων σχεδόν των οργάνων και ιστών του οργανισμού (da Silva Meirelles et al., 2006). Πέραν των μεσεγχυματικής προέλευσης κυττάρων τα οποία έχουν μια πιο εξειδικευμένη λειτουργία όπως για παράδειγμα τη δημιουργία οστού, χόνδρου, λίπους και μυών, οι πλειονηφία των υπολοίπων μεσεγχυματικών κυττάρων, με προεξάρχοντα τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, τους ινοβλάστες και τους μυοϊνοβλάστες, απαντώνται σε όλα σχεδόν τα όργανα του ανθρώπου (ή του ποντικού αντίστοιχα) όπου σχηματίζουν ένα σκελετό – ένα ικρίωμα πάνω στο οποίο δομείται το εκάστοτε όργανο ενώ παράλληλα ασκούν και μια σειρά υποστηρικτικές προς αυτό λειτουργίες (Εικόνα 1.5) (Haniffa et al., 2009).



Εικόνα 1.5. Σχηματική απεικόνιση της εντόπισης μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων στα διάφορα όργανα.

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα καθώς και τα υπόλοιπα μεσεγχυματικά κύτταρα όπως οι ινοβλάστες απαντώνται και μπορούν να απομονωθούν από όλα σχεδόν τα όργανα του οργανισμού. [Μετάφραση της εικόνας από τους (Bluguermann et al., 2013)]

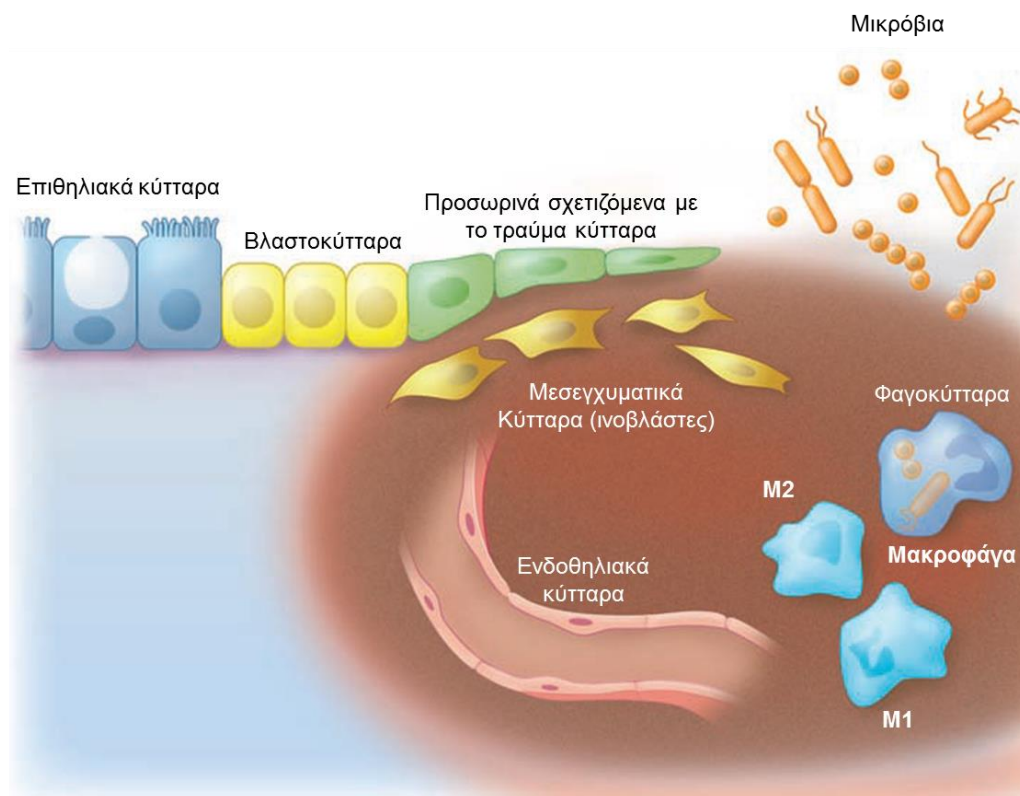
Πιο αναλυτικά οι πιο βασικές λειτουργίες των μεσεγχυματικών κυττάρων είναι:

- Ρύθμιση της λειτουργίας των παρεγχυματικών κυττάρων: Στους διάφορους ιστούς και τα διάφορα όργανα, τα μεσεγχυματικά κύτταρα είναι επιφορτισμένα με το καθήκον της διαμόρφωσης ενός τέτοιου μικροπεριβάλλοντος το οποίο θα διασφαλίζει πλήρως την ομοιόσταση του αντίστοιχου ιστού ή οργάνου (Lee and Kim, 2012). Κάτι τέτοιο εξασφαλίζεται μέσω ποικίλων μηχανισμών. Πρώτον, τα μεσεγχυματικά κύτταρα παρέχουν όλα τα απαραίτητα σηματοδοτικά μόρια όπως για παράδειγμα οι διάφοροι αυξητικοί παράγοντες (πχ. ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών, ο αυξητικός παράγοντας των κερατινοκυττάρων και ο ανασταλτικός παράγοντας της λευχαιμίας), τα οποία μέσω κατά βάση παρακρινών μηχανισμών προάγουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των παρεγχυματικών κυττάρων (Caplan and Dennis, 2006). Δεύτερον, τα μεσεγχυματικά κύτταρα σχηματίζουν ένα σκελετό ο οποίος, σε συνδυασμό με την εξωκυττάρια ουσία που αυτά παράγουν, εξασφαλίζει την απαραίτητη επαφή και αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών και των παρεγχυματικών κυττάρων, ώστε να καθοδηγείται η επιβίωση, διαφοροποίηση, ανανέωση και εξειδικευμένη δράση των παρεγχυματικών αυτών κυττάρων ανάλογα με τον ιστό/όργανο στο οποίο βρίσκονται. Παράλληλα, δημιουργούν και το κατάλληλο περιβάλλον για τη διατήρηση και διαφοροποίηση των φωλεών βλαστοκυττάρων που υπάρχουν σε κάθε ιστό (Blanpain et al., 2007; Bluguermann et al., 2013). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η διαδικασία της αιμοποίησης κατά την οποία τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα ήδη κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και πριν ακόμα ξεκινήσει η διαδικασία της αιμοποίησης, δημιουργούν το κατάλληλο περιβάλλον δηλαδή: ένα τρισδιάστατο σκελετό, τα απαραίτητα κύτταρα του στρώματος (ινοβλάστες, οστεοβλάστες, λιποκύτταρα, δικτυοκύτταρα) και την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία που θα ‘γεμίσει’ αυτό το σκελετό, καθώς και μια σειρά από εκκρινόμενες κυτταροκίνες και χημειοκίνες, τα οποία συνολικά υποστηρίζουν την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών μεσεγχυματικών κυττάρων (Campagnoli et al., 2001; Charbord et al., 1996; Dazzi et al., 2006).

[Μια πιο λεπτομερή και εξειδικευμένη περιγραφή των μεσεγχυματικών – παρεγχυματικών αλληλεπιδράσεων στην καρδιά, το ήπαρ, το νευρικό σύστημα, το

χόνδρο και τα κύτταρα του αίματος προσφέρει η ανασκόπηση των (Bluguermann et al., 2013)]

- Επούλωση τραύματος, ρύθμιση της φλεγμονής και ιστική αναγέννηση: Η αντίδραση στη δημιουργία ενός τραύματος χωρίζεται σε δύο φάσεις. Η πρώτη - οξεία φάση - αφορά την τοπική ανάπτυξη φλεγμονής, δηλαδή την αύξηση της τοπικής κυκλοφορίας του αίματος και την αυξημένη διαπερατότητα των αγγείων ώστε να μπορέσουν να καταφτάσουν τα απαραίτητα κύτταρα (λευκοκύτταρα, αιμοπετάλια, μεσεγχυματικά κύτταρα κλπ) που θα σταθεροποιήσουν το τραύμα και θα συμβάλλουν στην επούλωσή του. Η δεύτερη φάση αφορά την αναγέννηση του ιστού που υπέστη τη βλάβη (Stappenbeck and Miyoshi, 2009). Τα μεσεγχυματικά κύτταρα σε όλη αυτή τη διαδικασία παίζουν σημαντικό ρόλο επηρεάζοντας πρακτικά όλους τους παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω (Εικόνα 1.6): Εκκρίνουν διάφορους προαγγειογενετικούς παράγοντες που προάγουν τη νεοαγγειογένεση (Wu et al., 2007a). Αλληλεπιδρούν με το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω κυτταροκινών, χημειοκινών ή άλλων σηματοδοτικών μορίων όπως οι προσταγλανδίνες (Francois et al., 2012; Kassis et al., 2011; Ren et al., 2008; Roulis et al., 2014), λειτουργούν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Saada et al., 2006) και ρυθμίζουν τη φλεγμονή εμποδίζοντας τη διατήρηση του μεγέθους και της διάρκειάς αυτής πέραν των επιθυμητών ορίων (Bernardo and Fibbe, 2013; Gonzalez et al., 2009). Αλληλεπιδρούν με το τραυματισμένο επιθήλιο και προάγουν την επούλωσή του (Miyoshi et al., 2017). Τέλος, οι μυοϊνοβλάστες, αξιοποιώντας τις ικανότητες σύσπασης και συστολής που παρουσιάζουν έχουν τη δυνατότητα να ασκούν ελκτικές δυνάμεις στα χείλη του τραύματος σε τέτοια κατεύθυνση ώστε να προάγεται το κλείσιμό του (Hinz, 2010; Tomasek et al., 2002). Από μοριακής απόψεως, σημαντικό ρόλο σε όλα τα παραπάνω παίζει η ενεργοποίηση των ινοβλαστών του στρώματος μέσω της αλληλεπίδρασης του CD40 με το συνδέτη του CD40 (CD40-CD40 ligant) και η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού NFκB/RelB (Smith et al., 1997; Zhang et al., 1998).



Εικόνα 1.6. Σχηματική απεικόνιση του ρόλου των ινοβλαστών κατά την επούλωση του τραύματος ενός οργάνου το οποίο καλύπτεται με επιθήλιο.

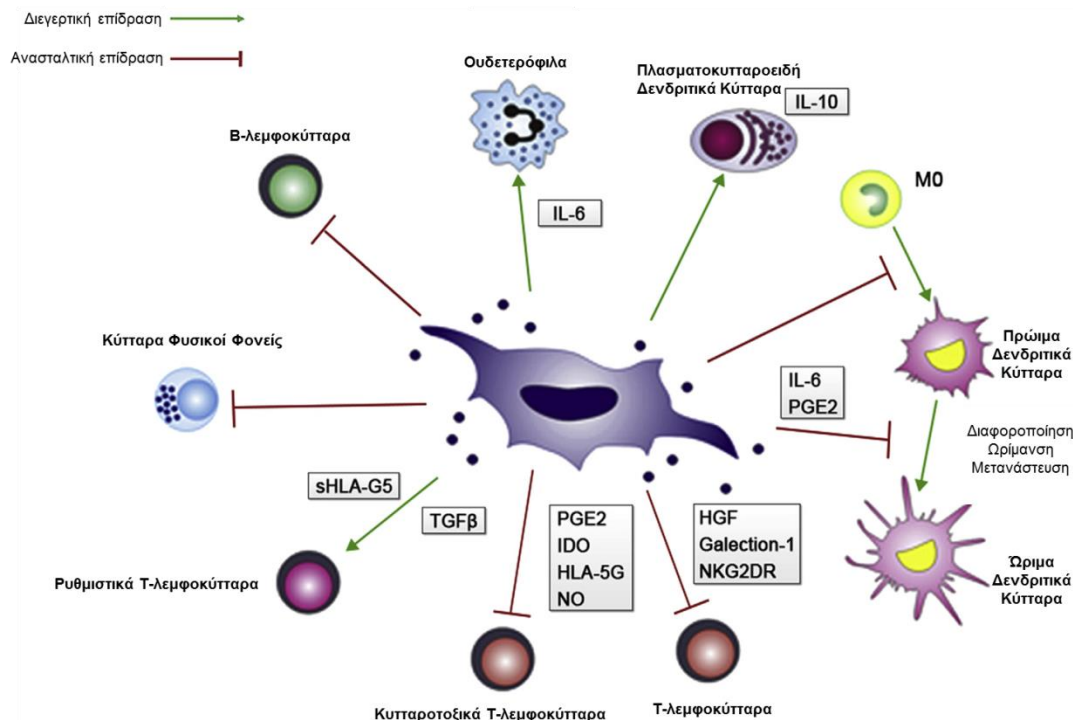
Η βάση του τραύματος αποτελείται πρωτίστως από ινοβλάστες, νέα αγγεία και μακροφάγα. Το επιθήλιο αποτελείται από βλαστοκύτταρα τα οποία παράγουν διαφοροποιημένα κύτταρα σε περιοχές απομακρυσμένες από το τραύμα καθώς και λιγότερο διαφοροποιημένα κύτταρα τα οποία σχετίζονται με τη βάση του τραύματος. Ο συγχρονισμός και η ισορροπία μεταξύ της επούλωσης του τραύματος και της εξάλειψης των μικροβίων στη βάση του τραύματος πρέπει να ενορχηστρωθεί με ακρίβεια. Οι ινοβλάστες βρίσκονται στην κατάλληλη θέση για να επιτελέσουν αυτήν ακριβώς τη λειτουργία μέσω της επικοινωνίας τους με τα υπερκείμενα επιθηλιακά κύτταρα αλλά και τα μακροφάγα που βρίσκονται εντός του τραύματος. Παράλληλα μπορούν να επιτελέσουν και μια σειρά άλλες λειτουργίες όπως η νεοαγγειογένεση και η συστολή των χειλέων του τραύματος.

[Μεταφράστηκε και τροποποιήθηκε από τους (Stappenbeck and Miyoshi, 2009)]

- Κεντρική και περιφερική ανοσοανοχή: Οι ινοβλάστες του θύμου αδένος, μέσω της παραγωγής και έκκρισης μιας σειράς από αυξητικούς παράγοντες, συμβάλλουν στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων του αδένος ενώ παράλληλα συμβάλλουν στην προσέλκυση πρόδρομων T-λεμφοκυττάρων αλλά και τη μετακίνηση των υπό ωρίμανση T-λεμφοκυττάρων μέσα στο μυελό και το φλοιό του αδένος (Gray et al., 2007; Jenkinson et al., 2003; Liu et al., 2005). Επιπρόσθετα, τα μεσεγχυματικά κύτταρα του στρώματος στους λεμφαδένες μπορούν μέσω της αντιγονοπαρουσίασης και της καταστροφής των κυκλοφορούντων αυτό-αντιδραστικών T-λεμφοκυττάρων να συμβάλλουν στην περιφερική ανοσοανοχή (Lee et al., 2007). Τέλος, έχει δειχτεί ότι τα μεσεγχυματικά

κύτταρα, σε συγκεκριμένες συνθήκες, μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη (Ryan and Tang, 1995), την επιβίωση (Tabera et al., 2008) και τη διέγερση των Β-λεμφοκυττάρων για παραγωγή αντισωμάτων (Rasmusson et al., 2007; Traggiai et al., 2008).

- Ανοσορρύθμιση: Τα μεσεγχυματικά κύτταρα και κυρίως τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, παρουσιάζουν ποικίλες ανοσοτροποποιητικές ή/και ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες, ειδικά όταν χορηγούνται εξωγενώς. Πιο συγκεκριμένα, τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα μπορούν να επηρεάσουν τόσο την έμφυτη όσο και την επίκτητη ανοσία μέσω της αναστολής του πολλαπλασιασμού, της επιβίωσης και της δράσης διαφόρων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα Τ-λεμφοκύτταρα, τα Κύτταρα Φυσικού Φονεί (NK Τ-λεμφοκύτταρα), τα Β-λεμφοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα κ.ο.κ. ή να καταστείλουν την ανοσολογική αντίδραση μέσω την ενίσχυσης της επιβίωσης και δράσης ανοσοκατασταλτικών κυττάρων (ρυθμιστικά Τ-λεμφοκύτταρα). Η δράση αυτή των μεσεγχυματικών κυττάρων επιτυγχάνεται τόσο μέσω μορίων που εκφράζουν στην επιφάνειά τους όσο και μέσω μορίων που εκκρίνουν στο περιβάλλον τους (Najar et al., 2016; Zhao et al., 2010) (Εικόνα 1.7). Μέσω αυτών των μηχανισμών, τα μεσεγχυματικά κύτταρα μπορούν να επηρεάσουν το σύνολο της ανοσολογικής απόκρισης στα πλαίσια ομοιοστατικών μηχανισμών (όπως η επούλωση τραυμάτων) αλλά και στα πλαίσια της νόσου (όπως θα περιγραφεί και στη συνέχεια).



Εικόνα 1.7. Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα επιδεικνύουν την ανοσοκατασταλτική / ανοσοτροποποιητική δράση τους μέσω της διακυτταρικής επαφής και της έκκρισης ανοσοτροποποιητικών μορίων.

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα μπορούν να αναστείλουν ή να ενισχύσουν τον πολλαπλασιασμό και τη δράση πολλών και διαφορετικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Αρκετοί διαλυτοί παράγοντες φαίνεται να παίζουν μείζονα ρόλο στη δράση τους αυτή συμπεριλαμβανομένης της προσταγλανδίνης E2 (PGE2), του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα β (TGF-β1), του νιτρικού οξέος (NO), του ηπατοκυτταρικού αυξητικού παράγοντα (HGF) και των ιντερλευκινών 6 (IL-6) και 10 (IL-10).

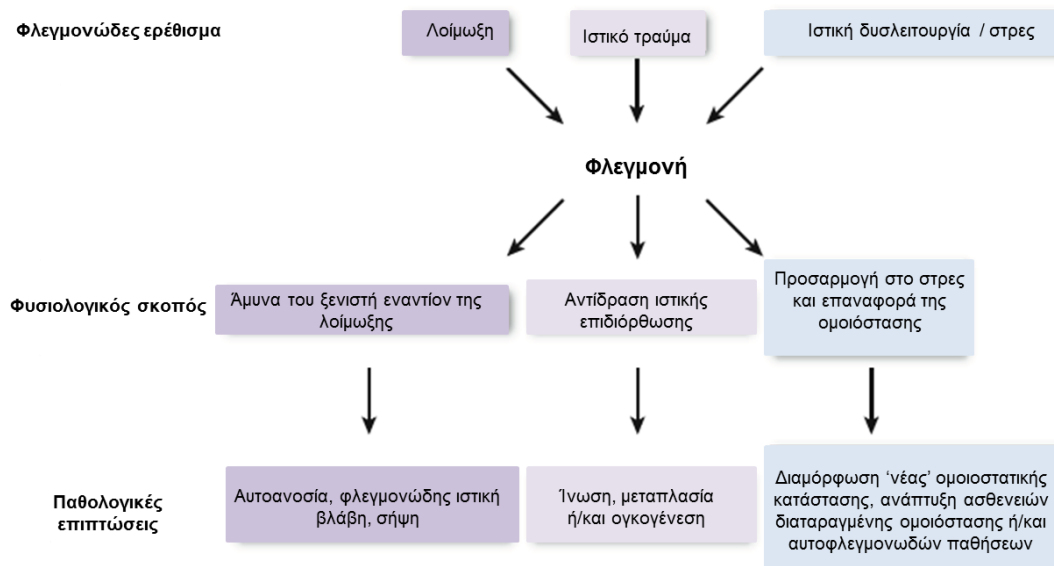
[Μετάφραση και τροποποίηση από τους (Zhao et al., 2015)]

1.4 Ο ρόλος των μεσεγχυματικών κυττάρων στη νόσο.

Όπως αναφέρθηκε πρωτίτερα, τα μεσεγχυματικά κύτταρα παίζουν ποικίλους πολύ σημαντικούς ρόλους στη διατήρηση της ομοιόστασης, δηλαδή της φυσιολογικής δομής και λειτουργίας όλων σχεδόν των οργάνων του ανθρώπου και κατ'επέκταση στη συνολική δομή και λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού (το ίδιο φυσικά ισχύει και για τα υπόλοιπα σπονδυλωτά). Εξίσου σημαντικός όμως είναι και ο ρόλος τους στην παθογένεση και την παθοφυσιολογία μιας σειράς ασθενειών (η διάκριση που ακολουθεί αφορά ομάδες ασθενειών οι οποίες μοιράζονται κοινούς μηχανισμούς και όχι μεμονωμένες νοσολογικές οντότητες):

- Νοσήματα που προκαλούνται μέσω της ανοσολογικής απόκρισης και της φλεγμονής [αυτοάνοσα νοσήματα, (αυτό)φλεγμονώδη νοσήματα κ.α.]: Ως φλεγμονή ορίζεται η φυσιολογική απάντηση ενός ιστού σε κάποιο παθολογικό

ερέθισμα (τραύμα, λοίμωξη, μηχανικό στρες κλπ) που περιλαμβάνει την τοπική αύξηση της κυκλοφορίας του αίματος, την εξαγγείωση κυττάρων και πρωτεϊνών στην περιοχή, την ενεργοποίηση κυττάρων που βρίσκονται εντός του τραυματισμένου ιστού και κινητοποίηση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, με σκοπό την καταπολέμηση του παθογόνου ερεθίσματος και την επανόρθωση της ιστικής βλάβης ώστε να επανέλθει η ομοιόσταση. Πρωταρχικό ρόλο στην εξέλιξη της φλεγμονής παίζουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τόσο αυτά που ανήκουν στην έμφυτη ανοσία όσο και αυτά που ανήκουν στην επίκτητη ανοσία (Buckley et al., 2015; Medzhitov, 2008). Η σημασία της πολύ στενής χωρικής και χρονικής ρύθμισης της φλεγμονής φαίνεται από περιπτώσεις στις οποίες είτε η φλεγμονή δεν τερματίζεται όταν πρέπει και μεταπίπτει σε χρονιότητα, είτε έχουμε διαρκή ενεργοποίηση της φλεγμονώδους απόκρισης. Το αποτέλεσμα είναι η δράση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος να γίνεται επιβλαβής για τον ίδιο τον ιστό και κατ'επέκταση για όλο τον οργανισμό και να οδηγεί στην ανάπτυξη διαφόρων αυτοάνοσων και (αυτο)φλεγμονωδών νοσημάτων, καθώς και ιστικής ίνωσης ή ακόμη και καρκίνου (στα οποία θα γίνει αναφορά στη συνέχεια) (Medzhitov, 2008) (Εικόνα 1.8). Να αναφερθεί εδώ ότι η βασική διάκριση μεταξύ αυτοάνοσων και (αυτο)φλεγμονωδών νοσημάτων έγκειται στο γεγονός ότι στα αυτοάνοσα νοσήματα έχουμε ενεργοποίηση της επίκτητης ανοσίας μέσω των T-λεμφοκυττάρων ή και της παραγωγής αντισωμάτων από τα B-λεμφοκύτταρα τα οποία στρέφονται εναντίον αντιγόνων του ίδιου του οργανισμού (αυτο-αντιδραστικά T-λεμφοκύτταρα και αυτοαντισώματα), ενώ στα αυτοφλεγμονώδη νοσήματα δεν υπάρχει κάποιο εμφανές αυτοαντιγόνο-αυτοαντίσωμα (Doria et al., 2012).



Εικόνα 1.8. Αίτια, σκοποί και παθολογικές επιπτώσεις της φλεγμονής.

Ανάλογα με το ερέθισμα, η φλεγμονή εξυπηρετεί διαφορετικούς ρόλους στη φυσιολογία ενός οργανισμού, ενώ μπορεί να έχει και διάφορες παθολογικές επιπτώσεις οδηγώντας σε ποικίλες νοσολογικές οντότητες.

[Μεταφράστηκε και τροποποιήθηκε από τον (Medzhitov, 2008)]

Όλο και πιο συχνά πλέον έρχονται στο φως νέα ευρήματα που υπογραμμίζουν το σημαντικότερο ρόλο που παίζουν στη λεπτεπίλεπτη και πολύπλοκη ρύθμιση όλων των σταδίων της φλεγμονής (έναρξη – εξέλιξη – λύση) τα μεσεγγχυματικά κύτταρα (μεσεγγχυματικά βλαστοκύτταρα, ινοβλάστες, μυοϊνοβλάστες κλπ.) τα οποία συναντώνται κυρίως στο στρώμα του φλεγμονώδους ιστού (Buckley, 2011; Buckley et al., 2015; Parsonage et al., 2005; Serhan et al., 2007). Πρώτον, τα μεσεγγχυματικά κύτταρα του στρώματος εκκρίνουν μια σειρά από κυτταροκίνες (όπως η ιντερλευκίνη 6 και 8), χημειοκίνες και προστανοειδή όπως η Προσταγλανδίνη E2, τα οποία βοηθούν στην ενεργοποίηση παρακείμενων κυττάρων και τη χημειοτακτική προσέλκυση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στην περιοχή (Buckley et al., 2001). Τον ίδιο σκοπό επιτελεί και η έκφραση μιας σειράς από μόρια προσκόλλησης στην επιφάνεια των μεσεγγχυματικών κυττάρων (Buckley et al., 2001; Saada et al., 2006). Παράλληλα, η παραγωγή μορίων όπως οι ιντερφερόνες τύπου 1 (κυρίως η ιντερφερόνη-α και η ιντερφερόνη-β), αναστέλλει την απόπτωση και προάγει την επιβίωση διαφόρων τύπων λευκοκυττάρων, ενισχύοντας έτσι την επιμονή της φλεγμονής (Tough et al., 1999). Τέλος, τα μεσεγγχυματικά κύτταρα συμβάλλουν και στην καταστροφή του ιστού per se, μέσω της παραγωγής και έκκρισης ενζύμων που διασπούν

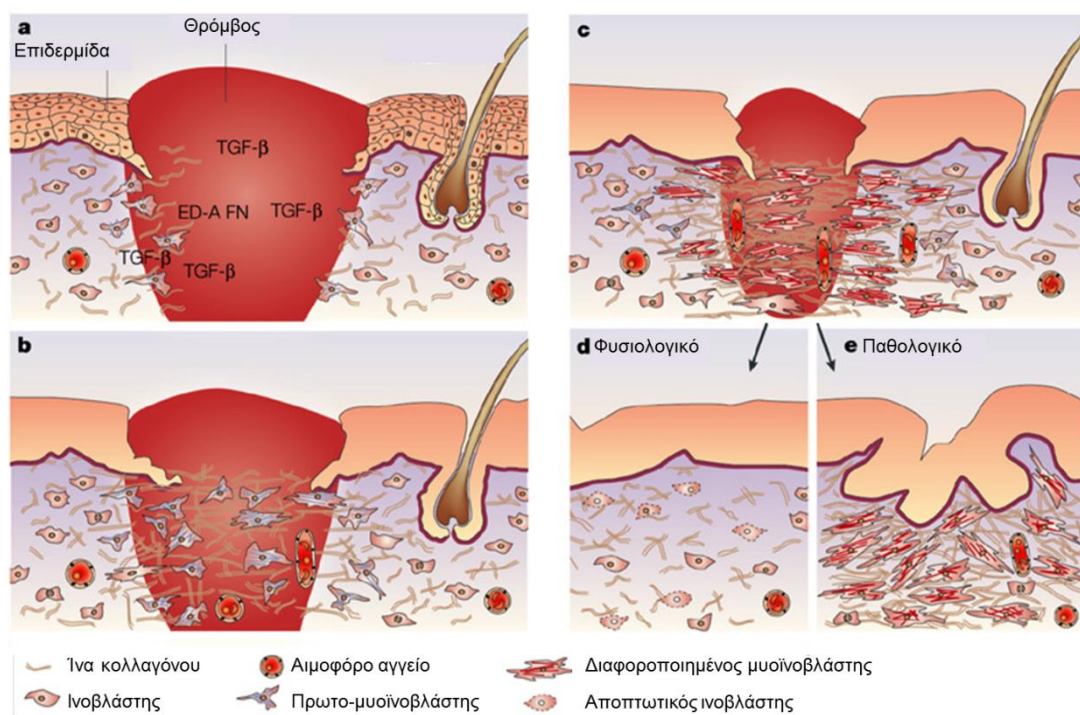
την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία αλλά και τον ίδιο τον ιστό, όπως για παράδειγμα οι Μεταλλοπρωτεϊνάσες του στρώματος (Pender and MacDonald, 2004; Zhu and Yu, 2006). Η απορρύθμιση των παραπάνω μηχανισμών μπορεί να οδηγήσει τη φλεγμονή σε χρονιότητα. Σε αυτήν την περίπτωση η φλεγμονή σταθεροποιείται και αρκετά συχνά οδηγεί στο σχηματισμό χαρακτηριστικών δομών όπως τα κοκκιώματα (Timmermans et al., 2016) ή οι δομές που προσομοιάζουν στο λεμφικό ιστό και τα τριτογενή λεμφοειδή όργανα (Aloisi and Pujol-Borrell, 2006). Τέτοιες δομές απαντώνται σε πολλές ασθένειες που προκαλούνται μέσω της ανοσολογικής απόκρισης όπως τα αυτοάνοσα-φλεγμονώδη νοσήματα (πχ Ρευματοειδής Αρθρίτιδα, σύνδρομο Sjögren, θυρεοειδίτιδα Hashimoto κ.α.), οι αγγειίτιδες (πχ νόσος του Wegener), κάποιες χρόνιες λοιμώξεις (πχ νόσος Lyme, χρόνια ηπατίτιδα C κ.α.), η απόρριψη μοσχευμάτων ή εμφυτευμάτων και διάφορες άλλες (Aloisi and Pujol-Borrell, 2006; Carragher et al., 2008; Csernok and Gross, 2013; Drayton et al., 2006; Mittal et al., 2013; Neyt et al., 2012).

Ενδιαφέρον μάλιστα παρουσιάζει το γεγονός ότι τα κύρια μεσεγχυματικά κύτταρα του στρώματος, οι ινοβλάστες, όταν προέρχονται από διαφορετικές ανατομικές περιοχές (πχ συνόβιο, δέρμα, μυελός των οστών, έντερο κλπ.) παρουσιάζουν σημαντικές λειτουργικές διαφορές σε ότι αφορά πχ την εκκριτική τους ικανότητα, το ρεπερτόριο μορίων που παράγουν και εκκρίνουν, τη συσταλτικότητά τους καθώς και τη δυνατότητά τους να παράγουν εξωκυττάρια ουσία αλλά και να την αποδομούν. Η ποικιλότητα αυτή στη λειτουργία των ινοβλαστών με βάση την τοποθεσία τους, καθορίζει ως ένα βαθμό και τα χαρακτηριστικά της φλεγμονής που θα αναπτυχθεί στον κάθε ιστό (Fries et al., 1994; Parsonage et al., 2003; Parsonage et al., 2005; Rinn et al., 2006). Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι ο φαινότυπος των ινοβλαστών που προέρχονται από έναν υγιή ιστό διαφέρουν σημαντικά από αυτό των ινοβλαστών που απομονώνονται από τον ίδιο ιστό—την ίδια ανατομική περιοχή όταν σε αυτόν υφίσταται κάποια χρόνια φλεγμονή (Brouty-Boye et al., 2000; Buckley et al., 2001; Hogaboam et al., 1998; Pap et al., 2000). Για παράδειγμα οι συνοβιακοί ινοβλάστες που απομονώνονται από μια φλεγμαίνουσα λόγω ρευματοειδούς αρθρίτιδας άρθρωση, διαφέρουν σημαντικά από τους συνοβιακούς ινοβλάστες που απομονώνονται από την ίδια άρθρωση όταν αυτή είναι υγιής, και μάλιστα διατηρούν τον διαφορετικό

τους -επιθετικό- φαινότυπο ακόμη και σε καλλιέργεια in vitro για αρκετά περάσματα χωρίς να χρειάζονται κάποιο επιπλέον ερέθισμα (Pap et al., 2000). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, όλο και περισσότερες δημοσιεύσεις αναδεικνύουν τον σημαντικότερο ρόλο των μεσεγχυματικών κυττάρων στην παθογένεια ποικίλων ασθενειών που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση και τη φλεγμονή, καθιστώντας τα κύτταρα αυτά νέους πιθανούς και πολλά υποσχόμενους θεραπευτικούς στόχους (Flavell et al., 2008). Για παράδειγμα, έχει αποδειχτεί ότι η σηματοδότηση μέσω του παράγοντα νέκρωσης όγκων και του υποδοχέα του τύπου 1 (TNF-TNFR1) στα μεσεγχυματικά κύτταρα του εντέρου (εντερικοί μυοϊνοβλάστες) και στα μεσεγχυματικά κύτταρα της άρθρωσης (συνοβιακοί ινοβλάστες), είναι επαρκής για να οδηγήσει την παθογένεια της Φλεγμονώδους Νόσου του Εντέρου που προσομοιάζει με τη νόσο του Crohn και της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας αντίστοιχα στα ζωικά πρότυπα των ασθενειών αυτών, κι επομένως η στόχευσή τους θα μπορούσε να συμβάλει στην αντιμετώπιση των ασθενειών αυτών (Armaka et al., 2008). Παράλληλα γίνονται προσπάθειες να αξιοποιηθούν οι ανοσοτροποποιητικές / ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων μέσω της δοκιμαστικής εξωγενούς χορήγησής τους στα πλαίσια κλινικών δοκιμών (περισσότερες πληροφορίες στο www.clinicaltrials.gov) για τη θεραπεία ασθενειών όπως η νόσος του Crohn, η Ρευματοειδής Αρθρίτιδα, η Σκλήρυνση κατά Πλάκας, η απλαστική αναιμία, η αντίδραση του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή, το σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας κ.α. (Zhao et al., 2015).

- Επούλωση τραύματος – ιστική ίνωση: Όπως αναφέρθηκε προηγούμενα, τα μεσεγχυματικά κύτταρα που είτε βρίσκονται μέσα σε έναν τραυματισμένο ιστό είτε φτάνουν εκεί μέσω της κυκλοφορίας του αίματος συμβάλλουν μέσω ποικίλων μηχανισμών στην επούλωση του τραύματος και την αναδόμηση του ιστού. Μια βασική λειτουργία των μεσεγχυματικών κυττάρων κατά την επούλωση του τραύματος είναι η επιτήρηση του φλεγμονώδους περιβάλλοντος που έχει αναπτυχθεί και ο περιορισμός της διάρκειας και της έντασης της φλεγμονής, καθώς επίσης και η ιστική αναγέννηση. Σε περίπτωση που αυτό δε συμβεί και η φλεγμονή καταστεί χρόνια, η επούλωση του τραύματος θα είναι πλημμελής ή θα γίνει μέσω ίνωσης και δημιουργίας ουλής [με ακραίο παράδειγμα τη δημιουργία χηλοειδούς (Mari et al., 2015)] οδηγώντας σε δομική αναδιοργάνωση του

ιστού και αλλαγές στα χαρακτηριστικά του όπως η ελαστικότητα, η ανθεκτικότητα, η αγωγιμότητα κλπ., με αρνητικές φυσικά συνέπειες για τη λειτουργία του. Σε κάποιες περιπτώσεις μάλιστα, η χρόνια φλεγμονή – χρόνια ιστική βλάβη μπορεί να οδηγήσει ακόμη και σε μεταπλασία του ιστού και καρκινογένεση (Bernardo and Fibbe, 2013; Filer et al., 2006; Serhan et al., 2007) (Εικόνες 1.8 και 1.9). Χαρακτηριστικό παράδειγμα προβληματικής επούλωσης αποτελεί η δημιουργία ουλής κατά την επούλωση τραυμάτων στο δέρμα (Tomasek et al., 2002). Αντίστοιχα παραδείγματα εσφαλμένης επούλωσης και ίνωσης συναντάμε σε πολλά όργανα όπως η καρδιά (Kong et al., 2014), οι πνεύμονες (Todd et al., 2012), το έντερο (Rieder and Fiocchi, 2013), το ήπαρ (Lee and Friedman, 2011), οι νεφροί (Duffield, 2014) κοκ. Η ίνωση αυτή τις περισσότερες φορές είναι μη αναστρέψιμη και σχετίζεται με σημαντική δυσλειτουργία μέχρι και ανεπάρκεια των οργάνων αυτών (Weber, 1997).



Εικόνα 1.9. Σχηματική απεικόνιση του ρόλου των μυοϊνοβλαστών κατά την επούλωση ενός ανοιχτού τραύματος.

α. Σε φυσιολογικούς ιστούς, οι ινοβλάστες βιώνουν τέτοια χαμηλά επίπεδα τάσης λόγω της προστασίας που τους παρέχει από το στρες η περιβάλλουσα εξωκυττάρια ουσία κολλαγόνου, ώστε να μην ενεργοποιείται η οργάνωση του κυτταροσκελετού τους με προοπτική συστολής (ελαφρά ροζ περιοχή της δερμίδας – κάτω από την επιδερμίδα). Όταν το τραύμα που έχει προκληθεί καλυφθεί από ένα θρόμβο ινικής, οι τοπικά εκκρινόμενοι αυξητικοί παράγοντες διεγείρουν τους ινοβλάστες που βρίσκονται στην παρακείμενη υγιή δερμίδα να διεισδύσουν σε αυτή την προσωρινή δομή. Οι ινοβλάστες αυτοί, μαζί με τα νεοδημιουργηθέντα αγγεία γεμίζουν το τραύμα, σχηματίζοντας έτσι έναν κοκκιώδη ιστό. Σε αυτό το σημείο οι ινοβλάστες είναι ήδη διεγερμένοι ώστε να παράγουν ED-A

ινονεκτίνη. **β.** Οι μεταναστεύοντες ινοβλάστες ασκούν ελκτικές δυνάμεις στην εξωκυττάρια ουσία κολλαγόνου, κάτι το οποίο οδηγεί σε επαναδιοργάνωση αυτής κατά μήκος των γραμμών τάσης. Η ανάπτυξη μηχανικής τάσης διεγείρει τους ινοβλάστες να αναπτύξουν ίνες τάσης (stress fibers) και να παράξουν κολλαγόνο, κι έτσι αποκτούν το φαινότυπο του πρωτο-μυοϊνοβλάστη. Οι δυνάμεις τάσης και οι αυξητικοί παράγοντες διεγείρουν τους πρωτο-μυοϊνοβλάστες αυτούς να εκκρίνουν μετατρεπτικό αυξητικό παράγοντα β (TGF- β 1) καθώς και αυξημένα επίπεδα ινονεκτίνης ED-A. **γ.** Μέσω ενός μηχανισμού παλινδρόμης ρύθμισης, οι πρωτο-μυοϊνοβλάστες μετατρέπονται σε διαφοροποιημένους μυοϊνοβλάστες οι οποίοι συνθέτουν α -ακτίνη των λεπτών μυικών ινών (aSMA) και δημιουργούν αυξημένες συσταλτικές δυνάμεις. Την ίδια στιγμή, οι διαφοροποιημένοι μυοϊνοβλάστες εναποθέτουν κολλαγόνο και άλλα συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, και παράγουν πρωτεάσες. Η περίπλοκη αυτή διαδικασία οδηγεί στη σύμπτυξη της εξωκυττάριας ουσίας κολλαγόνου και κατ'επέκταση στο κλείσιμο του τραύματος. **δ.** Όταν ένα τραύμα κλείνει φυσιολογικά, οι μυοϊνοβλάστες εξαφανίζονται μέσω απόπτωσης και σχηματίζεται ουλή. **ε.** Ωστόσο, σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως ο σχηματισμός υπερτροφικής ουλής, οι μυοϊνοβλάστες παραμένουν και συνεχίζουν να αναδομούν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, με αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή συνδετικού ιστού. Εν κατακλείδι, οι μυοϊνοβλάστες είναι απαραίτητοι για την επούλωση ενός τραύματος, αλλά η απορρύθμισή τους μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία του ιστού. [Μετάφραση και τροποποίηση από τους (Tomasek et al., 2002)]

Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της ιστικής ίνωσης παίζουν κυρίως οι ινοβλάστες και οι μυοϊνοβλάστες μέσω της υπερπαραγωγής εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας με προεξάρχον στοιχείο το κολλαγόνο (Desmouliere et al., 2003; Wallach-Dayana et al., 2007), ενώ από μοριακής απόψεως, το σημαντικότερο μόριο το οποίο καθοδηγεί αυτή τη διαδικασία είναι ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β (TGF- β 1) (Εικόνα 1.9) (Leask and Abraham, 2004; Meng et al., 2016).

Είναι τέλος σημαντικό να γίνει αναφορά στις κλινικές δοκιμές που βρίσκονται εν εξελίξει και στοχεύουν στην επίτευξη ιστικής αναγέννησης μέσω της εξωγενούς χορήγησης μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων (περισσότερες πληροφορίες στο www.clinicaltrials.gov) με σκοπό τη θεραπεία σειράς ασθενειών όπως η καρδιακή ισχαιμία, η ισχαιμία των άκρων, η πλάγια μυατροφική σκλήρυνση, ο διαβήτης, το ισχαιμικό εγκεφαλικό, η οστεοαρθρίτιδα, η κίρρωση του ήπατος, η ηπατική ανεπάρκεια κ.κ. (Zhao et al., 2015).

- Καρκίνος: Η συνεισφορά και ο ρόλος των μεσεγχυματικών κυττάρων στην καρκινογένεση αφορά δύο διαφορετικούς μηχανισμούς. Από τη μία μεριά, υπάρχουν μια σειρά όγκοι οι οποίοι αναπτύσσονται σε μεσεγχυματικούς ιστούς και οι οποίοι περιγράφονται με το γενικό όρο «σάρκωμα» (Cormier and Pollock, 2004). Οι όγκοι αυτοί είναι αρκετά σπάνιοι, και αποτελούν περίπου το 1% των μορφών καρκίνου στους ενήλικες (Jemal et al., 2007) αλλά το ποσοστό αυτό αυξάνεται και φτάνει το 7-10% στα παιδιά (Birch et al., 2003). Τα σαρκώματα περιλαμβάνουν πάνω από 50

υποτύπους η ονομασία των οποίων συνήθως προκύπτει από την ιστολογική εικόνα ή την ανατομική εντόπιση του όγκου (για παράδειγμα μυοσάρκωμα, ραβδομυοσάρκωμα, λειομυοσάρκωμα, λιποσάρκωμα, οστεοσάρκωμα, χονδροσάρκωμα κοκ.) και χωρίζονται χοντρικά στα «σαρκώματα των μαλακών μορίων» και τα «σαρκώματα των οστών» (Fletcher CDM et al., 2013; Mohseny and Hogendoorn, 2011). Τα σαρκώματα μπορούν να εμφανιστούν σε οποιαδήποτε ηλικία αν και συνήθως προτιμούν τους μέσης και μεγαλύτερης ηλικίας ενήλικες, ενώ μπορούν να εντοπιστούν σε οποιοδήποτε μέρος του σώματος, με πιο συχνές θέσεις εντόπισης τα άκρα, τον κορμό και την οπισθοπεριτοναϊκή περιοχή. Τέλος, η πρόγνωσή τους ποικίλλει και εξαρτάται από τον τύπο του σαρκώματος, την εντόπισή του, το στάδιο της νόσου κατά τη διάγνωση, την επιθετικότητα του όγκου αλλά και την ύπαρξη ή όχι μεταστάσεων (οι οποίες σχεδόν πάντα είναι αιματογενείς) (Cormier and Pollock, 2004; Dangoor et al., 2016).

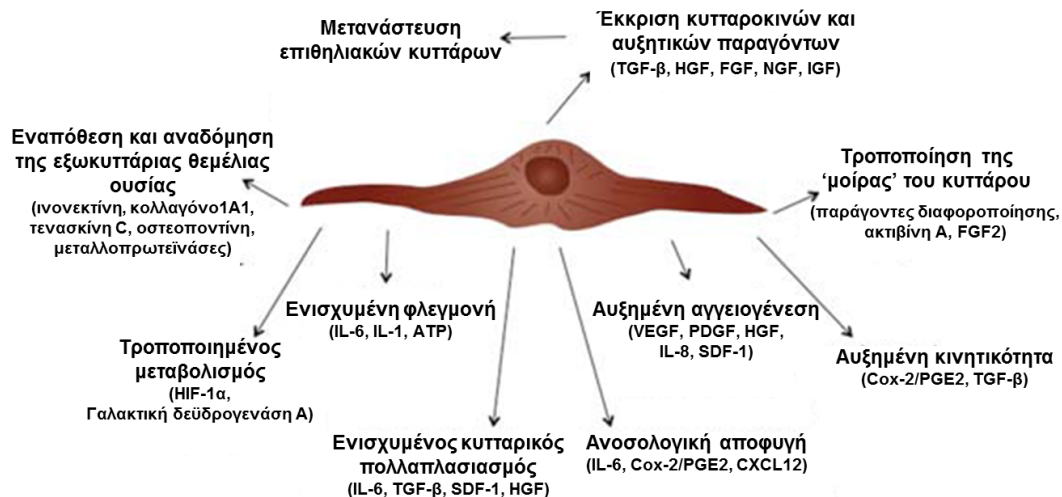
Από την άλλη μεριά, τα μεσεγχυματικά κύτταρα παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο και σε μια σειρά από όγκους, κυρίως συμπαγείς, μη μεσεγχυματικής προέλευσης (όπως για παράδειγμα ο καρκίνος του παχέως εντέρου, το μελάνωμα, ο καρκίνος του μαστού κλπ.), στους οποίους το μεσέγγυμα αποτελεί κομμάτι του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Μάλιστα, η πολύ μεγαλύτερη συχνότητα των όγκων αυτών σε σύγκριση με τα σαρκώματα, υπογραμμίζει και τη σημασία της αλληλεπίδρασης των μεσεγχυματικών κυττάρων με τους μη μεσεγχυματικούς όγκους (Balkwill et al., 2012; Hanahan and Coussens, 2012; Hanahan and Weinberg, 2011; Kalluri and Zeisberg, 2006; Koliaraki et al., 2017).

Συνολικά, το μικροπεριβάλλον του όγκου αποτελείται από πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων: κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος τόσο της έμφυτης όσο και της επίκτητης ανοσίας (μακροφάγα, μονοκύτταρα, Τ-λεμφοκύτταρα, Β-λεμφοκύτταρα, κύτταρα φυσικοί-φονείς, ουδετερόφιλα), ενδοθηλιακά κύτταρα, περικύτταρα, λιποκύτταρα, λεμφικά ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς και μεσεγχυματικά κύτταρα (ινοβλάστες, μυοϊνοβλάστες και μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα) (Balkwill et al., 2012). Οι διαφορετικοί αυτοί πληθυσμοί απαντώνται σε ποικίλες αναλογίες ανάλογα με τον όγκο, ενώ τα μεσεγχυματικά κύτταρα μπορεί να αποτελούν μέχρι και το 80% της μάζας αυτού (για παράδειγμα σε όγκους του παγκρέατος ή του μαστού με έντονη δεσμοπλαστική αντίδραση) (Olive et al., 2009). Σε ότι αφορά τη δράση των

μεσεγχυματικών αυτών κυττάρων, πολλές μελέτες έχουν δείξει το σημαντικότερο ρόλο που παίζουν στην ανάπτυξη του όγκου είτε εμποδίζοντας αυτήν (Bissell and Hines, 2011) είτε συνηθέστερα ενισχύοντάς την (Gascard and Tlsty, 2016). Στη βιβλιογραφία μάλιστα, οι ινοβλάστες που εντοπίζονται στο μικροπεριβάλλον του όγκου και ενισχύουν την ανάπτυξή του αποκαλούνται «ινοβλάστες σχετιζόμενοι με τον καρκίνο» (cancer associated fibroblasts ή CAFs) και προέρχονται είτε από την ενεργοποίηση μεσεγχυματικών κυττάρων που κατοικούσαν στον ιστό πριν την ανάπτυξη του όγκου (Gascard and Tlsty, 2016), είτε από το μυελό των οστών (McDonald et al., 2015), είτε μέσω της διαφοροποίησης άλλων κυττάρων που βρίσκονται στην περιοχή όπως τα λιποκύτταρα (Bochet et al., 2013), τα ενδοθηλιακά κύτταρα (μέσω της Ενδοθηλιακής-Μεσεγχυματικής Μετάβασης) (Zeisberg et al., 2007) ή ακόμη και τα επιθηλιακά κύτταρα (μέσω της Επιθηλιακής-Μεσεγχυματικής Μετάβασης) (Radisky et al., 2007). Επιπλέον προκαλεί ενδιαφέρον το γεγονός ότι πέραν της ενεργοποίησης των ινοβλαστών του στρώματος από την αλληλεπίδρασή τους με τα καρκινικά κύτταρα τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (Rozenchan et al., 2009), ο χαρακτηρισμός ιστών οι οποίοι βρίσκονταν σε υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου ανέδειξε την ύπαρξη ενός προκαρκινικού μικροπεριβάλλοντος το οποίο προϋπήρχε της εμφάνισης του όγκου και περιείχε ινοβλάστες με αλλαγμένο μοριακό και φαινοτυπικό προφίλ, οι οποίοι ήταν παρόμοιοι με τους σχετιζόμενους με τον καρκίνο ινοβλάστες (DeFilippis et al., 2014; Saadi et al., 2010).

Οι σχετιζόμενοι με τον καρκίνο ινοβλάστες έχει αποδειχτεί ότι μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη και εξέλιξη ενός όγκου μέσω ποικίλων μηχανισμών (εικόνα 1.10): α) Παράγουν και εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες που ενισχύουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων ενώ εμποδίζουν την απόπτωσή τους (Bhowmick et al., 2004b; Koliaraki et al., 2017; Quail and Joyce, 2013). β) Προάγουν και υποστηρίζουν τη νεοαγγειογένεση μέσω της έκκρισης των απαραίτητων ουσιών που θα επάγουν και θα καθοδηγήσουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα ώστε να δημιουργήσουν νέα αγγεία (όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας – VEGF) αλλά και της έκκρισης μεταλλοπρωτεασών οι οποίες θα αναδιαμορφώσουν κατάλληλα την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (Bonnans et al., 2014; Fukumura et al., 1998). γ) Εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και άλλα μόρια που αυξάνουν τοπικά τη φλεγμονή, η οποία με

τη σειρά της ενισχύει τη διαδικασία της καρκινογένεσης (Erez et al., 2010). Παράλληλα, τα μεσεγχυματικά κύτταρα του στρώματος εκκρίνουν μια σειρά από κυτταροκίνες, χημειοκίνες και προστανοειδή, τα οποία επιδρούν στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος προάγοντας την ανοσοκαταστολή και την αποφυγή της απόρριψης του όγκου από αυτό (Liao et al., 2009; Stover et al., 2007). Οι μηχανισμοί αυτοί προσομοιάζουν με τους μηχανισμούς που κινητοποιούνται κατά την επούλωση ενός τραύματος (με τη διαφορά ότι χρονίζουν και δεν οδηγούν σε πλήρη και σωστή αποκατάσταση του ιστού), με αποτέλεσμα οι συμπαγείς όγκοι να έχουν χαρακτηριστεί και ως ‘πληγές οι οποίες δεν κλείνουν’ (Dvorak, 1986). δ) Διαμορφώνουν και συντηρούν μια φωλεά καρκινικών βλαστοκυττάρων από τα οποία πιστεύεται ότι ξεκινάει η καρκινογένεση (Shaker et al., 2010; Vermeulen et al., 2010). ε) Αναδιαμορφώνουν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία επιτρέποντας τόσο την τοπική ανάπτυξη του όγκου, όσο και την νεοαγγειογένεση αλλά και τη δημιουργία μεταστάσεων (Dumont et al., 2013). στ) Προωθούν τις μεταστάσεις. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα του στρώματος εκκρίνουν μόρια τα οποία προάγουν έναν πιο επιθετικό-διηθητικό φαινότυπο στα καρκινικά κύτταρα ενισχύοντας την τάση τους για μετάσταση (Dimanche-Boitrel et al., 1994; van Zijl et al., 2009) εν μέρει μέσω και της ενεργοποίησης της Επιθηλιακής-Μεσεγχυματικής Μετάβασης (Bhowmick et al., 2004b). Η παράλληλη έκκριση μεταλλοπρωτεασών που αναφέρθηκε και νωρίτερα σε συνδυασμό με τη διαμόρφωση του κατάλληλου περιβάλλοντος το οποίο θα υποδεχτεί τα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα στους ιστούς στόχους (Coghlin and Murray, 2010; Peinado et al., 2011), συμβάλλουν στην πραγματοποίηση απομακρυσμένων μεταστάσεων και τη διασπορά της νόσου. ζ) Τροποποιούν το μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων και παρέχουν ενέργεια προς αυτά (Martinez-Outschoorn et al., 2014; Rattigan et al., 2012). η) Παρέχουν ανθεκτικότητα στα αντικαρκινικά φάρμακα μέσω διαφόρων μηχανισμών: ενίσχυση της επιβίωσης – αποφυγή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων μέσω αλληλεπίδρασής τους είτε με την τροποποιημένη εξωκυττάρια ουσία είτε μεταξύ τους είτε με τα μεσεγχυματικά κύτταρα, παρεμπόδιση της πρόσβασης του φαρμάκου στον όγκο, ενίσχυση της επιγενετικής αστάθειας των καρκινικών κυττάρων ώστε να υφίστανται πιο εύκολα μεταλλάξεις κ.α.) (Junttila and de Sauvage, 2013).



Εικόνα 1.10. Οι σχετιζόμενοι με τον καρκίνο ινοβλάστες εκκρίνουν μια σειρά από παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν και επάγουν ποικίλους φαινοτύπους τόσο στα καρκινικά κύτταρα όσο και στα παρακείμενα κύτταρα του στρώματος

[Μετάφραση και τροποποίηση από τους (Gascard and Tlsty, 2016)]

Όπως έγινε κατανοητό από τα παραπάνω, τα μεσεγχυματικά κύτταρα που αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι του μικροπεριβάλλοντος ενός αναπτυσσόμενου όγκου είναι πολύ σημαντικά για την ανάπτυξη αυτού, κι επομένως αποτελούν ελκυστικούς στόχους για την αντιμετώπισή του. Υπάρχουν πλέον αρκετές κλινικές δοκιμές οι οποίες στοχεύουν τους σχετιζόμενους με τον καρκίνο ινοβλάστες είτε σε συνάρτηση με την ταυτόχρονη στόχευση των καρκινικών κυττάρων είτε στα πλαίσια της ‘θεραπείας’ ενός προκαρκινικού μικροπεριβάλλοντος, με σκοπό τη δημιουργία ενός περιβάλλοντος ανθεκτικού στην και εχθρικού προς την καρκινογένεση (Togo et al., 2013; Zhou et al., 2015). Για το σκοπό αυτό, δοκιμάζονται μια σειρά από θεραπείες οι οποίες έχουν ως σκοπό είτε την εξάλειψη των σχετιζόμενων με τον καρκίνο ινοβλαστών είτε την αλλαγή του φαινοτύπου αυτών και τη μετατροπή τους σε φυσιολογικούς ινοβλάστες οι οποίοι θα εμποδίζουν την καρκινογένεση (Gascard and Tlsty, 2016; Koliaraki et al., 2017). Τέλος, ο καλύτερος μοριακός και συνολικότερος φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των σχετιζόμενων με τον καρκίνο ινοβλαστών και η συσχέτισή του με τη βαρύτητα της νόσου, την πορεία της νόσου και την ανθεκτικότητα στις θεραπείες, καθώς και ο υπολογισμός της πιθανότητας ανάπτυξης όγκου σε ένα προκαρκινικό περιβάλλον με βάση το χαρακτηρισμό αυτό, θα μπορούσε να αξιοποιηθεί ως δείκτης για την πρόγνωση, έγκαιρη

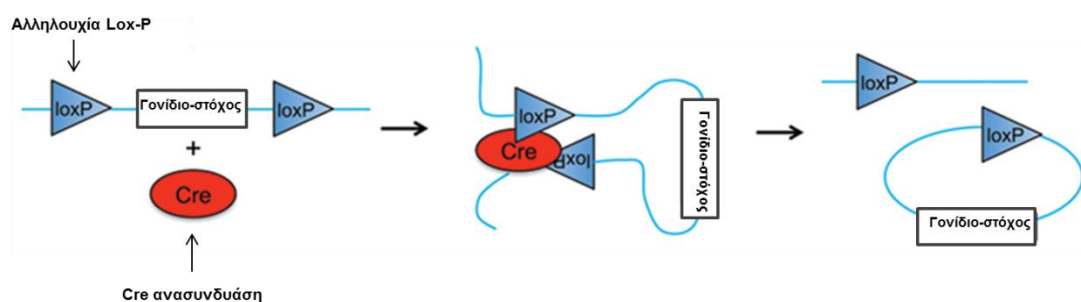
διάγνωση αλλά και αποτελεσματικότερη θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου (Berdiet-Acer et al., 2014; Sadanandam et al., 2013; Torres et al., 2013; Tsujino et al., 2007).

1.5 Πειραματικά πρότυπα (μοντέλα) ποντικών για τη μελέτη των μεσεγχυματικών κυττάρων στη φυσιολογία και τη νόσο.

Ως γνωστόν, οι ποντικοί αποτελούν ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα ζώα εργαστηρίου για τη μελέτη και μοντελοποίηση τόσο της φυσιολογίας όσο και της παθολογίας του ανθρώπου. Τα γενετικά 'εργαλεία' που πλέον έχουμε στα χέρια μας, μας επιτρέπουν την εξειδικευμένη μελέτη συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών όπως τα μεσεγχυματικά κύτταρα. Για το σκοπό αυτό, τη μελέτη δηλαδή της φυσιολογίας συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών (όπως τα μεσεγχυματικά κύτταρα) και του ρόλου τους στη νόσο, χρησιμοποιούνται συνηθέστερα δύο βασικές τεχνικές:

Η πρώτη, αφορά την εξειδικευμένη-τοποειδική γενετική απαλοιφή ή αποσιώπηση συγκεκριμένων γονιδίων από τα μεσεγχυματικά κύτταρα με την αξιοποίηση της τεχνικής του Cre-Lox ανασυνδυασμού. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.11, η βασική αρχή της τεχνικής αυτής είναι η εξής: Με τη χρήση τεχνικών γενετικού ανασυνδυασμού εισάγεται εντός του DNA και εκατέρωθεν του γονιδίου που θέλουμε να απαλείψουμε δύο αλληλουχίες DNA μήκους 34 ζευγών βάσεων (με τον ίδιο γενετικό προσανατολισμό) οι οποίες ονομάζονται αλληλουχίες Lox-P. Έπειτα, το ένζυμο Cre ανασυνδυάζει το οποίο πάλι με τεχνικές γενετικού ανασυνδυασμού έχει εισαχθεί και εκφράζεται εντός του ποντικού, προκαλεί ανασυνδυασμό μεταξύ των δύο αυτών Lox-P αλληλουχιών και αποκόπτει την περιοχή μεταξύ τους, η οποία περιέχει και το γονίδιο-στόχο. Εάν η έκφραση της Cre ανασυνδυάσης γίνεται σε όλο τον οργανισμό, τότε και η απαλοιφή του γονιδίου-στόχου θα γίνει σε όλο τον οργανισμό. Εάν όμως η έκφρασή της πραγματοποιηθεί σε συγκεκριμένους μόνο ιστούς με τη χρήση των κατάλληλων υποκινητών (για παράδειγμα μόνο στα μεσεγχυματικά κύτταρα), τότε και η απαλοιφή του γονιδίου-στόχου θα γίνει στους ιστούς αυτούς ενώ στον υπόλοιπο οργανισμό θα εκφράζεται κανονικά. Έτσι δημιουργούνται ποντικοί στους οποίους είτε το ένα αλληλίο (ετερόζυγοι) είτε και τα δύο αλληλία (ομόζυγοι) του γονιδίου-στόχου έχουν απαλειφθεί είτε σε ολόκληρο τον οργανισμό είτε σε συγκεκριμένα κύτταρα. Βέβαια, επειδή πολλά γονίδια είναι πολύ μεγάλα σε μέγεθος και δεν είναι εύκολο να αφαιρεθούν ολόκληρα, χρησιμοποιώντας

την τεχνική του Cre-Lox ανασυνδυασμού είναι δυνατόν να αφαιρεθεί ένα ή περισσότερα εξώνια από το γονίδιο-στόχος, κάτι το οποίο οδηγεί στο ίδιο αποτέλεσμα, την αποσιώπηση δηλαδή της έκφρασης του γονιδίου-στόχου (δηλαδή τη μη έκφρασή του ή τη μη παραγωγή της λειτουργικής πρωτεΐνης που αυτό κωδικοποιεί) (Branda and Dymecki, 2004; Kuhn and Torres, 2002; Maddison and Clarke, 2005; Sternberg and Hamilton, 1981). Από την άλλη, αν και σπανιότερα, το ίδιο σύστημα μπορεί να εισαχθεί στο γονιδίωμα ενός ποντικού για να επάγει την έκφραση ενός γονιδίου με ιστοειδικό τρόπο (πχ στα μεσεγχυματικά κύτταρα) είτε αυθόρμητα είτε μετά την εφαρμογή ενός ερεθίσματος όπως η χορήγηση ταμοξιφένης ή τετρακυκλίνης (Baron and Bujard, 2000; Maddison and Clarke, 2005; Metzger and Chambon, 2001).



Εικόνα 1.11. Γενετική απαλοιφή του γονιδίου-στόχου μέσω της χρήσης του συστήματος του Cre-Lox ανασυνδυασμού.

Το ένζυμο Cre ανασυνδυάση αναγνωρίζει τις αλληλουχίες loxP, συνδέεται μαζί τους και τελικά προκαλεί αποκοπή του τμήματος του DNA που βρίσκεται μεταξύ τους αφήνοντας μόνο μία αλληλουχία στο αρχικό μόριο DNA.

[Μετάφραση και τροποποίηση από τους (Bastle and Neisewander, 2016)]

Πιο συγκεκριμένα, για τη στόχευση των μεσεγχυματικών κυττάρων και την εξειδικευμένη απαλοιφή/αποσιώπηση ή έκφραση γονιδίων σε αυτά μέσω του συστήματος του Cre-Lox ανασυνδυασμού, έχουν χρησιμοποιηθεί μια σειρά από υποκινητές με διαφορετικά αποτελέσματα σε ότι αφορά την αποτελεσματικότητα του ανασυνδυασμού (δηλαδή την αποτελεσματικότητα της απαλοιφής/αποσιώπησης του γονιδίου-στόχου) αλλά και τα κύτταρα στα οποία αυτή συμβαίνει, δεδομένου ότι όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, τα μεσεγχυματικά κύτταρα παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια (Πίνακας 1.1) (Koliarakis et al., 2017).

Πίνακας 1.1. Στελέχη ποντικών που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των μεσεγχυματικών κυττάρων.

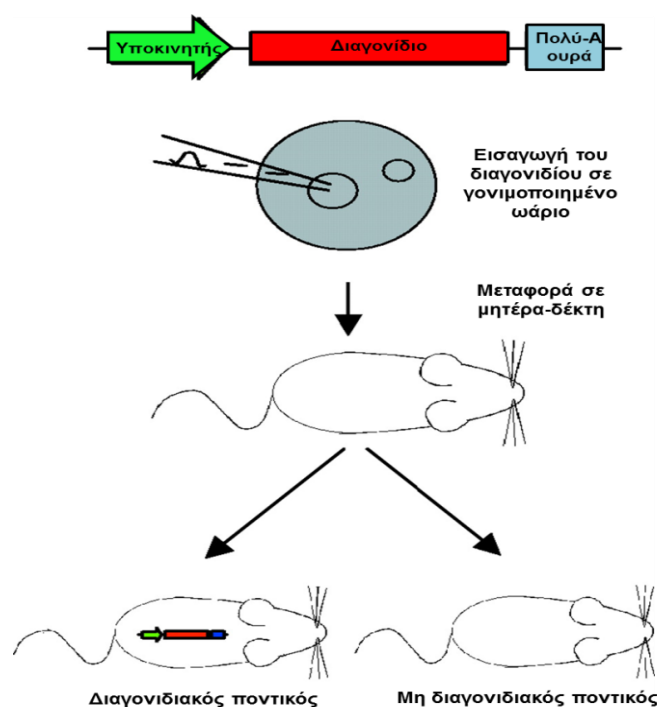
Γενετικό* εργαλείο (στέλεχος ποντικού)	Ιστοί-κύτταρα έκφρασης της Cre ανασυνδυάσης**	Αναφορά
<i>αSMA-Cre</i>	Αορτή, καρδιακά μυοκύτταρα, χονδροκύτταρα των αρθρώσεων, των πλευρών και των κρανιακών δομών, λείες μυικές ίνες του εντέρου, των σπλάχνων, των αγγείων και των κρανιακών ραφών, πνεύμονες	(Maruyama et al., 2007; Wu et al., 2007b)
<i>αSMA-CreER</i>	Λείες μυικές ίνες διαφόρων οργάνων (αορτή, σκελετικοί μύες, έντερο, νεφροί, πάγκρεας, εγκέφαλος, καρδιά, πνεύμονας), κάποια καρδιακά μυοκύτταρα	(Wendling et al., 2009)
<i>Col1a2-CreER</i>	Ινοβλάστες του εντέρου, της δερμίδας, των πνευμόνων, του περικαρδιακού συνδετικού ιστού, της κάψας του σπληνός, του τοιχώματος των αγγείων, μεσαγγειακά κύτταρα του σπειράματος	(Zheng et al., 2002)
<i>ColVI-Cre</i>	Μεσεγχυματικά κύτταρα του εντέρου, των αρθρώσεων, του δέρματος και της καρδιάς, σκελετικοί μύες	(Armaka et al., 2008; Koliaraki et al., 2015)
<i>Foxl1-Cre</i>	Γαστρεντερικό μεσέγχυμα, ηπατικά προγονικά κύτταρα	(Aoki et al., 2016; Sackett et al., 2007)
<i>Fsp1-Cre</i>	Ινοβλάστες διαφόρων οργάνων (στομάχι, έντερο, μαστός, καρδιά, νεφροί, προστάτης, πνεύμονας κλπ.), χονδροκύτταρα, μακροφάγα	(Bhowmick et al., 2004a; Osterreicher et al., 2011)
<i>Grem1-CreER</i>	Ινοβλάστες του εντέρου, μυοϊνοβλάστες του εντέρου, κύτταρα του στρώματος του μυελού των οστών, χονδροκύτταρα, οστεοκύτταρα	(Worthley et al., 2015)
<i>MslnCLN</i>	Ινοβλάστες και λείες μυικές ίνες του εντέρου, της ουροδόχου κύστης, των ουρητήρων, των αγγείων, των πνευμόνων, του ήπατος και του θύμου	(Rinkevich et al., 2012)
<i>Myh11-Cre</i>	Λείες μυικές ίνες διαφόρων οργάνων (έντερο, στομάχι, πνεύμονες, κύστη, όρχεις, καρδιά κλπ.)	(Xin et al., 2002)
<i>Myh-CreER</i>	Λείες μυικές ίνες διαφόρων οργάνων (έντερο, στομάχι, νεφροί, πνεύμονες, κύστη, σπλήνας, καρδιά κλπ.)	(Wirth et al., 2008)
<i>Tcf21/Pod1-Cre</i>	Μεσεγχυματικά κύτταρα διαφόρων οργάνων (υποβλεννογόνια εντερική στοιβάδα, μυική στοιβάδα του εντέρου, επικάρδιο, πνεύμονες, νεφροί, πάγκρεας, επινεφρίδια, γονάδες, αορτή κλπ.)	(Maezawa et al., 2012)
<i>Twist2-Cre</i>	Έντερο (λεία μυικά κύτταρα, ινοβλάστες, μυοϊνοβλάστες), μεσόδερμα, προγονικά κύτταρα στα οστά, μεσεγχυματικά κύτταρα των πνευμόνων	(Chivukula et al., 2014; Susic et al., 2003)
<i>Vimentin-CreER</i>	Ινοβλάστες του εντέρου, του ήπατος και των νεφρών	(Troeger et al., 2012)
<i>Wt1-Cre</i>	Έντερο (μεσοθήλιο των ορογόνων υμένων, λείες μυικές ίνες), ενδοθηλιακά κύτταρα, λείες μυικές ίνες των αγγείων στο μεσεντέριο και την καρδιά	(Wilm et al., 2005)

* Το πρόθεμα πριν από το 'Cre' στο όνομα του κάθε στελέχους ποντικού που καταγράφεται στον πίνακα 1 συνήθως αναφέρεται στον υποκινητή ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία του στελέχους αυτού.

****Αναφέρονται μόνο οι ιστοί και τα κύτταρα στα οποία έχει δειχτεί η έκφραση της Cre ανασυνδυάσης, παρόλο που είναι γνωστό ότι δεν έχουν ελεγχθεί όλα τα όργανα.**

[Μετάφραση και τροποποίηση από τους (Koliaraki et al., 2017)]

Η δεύτερη τεχνική αφορά τη διαγονιδιακή έκφραση ενός ‘ξένου’ γονιδίου («διαγονίδιο») συνήθως προερχόμενου από άλλον οργανισμό από έναν ποντικό («διαγονιδιακός ποντικός»), συνηθέστερα σε συγκεκριμένα κύτταρα ή ιστούς ή σε συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο (Gordon et al., 1980; Palmiter and Brinster, 1986). Όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.12, η βασική αρχή της μεθόδου είναι η εξής: Το διαγονίδιο, συνοδευόμενο από τις απαραίτητες ρυθμιστικές αλληλουχίες (υποκινητής, πολυ-Α ουρά κλπ.), εισάγεται (με διάφορες μεθόδους) στο έμβρυο του ποντικού κατά τα πολύ αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης. Εν συνεχεία ενσωματώνεται σε κάποια τυχαία θέση μέσα στο γονιδίωμα του ποντικού (πολλές φορές σε περισσότερα από ένα αντίγραφα) και αρχίζει να εκφράζεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή και των ρυθμιστικών στοιχείων που το συνοδεύουν αλλά και άλλων πιθανών ρυθμιστικών αλληλουχιών που βρίσκονται στη γύρω περιοχή του γονιδιώματος στην οποία έγινε η ενσωμάτωσή του (Bockamp et al., 2002; Rijkers et al., 1994). Χαρακτηριστικό παράδειγμα διαγονιδιακού ποντικού αποτελούν οι διάφοροι ποντικοί που εκφράζουν την Cre ανασυνδυάση σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους (Wang, 2009). Σε ότι αφορά μάλιστα την έκφραση διαγονιδίων στα μεσεγχυματικά κύτταρα, μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση των ίδιων υποκινητών που αναφέρονται και στον πίνακα 1.1.



Εικόνα 1.12. Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών για την έκφραση διαγονιδίων σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους ή σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια.

[Μετάφραση και τροποποίηση από τους (Bockamp et al., 2002)]

Η χρήση των παραπάνω τεχνικών καθώς και των ποικίλων παραλλαγών αλλά και περισσότερο εξελιγμένων μορφών τους (η εκτενής αναφορά των οποίων ξεφεύγει της παρούσας διατριβής) έχει καταστήσει δυνατό το γενετικό χειρισμό γονιδίων με μεγάλη ακρίβεια και εξειδικευμένη στόχευση σε συγκεκριμένα κύτταρα-στόχους και σε συγκεκριμένα εξελικτικά στάδια, ώστε να μελετηθεί καλύτερα και σε *in vivo* συνθήκες ο ρόλος των γονιδίων αυτών τόσο στη φυσιολογία όσο και στη νόσο, αλλά και να μεταφραστεί πιο αποτελεσματικά όλη αυτή η νεοαποκτηθείσα γνώση σε κλινικά απτά αποτελέσματα.

1.6 Συμπεράσματα

Στα σπονδυλωτά ζώα, τα μεσεγχυματικά κύτταρα αποτελούν έναν ξεχωριστό και συνάμα ποικιλόμορφο πληθυσμό κυττάρων, με σημαντικότερο ρόλο σε ένα ευρύτατο φάσμα ομοιοστατικών αλλά και παθολογικών διεργασιών και μηχανισμών τόσο σε επίπεδο κυττάρου – ιστού, όσο και σε επίπεδο ολόκληρου του οργανισμού. Οι μηχανισμοί αυτοί εμπλέκονται από τη μία μεριά στη διατήρηση της ομοιόστασης και την αντιμετώπιση της νόσου, και από την άλλη, υπό τις κατάλληλες προϋποθέσεις, στην καθοδήγηση της νόσου. Επομένως η περεταίρω μελέτη των κυττάρων αυτών αλλά και των μηχανισμών μέσω των οποίων αυτά ρυθμίζουν τη φυσιολογία αλλά και τη νόσο, θα δώσουν τη δυνατότητα καλύτερης αξιοποίησής τους για την ολόπλευρη αλλά και πιο στοχευμένη αντιμετώπιση πληθώρας ασθενειών για τις οποίες δεν υπάρχει ακόμη (αποτελεσματική) θεραπεία.

Βιβλιογραφία

Acloque, H., Adams, M.S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *The Journal of clinical investigation* 119, 1438-1449.

Aloisi, F., and Pujol-Borrell, R. (2006). Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nature reviews Immunology* 6, 205-217.

Aoki, R., Shoshkes-Carmel, M., Gao, N., Shin, S., May, C.L., Golson, M.L., Zahm, A.M., Ray, M., Wiser, C.L., Wright, C.V., *et al.* (2016). Foxl1-expressing mesenchymal cells constitute the intestinal stem cell niche. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 2, 175-188.

Armaka, M., Apostolaki, M., Jacques, P., Kontoyiannis, D.L., Elewaut, D., and Kollias, G. (2008). Mesenchymal cell targeting by TNF as a common pathogenic principle in chronic inflammatory joint and intestinal diseases. *The Journal of experimental medicine* 205, 331-337.

Augello, A., and De Bari, C. (2010). The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. *Human gene therapy* 21, 1226-1238.

Balkwill, F.R., Capasso, M., and Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *Journal of cell science* 125, 5591-5596.

- Baron, U., and Bujard, H. (2000). Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods in enzymology* 327, 401-421.
- Bastle, R.M., and Neisewander, J.L. (2016). Epigenetics and Drug Abuse. In *Recent Advances in Drug Addiction Research and Clinical Applications*, D.W. Meil, ed. (InTech).
- Bellairs, R. (1986). The primitive streak. *Anatomy and embryology* 174, 1-14.
- Berdiel-Acer, M., Berenguer, A., Sanz-Pamplona, R., Cuadras, D., Sanjuan, X., Paules, M.J., Santos, C., Salazar, R., Moreno, V., Capella, G., *et al.* (2014). A 5-gene classifier from the carcinoma-associated fibroblast transcriptomic profile and clinical outcome in colorectal cancer. *Oncotarget* 5, 6437-6452.
- Bernardo, M.E., and Fibbe, W.E. (2013). Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell stem cell* 13, 392-402.
- Bhowmick, N.A., Chytil, A., Plieth, D., Gorska, A.E., Dumont, N., Shappell, S., Washington, M.K., Neilson, E.G., and Moses, H.L. (2004a). TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* 303, 848-851.
- Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., and Moses, H.L. (2004b). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332-337.
- Birch, J.M., Alston, R.D., Quinn, M., and Kelsey, A.M. (2003). Incidence of malignant disease by morphological type, in young persons aged 12-24 years in England, 1979-1997. *European journal of cancer* 39, 2622-2631.
- Bissell, M.J., and Hines, W.C. (2011). Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nature medicine* 17, 320-329.
- Blanpain, C., Horsley, V., and Fuchs, E. (2007). Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell* 128, 445-458.
- Blughermann, C., Wu, L., Petrigliano, F., McAllister, D., Miriuka, S., and Evseenko, D.A. (2013). Novel aspects of parenchymal-mesenchymal interactions: from cell types to molecules and beyond. *Cell biochemistry and function* 31, 271-280.
- Bochet, L., Lehuède, C., Dauvillier, S., Wang, Y.Y., Dirat, B., Laurent, V., Dray, C., Guet, R., Maridonneau-Parini, I., Le Gonidec, S., *et al.* (2013). Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer research* 73, 5657-5668.
- Bockamp, E., Maringer, M., Spangenberg, C., Fees, S., Fraser, S., Eshkind, L., Oesch, F., and Zabel, B. (2002). Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiological genomics* 11, 115-132.
- Bonnans, C., Chou, J., and Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* 15, 786-801.
- Branda, C.S., and Dymecki, S.M. (2004). Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Developmental cell* 6, 7-28.
- Brouty-Boye, D., Pottin-Clemenceau, C., Doucet, C., Jasmin, C., and Azzarone, B. (2000). Chemokines and CD40 expression in human fibroblasts. *European journal of immunology* 30, 914-919.
- Buckley, C.D. (2011). Why does chronic inflammation persist: An unexpected role for fibroblasts. *Immunology letters* 138, 12-14.
- Buckley, C.D., Barone, F., Nayar, S., Benezech, C., and Caamano, J. (2015). Stromal cells in chronic inflammation and tertiary lymphoid organ formation. *Annual review of immunology* 33, 715-745.
- Buckley, C.D., Pilling, D., Lord, J.M., Akbar, A.N., Scheel-Toellner, D., and Salmon, M. (2001). Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends in immunology* 22, 199-204.
- Campagnoli, C., Roberts, I.A., Kumar, S., Bennett, P.R., Bellantuono, I., and Fisk, N.M. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98, 2396-2402.

- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 9, 641-650.
- Caplan, A.I., and Dennis, J.E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of cellular biochemistry* 98, 1076-1084.
- Carragher, D.M., Rangel-Moreno, J., and Randall, T.D. (2008). Ectopic lymphoid tissues and local immunity. *Seminars in immunology* 20, 26-42.
- Charbord, P., Tavian, M., Humeau, L., and Peault, B. (1996). Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment. *Blood* 87, 4109-4119.
- Chivukula, R.R., Shi, G., Acharya, A., Mills, E.W., Zeitels, L.R., Anandam, J.L., Abdelnaby, A.A., Balch, G.C., Mansour, J.C., Yopp, A.C., *et al.* (2014). An essential mesenchymal function for miR-143/145 in intestinal epithelial regeneration. *Cell* 157, 1104-1116.
- Coghlin, C., and Murray, G.I. (2010). Current and emerging concepts in tumour metastasis. *The Journal of pathology* 222, 1-15.
- Cormier, J.N., and Pollock, R.E. (2004). Soft tissue sarcomas. *CA: a cancer journal for clinicians* 54, 94-109.
- Croft, A.P., Naylor, A.J., Marshall, J.L., Hardie, D.L., Zimmermann, B., Turner, J., Desanti, G., Adams, H., Yemm, A.I., Muller-Ladner, U., *et al.* (2016). Rheumatoid synovial fibroblasts differentiate into distinct subsets in the presence of cytokines and cartilage. *Arthritis research & therapy* 18, 270.
- Csernok, E., and Gross, W.L. (2013). Current understanding of the pathogenesis of granulomatosis with polyangiitis (Wegener's). *Expert review of clinical immunology* 9, 641-648.
- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C., and Nardi, N.B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science* 119, 2204-2213.
- Dangoor, A., Seddon, B., Gerrand, C., Grimer, R., Whelan, J., and Judson, I. (2016). UK guidelines for the management of soft tissue sarcomas. *Clinical sarcoma research* 6, 20.
- Dazzi, F., Ramasamy, R., Glennie, S., Jones, S.P., and Roberts, I. (2006). The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood reviews* 20, 161-171.
- DeFilippis, R.A., Fordyce, C., Patten, K., Chang, H., Zhao, J., Fontenay, G.V., Kerlikowske, K., Parvin, B., and Tlsty, T.D. (2014). Stress signaling from human mammary epithelial cells contributes to phenotypes of mammographic density. *Cancer research* 74, 5032-5044.
- Desmouliere, A., Darby, I.A., and Gabbiani, G. (2003). Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 83, 1689-1707.
- Dimanche-Boitrel, M.T., Vakaet, L., Jr., Pujuguet, P., Chauffert, B., Martin, M.S., Hammann, A., Van Roy, F., Mareel, M., and Martin, F. (1994). In vivo and in vitro invasiveness of a rat colon-cancer cell line maintaining E-cadherin expression: an enhancing role of tumor-associated myofibroblasts. *International journal of cancer* 56, 512-521.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Doria, A., Zen, M., Bettio, S., Gatto, M., Bassi, N., Nalotto, L., Ghirardello, A., Iaccarino, L., and Punzi, L. (2012). Autoinflammation and autoimmunity: bridging the divide. *Autoimmunity reviews* 12, 22-30.
- Drayton, D.L., Liao, S., Mounzer, R.H., and Ruddle, N.H. (2006). Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nature immunology* 7, 344-353.
- Duffield, J.S. (2014). Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 124, 2299-2306.
- Dumont, N., Liu, B., Defilippis, R.A., Chang, H., Rabban, J.T., Karnezis, A.N., Tjoe, J.A., Marx, J., Parvin, B., and Tlsty, T.D. (2013). Breast fibroblasts modulate early dissemination,

tumorigenesis, and metastasis through alteration of extracellular matrix characteristics. *Neoplasia* 15, 249-262.

Dvorak, H.F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine* 315, 1650-1659.

Erez, N., Truitt, M., Olson, P., Arron, S.T., and Hanahan, D. (2010). Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer cell* 17, 135-147.

Ferrer-Vaquer, A., Viotti, M., and Hadjantonakis, A.K. (2010). Transitions between epithelial and mesenchymal states and the morphogenesis of the early mouse embryo. *Cell adhesion & migration* 4, 447-457.

Filer, A., Pitzalis, C., and Buckley, C.D. (2006). Targeting the stromal microenvironment in chronic inflammation. *Current opinion in pharmacology* 6, 393-400.

Flavell, S.J., Hou, T.Z., Lax, S., Filer, A.D., Salmon, M., and Buckley, C.D. (2008). Fibroblasts as novel therapeutic targets in chronic inflammation. *British journal of pharmacology* 153 Suppl 1, S241-246.

Fletcher CDM, Sundaram M, Rydholm A, Coindre JM, and S., S. (2013). WHO classification of tumours of soft tissue and bone. 4th edition (Lyon: IARC Press).

Francois, M., Romieu-Mourez, R., Li, M., and Galipeau, J. (2012). Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 20, 187-195.

Friedl, P. (2004). Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Current opinion in cell biology* 16, 14-23.

Fries, K.M., Blieden, T., Looney, R.J., Sempowski, G.D., Silvera, M.R., Willis, R.A., and Phipps, R.P. (1994). Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clinical immunology and immunopathology* 72, 283-292.

Fukumura, D., Xavier, R., Sugiura, T., Chen, Y., Park, E.C., Lu, N., Selig, M., Nielsen, G., Taksir, T., Jain, R.K., *et al.* (1998). Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 94, 715-725.

Gascard, P., and Tlsty, T.D. (2016). Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. *Genes & development* 30, 1002-1019.

Gonzalez, M.A., Gonzalez-Rey, E., Rico, L., Buscher, D., and Delgado, M. (2009). Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* 136, 978-989.

Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., and Ruddle, F.H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 7380-7384.

Gray, D.H., Tull, D., Ueno, T., Seach, N., Classon, B.J., Chidgey, A., McConville, M.J., and Boyd, R.L. (2007). A unique thymic fibroblast population revealed by the monoclonal antibody MTS-15. *Journal of immunology* 178, 4956-4965.

Hanahan, D., and Coussens, L.M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell* 21, 309-322.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Haniffa, M.A., Collin, M.P., Buckley, C.D., and Dazzi, F. (2009). Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica* 94, 258-263.

Hay, E.D. (2005). The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 233, 706-720.

Hinz, B. (2010). The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *Journal of biomechanics* 43, 146-155.

Hogaboam, C.M., Steinhäuser, M.L., Chensue, S.W., and Kunkel, S.L. (1998). Novel roles for chemokines and fibroblasts in interstitial fibrosis. *Kidney international* 54, 2152-2159.

- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., and Thun, M.J. (2007). Cancer statistics, 2007. *CA: a cancer journal for clinicians* 57, 43-66.
- Jenkinson, W.E., Jenkinson, E.J., and Anderson, G. (2003). Differential requirement for mesenchyme in the proliferation and maturation of thymic epithelial progenitors. *The Journal of experimental medicine* 198, 325-332.
- Junttila, M.R., and de Sauvage, F.J. (2013). Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 501, 346-354.
- Kalluri, R., and Neilson, E.G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 112, 1776-1784.
- Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 119, 1420-1428.
- Kalluri, R., and Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature reviews Cancer* 6, 392-401.
- Kassis, I., Vaknin-Dembinsky, A., and Karussis, D. (2011). Bone marrow mesenchymal stem cells: agents of immunomodulation and neuroprotection. *Current stem cell research & therapy* 6, 63-68.
- Koliarakis, V., Pallangyo, C.K., Greten, F.R., and Kollias, G. (2017). Mesenchymal Cells in Colon Cancer. *Gastroenterology*.
- Koliarakis, V., Pasparakis, M., and Kollias, G. (2015). IKKbeta in intestinal mesenchymal cells promotes initiation of colitis-associated cancer. *The Journal of experimental medicine* 212, 2235-2251.
- Kong, P., Christia, P., and Frangogiannis, N.G. (2014). The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71, 549-574.
- Kuhn, R., and Torres, R.M. (2002). Cre/loxP recombination system and gene targeting. *Methods in molecular biology* 180, 175-204.
- Leask, A., and Abraham, D.J. (2004). TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 816-827.
- Lee, C.C., and Kim, K.D. (2012). Stem cell microenvironment as a potential therapeutic target. *Regenerative medicine* 7, 3-5.
- Lee, J.W., Epardaud, M., Sun, J., Becker, J.E., Cheng, A.C., Yonekura, A.R., Heath, J.K., and Turley, S.J. (2007). Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nature immunology* 8, 181-190.
- Lee, U.E., and Friedman, S.L. (2011). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 25, 195-206.
- Liao, D., Luo, Y., Markowitz, D., Xiang, R., and Reisfeld, R.A. (2009). Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *PloS one* 4, e7965.
- Lindner, U., Kramer, J., Rohwedel, J., and Schlenke, P. (2010). Mesenchymal Stem or Stromal Cells: Toward a Better Understanding of Their Biology? *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 37, 75-83.
- Liu, C., Ueno, T., Kuse, S., Saito, F., Nitta, T., Piali, L., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Hollander, G.A., *et al.* (2005). The role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymi. *Blood* 105, 31-39.
- Maddison, K., and Clarke, A.R. (2005). New approaches for modelling cancer mechanisms in the mouse. *The Journal of pathology* 205, 181-193.
- Maezawa, Y., Binnie, M., Li, C., Thorner, P., Hui, C.C., Alman, B., Taketo, M.M., and Quaggin, S.E. (2012). A new Cre driver mouse line, Tcf21/Pod1-Cre, targets metanephric mesenchyme. *PloS one* 7, e40547.
- Mari, W., Alsabri, S.G., Tabal, N., Younes, S., Sherif, A., and Simman, R. (2015). Novel Insights on Understanding of Keloid Scar: Article Review. *The journal of the American College of Clinical Wound Specialists* 7, 1-7.

Martinez-Outschoorn, U.E., Lisanti, M.P., and Sotgia, F. (2014). Catabolic cancer-associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth. *Seminars in cancer biology* 25, 47-60.

Maruyama, T., Hatakeyama, S., Miwa, T., and Nishimori, K. (2007). Human smooth muscle alpha-actin promoter drives Cre recombinase expression in the cranial suture in addition to smooth muscle cell. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71, 1103-1106.

McDonald, L.T., Russell, D.L., Kelly, R.R., Xiong, Y., Motamarry, A., Patel, R.K., Jones, J.A., Watson, P.M., Turner, D.P., Watson, D.K., *et al.* (2015). Hematopoietic stem cell-derived cancer-associated fibroblasts are novel contributors to the pro-tumorigenic microenvironment. *Neoplasia* 17, 434-448.

Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428-435.

Meng, X.M., Nikolic-Paterson, D.J., and Lan, H.Y. (2016). TGF-beta: the master regulator of fibrosis. *Nature reviews Nephrology* 12, 325-338.

Metzger, D., and Chambon, P. (2001). Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 24, 71-80.

Mittal, S., Revell, M., Barone, F., Hardie, D.L., Matharu, G.S., Davenport, A.J., Martin, R.A., Grant, M., Mosselmans, F., Pynsent, P., *et al.* (2013). Lymphoid aggregates that resemble tertiary lymphoid organs define a specific pathological subset in metal-on-metal hip replacements. *PloS one* 8, e63470.

Miyoshi, H., VanDussen, K.L., Malvin, N.P., Ryu, S.H., Wang, Y., Sonnek, N.M., Lai, C.W., and Stappenbeck, T.S. (2017). Prostaglandin E2 promotes intestinal repair through an adaptive cellular response of the epithelium. *The EMBO journal* 36, 5-24.

Mohseny, A.B., and Hogendoorn, P.C. (2011). Concise review: mesenchymal tumors: when stem cells go mad. *Stem cells* 29, 397-403.

Najar, M., Raicevic, G., Fayyad-Kazan, H., Bron, D., Tounouz, M., and Lagneaux, L. (2016). Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. *Cytotherapy* 18, 160-171.

Neyt, K., Perros, F., GeurtsvanKessel, C.H., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2012). Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity. *Trends in immunology* 33, 297-305.

Olive, K.P., Jacobetz, M.A., Davidson, C.J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., Madhu, B., Goldgraben, M.A., Caldwell, M.E., Allard, D., *et al.* (2009). Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 324, 1457-1461.

Osterreicher, C.H., Penz-Osterreicher, M., Grivennikov, S.I., Guma, M., Koltsova, E.K., Datz, C., Sasik, R., Hardiman, G., Karin, M., and Brenner, D.A. (2011). Fibroblast-specific protein 1 identifies an inflammatory subpopulation of macrophages in the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 308-313.

Palmiter, R.D., and Brinster, R.L. (1986). Germ-line transformation of mice. *Annual review of genetics* 20, 465-499.

Pap, T., Muller-Ladner, U., Gay, R.E., and Gay, S. (2000). Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis research* 2, 361-367.

Parsonage, G., Falciani, F., Burman, A., Filer, A., Ross, E., Bofill, M., Martin, S., Salmon, M., and Buckley, C.D. (2003). Global gene expression profiles in fibroblasts from synovial, skin and lymphoid tissue reveals distinct cytokine and chemokine expression patterns. *Thrombosis and haemostasis* 90, 688-697.

Parsonage, G., Filer, A.D., Haworth, O., Nash, G.B., Rainger, G.E., Salmon, M., and Buckley, C.D. (2005). A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends in immunology* 26, 150-156.

Peinado, H., Lavotshkin, S., and Lyden, D. (2011). The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Seminars in cancer biology* 21, 139-146.

- Pender, S.L., and MacDonald, T.T. (2004). Matrix metalloproteinases and the gut - new roles for old enzymes. *Current opinion in pharmacology* 4, 546-550.
- Pinchuk, I.V., Mifflin, R.C., Saada, J.I., and Powell, D.W. (2010). Intestinal mesenchymal cells. *Current gastroenterology reports* 12, 310-318.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
- Pittenger, M.F., and Martin, B.J. (2004). Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circulation research* 95, 9-20.
- Powell, D.W., Pinchuk, I.V., Saada, J.I., Chen, X., and Mifflin, R.C. (2011). Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. *Annual review of physiology* 73, 213-237.
- Quail, D.F., and Joyce, J.A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine* 19, 1423-1437.
- Radisky, D.C., Kenny, P.A., and Bissell, M.J. (2007). Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? *Journal of cellular biochemistry* 101, 830-839.
- Rasmusson, I., Le Blanc, K., Sundberg, B., and Ringden, O. (2007). Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scandinavian journal of immunology* 65, 336-343.
- Rattigan, Y.I., Patel, B.B., Ackerstaff, E., Sukenick, G., Koutcher, J.A., Glod, J.W., and Banerjee, D. (2012). Lactate is a mediator of metabolic cooperation between stromal carcinoma associated fibroblasts and glycolytic tumor cells in the tumor microenvironment. *Experimental cell research* 318, 326-335.
- Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A.I., Zhao, R.C., and Shi, Y. (2008). Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell stem cell* 2, 141-150.
- Rieder, F., and Fiocchi, C. (2013). Mechanisms of tissue remodeling in inflammatory bowel disease. *Digestive diseases* 31, 186-193.
- Rijkers, T., Peetz, A., and Ruther, U. (1994). Insertional mutagenesis in transgenic mice. *Transgenic research* 3, 203-215.
- Rinkevich, Y., Mori, T., Sahoo, D., Xu, P.X., Bermingham, J.R., Jr., and Weissman, I.L. (2012). Identification and prospective isolation of a mesothelial precursor lineage giving rise to smooth muscle cells and fibroblasts for mammalian internal organs, and their vasculature. *Nature cell biology* 14, 1251-1260.
- Rinn, J.L., Bondre, C., Gladstone, H.B., Brown, P.O., and Chang, H.Y. (2006). Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS genetics* 2, e119.
- Roulis, M., and Flavell, R.A. (2016). Fibroblasts and myofibroblasts of the intestinal lamina propria in physiology and disease. *Differentiation; research in biological diversity* 92, 116-131.
- Roulis, M., Nikolaou, C., Kotsaki, E., Kaffe, E., Karagianni, N., Koliarakis, V., Salpea, K., Ragoussis, J., Aidinis, V., Martini, E., *et al.* (2014). Intestinal myofibroblast-specific Tpl2-Cox-2-PGE2 pathway links innate sensing to epithelial homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, E4658-4667.
- Rozenchan, P.B., Carraro, D.M., Brentani, H., de Carvalho Mota, L.D., Bastos, E.P., e Ferreira, E.N., Torres, C.H., Katayama, M.L., Roela, R.A., Lyra, E.C., *et al.* (2009). Reciprocal changes in gene expression profiles of cocultured breast epithelial cells and primary fibroblasts. *International journal of cancer* 125, 2767-2777.
- Ryan, D.H., and Tang, J. (1995). Regulation of human B cell lymphopoiesis by adhesion molecules and cytokines. *Leukemia & lymphoma* 17, 375-389.
- Saada, J.I., Pinchuk, I.V., Barrera, C.A., Adegboyega, P.A., Suarez, G., Mifflin, R.C., Di Mari, J.F., Reyes, V.E., and Powell, D.W. (2006). Subepithelial myofibroblasts are novel nonprofessional APCs in the human colonic mucosa. *Journal of immunology* 177, 5968-5979.

Saadi, A., Shannon, N.B., Lao-Sirieix, P., O'Donovan, M., Walker, E., Clemons, N.J., Hardwick, J.S., Zhang, C., Das, M., Save, V., *et al.* (2010). Stromal genes discriminate preinvasive from invasive disease, predict outcome, and highlight inflammatory pathways in digestive cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 2177-2182.

Sackett, S.D., Fulmer, J.T., Friedman, J.R., and Kaestner, K.H. (2007). Foxl1-Cre BAC transgenic mice: a new tool for gene ablation in the gastrointestinal mesenchyme. *Genesis* *45*, 518-522.

Sadanandam, A., Lyssiotis, C.A., Homicsko, K., Collisson, E.A., Gibb, W.J., Wulschleger, S., Ostos, L.C., Lannon, W.A., Grotzinger, C., Del Rio, M., *et al.* (2013). A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nature medicine* *19*, 619-625.

Schock, F., and Perrimon, N. (2002). Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. *Annual review of cell and developmental biology* *18*, 463-493.

Serhan, C.N., Brain, S.D., Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Haslett, C., O'Neill, L.A., Perretti, M., Rossi, A.G., and Wallace, J.L. (2007). Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *21*, 325-332.

Shaker, A., Swietlicki, E.A., Wang, L., Jiang, S., Onal, B., Bala, S., DeSchryver, K., Newberry, R., Levin, M.S., and Rubin, D.C. (2010). Epimorphin deletion protects mice from inflammation-induced colon carcinogenesis and alters stem cell niche myofibroblast secretion. *The Journal of clinical investigation* *120*, 2081-2093.

Smith, R.S., Smith, T.J., Blieden, T.M., and Phipps, R.P. (1997). Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *The American journal of pathology* *151*, 317-322.

Sosic, D., Richardson, J.A., Yu, K., Ornitz, D.M., and Olson, E.N. (2003). Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF-kappaB activity. *Cell* *112*, 169-180.

Stappenbeck, T.S., and Miyoshi, H. (2009). The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair. *Science* *324*, 1666-1669.

Stern, C. (2004). *Gastrulation: From Cells to Embryo* (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sternberg, N., and Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *Journal of molecular biology* *150*, 467-486.

Stover, D.G., Bierie, B., and Moses, H.L. (2007). A delicate balance: TGF-beta and the tumor microenvironment. *Journal of cellular biochemistry* *101*, 851-861.

Tabera, S., Perez-Simon, J.A., Diez-Campelo, M., Sanchez-Abarca, L.I., Blanco, B., Lopez, A., Benito, A., Ocio, E., Sanchez-Guijo, F.M., Canizo, C., *et al.* (2008). The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica* *93*, 1301-1309.

Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature reviews Molecular cell biology* *7*, 131-142.

Thompson, E.W., Newgreen, D.F., and Tarin, D. (2005). Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer research* *65*, 5991-5995; discussion 5995.

Timmermans, W.M., van Laar, J.A., van Hagen, P.M., and van Zelm, M.C. (2016). Immunopathogenesis of granulomas in chronic autoinflammatory diseases. *Clinical & translational immunology* *5*, e118.

Todd, N.W., Luzina, I.G., and Atamas, S.P. (2012). Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis & tissue repair* *5*, 11.

Togo, S., Polanska, U.M., Horimoto, Y., and Orimo, A. (2013). Carcinoma-associated fibroblasts are a promising therapeutic target. *Cancers* *5*, 149-169.

Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R.A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology* 3, 349-363.

Torres, S., Bartolome, R.A., Mendes, M., Barderas, R., Fernandez-Acenero, M.J., Pelaez-Garcia, A., Pena, C., Lopez-Lucendo, M., Villar-Vazquez, R., de Herreros, A.G., *et al.* (2013). Proteome profiling of cancer-associated fibroblasts identifies novel proinflammatory signatures and prognostic markers for colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19, 6006-6019.

Tough, D.F., Sun, S., Zhang, X., and Sprent, J. (1999). Stimulation of naive and memory T cells by cytokines. *Immunological reviews* 170, 39-47.

Traggiai, E., Volpi, S., Schena, F., Gattorno, M., Ferlito, F., Moretta, L., and Martini, A. (2008). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. *Stem cells* 26, 562-569.

Troeger, J.S., Mederacke, I., Gwak, G.Y., Dapito, D.H., Mu, X., Hsu, C.C., Pradere, J.P., Friedman, R.A., and Schwabe, R.F. (2012). Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice. *Gastroenterology* 143, 1073-1083 e1022.

Tsujino, T., Seshimo, I., Yamamoto, H., Ngan, C.Y., Ezumi, K., Takemasa, I., Ikeda, M., Sekimoto, M., Matsuura, N., and Monden, M. (2007). Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 2082-2090.

Turley, E.A., Veiseth, M., Radisky, D.C., and Bissell, M.J. (2008). Mechanisms of disease: epithelial-mesenchymal transition--does cellular plasticity fuel neoplastic progression? *Nature clinical practice Oncology* 5, 280-290.

van Zijl, F., Mair, M., Csiszar, A., Schneller, D., Zulehner, G., Huber, H., Eferl, R., Beug, H., Dolznig, H., and Mikulits, W. (2009). Hepatic tumor-stroma crosstalk guides epithelial to mesenchymal transition at the tumor edge. *Oncogene* 28, 4022-4033.

Vermeulen, L., De Sousa, E.M.F., van der Heijden, M., Cameron, K., de Jong, J.H., Borovski, T., Tuynman, J.B., Todaro, M., Merz, C., Rodermond, H., *et al.* (2010). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nature cell biology* 12, 468-476.

Wallach-Dayán, S.B., Golan-Gerstl, R., and Breuer, R. (2007). Evasion of myofibroblasts from immune surveillance: a mechanism for tissue fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 20460-20465.

Wang, X. (2009). Cre transgenic mouse lines. *Methods in molecular biology* 561, 265-273.

Weber, K.T. (1997). Monitoring tissue repair and fibrosis from a distance. *Circulation* 96, 2488-2492.

Wendling, O., Bornert, J.M., Chambon, P., and Metzger, D. (2009). Efficient temporally-controlled targeted mutagenesis in smooth muscle cells of the adult mouse. *Genesis* 47, 14-18.

Wilm, B., Ipenberg, A., Hastie, N.D., Burch, J.B., and Bader, D.M. (2005). The serosal mesothelium is a major source of smooth muscle cells of the gut vasculature. *Development* 132, 5317-5328.

Wirth, A., Benyo, Z., Lukasova, M., Leutgeb, B., Wettschureck, N., Gorbey, S., Orsy, P., Horvath, B., Maser-Gluth, C., Greiner, E., *et al.* (2008). G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nature medicine* 14, 64-68.

Worthley, D.L., Churchill, M., Compton, J.T., Taylor, Y., Rao, M., Si, Y., Levin, D., Schwartz, M.G., Uygun, A., Hayakawa, Y., *et al.* (2015). Gremlin 1 identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential. *Cell* 160, 269-284.

Wu, Y., Chen, L., Scott, P.G., and Tredget, E.E. (2007a). Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem cells* 25, 2648-2659.

Wu, Z., Yang, L., Cai, L., Zhang, M., Cheng, X., Yang, X., and Xu, J. (2007b). Detection of epithelial to mesenchymal transition in airways of a bleomycin induced pulmonary fibrosis model derived from an alpha-smooth muscle actin-Cre transgenic mouse. *Respiratory research* 8, 1.

Xin, H.B., Deng, K.Y., Rishniw, M., Ji, G., and Kotlikoff, M.I. (2002). Smooth muscle expression of Cre recombinase and eGFP in transgenic mice. *Physiological genomics* 10, 211-215.

Zeisberg, E.M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2007). Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer research* 67, 10123-10128.

Zhang, Y., Cao, H.J., Graf, B., Meekins, H., Smith, T.J., and Phipps, R.P. (1998). CD40 engagement up-regulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human lung fibroblasts. *Journal of immunology* 160, 1053-1057.

Zhao, Q., Ren, H., and Han, Z. (2015). Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases,. *Journal of Cellular Immunotherapy* 2, 3-20.

Zhao, S., Wehner, R., Bornhauser, M., Wassmuth, R., Bachmann, M., and Schmitz, M. (2010). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells and their therapeutic consequences for immune-mediated disorders. *Stem cells and development* 19, 607-614.

Zheng, B., Zhang, Z., Black, C.M., de Crombrughe, B., and Denton, C.P. (2002). Ligand-dependent genetic recombination in fibroblasts : a potentially powerful technique for investigating gene function in fibrosis. *The American journal of pathology* 160, 1609-1617.

Zhou, L., Yang, K., Andl, T., Wickett, R.R., and Zhang, Y. (2015). Perspective of Targeting Cancer-Associated Fibroblasts in Melanoma. *Journal of Cancer* 6, 717-726.

Zhu, J., and Yu, D.T. (2006). Matrix metalloproteinase expression in the spondyloarthropathies. *Current opinion in rheumatology* 18, 364-368.

2 Σωματική αύξηση

2.1 Γενικά

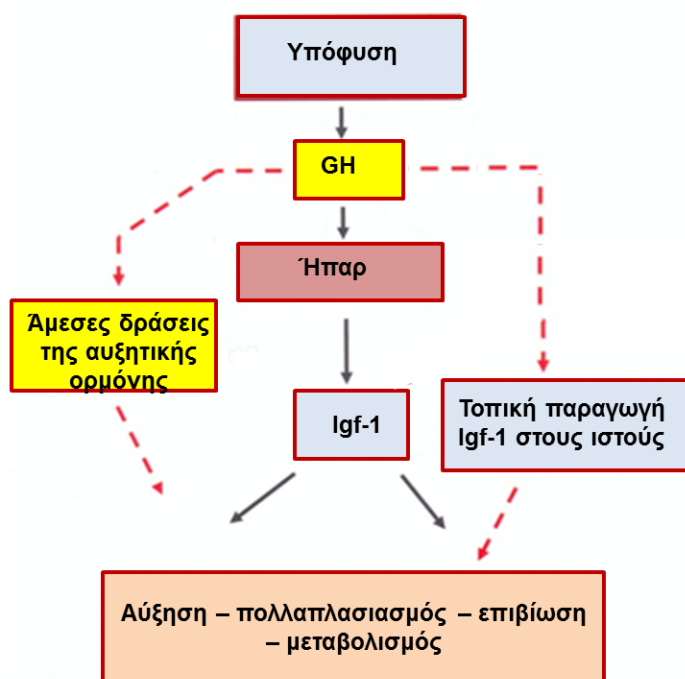
Σύμφωνα με τους Murray και Clayton ως (σωματική) αύξηση ορίζεται η αύξηση του μεγέθους του σώματος μέσω της αύξησης της μάζας των ιστών, η οποία εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ κυτταρικής υπερτροφίας, κυτταρικής υπερπλασίας και κυτταρικής απόπτωσης. Στον άνθρωπο η διαδικασία της αύξησης ξεκινάει αμέσως μετά τη σύλληψη και ολοκληρώνεται κατά το τέλος της ήβης με το κλείσιμο των επιφυσιικών πλακών και τον τερματισμό της κατά μήκους αύξησης των οστών. Επιπλέον, αν και αποτελεί μια συνεχή διαδικασία, μπορεί να χωριστεί σε τέσσερα στάδια με βάση τους διαφορετικούς μηχανισμούς που την καθοδηγούν, ήτοι: εμβρυική αύξηση, βρεφική αύξηση, αύξηση κατά την παιδική ηλικία και αύξηση κατά την εφηβεία (Devesa et al., 2016; Murray and Clayton, 2013).

2.2 Ο άξονας εκλυτική ορμόνη της αυξητικής ορμόνης – αυξητική ορμόνη – ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας (GHRH – GH – Igf-1)

Η διαδικασία της σωματικής αύξησης ελέγχεται και καθοδηγείται από διάφορα ορμονικά (και όχι μόνο) συστήματα, με προεξάρχοντα τον άξονα εκλυτική ορμόνη της αυξητικής ορμόνης – αυξητική ορμόνη – ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας (GHRH - GH - Igf-1) (Murray and Clayton, 2013). Η αρχική υπόθεση που διαμορφώθηκε το 1972 για να εξηγήσει τα πειραματικά ευρήματα που υπήρχαν σχετικά με τη ρύθμιση της σωματικής αύξησης - η γνωστή πλέον ως «υπόθεση της σωματομεδίνης» - προέβλεπε ότι η αυξητική ορμόνη ασκεί τις δράσεις της μόνο έμμεσα μέσω της παραγωγής κάποιου άλλου παράγοντα από το ήπαρ ο οποίος ονομάστηκε σωματομεδίνη (Daughaday et al., 1972). Σύντομα ανακαλύφθηκε ότι δεν υπήρχε μόνο μία σωματομεδίνη, αλλά περιγράφηκαν τουλάχιστον δύο διαφορετικές μορφές της (η σωματομεδίνη A και η σωματομεδίνη C) (Van Wyk et al., 1974) οι οποίες λόγω των δομικών ομοιοτήτων τους με την ινσουλίνη και της δυνατότητάς τους να προσδένονται και να ενεργοποιούν τον υποδοχέα της ινσουλίνης μετονομάστηκαν σε ινσουλινοειδείς αυξητικοί παράγοντες (I και II) (Froesch et al., 1985).

Ωστόσο, από το 1972 μέχρι σήμερα, με βάση τις αμέτρητες μελέτες που έχουν γίνει πάνω στο συγκεκριμένο σύστημα, η όλη «υπόθεση της σωματομεδίνης» έχει αναθεωρηθεί και εμπλουτιστεί (Εικόνα 2.1) (Kaplan and Cohen, 2007). Πρώτον, έχει αποδειχτεί ότι η αυξητική ορμόνη μπορεί να δρα άμεσα μέσω του υποδοχέα της ο

οποίος εντοπίζεται πρακτικά σε όλους τους ιστούς (Ballesteros et al., 2000). Επίσης, η παραγωγή του Igf-1 δε γίνεται αποκλειστικά στο ήπαρ αλλά μπορεί να λάβει χώρα πρακτικά σε όλους τους ιστούς δρώντας είτε τοπικά (αυτοκρινώς/παρακρινώς) είτε εισερχόμενος στη συστηματική κυκλοφορία (Le Roith et al., 2001; Murphy et al., 1987). Τέλος, ενώ κάποιες από τις δράσεις της αυξητικής ορμόνης και του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα είναι παρόμοιες, εντούτοις άλλες δράσεις τους είναι αντίθετες. Για παράδειγμα οι δύο αυτές ορμόνες δρουν συνεργατικά σε ότι αφορά τις αναβολικές τους δράσεις, ενώ σε ότι αφορά τον έλεγχο της γλυκόζης πλάσματος έχουν αντίθετες δράσεις, με την αυξητική ορμόνη να προκαλεί υπεργλυκαιμία και τον ινσουλινοειδή αυξητικό παράγοντα να δρα όπως η ινσουλίνη μειώνοντας τα επίπεδα γλυκόζης (Kaplan and Cohen, 2007; Le Roith et al., 2001).



Εικόνα 2.1. Η αναθεωρημένη – εμπλουτισμένη «υπόθεση της σωματομεδίνης».

Η παραγόμενη από την υπόφυση αυξητική ορμόνη (GH), αφενός μεν δρα άμεσα στους υποδοχείς της που βρίσκονται σε όλους σχεδόν τους ιστούς του οργανισμού επηρεάζοντας τη σωματική αύξηση, την κυτταρική επιβίωση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καθώς και διάφορες μεταβολικές διεργασίες του οργανισμού. Αφετέρου δε, επάγει την παραγωγή του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα (Igf-1) κυρίως από το ήπαρ (αλλά και από διάφορους άλλους ιστούς), ο οποίος με τη σειρά του επηρεάζει τις ίδιες διεργασίες που επηρεάζει και η αυξητική ορμόνη, είτε συνεπικουρώντας το έργο της είτε αντιτιθέμενος σε αυτό.

[Μετάφραση και τροποποίηση από τους (Husvénth, 2011)]

Επιπρόσθετα, η σημασία του κάθε παράγοντα για το κάθε επιμέρους αναπτυξιακό στάδιο δεν είναι σταθερή αλλά μεταβάλλεται. Για παράδειγμα, κατά την εμβρυική ανάπτυξη, η αυξητική ορμόνη δε φαίνεται να είναι πρωτεύουσας σημασίας ενώ

αντίθετα κυρίαρχο ρόλο παίζουν ο Igf-1, ο Igf-2 [που αποτελεί και τον κύριο ινσουλινοειδή αυξητικό παράγοντα του εμβρύου (Sferruzzi-Perri et al., 2011)] και η ινσουλίνη (Gluckman et al., 1983; Verhaeghe et al., 1993; Waters and Kaye, 2002). Μετά τη γέννηση όμως, και καθώς η ηλικία προχωρά, η αυξητική ορμόνη αποκτά κυρίαρχο και συνεχώς αυξανόμενο ρόλο στη σωματική αύξηση (είτε έμμεσα μέσω της παραγωγής του Igf-1 είτε άμεσα) ενώ παράλληλα υποβοηθείται και από άλλες ορμόνες όπως για παράδειγμα οι ορμόνες του θυρεοειδούς, οι ορμόνες του φύλου και οι κατεχολαμίνες, οι οποίες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο κυρίως κατά την ανάπτυξη των παιδιών και των εφήβων (Devesa et al., 1992; Murray and Clayton, 2013).

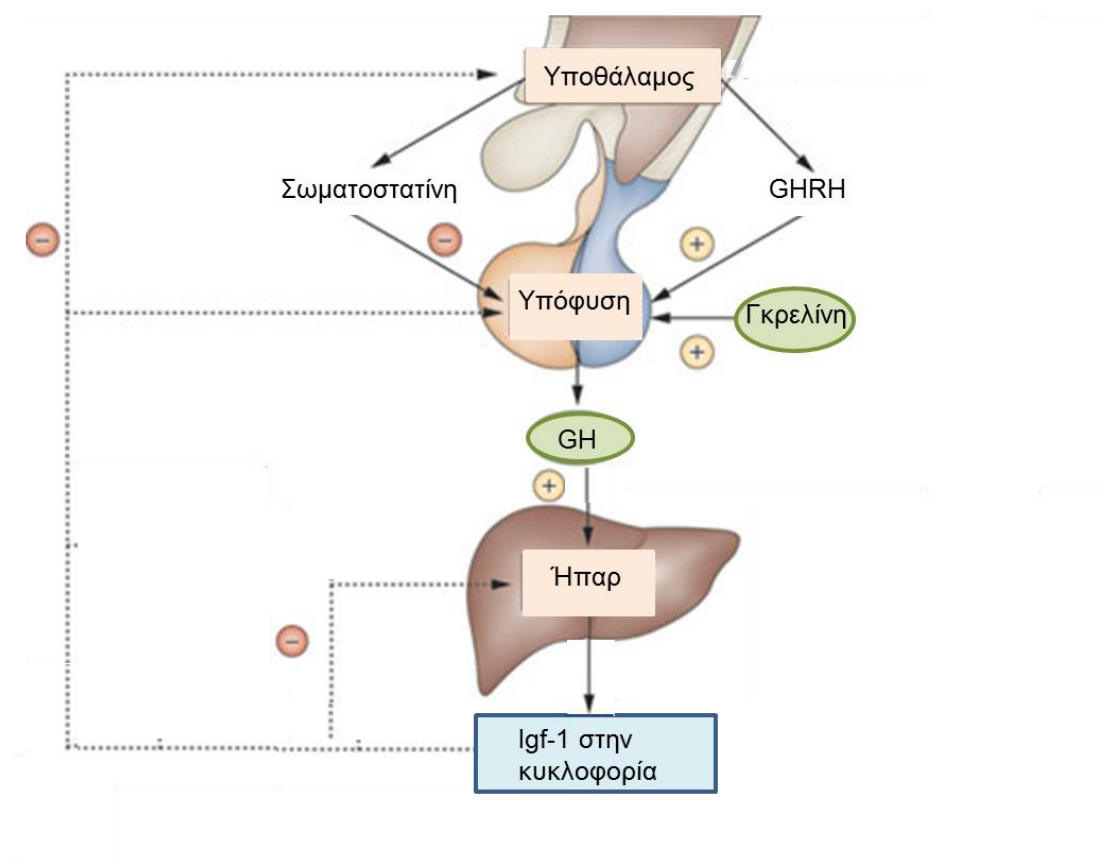
2.3 Αυξητική ορμόνη

2.3.1 Γενικά – παραγωγή της αυξητικής ορμόνης

Ήδη από το 1921 οι παρατηρήσεις των Evans και Long (Evans and Long, 1921) ότι η χορήγηση σε αρουραίους ενός εκχυλίσματος από υπόφυση βοοειδών οδηγούσε σε αύξηση του μεγέθους τους, οδήγησαν στη διαμόρφωση της υπόθεσης για την πιθανή ύπαρξη ενός παράγοντα ο οποίος είναι υπεύθυνος για την κατά μήκος αύξηση ενός οργανισμού. Χρειάστηκαν λίγο περισσότερα από 30 χρόνια για να καταστεί το 1956 δυνατή η απομόνωση του παράγοντα αυτού από την ανθρώπινη υπόφυση και η χορήγησή του ως θεραπεία σε ασθενείς που έπασχαν από νανισμό (Raben, 1958). Στις δεκαετίες που ακολούθησαν, η καλύτερη απομόνωση και μελέτη του παράγοντα αυτού οδήγησε στην περιγραφή της γνωστής σε όλους μας σήμερα αυξητικής ορμόνης (ή αλλιώς σωματοτροπίνη ή growth hormone ή GH) (Li and Dixon, 1971).

Η κύρια μορφή της αυξητικής ορμόνης η οποία έχει βάρος 22 kDa παράγεται από τα σωματοτρόπα κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης (αδενοϋπόφυση) από το γονίδιο GH1 και εκκρίνεται κατά ώσεις στη συστηματική κυκλοφορία (Niall et al., 1971). Ο έλεγχος της παραγωγής και έκκρισης της αυξητικής ορμόνης από την υπόφυση γίνεται κυρίως μέσω ορμονών που παράγονται και εκκρίνονται από τον υποθάλαμο. Πιο συγκεκριμένα, η εκλυτική ορμόνη της αυξητικής ορμόνης (GHRH) επάγει την παραγωγή αυξητικής ορμόνης ενώ η σωματοστατίνη (SS) την αναστέλλει (Murray and Clayton, 2013; Tsaneva-Atanasova et al., 2007). Επίσης και άλλες ορμόνες ή μόρια που βρίσκονται στη συστηματική κυκλοφορία και φτάνουν είτε στον υποθάλαμο είτε στην υπόφυση μπορούν μέσω παλίνδρομων μηχανισμών να επηρεάσουν την παραγωγή της αυξητικής ορμόνης είτε θετικά είτε αρνητικά. Για παράδειγμα ο Igf-1 που παράγεται κυρίως στο ήπαρ ως απάντηση στην αυξητική

ορμόνη, προκαλεί (άμεσα και έμμεσα) αναστολή της παραγωγής επιπλέον αυξητικής ορμόνης, ενώ και άλλες ορμόνες όπως τα στεροειδή του φύλου, η κορτιζόλη, οι θυρεοειδικές ορμόνες, η γκρελίνη κλπ, μπορούν να έχουν τα ίδια ή τα αντίθετα αποτελέσματα (Εικόνα 2.2) (Devesa et al., 1992; Kojima et al., 1999; Steyn et al., 2016).



Εικόνα 2.2. Συνοπτική απεικόνιση της ρύθμισης της παραγωγής και έκκρισης της αυξητικής ορμόνης από την υπόφυση.

Η παραγόμενη στον υποθάλαμο εκλυτική ορμόνη της αυξητικής ορμόνης (GHRH), επιδρά στην υπόφυση διεγείροντας την παραγωγή και έκκριση της αυξητικής ορμόνης στη συστηματική κυκλοφορία. Ταυτόχρονα, η σωματοστατίνη που παράγεται στον υποθάλαμο, δρα στην υπόφυση επιφέροντας τα αντίθετα αποτελέσματα, δηλαδή καταστέλλοντας την παραγωγή και έκκριση αυξητικής ορμόνης. Η αυξητική ορμόνη που βγαίνει στην κυκλοφορία, επιδρά στο ήπαρ και σε άλλους ιστούς και οδηγεί στην παραγωγή Igf-1. Με τη σειρά του ο Igf-1, πέραν των διαφόρων δράσεων που έχει στους ιστούς-στόχους, ασκεί αρνητική παλινδρομη ρύθμιση στην παραγωγή της αυξητικής ορμόνης τόσο έμμεσα (στο επίπεδο του υποθαλάμου) όσο και άμεσα (στο επίπεδο της υπόφυσης) ενώ μειώνει και την παραγωγή του ίδιου από το ήπαρ. Αντίστοιχα, άλλες ορμόνες και μόρια που βρίσκονται στην κυκλοφορία, όπως η παραγόμενη από το στομάχι γκρελίνη, επιδρούν είτε θετικά είτε αρνητικά στην παραγωγή της αυξητικής ορμόνης.

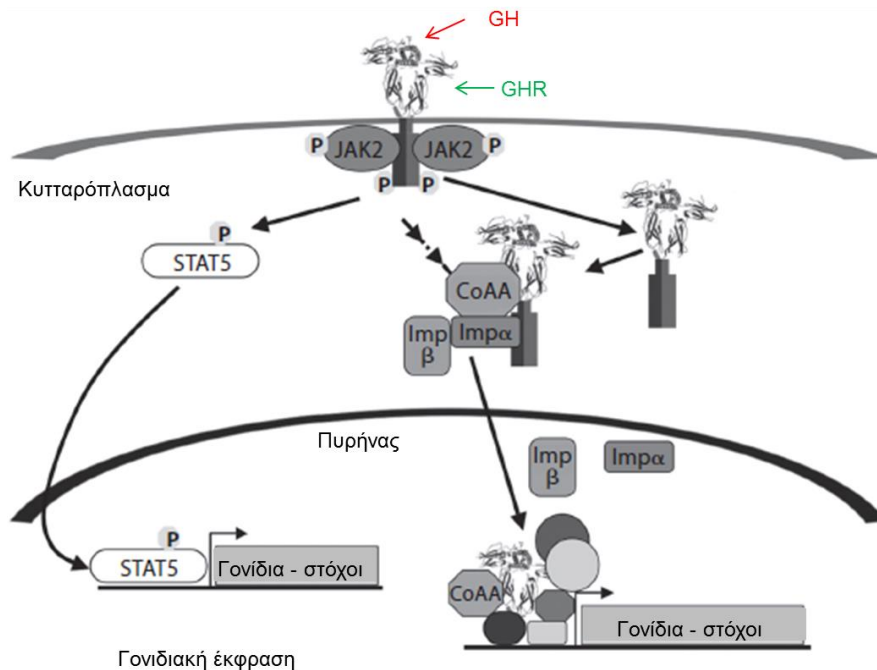
[Μετάφραση και τροποποίηση από τους (Rees and Mak, 2011)]

Ταυτόχρονα, μια παραλλαγή της αυξητικής ορμόνης η οποία ονομάζεται GH-V παράγεται στον πλακούντα από το γονίδιο GH2 κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης (Lewis et al., 1978). Τέλος, η αυξητική ορμόνη και διάφορες ισομορφές της έχει βρεθεί ότι εκφράζονται πρακτικά σε όλα τα κύτταρα και τους ιστούς του οργανισμού τόσο στην ενήλικη ζωή όσο και κατά την εμβρυική ανάπτυξη ακόμη και στα πολύ

αρχικά στάδιά της (Devesa et al., 2016; Harvey, 2010; Harvey et al., 2000). Για παράδειγμα η αυξητική ορμόνη έχει βρεθεί να παράγεται στο νευρικό σύστημα (Kyle et al., 1981; Lechan et al., 1983; Yoshizato et al., 1998), στο αναπαραγωγικό σύστημα (Mol et al., 1995; Schwarzler et al., 1997; Untergasser et al., 1998; Untergasser et al., 1997), στο λεμφικό ιστό (Baxter et al., 1991; Kao et al., 1992a; Maggiano et al., 1994; Wu et al., 1996), στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Baxter et al., 1991; Costoya et al., 1996; Kao et al., 1992b; Kooijman et al., 1997a; Kooijman et al., 1997b; Lytras et al., 1993; Palmetshofer et al., 1995; Varma et al., 1993), στην καρδιά, στο ήπαρ, στον πωρό (Yang et al., 1999), στο κόλον, στο νεφρό, στο δέρμα, στους πνεύμονες, στους ινοβλάστες στο δέρμα, στους μύες, στα αγγεία, στους σιελογόνους αδένες (Kyle et al., 1981; Palmetshofer et al., 1995; Tresguerres et al., 1999; Wu et al., 1996) κ.ο.κ.

2.3.2 Δράσεις της αυξητικής ορμόνης

Συνοπτικά, η αυξητική ορμόνη θα μπορούσε να περιγραφεί ως «μια μεταβολική ορμόνη η οποία προκαλεί υπεργλυκαιμία, λιπόλυση και αναβολισμό των πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, επάγει την έκκριση πολλών άλλων αυξητικών παραγόντων [κυρίως του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα (IGF-1)] και έχει άμεσες επιπτώσεις στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαφοροποίηση και την κυτταρική επιβίωση. Οι επιπτώσεις της αυξητικής ορμόνης στη σωματική αύξηση πιθανότατα είναι αποτέλεσμα της μεταβολικής επαγωγής της έκφρασης άλλων αυξητικών παραγόντων και της ενίσχυσης του πολλαπλασιασμού σε συγκεκριμένες χρονικές περιόδους κατά τη διάρκεια της ζωής ενός οργανισμού» (Devesa et al., 2016). Από μοριακή απόψεως, η αυξητική ορμόνη συνδέεται στο μεμβρανικό υποδοχέα της (Growth Hormone Receptor ή GHR) και ενεργοποιεί διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια με προεξάρχον αυτό των JAK2/STAT5b (Chia, 2014). Έπειτα, ο ενεργοποιημένος υποδοχέας της αυξητικής ορμόνης ενδοκυτταρώνεται και μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου όπου ρυθμίζει την έκφραση διαφόρων γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική αύξηση (Εικόνα 2.3) (Waters and Brooks, 2012).



Εικόνα 2.3. Η σηματοδότηση της αυξητικής ορμόνης μέσω του υποδοχέα της.

Η πρόσδεση της αυξητικής ορμόνης (GH) στον υποδοχέα της (GHR) οδηγεί στην ενεργοποίηση του κλασικού μονοπατιού JAK/STAT. Εν συνεχεία η μεταφορά του μεταγραφικού παράγοντα STAT5 στον πυρήνα του κυττάρου και η πρόσδεσή του στις αντίστοιχες αλληλουχίες του DNA, επάγει τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων. Σε συγκεκριμένες συνθήκες ωστόσο, όπως για παράδειγμα κατά τον έντονο πολλαπλασιασμό ενός κυτταρικού πληθυσμού, το σύμπλοκο GH-GHR μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου κι έπειτα στον πυρήνα (μέσω ειδικών συστημάτων μεταφοράς όπως αυτά που περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες CoAA και τις ιμπορτίνες α και β) όπου δρα ως μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων που ελέγχουν και προάγουν τον κυτταρικό κύκλο.

[Μετάφραση και τροποποίηση από τους (Conway-Campbell et al., 2008)]

Η αυξητική ορμόνη, μέσω πληθώρας ενδοκρινών, παρακρινών και αυτοκρινών μηχανισμών, ασκεί πλειοτροπική δράση σε όλους πρακτικά τους ιστούς ενός οργανισμού, κοινή συνισταμένη των οποίων είναι η προαγωγή της αύξησης. Οι δράσεις αυτές πραγματοποιούνται είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω της παραγωγής Igf-1. Συνοπτικά, οι κύριες επιδράσεις της αυξητικής ορμόνης στους επιμέρους ιστούς είναι οι εξής:

- **Σωματική αύξηση:** Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η αυξητική ορμόνη είναι ο κύριος παράγοντας που οδηγεί τη σωματική αύξηση μετά τη γέννηση. Πέραν της κατά μήκος αύξησης του οργανισμού, η αυξητική ορμόνη δρα ως τροφικός παράγοντας σε όλα σχεδόν τα όργανα, οδηγώντας στην αύξηση του μεγέθους τους παράλληλα με την αύξηση του σωματικού μεγέθους (Devesa et al., 2010).

- **Εμβρυική ανάπτυξη:** Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, η αυξητική ορμόνη δεν επηρεάζει την κατά μήκος σωματική αύξηση του εμβρύου (Waters and Kaye, 2002). Ωστόσο έχει αποδειχτεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη σωστή ανάπτυξη και οργανογένεση του εμβρύου, διαδικασίες οι οποίες επηρεάζουν σημαντικά και τη μετέπειτα εξέλιξη του ενήλικου οργανισμού (Oberbauer, 2015) .
- **Οστά - χόνδρος:** Η αυξητική ορμόνη δρα στα χονδροκύτταρα της αυξητικής πλάκας των οστών προάγοντας την κατά μήκος αύξησή τους και κατ'επέκταση την κατά μήκος αύξηση του οργανισμού (Isaksson et al., 1982; Parker et al., 2007). Ταυτόχρονα, η αυξητική ορμόνη ρυθμίζει συνολικά τη φυσιολογία και το μεταβολισμό των οστών προωθώντας την ανανέωσή τους και αυξάνοντας την οστική τους πυκνότητα (Tritos and Klibanski, 2016; Yakar et al., 2010).
- **Ήπαρ:** Από τη μία μεριά, η αυξητική ορμόνη παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιπιδίων στο ήπαρ και την έκκρισή τους από αυτό στην κυκλοφορία του αίματος, με συνέπεια η διαταραχή της σηματοδότησης της αυξητικής ορμόνης στο ήπαρ να οδηγεί σε ηπατική στεάτωση (Fan et al., 2009; Sos et al., 2011). Από την άλλη μεριά, η αυξητική ορμόνη ενισχύει την αναγέννηση του ήπατος μετά από κάποια βλάβη είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω της παραγωγής του ηπατικού αυξητικού παράγοντα (Cui et al., 2007; Ekberg et al., 1992). Επιπλέον ενισχύει την πρόσληψη και αποθήκευση τριγλυκεριδίων στο ήπαρ μέσω της αύξησης της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης και της ηπατικής λιπάσης (Oscarsson et al., 1999a; Wang et al., 2007). Τέλος, αυξάνει την ηπατική παραγωγή γλυκόζης μέσω της αύξησης της γλυκογονόλυσης πιθανότατα συνεπικουρούμενη από μια μικρή διεγερτική δράση της στη νεογλυκογένεση (Fan et al., 2009; Hoybye et al., 2008).
- **Επινεφρίδια:** Η αυξητική ορμόνη έχει δείχτεί ότι ενισχύει τη στεροειδογένεση από τα επινεφρίδια (Balducci et al., 1998; Isidori et al., 2003).
- **Καρδιαγγειακό σύστημα:** Η αυξητική ορμόνη παίζει πολύ σημαντικό ρόλο τόσο στην ανάπτυξη της καρδιάς κατά τη διαδικασία της οργανογένεσης στην εμβρυική ζωή όσο και στη φυσιολογική δομή και λειτουργία της κατά την ενήλικη ζωή, ρυθμίζοντας πολλές επιμέρους διεργασίες όπως το μέγεθος της καρδιάς, η δομή, η συσταλτικότητα, ο καρδιακός μεταβολισμός, η απόπτωση

των καρδιακών μυοκυττάρων, η ίνωση κοκ (Bruel and Oxlund, 1995; Li et al., 1997; Mayoux et al., 1993; Sacca et al., 1994; Timsit et al., 1990).

Ταυτόχρονα, η αυξητική ορμόνη επηρεάζει και τη διαδικασία της αγγειογένεσης καθώς επίσης και τη φυσιολογική λειτουργία των αγγείων μέσω ποικίλων μηχανισμών (Castellano et al., 2009; Clapp et al., 2009; Isgaard et al., 2015). Ρυθμίζει τον τόνο των αγγείων μέσω της έκκρισης μονοξειδίου του αζώτου (NO), της παρεμπόδισης του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης λείων μυικών κυττάρων στα τοιχώματα του αγγείου, της μείωσης της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων και της μείωσης της οξειδωμένης LDL (Capaldo et al., 2001; Muniyappa et al., 1997; Napoli et al., 2002). Επιπλέον δρα στα ενδοθηλιακά κύτταρα είτε άμεσα είτε μέσω της έκκρισης του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και το σχηματισμό τριχοειδών στα πλαίσια της νεοαγγειογένεσης (Brunet-Dunand et al., 2009; Frerich et al., 2005; Rymaszewski et al., 1991; Struman et al., 1999).

- **Λιπώδης ιστός:** Η αυξητική ορμόνη μέσω της αύξησης της δραστηριότητας της ορμονο-ευαίσθητης λιπάσης (η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε αυξημένη λιπόλυση) αλλά και μέσω της πιθανής διέγερσης της έκκρισης λιποκινών, οδηγεί σε μείωση της μάζας κυρίως του σπλαχνικού λιπώδους ιστού (Johansen et al., 2003; List et al., 2013). Επίσης καταστέλλει τη de novo σύνθεση λιπαρών οξέων στο λιπώδη ιστό, καταστέλλοντας έτσι την εναπόθεση λιπιδίων σε αυτόν (Harris et al., 1993). Παράλληλα, εμποδίζει την δράση της ινσουλίνης στο λιπώδη ιστό καθώς και την πρόσληψη γλυκόζης από αυτόν (Vijayakumar et al., 2010). Τέλος, έχει δειχτεί ότι η αυξητική ορμόνη επηρεάζει και τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και το γήρας των πρόδρομων μορφών των λιποκυττάρων (Berryman et al., 2013).
- **Σκελετικοί μύες:** Η αυξητική ορμόνη επηρεάζει τη φυσιολογική ανάπτυξη των σκελετικών μυών μέσω ποικίλων μηχανισμών όπως η αύξηση της πρόσληψης αμινοξέων και της σύνθεσης πρωτεϊνών, ο πολλαπλασιασμός και η σύντηξη μυικών ινών για το σχηματισμό μυοσωλήνων κοκ (Mavalli et al., 2010; Sotiropoulos et al., 2006; Ullman and Oldfors, 1989; Weber, 2002). Παράλληλα αυξάνει την πρόσληψη και αποθήκευση τριγλυκεριδίων κυρίως μέσω της αύξησης της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης, ενώ μειώνει την προκαλούμενη από την ινσουλίνη πρόσληψη γλυκόζης (Cho et al., 2006;

Khalfallah et al., 2001; Oscarsson et al., 1999b). Τέλος, η απώλεια μυϊκής μάζας (σαρκοπενία) που παρατηρείται κατά το γήρας έχει συσχετιστεί με τα μειωμένα επίπεδα αυξητικής ορμόνης και Igf-1 στον ορό των ηλικιωμένων ατόμων (Deschenes, 2004).

- **Νεφροί:** Στους νεφρούς η αυξητική ορμόνη αυξάνει το ρυθμό σπειραματικής διήθησης (GFR) καθώς και τη νεφρική ροή πλάσματος (Hirschberg and Korpple, 1989). Επίσης αυξάνει την κατακράτηση νατρίου καθώς και τα επίπεδα διττανθρακικών στο πλάσμα επηρεάζοντας έτσι και το pH του αίματος (Sicuro et al., 1998).
- **Αιμοποιητικό σύστημα:** Η αυξητική ορμόνη φαίνεται να παίζει ρόλο και στη διαδικασία της αιμοποίησης, εξασφαλίζοντας τη φυσιολογική διαφοροποίηση και λειτουργία των κυττάρων του αίματος. Η εξωγενής χορήγηση αυξητικής ορμόνης οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων, της αιμοσφαιρίνης και του αιματοκρίτη, καθώς και του αριθμού των λευκοκυττάρων, υποδηλώνοντας ένα γενικότερο υποστηρικτικό ρόλο προς τη φυσιολογική αιμοποίηση, παρόμοιο με αυτόν του διεγερτικού παράγοντα αποικιών των κοκκιοκυττάρων (G-CSF) (Carlo-Stella et al., 2004; Meazza et al., 2009).
- **Ανοσοποιητικό σύστημα:** Η σημασία της αυξητικής ορμόνης στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος φαίνεται και από το γεγονός ότι τόσο η αυξητική ορμόνη, όσο και ο Igf-1 αλλά και η GHRH παράγονται τοπικά σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ επίσης στα ίδια κύτταρα εντοπίζεται και ο υποδοχέας της αυξητικής ορμόνης. Είναι μάλιστα ενδιαφέρουσα η παρατήρηση ότι στο εσωτερικό πολλών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος εντοπίζονται μορφές της αυξητικής ορμόνης μεγαλύτερου μοριακού βάρους από το συνηθισμένο (22 kDa), χωρίς ωστόσο να είναι γνωστή ακόμη η σημασία της παρατήρησης αυτής (Weigent, 2011). Είναι πλέον γνωστό ότι όλοι αυτοί οι παράγοντες, μέσω ενδοκρινών, αυτοκρινών, παρακρινών και διακρινών μηχανισμών επηρεάζουν και ρυθμίζουν διάφορες ανοσολογικές λειτουργίες (Weigent, 2013). Για παράδειγμα η αυξητική ορμόνη προάγει την ωρίμανση και ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων, ενισχύοντας την αντιγονοπαρουσιαστική τους δράση (Liu et al., 2015). Επίσης επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των λεμφοκυττάρων καθώς και την παραγωγή από αυτά κυτταροκινών όπως η ιντερφερόνη-γ και η ιντερλευκίνη 10 (Farmer and Weigent, 2006; Malarkey

et al., 2002; Weigent et al., 1991). Τέλος έχειδειχτεί ότι η οξειδοαναγωγική κατάσταση ενός λεμφοκυττάρου ως αποτέλεσμα της αναγνώρισης ενός παθογόνου επηρεάζει τα ενδοκυττάρια επίπεδα αυξητικής ορμόνης τα οποία με τη σειρά τους μπορούν να επηρεάσουν την απάντηση του κυττάρου στο παθογόνο (Weigent, 2011).

- **Νευρικό σύστημα:** Η αυξητική ορμόνη φαίνεται να ασκεί μια σειρά από θετικές επιδράσεις τόσο στο κεντρικό όσο και στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Καταρχήν, παίζει σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης στη διαμόρφωση του μεγέθους και της μορφολογίας του κεντρικού νευρικού συστήματος (Lobie et al., 2000). Επίσης, ενισχύει τη νευρογένεση τόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες όσο και στα πλαίσια της αποκατάστασης ενός τραύματος (πχ μετά από ένα εγκεφαλικό) (Aberg, 2010), επηρεάζοντας σε σημαντικό βαθμό τις γνωσιακές λειτουργίες (Nyberg and Hallberg, 2013). Επιπλέον επηρεάζει, με διαφορετικό τρόπο σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου, την παραγωγή και έκκριση των σημαντικότερων νευροδιαβιβαστών όπως η μοναμίνες (σεροτονίνη, νοραδρεναλίνη), το ντοπαμινεργικό σύστημα, το σύστημα των οπιοειδών, το χολινεργικό σύστημα και το γλουταματεργικό σύστημα (Andersson et al., 1983; Araujo et al., 1989; Le Greves et al., 2005; Stern et al., 1975). Τέλος, σε ότι αφορά τη δράση της αυξητικής ορμόνης στο περιφερικό νευρικό σύστημα, έχει αποδειχτεί ότι ενισχύει την επανανεύρωση των μυών και την επαναμυελίνωση των νευρών μετά από τραύμα (Devesa et al., 2012; Tuffaha et al., 2016).
- **Αναπαραγωγικό σύστημα:** Στο αρσενικό φύλο, η αυξητική ορμόνη σε συνεργασία με τις γοναδοτροπίνες προάγει την ανάπτυξη και την αύξηση του μεγέθους των όρχεων, ενώ παράλληλα διεγείρει τη γαμετογένεση και τη στεροειδογένεση (Laron and Klinger, 1998; Nguyen et al., 1996). Στο θηλυκό φύλο, η αυξητική ορμόνη έχει ποικίλες δράσεις. Αρχικά επηρεάζει την παραγωγή προγεστερόνης και οιστραδιόλης (Doldi et al., 1996; Karamouti et al., 2008; Sirotkin et al., 2000), ενώ πιθανότατα εμπλέκεται και στη στεροειδογένεση που πραγματοποιείται στις ωοθήκες (Chase et al., 1998). Επίσης επηρεάζει τον αριθμό, την ωρίμανση και το μέγεθος των ωοθυλακίων καθώς και την ωορρηξία (Bachelot et al., 2002; Hull and Harvey, 2001; Slot et al., 2006). Παράλληλα, επιταχύνει την ωρίμανση του πυρήνα του ωαρίου, επηρεάζοντας έτσι θετικά την ποιότητά του (Kiapekou et al., 2005; Menezo

et al., 2006). Τέλος, κατά τα πολύ αρχικά στάδια της εγκυμοσύνης και πριν ο πλακούντας ξεκινήσει να παράγει προγεστερόνη, η αυξητική ορμόνη φαίνεται να δρα στα κύτταρα του ωχρού σωματίου ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό τους και εμποδίζοντας την απόπτωσή τους (Lobie et al., 1990).

- **Μεταβολισμός των πρωτεϊνών:** Η αυξητική ορμόνη εμφανίζει ξεκάθαρες αναβολικές δράσεις σε ότι αφορά το μεταβολισμό των πρωτεϊνών, καθώς διεγείρει την πρωτεϊνική σύνθεση και καταστέλλει την πρωτεϊνική αποδόμηση (Gibney et al., 2007; Giovannini et al., 2008; Mauras et al., 2000).
- **Μεταβολισμός των υδατανθράκων:** Η δράση της αυξητικής ορμόνης σε ότι αφορά το μεταβολισμό των υδατανθράκων είναι αντίθετη από αυτήν της ινσουλίνης, προκαλώντας αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Η δράση αυτή της αυξητικής ορμόνης διαμεσολαβείται από τις επιμέρους επιδράσεις της στους σημαντικότερους από μεταβολικής απόψεως ιστούς, δηλαδή το ήπαρ, το λιπώδη ιστό και τους σκελετικούς μύες (όπως περιγράφηκαν παραπάνω) (Vijayakumar et al., 2010).

2.4 Πειραματικά πρότυπα ποντικών για τη μελέτη της φυσιολογίας της σωματικής αύξησης και της αυξητικής ορμόνης

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η αυξητική ορμόνη αποτελεί τον κύριο παράγοντα που ρυθμίζει τη σωματική αύξηση κυρίως από τη γέννηση κι έπειτα. Για τη μελέτη λοιπόν του ρόλου της στη σωματική αύξηση, τόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε παθολογικές καταστάσεις, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα μοντέλα (ζωικά πρότυπα) ποντικών τα οποία είτε εμφανίζουν έλλειψη ή μειωμένη δράση της αυξητικής ορμόνης είτε υπερεκφράζουν την αυξητική ορμόνη (Bartke et al., 2002; Gahete et al., 2016). Για τη δημιουργία των προτύπων αυτών έχουν αξιοποιηθεί κατά βάση οι κλασικές μέθοδοι που αναφέρθηκαν και στην παράγραφο 1.5 του παρόντος κειμένου (γενετική αποσιώπηση με τη χρήση του συστήματος του Cre-Lox ανασυνδυασμού και υπερέκφραση γονιδίων στόχων είτε μέσω της δημιουργίας διαγονιδιακών ποντικών είτε μέσω της χρήσης του Cre-Lox ανασυνδυασμού), με τις διάφορες παραλλαγές – βελτιώσεις τους. Παράλληλα, όπως θα αναφερθεί στη συνέχεια, κάποια από τα πρότυπα ποντικών προέκυψαν ως αποτέλεσμα τυχαίων μεταλλάξεων.

2.4.1 Πειραματικά πρότυπα έλλειψης – ανεπάρκειας της αυξητικής ορμόνης

Με τον όρο ανεπάρκεια της αυξητικής ορμόνης αναφέρονται παθολογικές καταστάσεις στις οποίες είτε α) τα παραγόμενα επίπεδα της αυξητικής ορμόνης είναι χαμηλότερα των απαιτούμενων ώστε να υποστηριχθεί η φυσιολογική ανάπτυξη (Growth Hormone Research, 2000; Ho and Participants, 2007) είτε β) τα παραγόμενα επίπεδα της αυξητικής ορμόνης είναι φυσιολογικά (ή ακόμη και αυξημένα) αλλά οι ιστοί-στόχοι δεν ανταποκρίνονται σε αυτήν -εμφανίζεται δηλαδή αντοχή στην αυξητική ορμόνη- με αποτέλεσμα και σε αυτήν την περίπτωση να μην υποστηρίζεται η φυσιολογική αύξηση (Baumann, 2002).

Μέχρι στιγμής έχουν δημιουργηθεί διάφορα πρότυπα ποντικών τα οποία εμφανίζουν ανεπάρκεια της αυξητικής ορμόνης:

A) Μειωμένη παραγωγή αυξητικής ορμόνης:

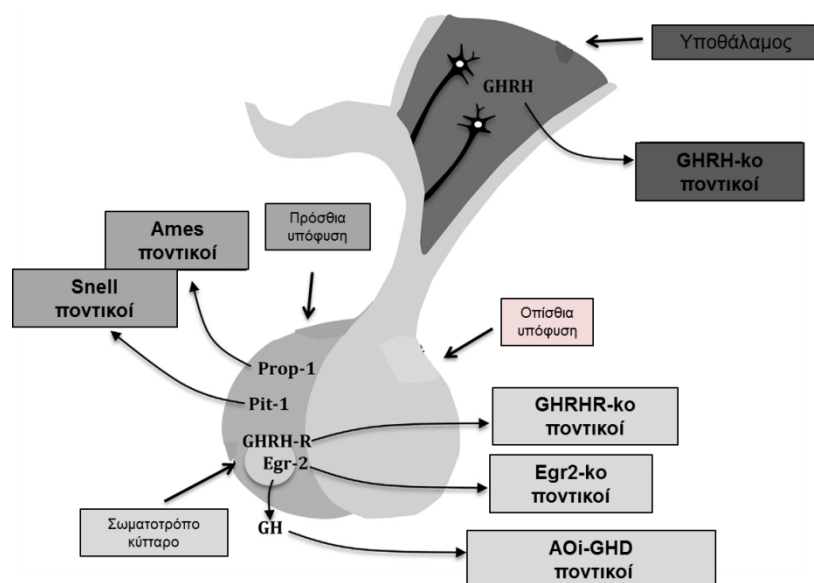
Στον πίνακα 2.1 παρουσιάζονται τα σημαντικότερα πειραματικά πρότυπα ποντικών τα οποία παρουσιάζουν ανεπάρκεια της αυξητικής ορμόνης λόγω μειωμένης (έως και καθόλου) παραγωγής της από την υπόφυση είτε λόγω μη διέγερσης των σωματοτρόπων κυττάρων από τον υποθάλαμο μέσω της εκλυτικής ορμόνης της αυξητικής ορμόνης είτε μέσω της αδυναμίας παραγωγής αυξητικής ορμόνης είτε μέσω της καταστροφής των σωματοτρόπων κυττάρων (Εικόνα 2.4).

Πίνακας 2.1. Τα βασικότερα πρότυπα ποντικών που παρουσιάζουν ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης λόγω μη παραγωγής της ή μειωμένης παραγωγής της.

Πρότυπο ποντικού	Μηχανισμός	Αναφορά
GHRH-ko	γενετική αποσιώπηση της εκλυτικής ορμόνης της αυξητικής ορμόνης	(Alba and Salvatori, 2004)
GHRHR-ko	μετάλλαξη στον υποδοχέα της εκλυτικής ορμόνης της αυξητικής ορμόνης	(Eicher and Beamer, 1976)
Ames dwarf	μετάλλαξη στο γονίδιο Prop-1*	(Andersen et al., 1995; Sornson et al., 1996)
Snell dwarf	μετάλλαξη στο γονίδιο POU1F1**	(Eicher and Beamer, 1980; Snell, 1929)
AOiGHD	εκλεκτική καταστροφή των σωματοτρόπων κυττάρων της υπόφυσης μετά την ενηλικίωση	(Luque et al., 2011)
Egr2-ko	εκλεκτική καταστροφή των σωματοτρόπων κυττάρων της υπόφυσης μετά τη γέννηση	(Bouchoucha et al., 2013)

*Το γονίδιο Prop-1 (Prophet of PIT-1) κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PROP1 η οποία έχει την ικανότητα να προσδένεται στο DNA και να δρα ως μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος διαδραματίζει σημαντικότατο ρόλο στην οντογένεση των σωματοτρόπων, λακτοτρόπων, γοναδοτρόπων και θυρεοειδοτρόπων κυττάρων της υπόφυσης (Davis et al., 2016).

****Το γονίδιο POU1F1 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PIT-1 η οποία δρα ως μεταγραφικός παράγοντας και ρυθμίζει την ανάπτυξη των σωματοτρόπων, λακτοτρόπων και θυρεοειδοτρόπων κυττάρων της υπόφυσης (Tatsumi and Amino, 1999)**
[Μετάφραση και τροποποίηση από τους (Gahete et al., 2016)]



Εικόνα 2.4. Γραφική απεικόνιση των ρυθμιστικών στοιχείων τα οποία είτε έχουν μεταλλαχθεί είτε έχουν τροποποιηθεί γενετικά για τη δημιουργία προτύπων ποντικών με ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης.
[Μετάφραση και τροποποίηση από τους (Gahete et al., 2016)]

Κοινά χαρακτηριστικά όλων των παραπάνω ποντικών αποτελούν η μειωμένη έως και απύουσα αυξητική ορμόνη και η εν συνεχεία μείωση των επιπέδων του Igf-1 στην κυκλοφορία, το μειωμένο βάρος και μήκος σώματος (με εξαίρεση τους AOi-GHD ποντικούς στους οποίους η ανεπάρκεια της αυξητικής ορμόνης εμφανίζεται στην ενήλικη ζωή και αφού οι επιφυσιικές πλάκες έχουν κλείσει) καθώς και διαταραχές στο μεταβολισμό των υδατανθράκων αλλά και την αναλογία λιπώδους – μη λιπώδους ιστού, ενώ όλοι παρουσίασαν μια μικρότερη ή μεγαλύτερη αύξηση της διάρκειας ζωής (με εξαίρεση πιθανώς τους AOi-GHD και Egr2-ko ποντικούς). Παράλληλα, με μικρές διαφορές μεταξύ του κάθε προτύπου (συναρτήσει του μεγέθους της μείωσης της αυξητικής ορμόνης, των ταυτόχρονων διαταραχών σε άλλες ορμόνες, της ηλικίας εμφάνισης της ανεπάρκειας στην αυξητική ορμόνη κλπ.), παρουσιάστηκαν διαταραχές και σε άλλες παραμέτρους της φυσιολογίας όπως στη γονιμότητα, την πρόσληψη τροφής, τη συμπεριφορά, το μεταβολισμό των οστών, τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, τη θερμορύθμιση κλπ. (Gahete et al., 2016).

B) Αντοχή στην αυξητική ορμόνη:

Ως αντοχή στην αυξητική ορμόνη ορίζεται η παθολογική κατάσταση στην οποία ενώ υπάρχουν φυσιολογικά ή ακόμη και αυξημένα επίπεδα αυξητικής ορμόνης στη συστηματική κυκλοφορία, εντούτοις η ορμόνη δε δρα στους ιστούς στόχους, συνήθως λόγω διαταραχών στον υποδοχέα της. Αντίσταση στην αυξητική ορμόνη παρουσιάζουν διάφορα πειραματικά πρότυπα ποντικών στους οποίους έχει απαλειφθεί γενετικά ο υποδοχέας της αυξητικής ορμόνης (GHR) ή υπερεκφράζουν έναν ανταγωνιστή του υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης. Η αντίσταση αυτή μπορεί να είναι συνολική όταν για παράδειγμα ο υποδοχέας της αυξητικής ορμόνης έχει απαλειφθεί από όλο τον οργανισμό του ποντικού ή ιστοειδική όταν ο υποδοχέας έχει απαλειφθεί από ένα συγκεκριμένο ιστό ή από ένα συγκεκριμένο τύπο κυττάρων (Baumann, 2002). Στον πίνακα 2.2 παρουσιάζονται τα σημαντικότερα πειραματικά πρότυπα ποντικών τα οποία παρουσιάζουν αντοχή στην αυξητική ορμόνη λόγω απάλειψης του GHR.

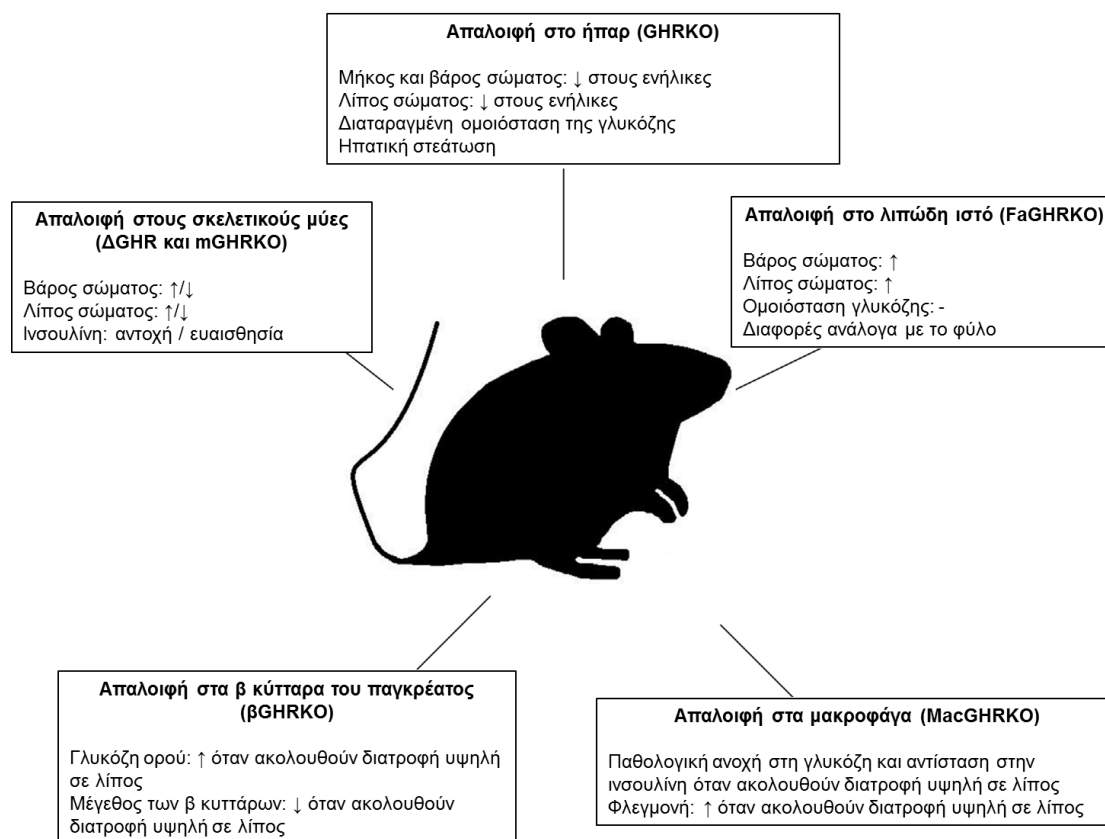
Πίνακας 2.2. Τα σημαντικότερα και ευρύτερα χρησιμοποιούμενα πειραματικά πρότυπα ποντικών που παρουσιάζουν είτε γενικευμένη (GHRKO) είτε ιστοειδική (όλα τα υπόλοιπα) αντοχή στην αυξητική ορμόνη.

Πρότυπο ποντικού	Ιστοειδικότητα	Αναφορά
GHRKO	Καμία	(Zhou et al., 1997)
GHRLD	Ήπαρ	(Fan et al., 2009)
LiGHRKO	Ήπαρ	(List et al., 2014)
ΔGHR*	σκελετικοί μύες στον ενήλικο	(Mavalli et al., 2010)
mGHRKO*	σκελετικοί μύες σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια	(Bruning et al., 1998)
FaGHRKO	λιπώδης ιστός	(List et al., 2013)
βGHRKO	β-κύτταρα του παγκρέατος	(Wu et al., 2011)
MacGHRKO	Μακροφάγα	(Lu et al., 2013)

*Οι διαφορές μεταξύ των δύο προτύπων ποντικών οφείλονται στους διαφορετικούς υποκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία τους.
[Μετάφραση και τροποποίηση από τους (Young et al., 2016)]

Η συνολική απάλειψη του GHR από όλους τους ιστούς του ποντικού οδηγεί σε φαινότυπο παρόμοιο με αυτό των ποντικών που παρουσιάζουν έλλειψη της αυξητικής ορμόνης, ήτοι μείωση του βάρους και του μήκους σώματος, αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη και βελτιωμένο μεταβολισμό των υδατανθράκων, αλλαγμένη αναλογία λιπώδους – μη λιπώδους ιστού καθώς και σημαντική αύξηση της διάρκειας

ζωής (Gahete et al., 2016). Παρόμοιο φαινότυπο παρουσιάζουν και οι διαγονιδιακοί ποντικοί GHA οι οποίοι υπερεκφράζουν έναν ανταγωνιστή του υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η πρόσδεση αυτής στον υποδοχέα της. Η μόνη σημαντική διαφορά τους είναι το γεγονός ότι δεν παρουσιάζουν αυξημένη διάρκεια ζωής, πιθανότατα λόγω της έντονης παχυσαρκίας που παρουσιάζουν (Berryman et al., 2014). Από την άλλη πλευρά, η ιστοειδική απαλοιφή του GHR έχει ποικίλες επιπτώσεις ανάλογα με τον ιστό στον οποίο πραγματοποιείται η απαλοιφή (Εικόνα 2.5) (Young et al., 2016).



Εικόνα 2.5. Συνοπτική απεικόνιση των σημαντικότερων φαινοτύπων που παρατηρούνται σε ποντικούς κατά την ιστοειδική απαλοιφή του υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης.
[Μετάφραση και τροποποίηση από τους (Young et al., 2016)]

2.4.2 Πειραματικά πρότυπα υπερέκφρασης της αυξητικής ορμόνης

Μελέτες γύρω από την αυξητική ορμόνη προερχόμενη από διαφορετικά ζώα (μεταξύ των οποίων και ο ποντικός) επιβεβαίωσαν ότι η αυξητική ορμόνη του αρουραίου, της αγελάδας και του προβάτου έχουν τη δυνατότητα να συνδεθούν και να ενεργοποιήσουν τον υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης του ποντικού, μιμούμενοι την πρόσδεση της αυξητικής ορμόνης του ποντικού. Βασική εξαίρεση αποτελεί η αυξητική ορμόνη του ανθρώπου η οποία πέραν του υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης

του ποντικού, συνδέεται και ενεργοποιεί ταυτόχρονα και τον υποδοχέα της προλακτίνης. (Posner et al., 1974).

Το 1982 λοιπόν, δημιουργήθηκε ο πρώτος διαγονιδιακός ποντικός ο οποίος υπερέκφραζε την αυξητική ορμόνη του αρουραίου στο ήπαρ του, με αποτέλεσμα πολύ ψηλά επίπεδα αυξητικής ορμόνης στη συστηματική του κυκλοφορία και δραματική αύξηση του μεγέθους του (Palmiter et al., 1982). Ακολούθησε η δημιουργία ποικίλων διαγονιδιακών ποντικών οι οποίοι υπερέκφραζαν κάποια από τις προαναφερθείσες αυξητικές ορμόνες είτε συστηματικά είτε σε συγκεκριμένους ιστούς (Bartke et al., 2002). Κύριο χαρακτηριστικό των περισσοτέρων από αυτούς αποτελεί η αύξηση του μεγέθους του σώματος αλλά και των οργάνων τους η οποία μπορεί να φτάσει ακόμη και το 100%, καθώς και η μείωση του λιπώδους ιστού τους (Bartke et al., 1994; Palmiter et al., 1982; Searle et al., 1992). Επιπλέον, σε διάφορους από αυτούς του ποντικούς έχουν περιγραφεί διαταραχές στο καρδιαγγειακό σύστημα (Bohlooly et al., 2001a; Bollano et al., 2000), το ανοσοποιητικό σύστημα (Gonzalo et al., 1996), τα οστά (Baker et al., 1992), τη συμπεριφορά και τη μνήμη (Bohlooly et al., 2001b; Meliska et al., 1997) καθώς και το αναπαραγωγικό τους σύστημα (Bartke et al., 2002). Παράλληλα, πολλοί από αυτούς τους ποντικούς στους οποίους η αυξητική ορμόνη είναι συστηματικά αυξημένη (και όχι μόνο τοπικά) παρουσιάζουν μειωμένη διάρκεια ζωής, ενώ μάλιστα τα επίπεδα της αυξητικής ορμόνης στο πλάσμα τους φαίνεται να σχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με τη διάρκεια ζωής τους (Bartke et al., 1998; Wolf et al., 1993). Τέλος, ιδιαίτερη μνεία πρέπει να γίνει στους διαγονιδιακούς ποντικούς που εκφράζουν την ανθρώπινη αυξητική ορμόνη η οποία πιθανότατα μέσω και της δράσης της στον υποδοχέα της προλακτίνης οδηγεί σε επιπλέον διαταραχές στους ιστούς που είναι ευαίσθητοι στη δράση της προλακτίνης όπως οι ιστοί του αναπαραγωγικού συστήματος και κυρίως οι μαστοί, ενώ επηρεάζει και τα επίπεδα τόσο της προλακτίνης όσο και των γοναδοτροπινών στην κυκλοφορία (Bartke et al., 1994).

2.5 Συμπεράσματα

Όπως φάνηκε από τα παραπάνω, η διαδικασία της σωματικής αύξησης αποτελεί μια σύνθετη διαδικασία στενά ρυθμιζόμενη από πολλούς παράγοντες. Πέραν όμως της απλής αύξησης του μεγέθους των οργάνων και του σώματος, η διαδικασία της σωματικής αύξησης προϋποθέτει και περιλαμβάνει τη ρύθμιση και ωρίμανση μια σειράς άλλων μηχανισμών που αφορούν το μεταβολισμό, το νευρικό σύστημα, το

ανοσοποιητικό σύστημα, το αναπαραγωγικό σύστημα κοκ. Από τη στιγμή της σύλληψης κι έπειτα, η αυξητική ορμόνη, είτε άμεσα είτε έμμεσα, διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο σε όλους αυτούς τους μηχανισμούς. Η χρήση των πειραματικών προτύπων ποντικών που αναφέρθηκαν μπορεί να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση της φυσιολογίας της έκκρισης και δράσης της αυξητικής ορμόνης όχι μόνο σε συστηματικό επίπεδο αλλά κυρίως σε ιστοειδικό επίπεδο (ή ακόμη και σε επίπεδο συγκεκριμένων κυττάρων), ώστε να αποκτηθεί η δυνατότητα στοχευμένης παρέμβασης για την αντιμετώπιση των όποιων παθολογικών καταστάσεων με το ελάχιστο δυνατό 'κόστος' σε ανεπιθύμητες ενέργειες.

Βιβλιογραφία

Aberg, D. (2010). Role of the growth hormone/insulin-like growth factor 1 axis in neurogenesis. *Endocrine development* 17, 63-76.

Alba, M., and Salvatori, R. (2004). A mouse with targeted ablation of the growth hormone-releasing hormone gene: a new model of isolated growth hormone deficiency. *Endocrinology* 145, 4134-4143.

Andersen, B., Pearce, R.V., 2nd, Jenne, K., Sornson, M., Lin, S.C., Bartke, A., and Rosenfeld, M.G. (1995). The Ames dwarf gene is required for Pit-1 gene activation. *Developmental biology* 172, 495-503.

Andersson, K., Fuxe, K., Eneroth, P., Isaksson, O., Nyberg, F., and Roos, P. (1983). Rat growth hormone and hypothalamic catecholamine nerve terminal systems. Evidence for rapid and discrete reductions in dopamine and noradrenaline levels and turnover in the median eminence of the hypophysectomized male rat. *European journal of pharmacology* 95, 271-275.

Araujo, D.M., Lapchak, P.A., Collier, B., Chabot, J.G., and Quirion, R. (1989). Insulin-like growth factor-1 (somatomedin-C) receptors in the rat brain: distribution and interaction with the hippocampal cholinergic system. *Brain research* 484, 130-138.

Bachelot, A., Monget, P., Imbert-Bollere, P., Coshigano, K., Kopchick, J.J., Kelly, P.A., and Binart, N. (2002). Growth hormone is required for ovarian follicular growth. *Endocrinology* 143, 4104-4112.

Baker, A.R., Hollingshead, P.G., Pitts-Meek, S., Hansen, S., Taylor, R., and Stewart, T.A. (1992). Osteoblast-specific expression of growth hormone stimulates bone growth in transgenic mice. *Molecular and cellular biology* 12, 5541-5547.

Balducci, R., Toscano, V., Larizza, D., Mangiantini, A., Galasso, C., Municchi, G., Di Rito, A., Picone, S., and Boscherini, B. (1998). Effects of long-term growth hormone therapy on adrenal steroidogenesis in Turner syndrome. *Hormone research* 49, 210-215.

Ballesteros, M., Leung, K.C., Ross, R.J., Iismaa, T.P., and Ho, K.K. (2000). Distribution and abundance of messenger ribonucleic acid for growth hormone receptor isoforms in human tissues. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85, 2865-2871.

Bartke, A., Brown-Borg, H.M., Bode, A.M., Carlson, J., Hunter, W.S., and Bronson, R.T. (1998). Does growth hormone prevent or accelerate aging? *Experimental gerontology* 33, 675-687.

Bartke, A., Cecim, M., Tang, K., Steger, R.W., Chandrashekar, V., and Turyn, D. (1994). Neuroendocrine and reproductive consequences of overexpression of growth hormone in transgenic mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 206, 345-359.

- Bartke, A., Chandrashekar, V., Bailey, B., Zaczek, D., and Turyn, D. (2002). Consequences of growth hormone (GH) overexpression and GH resistance. *Neuropeptides* 36, 201-208.
- Baumann, G. (2002). Genetic characterization of growth hormone deficiency and resistance: implications for treatment with recombinant growth hormone. *American journal of pharmacogenomics : genomics-related research in drug development and clinical practice* 2, 93-111.
- Baxter, J.B., Blalock, J.E., and Weigent, D.A. (1991). Expression of immunoreactive growth hormone in leukocytes in vivo. *Journal of neuroimmunology* 33, 43-54.
- Berryman, D.E., Glad, C.A., List, E.O., and Johannsson, G. (2013). The GH/IGF-1 axis in obesity: pathophysiology and therapeutic considerations. *Nature reviews Endocrinology* 9, 346-356.
- Berryman, D.E., Lubbers, E.R., Magon, V., List, E.O., and Kopchick, J.J. (2014). A dwarf mouse model with decreased GH/IGF-1 activity that does not experience life-span extension: potential impact of increased adiposity, leptin, and insulin with advancing age. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 69, 131-141.
- Bohlooly, Y.M., Carlson, L., Olsson, B., Gustafsson, H., Andersson, I.J., To Rnell, J., and Bergstro, M.G. (2001a). Vascular Function and Blood Pressure in GH Transgenic Mice. *Endocrinology* 142, 3317-3323.
- Bohlooly, Y.M., Olsson, B., Gritli-Linde, A., Brusehed, O., Isaksson, O.G., Ohlsson, C., Soderpalm, B., and Tornell, J. (2001b). Enhanced spontaneous locomotor activity in bovine GH transgenic mice involves peripheral mechanisms. *Endocrinology* 142, 4560-4567.
- Bollano, E., Omerovic, E., Bohlooly, Y.M., Kujacic, V., Madhu, B., Tornell, J., Isaksson, O., Soussi, B., Schulze, W., Fu, M.L., *et al.* (2000). Impairment of Cardiac Function and Bioenergetics in Adult Transgenic Mice Overexpressing the Bovine Growth Hormone Gene. *Endocrinology* 141, 2229-2235.
- Bouchoucha, Y.X., Charnay, P., and Gilardi-Hebenstreit, P. (2013). Ablation of Egr2-positive cells in male mouse anterior pituitary leads to atypical isolated GH deficiency. *Endocrinology* 154, 270-282.
- Bruel, A., and Oxlund, H. (1995). Biosynthetic growth hormone increases the collagen deposition rate in rat aorta and heart. *European journal of endocrinology* 132, 195-199.
- Brunet-Dunand, S.E., Vouyovitch, C., Araneda, S., Pandey, V., Vidal, L.J., Print, C., Mertani, H.C., Lobie, P.E., and Perry, J.K. (2009). Autocrine human growth hormone promotes tumor angiogenesis in mammary carcinoma. *Endocrinology* 150, 1341-1352.
- Bruning, J.C., Michael, M.D., Winnay, J.N., Hayashi, T., Horsch, D., Accili, D., Goodyear, L.J., and Kahn, C.R. (1998). A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Molecular cell* 2, 559-569.
- Capaldo, B., Guardasole, V., Pardo, F., Matarazzo, M., Di Rella, F., Numis, F., Merola, B., Longobardi, S., and Sacca, L. (2001). Abnormal vascular reactivity in growth hormone deficiency. *Circulation* 103, 520-524.
- Carlo-Stella, C., Di Nicola, M., Milani, R., Longoni, P., Milanesi, M., Bifulco, C., Stucchi, C., Guidetti, A., Cleris, L., Formelli, F., *et al.* (2004). Age- and irradiation-associated loss of bone marrow hematopoietic function in mice is reversed by recombinant human growth hormone. *Experimental hematology* 32, 171-178.
- Castellano, G., Affuso, F., Conza, P.D., and Fazio, S. (2009). The GH/IGF-1 Axis and Heart Failure. *Current cardiology reviews* 5, 203-215.
- Chase, C.C., Jr., Kirby, C.J., Hammond, A.C., Olson, T.A., and Lucy, M.C. (1998). Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency. *Journal of animal science* 76, 212-219.
- Chia, D.J. (2014). Minireview: mechanisms of growth hormone-mediated gene regulation. *Molecular endocrinology* 28, 1012-1025.
- Cho, Y., Ariga, M., Uchijima, Y., Kimura, K., Rho, J.Y., Furuhashi, Y., Hakuno, F., Yamanouchi, K., Nishihara, M., and Takahashi, S. (2006). The novel roles of liver for

compensation of insulin resistance in human growth hormone transgenic rats. *Endocrinology* 147, 5374-5384.

Clapp, C., Thebault, S., Jeziorski, M.C., and Martinez De La Escalera, G. (2009). Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiological reviews* 89, 1177-1215.

Conway-Campbell, B.L., Brooks, A.J., Robinson, P.J., Perani, M., and Waters, M.J. (2008). The extracellular domain of the growth hormone receptor interacts with coactivator activator to promote cell proliferation. *Molecular endocrinology* 22, 2190-2202.

Costoya, J.A., Vidal, A., Garcia-Barros, M., Arce, V., and Devesa, J. (1996). Expression of the human growth hormone normal gene (hGH-N) in proliferating and differentiated HL-60 cells. *Experimental cell research* 228, 164-167.

Cui, Y., Hosui, A., Sun, R., Shen, K., Gavrilova, O., Chen, W., Cam, M.C., Gao, B., Robinson, G.W., and Hennighausen, L. (2007). Loss of signal transducer and activator of transcription 5 leads to hepatosteatosis and impaired liver regeneration. *Hepatology* 46, 504-513.

Daughaday, W.H., Hall, K., Raben, M.S., Salmon, W.D., Jr., van den Brande, J.L., and van Wyk, J.J. (1972). Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* 235, 107.

Davis, S.W., Keisler, J.L., Perez-Millan, M.I., Schade, V., and Camper, S.A. (2016). All Hormone-Producing Cell Types of the Pituitary Intermediate and Anterior Lobes Derive From Prop1-Expressing Progenitors. *Endocrinology* 157, 1385-1396.

Deschenes, M.R. (2004). Effects of aging on muscle fibre type and size. *Sports medicine* 34, 809-824.

Devesa, J., Almenglo, C., and Devesa, P. (2016). Multiple Effects of Growth Hormone in the Body: Is it Really the Hormone for Growth? *Clinical medicine insights Endocrinology and diabetes* 9, 47-71.

Devesa, J., Devesa, P., and Reimunde, P. (2010). [Growth hormone revisited]. *Medicina clinica* 135, 665-670.

Devesa, J., Lima, L., and Tresguerres, J.A. (1992). Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 3, 175-183.

Devesa, P., Gelabert, M., Gonzalez-Mosquera, T., Gallego, R., Relova, J.L., Devesa, J., and Arce, V.M. (2012). Growth hormone treatment enhances the functional recovery of sciatic nerves after transection and repair. *Muscle & nerve* 45, 385-392.

Doldi, N., Bassan, M., Bonzi, V., and Ferrari, A. (1996). Effects of growth hormone and growth hormone-releasing hormone on steroid synthesis in cultured human luteinizing granulosa cells. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 10, 101-108.

Eicher, E.M., and Beamer, W.G. (1976). Inherited ateliotic dwarfism in mice. Characteristics of the mutation, little, on chromosome 6. *The Journal of heredity* 67, 87-91.

Eicher, E.M., and Beamer, W.G. (1980). New mouse dw allele: genetic location and effects on lifespan and growth hormone levels. *The Journal of heredity* 71, 187-190.

Ekberg, S., Luther, M., Nakamura, T., and Jansson, J.O. (1992). Growth hormone promotes early initiation of hepatocyte growth factor gene expression in the liver of hypophysectomized rats after partial hepatectomy. *The Journal of endocrinology* 135, 59-67.

Evans, H., and Long, J. (1921). The effect of the anterior lobe administered intraperitoneally upon growth maturation, and oestrus cycles of the rat. *Anatomical Record* 21, 62-63.

Fan, Y., Menon, R.K., Cohen, P., Hwang, D., Clemens, T., DiGirolamo, D.J., Kopchick, J.J., Le Roith, D., Trucco, M., and Sperling, M.A. (2009). Liver-specific deletion of the growth hormone receptor reveals essential role of growth hormone signaling in hepatic lipid metabolism. *The Journal of biological chemistry* 284, 19937-19944.

Farmer, J.T., and Weigent, D.A. (2006). TGF-beta1 expression in EL4 lymphoma cells overexpressing growth hormone. *Cellular immunology* 240, 22-30.

Frerich, B., Kurtz-Hoffmann, J., and Lindemann, N. (2005). Influence of growth hormone on maintenance of capillary-like structures in an in vitro model of stromal vascular tissue--results from morphometric analysis. *Artificial organs* 29, 338-341.

- Froesch, E.R., Schmid, C., Schwander, J., and Zapf, J. (1985). Actions of insulin-like growth factors. *Annual review of physiology* 47, 443-467.
- Gahete, M.D., Luque, R.M., and Castano, J.P. (2016). Models of GH deficiency in animal studies. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 30, 693-704.
- Gibney, J., Wolthers, T., Burt, M.G., Leung, K.C., Umpelby, A.M., and Ho, K.K. (2007). Protein metabolism in acromegaly: differential effects of short- and long-term treatment. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92, 1479-1484.
- Giovannini, S., Marzetti, E., Borst, S.E., and Leeuwenburgh, C. (2008). Modulation of GH/IGF-1 axis: potential strategies to counteract sarcopenia in older adults. *Mechanisms of ageing and development* 129, 593-601.
- Gluckman, P.D., Johnson-Barrett, J.J., Butler, J.H., Edgar, B.W., and Gunn, T.R. (1983). Studies of insulin-like growth factor -I and -II by specific radioligand assays in umbilical cord blood. *Clinical endocrinology* 19, 405-413.
- Gonzalo, J.A., Mazuchelli, R., Mellado, M., Frade, J.M., Carrera, A.C., von Kobbe, C., Merida, I., and Martinez, A.C. (1996). Enterotoxin septic shock protection and deficient T helper 2 cytokine production in growth hormone transgenic mice. *Journal of immunology* 157, 3298-3304.
- Growth Hormone Research, S. (2000). Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH Research Society. GH Research Society. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85, 3990-3993.
- Harris, D.M., Dunshea, F.R., Bauman, D.E., Boyd, R.D., Wang, S.Y., Johnson, P.A., and Clarke, S.D. (1993). Effect of in vivo somatotropin treatment of growing pigs on adipose tissue lipogenesis. *Journal of animal science* 71, 3293-3300.
- Harvey, S. (2010). Extrapituitary growth hormone. *Endocrine* 38, 335-359.
- Harvey, S., Azumaya, Y., and Hull, K.L. (2000). Pituitary and extrapituitary growth hormone: Pit-1 dependence? *Canadian journal of physiology and pharmacology* 78, 1013-1028.
- Hirschberg, R., and Kopple, J.D. (1989). Effects of growth hormone and IGF-I on renal function. *Kidney international Supplement* 27, S20-26.
- Ho, K.K., and Participants, G.H.D.C.W. (2007). Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of adults with GH deficiency II: a statement of the GH Research Society in association with the European Society for Pediatric Endocrinology, Lawson Wilkins Society, European Society of Endocrinology, Japan Endocrine Society, and Endocrine Society of Australia. *European journal of endocrinology* 157, 695-700.
- Hoybye, C., Chandramouli, V., Efendic, S., Hulting, A.L., Landau, B.R., Schumann, W.C., and Wajngot, A. (2008). Contribution of gluconeogenesis and glycogenolysis to hepatic glucose production in acromegaly before and after pituitary microsurgery. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 40, 498-501.
- Hull, K.L., and Harvey, S. (2001). Growth hormone: roles in female reproduction. *The Journal of endocrinology* 168, 1-23.
- Husvéth, F. (2011). CONTROL AND MAND MANIPULATION OF ANIMAL GROWTH. In *PHYSIOLOGICAL AND REPRODUCTIONAL ASPECTS OF ANIMAL PRODUCTION*.
- Isaksson, O.G., Jansson, J.O., and Gause, I.A. (1982). Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* 216, 1237-1239.
- Isgaard, J., Arcopinto, M., Karason, K., and Cittadini, A. (2015). GH and the cardiovascular system: an update on a topic at heart. *Endocrine* 48, 25-35.
- Isidori, A.M., Kaltsas, G.A., Perry, L., Burrin, J.M., Besser, G.M., and Monson, J.P. (2003). The effect of growth hormone replacement therapy on adrenal androgen secretion in adult onset hypopituitarism. *Clinical endocrinology* 58, 601-611.
- Johansen, T., Richelsen, B., Hansen, H.S., Din, N., and Malmlof, K. (2003). Growth hormone-mediated breakdown of body fat: effects of GH on lipases in adipose tissue and

- skeletal muscle of old rats fed different diets. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 35, 243-250.
- Kao, T.L., Harbour, D.V., and Meyer, W.J., 3rd (1992a). Immunoreactive growth hormone production by cultured lymphocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 650, 179-181.
- Kao, T.L., Supowit, S.C., Thompson, E.A., and Meyer, W.J., 3rd (1992b). Immunoreactive growth hormone production by human lymphocyte cell lines. *Cellular and molecular neurobiology* 12, 483-498.
- Kaplan, S.A., and Cohen, P. (2007). The somatomedin hypothesis 2007: 50 years later. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92, 4529-4535.
- Karamouti, M., Kolia, P., Kallitsaris, A., Vamvakopoulos, N., Kollios, G., and Messinis, I.E. (2008). Growth hormone, insulin-like growth factor I, and leptin interaction in human cultured lutein granulosa cells steroidogenesis. *Fertility and sterility* 90, 1444-1450.
- Khalfallah, Y., Sassolas, G., Borson-Chazot, F., Vega, N., and Vidal, H. (2001). Expression of insulin target genes in skeletal muscle and adipose tissue in adult patients with growth hormone deficiency: effect of one year recombinant human growth hormone therapy. *The Journal of endocrinology* 171, 285-292.
- Kiapekou, E., Loutradis, D., Drakakis, P., Zapanti, E., Mastorakos, G., and Antsaklis, A. (2005). Effects of GH and IGF-I on the in vitro maturation of mouse oocytes. *Hormones* 4, 155-160.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656-660.
- Kooijman, R., Berus, D., Malur, A., Delhase, M., and Hooghe-Peters, E.L. (1997a). Human neutrophils express GH-N gene transcripts and the pituitary transcription factor Pit-1b. *Endocrinology* 138, 4481-4484.
- Kooijman, R., Malur, A., Van Buul-Offers, S.C., and Hooghe-Peters, E.L. (1997b). Growth hormone expression in murine bone marrow cells is independent of the pituitary transcription factor Pit-1. *Endocrinology* 138, 3949-3955.
- Kyle, C.V., Evans, M.C., and Odell, W.D. (1981). Growth hormone-like material in normal human tissues. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 53, 1138-1144.
- Laron, Z., and Klinger, B. (1998). Effect of insulin-like growth factor-I treatment on serum androgens and testicular and penile size in males with Laron syndrome (primary growth hormone resistance). *European journal of endocrinology* 138, 176-180.
- Le Greves, M., Le Greves, P., and Nyberg, F. (2005). Age-related effects of IGF-1 on the NMDA-, GH- and IGF-1-receptor mRNA transcripts in the rat hippocampus. *Brain research bulletin* 65, 369-374.
- Le Roith, D., Bondy, C., Yakar, S., Liu, J.L., and Butler, A. (2001). The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocrine reviews* 22, 53-74.
- Lechan, R.M., Molitch, M.E., and Jackson, I.M. (1983). Distribution of immunoreactive human growth hormone-like material and thyrotropin-releasing hormone in the rat central nervous system: evidence for their coexistence in the same neurons. *Endocrinology* 112, 877-884.
- Lewis, U.J., Dunn, J.T., Bonewald, L.F., Seavey, B.K., and Vanderlaan, W.P. (1978). A naturally occurring structural variant of human growth hormone. *The Journal of biological chemistry* 253, 2679-2687.
- Li, C.H., and Dixon, J.S. (1971). Human pituitary growth hormone. 32. The primary structure of the hormone: revision. *Archives of biochemistry and biophysics* 146, 233-236.
- Li, Q., Li, B., Wang, X., Leri, A., Jana, K.P., Liu, Y., Kajstura, J., Baserga, R., and Anversa, P. (1997). Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. *The Journal of clinical investigation* 100, 1991-1999.

List, E.O., Berryman, D.E., Funk, K., Gosney, E.S., Jara, A., Kelder, B., Wang, X., Kutz, L., Troike, K., Lozier, N., *et al.* (2013). The role of GH in adipose tissue: lessons from adipose-specific GH receptor gene-disrupted mice. *Molecular endocrinology* 27, 524-535.

List, E.O., Berryman, D.E., Funk, K., Jara, A., Kelder, B., Wang, F., Stout, M.B., Zhi, X., Sun, L., White, T.A., *et al.* (2014). Liver-specific GH receptor gene-disrupted (LiGHRKO) mice have decreased endocrine IGF-I, increased local IGF-I, and altered body size, body composition, and adipokine profiles. *Endocrinology* 155, 1793-1805.

Liu, Q.L., Zhang, J., Liu, X., and Gao, J.Y. (2015). Role of growth hormone in maturation and activation of dendritic cells via miR-200a and the Keap1/Nrf2 pathway. *Cell proliferation* 48, 573-581.

Lobie, P.E., Breipohl, W., Aragon, J.G., and Waters, M.J. (1990). Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the male and female reproductive systems. *Endocrinology* 126, 2214-2221.

Lobie, P.E., Zhu, T., Graichen, R., and Goh, E.L. (2000). Growth hormone, insulin-like growth factor I and the CNS: localization, function and mechanism of action. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 10 Suppl B, S51-56.

Lu, C., Kumar, P.A., Sun, J., Aggarwal, A., Fan, Y., Sperling, M.A., Lumeng, C.N., and Menon, R.K. (2013). Targeted deletion of growth hormone (GH) receptor in macrophage reveals novel osteopontin-mediated effects of GH on glucose homeostasis and insulin sensitivity in diet-induced obesity. *The Journal of biological chemistry* 288, 15725-15735.

Luque, R.M., Lin, Q., Cordoba-Chacon, J., Subbaiah, P.V., Buch, T., Waisman, A., Vankelecom, H., and Kineman, R.D. (2011). Metabolic impact of adult-onset, isolated, growth hormone deficiency (AOiGHD) due to destruction of pituitary somatotropes. *PLoS one* 6, e15767.

Lytras, A., Quan, N., Vrontakis, M.E., Shaw, J.E., Cattini, P.A., and Friesen, H.G. (1993). Growth hormone expression in human Burkitt lymphoma serum-free Ramos cell line. *Endocrinology* 132, 620-628.

Maggiano, N., Piantelli, M., Ricci, R., Larocca, L.M., Capelli, A., and Ranelletti, F.O. (1994). Detection of growth hormone-producing cells in human thymus by immunohistochemistry and non-radioactive in situ hybridization. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 42, 1349-1354.

Malarkey, W.B., Wang, J., Cheney, C., Glaser, R., and Nagaraja, H. (2002). Human lymphocyte growth hormone stimulates interferon gamma production and is inhibited by cortisol and norepinephrine. *Journal of neuroimmunology* 123, 180-187.

Mauras, N., O'Brien, K.O., Welch, S., Rini, A., Helgeson, K., Vieira, N.E., and Yergey, A.L. (2000). Insulin-like growth factor I and growth hormone (GH) treatment in GH-deficient humans: differential effects on protein, glucose, lipid, and calcium metabolism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85, 1686-1694.

Mavalli, M.D., DiGirolamo, D.J., Fan, Y., Riddle, R.C., Campbell, K.S., van Groen, T., Frank, S.J., Sperling, M.A., Esser, K.A., Bamman, M.M., *et al.* (2010). Distinct growth hormone receptor signaling modes regulate skeletal muscle development and insulin sensitivity in mice. *The Journal of clinical investigation* 120, 4007-4020.

Mayoux, E., Ventura-Clapier, R., Timsit, J., Behar-Cohen, F., Hoffmann, C., and Mercadier, J.J. (1993). Mechanical properties of rat cardiac skinned fibers are altered by chronic growth hormone hypersecretion. *Circulation research* 72, 57-64.

Meazza, C., Bonomelli, I., Pagani, S., Travaglino, P., Laarej, K., Cantoni, F., and Bozzola, M. (2009). Effect of human recombinant growth hormone therapy on circulating levels of erythropoietin and granulocyte-colony stimulating factor in short children. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 22, 837-843.

Meliska, C.J., Burke, P.A., Bartke, A., and Jensen, R.A. (1997). Inhibitory avoidance and appetitive learning in aged normal mice: comparison with transgenic mice having elevated plasma growth hormone levels. *Neurobiology of learning and memory* 68, 1-12.

- Menezo, Y.J., Nicollet, B., Rollet, J., and Hazout, A. (2006). Pregnancy and delivery after in vitro maturation of naked ICSI-GV oocytes with GH and transfer of a frozen thawed blastocyst: case report. *Journal of assisted reproduction and genetics* 23, 47-49.
- Mol, J.A., Henzen-Logmans, S.C., Hageman, P., Misdorp, W., Blankenstein, M.A., and Rijnberk, A. (1995). Expression of the gene encoding growth hormone in the human mammary gland. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 80, 3094-3096.
- Muniyappa, R., Walsh, M.F., Rangi, J.S., Zayas, R.M., Standley, P.R., Ram, J.L., and Sowers, J.R. (1997). Insulin like growth factor 1 increases vascular smooth muscle nitric oxide production. *Life sciences* 61, 925-931.
- Murphy, L.J., Bell, G.I., and Friesen, H.G. (1987). Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology* 120, 1279-1282.
- Murray, P.G., and Clayton, P.E. (2013). Endocrine control of growth. *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics* 163C, 76-85.
- Napoli, R., Guardasole, V., Matarazzo, M., Palmieri, E.A., Oliviero, U., Fazio, S., and Sacca, L. (2002). Growth hormone corrects vascular dysfunction in patients with chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 39, 90-95.
- Nguyen, A.P., Chandorkar, A., and Gupta, C. (1996). The role of growth hormone in fetal mouse reproductive tract differentiation. *Endocrinology* 137, 3659-3666.
- Niall, H.D., Hogan, M.L., Sauer, R., Rosenblum, I.Y., and Greenwood, F.C. (1971). Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68, 866-870.
- Nyberg, F., and Hallberg, M. (2013). Growth hormone and cognitive function. *Nature reviews Endocrinology* 9, 357-365.
- Oberbauer, A.M. (2015). Developmental programming: the role of growth hormone. *Journal of animal science and biotechnology* 6, 8.
- Oscarsson, J., Ottosson, M., and Eden, S. (1999a). Effects of growth hormone on lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Journal of endocrinological investigation* 22, 2-9.
- Oscarsson, J., Ottosson, M., Vikman-Adolfsson, K., Frick, F., Enerback, S., Lithell, H., and Eden, S. (1999b). GH but not IGF-I or insulin increases lipoprotein lipase activity in muscle tissues of hypophysectomised rats. *The Journal of endocrinology* 160, 247-255.
- Palmethofer, A., Zechner, D., Luger, T.A., and Barta, A. (1995). Splicing variants of the human growth hormone mRNA: detection in pituitary, mononuclear cells and dermal fibroblasts. *Molecular and cellular endocrinology* 113, 225-234.
- Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trumbauer, M.E., Rosenfeld, M.G., Birnberg, N.C., and Evans, R.M. (1982). Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300, 611-615.
- Parker, E.A., Hegde, A., Buckley, M., Barnes, K.M., Baron, J., and Nilsson, O. (2007). Spatial and temporal regulation of GH-IGF-related gene expression in growth plate cartilage. *The Journal of endocrinology* 194, 31-40.
- Posner, B.I., Kelly, P.A., Shiu, R.P., and Friesen, H.G. (1974). Studies of insulin, growth hormone and prolactin binding: tissue distribution, species variation and characterization. *Endocrinology* 95, 521-531.
- Raben, M.S. (1958). Treatment of a pituitary dwarf with human growth hormone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 18, 901-903.
- Rees, L., and Mak, R.H. (2011). Nutrition and growth in children with chronic kidney disease. *Nature reviews Nephrology* 7, 615-623.
- Rymaszewski, Z., Cohen, R.M., and Chomczynski, P. (1991). Human growth hormone stimulates proliferation of human retinal microvascular endothelial cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 617-621.
- Sacca, L., Cittadini, A., and Fazio, S. (1994). Growth hormone and the heart. *Endocrine reviews* 15, 555-573.

Schwarzler, P., Untergasser, G., Hermann, M., Dirnhofer, S., Abendstein, B., Madersbacher, S., and Berger, P. (1997). Selective growth hormone/placental lactogen gene transcription and hormone production in pre- and postmenopausal human ovaries. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82, 3337-3341.

Searle, T.W., Murray, J.D., and Baker, P.J. (1992). Effect of increased production of growth hormone on body composition in mice: transgenic versus control. *The Journal of endocrinology* 132, 285-291.

Sferruzzi-Perri, A.N., Owens, J.A., Pringle, K.G., and Roberts, C.T. (2011). The neglected role of insulin-like growth factors in the maternal circulation regulating fetal growth. *The Journal of physiology* 589, 7-20.

Sicuro, A., Mahlbacher, K., Hulter, H.N., and Krapf, R. (1998). Effect of growth hormone on renal and systemic acid-base homeostasis in humans. *The American journal of physiology* 274, F650-657.

Sirotkin, A.V., Makarevich, A.V., and Hetenyi, L. (2000). Effect of growth hormone and inhibitors of protein kinase A on IGF-I, oxytocin and progesterone release by cultured bovine granulosa cells. *Annales d'endocrinologie* 61, 154-158.

Slot, K.A., Kastelijn, J., Bachelot, A., Kelly, P.A., Binart, N., and Teerds, K.J. (2006). Reduced recruitment and survival of primordial and growing follicles in GH receptor-deficient mice. *Reproduction* 131, 525-532.

Snell, G.D. (1929). Dwarf, a New Mendelian Recessive Character of the House Mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 15, 733-734.

Sornson, M.W., Wu, W., Dasen, J.S., Flynn, S.E., Norman, D.J., O'Connell, S.M., Gukovsky, I., Carriere, C., Ryan, A.K., Miller, A.P., *et al.* (1996). Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature* 384, 327-333.

Sos, B.C., Harris, C., Nordstrom, S.M., Tran, J.L., Balazs, M., Caplazi, P., Febbraio, M., Applegate, M.A., Wagner, K.U., and Weiss, E.J. (2011). Abrogation of growth hormone secretion rescues fatty liver in mice with hepatocyte-specific deletion of JAK2. *The Journal of clinical investigation* 121, 1412-1423.

Sotiropoulos, A., Ohanna, M., Kedzia, C., Menon, R.K., Kopchick, J.J., Kelly, P.A., and Pende, M. (2006). Growth hormone promotes skeletal muscle cell fusion independent of insulin-like growth factor 1 up-regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 7315-7320.

Stern, W.C., Miller, M., Jalowiec, J.E., Forbes, W.B., and Morgane, P.J. (1975). Effects of growth hormone on brain biogenic amine levels. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 3, 1115-1118.

Steyn, F.J., Tolle, V., Chen, C., and Epelbaum, J. (2016). Neuroendocrine Regulation of Growth Hormone Secretion. *Comprehensive Physiology* 6, 687-735.

Struman, I., Bentzien, F., Lee, H., Mainfroid, V., D'Angelo, G., Goffin, V., Weiner, R.I., and Martial, J.A. (1999). Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1246-1251.

Tatsumi, K., and Amino, N. (1999). PIT1 abnormality. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 9 Suppl B, 18-22; discussion 23.

Timsit, J., Riou, B., Bertherat, J., Wisnewsky, C., Kato, N.S., Weisberg, A.S., Lubetzki, J., Lecarpentier, Y., Winegrad, S., and Mercadier, J.J. (1990). Effects of chronic growth hormone hypersecretion on intrinsic contractility, energetics, isomyosin pattern, and myosin adenosine triphosphatase activity of rat left ventricle. *The Journal of clinical investigation* 86, 507-515.

Tresguerres, J.A., Ariznavarreta, C., Granados, B., Costoya, J.A., Perez-Romero, A., Salame, F., and Hermanussen, M. (1999). Salivary gland is capable of GH synthesis under GHRH stimulation. *The Journal of endocrinology* 160, 217-222.

Tritos, N.A., and Klibanski, A. (2016). Effects of Growth Hormone on Bone. *Progress in molecular biology and translational science* 138, 193-211.

Tsaneva-Atanasova, K., Sherman, A., van Goor, F., and Stojilkovic, S.S. (2007). Mechanism of spontaneous and receptor-controlled electrical activity in pituitary somatotrophs: experiments and theory. *Journal of neurophysiology* 98, 131-144.

Tuffaha, S.H., Budiardjo, J.D., Sarhane, K.A., Khusheim, M., Song, D., Broyles, J.M., Salvatori, R., Means, K.R., Jr., Higgins, J.P., Shores, J.T., *et al.* (2016). Growth Hormone Therapy Accelerates Axonal Regeneration, Promotes Motor Reinnervation, and Reduces Muscle Atrophy following Peripheral Nerve Injury. *Plastic and reconstructive surgery* 137, 1771-1780.

Ullman, M., and Oldfors, A. (1989). Effects of growth hormone on skeletal muscle. I. Studies on normal adult rats. *Acta physiologica Scandinavica* 135, 531-536.

Untergasser, G., Hermann, M., Rumpold, H., and Berger, P. (1998). Complex alternative splicing of the GH-V gene in the human testis. *European journal of endocrinology* 139, 424-427.

Untergasser, G., Kranewitter, W., Schwarzler, P., Madersbacher, S., Dirnhofer, S., and Berger, P. (1997). Organ-specific expression pattern of the human growth hormone/placental lactogen gene-cluster in the testis. *Molecular and cellular endocrinology* 130, 53-60.

Van Wyk, J.J., Underwood, L.E., Hintz, R.L., Clemmons, D.R., Voina, S.J., and Weaver, R.P. (1974). The somatomedins: a family of insulinlike hormones under growth hormone control. *Recent progress in hormone research* 30, 259-318.

Varma, S., Sabharwal, P., Sheridan, J.F., and Malarkey, W.B. (1993). Growth hormone secretion by human peripheral blood mononuclear cells detected by an enzyme-linked immunoplaque assay. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 76, 49-53.

Verhaeghe, J., Van Bree, R., Van Herck, E., Laureys, J., Bouillon, R., and Van Assche, F.A. (1993). C-peptide, insulin-like growth factors I and II, and insulin-like growth factor binding protein-1 in umbilical cord serum: correlations with birth weight. *American journal of obstetrics and gynecology* 169, 89-97.

Vijayakumar, A., Novosyadlyy, R., Wu, Y., Yakar, S., and LeRoith, D. (2010). Biological effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 20, 1-7.

Wang, Z., Masternak, M.M., Al-Regaiey, K.A., and Bartke, A. (2007). Adipocytokines and the regulation of lipid metabolism in growth hormone transgenic and calorie-restricted mice. *Endocrinology* 148, 2845-2853.

Waters, M.J., and Brooks, A.J. (2012). Growth hormone and cell growth. *Endocrine development* 23, 86-95.

Waters, M.J., and Kaye, P.L. (2002). The role of growth hormone in fetal development. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 12, 137-146.

Weber, M.M. (2002). Effects of growth hormone on skeletal muscle. *Hormone research* 58 Suppl 3, 43-48.

Weigent, D.A. (2011). High molecular weight isoforms of growth hormone in cells of the immune system. *Cellular immunology* 271, 44-52.

Weigent, D.A. (2013). Lymphocyte GH-axis hormones in immunity. *Cellular immunology* 285, 118-132.

Weigent, D.A., Blalock, J.E., and LeBoeuf, R.D. (1991). An antisense oligodeoxynucleotide to growth hormone messenger ribonucleic acid inhibits lymphocyte proliferation. *Endocrinology* 128, 2053-2057.

Wolf, E., Kahnt, E., Ehrlein, J., Hermanns, W., Brem, G., and Wanke, R. (1993). Effects of long-term elevated serum levels of growth hormone on life expectancy of mice: lessons from transgenic animal models. *Mechanisms of ageing and development* 68, 71-87.

Wu, H., Devi, R., and Malarkey, W.B. (1996). Localization of growth hormone messenger ribonucleic acid in the human immune system--a Clinical Research Center study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 81, 1278-1282.

Wu, Y., Liu, C., Sun, H., Vijayakumar, A., Giglou, P.R., Qiao, R., Oppenheimer, J., Yakar, S., and LeRoith, D. (2011). Growth hormone receptor regulates beta cell hyperplasia and glucose-stimulated insulin secretion in obese mice. *The Journal of clinical investigation* 121, 2422-2426.

Yakar, S., Courtland, H.W., and Clemmons, D. (2010). IGF-1 and bone: New discoveries from mouse models. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 25, 2543-2552.

Yang, B.Y., Greene, M., and Chen, T.T. (1999). Early embryonic expression of the growth hormone family protein genes in the developing rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Molecular reproduction and development* 53, 127-134.

Yoshizato, H., Fujikawa, T., Soya, H., Tanaka, M., and Nakashima, K. (1998). The growth hormone (GH) gene is expressed in the lateral hypothalamus: enhancement by GH-releasing hormone and repression by restraint stress. *Endocrinology* 139, 2545-2551.

Young, J.A., List, E.O., and Kopchick, J.J. (2016). Deconstructing the Growth Hormone Receptor(GHR): Physical and Metabolic Phenotypes of Tissue-Specific GHR Gene-Disrupted Mice. *Progress in molecular biology and translational science* 138, 27-39.

Zhou, Y., He, L., Baumann, G., and Kopchick, J.J. (1997). Deletion of the mouse GH-binding protein (mGHBP) mRNA polyadenylation and splicing sites does not abolish production of mGHBP. *Journal of molecular endocrinology* 19, 1-13.

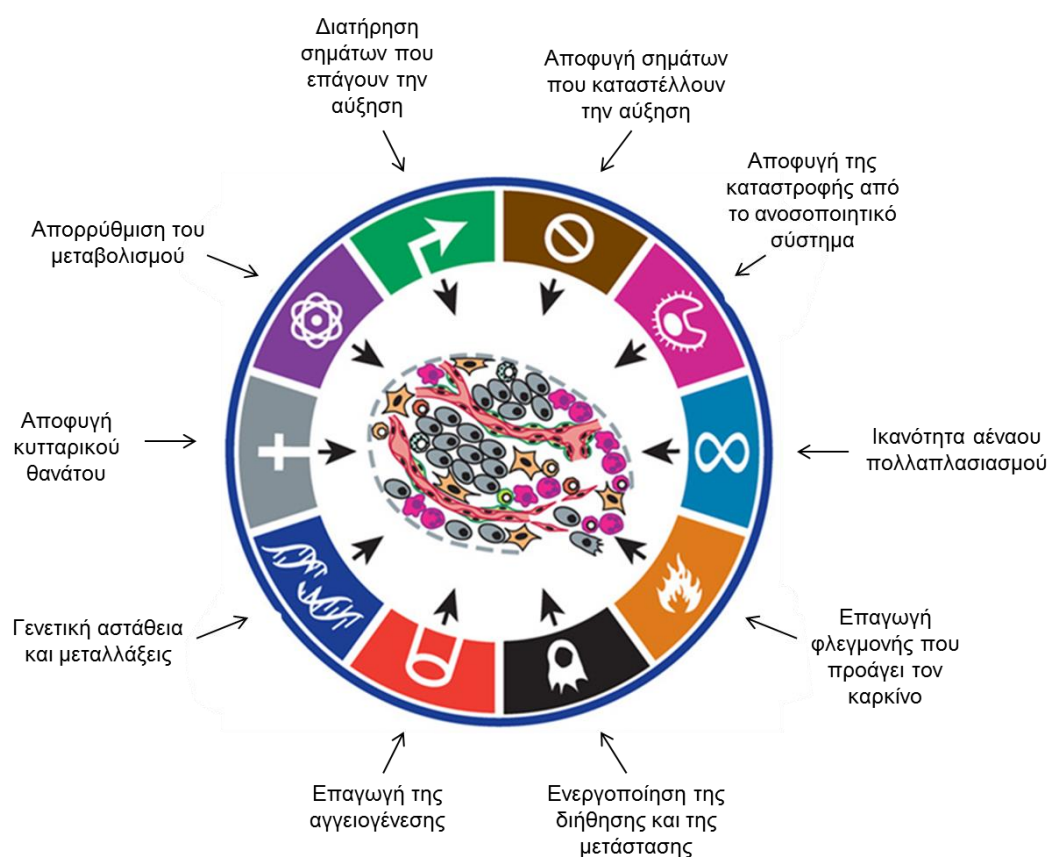
3 Καρκίνος

3.1 Γενικά

Σύμφωνα με το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου των ΗΠΑ (National Cancer Institute), ο όρος καρκίνος αναφέρεται σε ένα σύνολο σχετιζόμενων ασθενειών με κύριο χαρακτηριστικό τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κάποιων κυττάρων του οργανισμού τα οποία εν τέλει διηθούν γειτονικούς ή ακόμη και απομακρυσμένους ιστούς οδηγώντας πολλές φορές στο θάνατο. Καρκίνος μπορεί να αναπτυχθεί πρακτικά σε οποιοδήποτε μέρος/ιστό του σώματος, με αποτέλεσμα να έχουν περιγραφεί ήδη πάνω από 100 διαφορετικές μορφές καρκίνου. Οι διάφοροι αυτοί τύποι καρκίνου παίρνουν το όνομά τους συνήθως από τον ιστό στον οποίο αναπτύσσονται, ενώ παράλληλα ταξινομούνται με ποικίλα κριτήρια σε επιμέρους κατηγορίες. Μια βασική διάκριση είναι αυτή μεταξύ συμπαγών (όπως πχ οι όγκοι του εντέρου) και μη συμπαγών όγκων (όπως οι όγκοι του αίματος). Μια δεύτερη πολύ σημαντική διάκριση είναι αυτή μεταξύ των καρκίνων που είναι καλοήθεις και αυτών που είναι κακοήθεις. Οι καλοήθεις αναπτύσσονται τοπικά μόνο και δε διηθούν γειτονικούς ή απομακρυσμένους ιστούς και εν συνεχεία σπανίως είναι επικίνδυνοι για τη ζωή του ασθενούς, ενώ οι κακοήθεις έχουν το χαρακτηριστικό ότι διηθούν γειτονικές δομές και απομακρυσμένους ιστούς κι έτσι γίνονται, αργά ή γρήγορα, απειλητικοί για την ζωή του ασθενούς (NCI, 2015).

Καθώς ο ανθρώπινος οργανισμός αποτελείται από τρισεκατομμύρια κύτταρα, ο έλεγχος του πολλαπλασιασμού όλων αυτών των κυττάρων για να διατηρηθεί η ομοιόσταση και η υγεία είναι και πρέπει να είναι πολύ στενός και πολυεπίπεδος. Ωστόσο, πολλές φορές κάποια κύτταρα καταφέρνουν να ξεφύγουν από τους πολύπλοκους αυτούς μηχανισμούς και να οδηγήσουν στην ανάπτυξη καρκίνου. Παρόλο που υπάρχουν εκατοντάδες διαφορετικοί τύποι καρκίνου, εντούτοις όλοι τους μοιράζονται κάποια κοινά χαρακτηριστικά τα οποία τους επιτρέπουν να επιβιώσουν και να εξελιχθούν. Τα 6 βασικά αυτά χαρακτηριστικά πρωτοπεριγράφηκαν το 2000 από τους Hanahan και Weinberg και εμπλουτίστηκαν από τους ίδιους λίγα χρόνια αργότερα με 4 νέα ‘αναδυόμενα’ χαρακτηριστικά (Εικόνα 3.1). Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι ουσιαστικά το αποτέλεσμα της δράσης ποικίλων μηχανισμών όπως για παράδειγμα η συσσώρευση μεταλλάξεων σε ογκοκατασταλτικά γονίδια ή πρωτοογκογονίδια, τόσο στα κύτταρα από τα οποία εν τέλει αναπτύσσεται ο όγκος όσο και στο μικροπεριβάλλον αυτών, οι οποίοι

(μηχανισμοί) προετοιμάζουν το έδαφος για την καρκινογένεση και την καθοδηγούν – υποστηρίζουν σε όλα τα διαφορετικά στάδια εξέλιξής της (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011). Ειδικά μάλιστα σε ότι αφορά το μικροπεριβάλλον, όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 1.4, όλο και περισσότερα στοιχεία αναδεικνύουν τη σημασία που αυτό παίζει τόσο στην έναρξη όσο και στην εξέλιξη του καρκίνου (Balkwill et al., 2012; Hanahan and Coussens, 2012; Hanahan and Weinberg, 2011). Είναι λοιπόν επιτακτική ανάγκη να διαλευκανθούν σε βάθος όλοι αυτοί οι μηχανισμοί, ώστε να γίνει κάποια στιγμή εφικτή η πλήρης ίαση του καρκίνου.

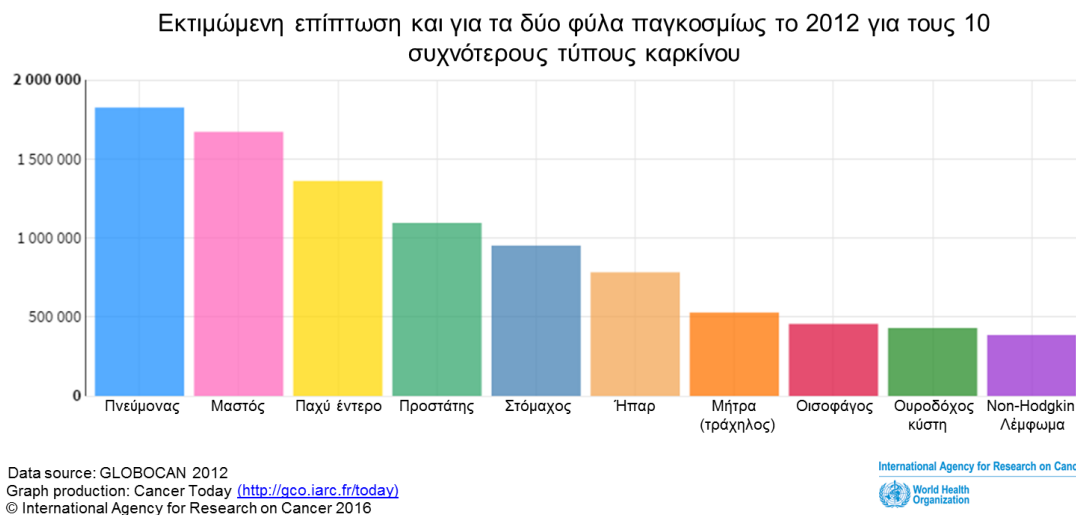


Εικόνα 3.1. Τα βασικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό όλες οι διαφορετικές μορφές καρκίνου.
[Μετάφραση και τροποποίηση από τους (Hanahan and Weinberg, 2011)]

3.2 Καρκίνος του παχέος εντέρου

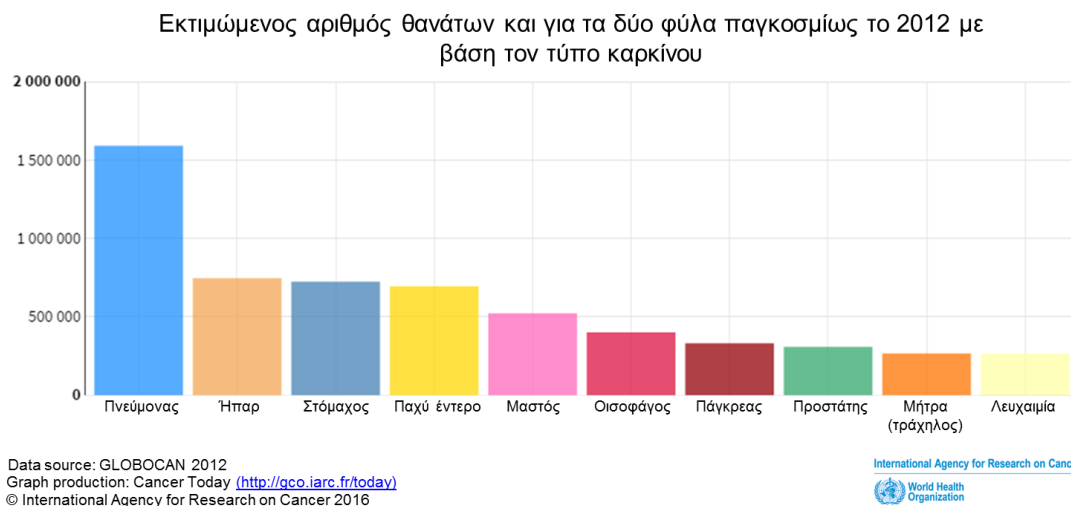
3.2.1 Γενικά

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο οργανισμό Υγείας, ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί την 3^η συχνότερη μορφή καρκίνου παγκοσμίως ενώ κατέχει την 4^η θέση από άποψη θνησιμότητας μεταξύ των υπολοίπων μορφών καρκίνου (Εικόνες 3.2 και 3.3) (WHO, 2017). Επίσης αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο που δε σχετίζεται με το κάπνισμα (Torre et al., 2015).



Εικόνα 3.2. Εκτιμώμενη επίπτωση των 10 συχνότερων μορφών καρκίνου παγκοσμίως και για τα 2 φύλα.

Πηγή: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO, 2017)



Εικόνα 3.3. Εκτιμώμενη θνησιμότητα των 10 πιο θανατηφόρων μορφών καρκίνου παγκοσμίως και για τα 2 φύλα.

Πηγή: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO, 2017)

Όπως και οι περισσότερες μορφές καρκίνου, έτσι και ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί μια ετερογενή και πολυπαραγοντική νόσο η οποία επηρεάζεται από μια σειρά γενετικούς παράγοντες (όπως η παρουσία μεταλλάξεων στο DNA) αλλά και περιβαλλοντικούς παράγοντες (όπως η διατροφή, το αλκοόλ, το κάπνισμα, η φυσική δραστηριότητα αλλά και το γήρας) (Wei et al., 2004). Υπάρχουν 3 βασικές μορφές καρκίνου του παχέος εντέρου: α) Σποραδική, β) Κληρονομική, γ) Σχετιζόμενη με την κολίτιδα. Το 75% περίπου των περιπτώσεων αναπτύσσεται σποραδικά συνήθως μετά την ηλικία των 50 ετών με αυξανόμενη συχνότητα όσο η ηλικία αυξάνει. Το υπόλοιπο 25% των περιπτώσεων εμφανίζει κάποιο μοτίβο κληρονομικότητας,

ωστόσο μόνο για το 5% αυτών των περιπτώσεων έχει εντοπιστεί μια συγκεκριμένη γενετική διαταραχή (Gala and Chung, 2011; Jaspersion et al., 2010). Τα δύο συχνότερα απαντώμενα κληρονομικά σύνδρομα καρκίνου του παχέος εντέρου είναι η Οικογενής Αδενωματώδης Πολυποδίαση (Familial Adenomatous Polyposis – FAP) και ο Κληρονομικός Μη-Πολυποειδής Καρκίνος του Παχέος Εντέρου (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer – HNPCC ή σύνδρομο Lynch). Χαρακτηριστικό και των δύο συνδρόμων αποτελεί η πολύ πρόωμη (αρκετά πριν τα 50 έτη) εμφάνιση όγκων στο παχύ έντερο (ή και σε άλλους ιστούς), εξαιτίας της ύπαρξης μεταλλάξεων σε γονίδια που σχετίζονται κατά βάση με τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA όπως είναι τα γονίδια APC, MLH1 και MSH2. Οι ασθενείς με Οικογενή Αδενωματώδη Πολυποδίαση έχουν 100% πιθανότητα να αναπτύξουν καρκίνο του εντέρου εάν δεν υποβληθούν έγκαιρα σε θεραπεία ενώ η αντίστοιχη πιθανότητα στους ασθενείς με το σύνδρομο HNPCC αγγίζει το 80%. Παράλληλα έχουν περιγραφεί πολλά ακόμη γονίδια τα οποία σχετίζονται με κληρονομικά σύνδρομα - όχι και τόσο καλά καθορισμένα- τα οποία επίσης περιλαμβάνουν την ανάπτυξη καρκίνου στο παχύ έντερο ή και σε άλλους ιστούς όπως για παράδειγμα τα γονίδια MSH6, Axin2, BMPR1A, SMAD4 και KIT (Gruber et al., 2002; Ligtenberg et al., 2009; Vogelstein and Kinzler, 2004). Τέλος, η τρίτη κατηγορία όγκων του παχέος εντέρου οι οποίοι αναφέρονται συχνά με τον όρο Καρκίνος Σχετιζόμενος με την Κολίτιδα (Colitis-associated cancer) είναι αυτή που αναπτύσσεται σε έδαφος χρόνιας φλεγμονής όπως για παράδειγμα σε έδαφος χρόνιας κολίτιδας που παρουσιάζουν οι ασθενείς με Νόσο του Crohn ή Ελκώδη Κολίτιδα. Οι όγκοι αυτοί, αν και ακολουθούν παρόμοιους μηχανισμούς και στάδια ανάπτυξης με τις υπόλοιπες μορφές καρκίνου του παχέος εντέρου (κληρονομικές ή σποραδικές), εντούτοις χαρακτηρίζονται από ταχύτερη εξέλιξη, βαρύτερη κλινική εικόνα, μεγαλύτερη θνησιμότητα αλλά και ευρύτερο φάσμα μεταλλάξεων που εντοπίζονται στα κύτταρα του όγκου (Grivennikov, 2013; Terzic et al., 2010; Yaeger et al., 2016).

3.2.2 Κυτταρικοί πληθυσμοί που συμμετέχουν στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου

Οι όγκοι που αναπτύσσονται στο παχύ έντερο είναι συνήθως σύνθετοι όγκοι οι οποίοι πέραν των καρκινικών κυττάρων περιέχουν και το λεγόμενο «μικροπεριβάλλον του όγκου» ή «στρώμα του όγκου» το οποίο με τη σειρά του αποτελείται από ένα κυτταρικό κομμάτι και ένα α-κυτταρικό κομμάτι. Σε ότι αφορά το πρώτο, περιλαμβάνει διάφορους τύπους κυττάρων όπως τα επιθηλιακά, τα ενδοθηλιακά και

τα μεσεγχυματικά κύτταρα (κυρίως διάφορες μορφές ενεργοποιημένων ινοβλαστών) καθώς και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Kalluri and Zeisberg, 2006; Rasanen and Vaheri, 2010; Sugimoto et al., 2006). Όλα αυτά τα κύτταρα βρίσκονται μέσα σε μια εξωκυττάρια θεμέλια ουσία η οποία αποτελείται από διάφορα είδη κολλαγόνου, λαμινίνης, ινονεκτίνης και πρωτεογλυκανών, και η οποία επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις όλων των παραπάνω κυτταρικών τύπων μεταξύ τους αλλά και με τα (προ)καρκινικά κύτταρα και κατ'επέκταση την εξέλιξη του ίδιου του καρκίνου (Allen and Louise Jones, 2011; Kalluri, 2003).

Τα επιθηλιακά κύτταρα είναι πολύ σημαντικά καθώς είναι αυτά τα οποία μεταλλάσσονται και οδηγούν στην καρκινογένεση. Επίσης, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του εντέρου, καθώς αποτελούν το φραγμό μεταξύ του οργανισμού και του εξωτερικού περιβάλλοντος (το οποίο στην περίπτωση του εντέρου αναφέρεται στο εσωτερικό του πεπτικού σωλήνα). Σε περίπτωση βλάβης του εντερικού επιθηλίου, μια σειρά από παθογόνα περνάνε από τον αυλό του εντέρου στο βλεννογόνο αλλά και τους υπόλοιπους εν τω βάθει ιστούς, οδηγώντας στην ανάπτυξη φλεγμονής και την επιστράτευση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, την ανάπτυξη ίνωσης αλλά και την επαγωγή του πολλαπλασιασμού στα πλαίσια της επιδιόρθωσης της βλάβης και της ιστικής αναδόμησης. Όλοι αυτοί οι μηχανισμοί μπορούν να συμβάλλουν και στην ανάπτυξη καρκινογένεσης όπως θα αναφερθεί και στη συνέχεια (Mantovani et al., 2008; Quante et al., 2013; Terzic et al., 2010).

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, επίσης παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της καρκινογένεσης και τη διασπορά της νόσου μέσω μεταστάσεων. Τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα μάλιστα παράγουν και εκκρίνουν ουσίες που προάγουν τη νεοαγγειογένεση έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η επαρκής αιμάτωση του όγκου αλλά και η δημιουργία μεταστάσεων (Butler et al., 2010; Murdoch et al., 2008). Παράλληλα, η τοπική αγγείωση επηρεάζει και τη διήθηση του όγκου από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, επηρεάζοντας έτσι και το ίδιο το μικροπεριβάλλον αυτού (Hanahan and Coussens, 2012).

Τέλος, τα μεσεγχυματικά κύτταρα, όπως περιγράφηκε εκτενώς στην παράγραφο 1.4, παίζουν σημαντικότατο ρόλο στην ανάπτυξη ενός καρκίνου και δη στο παχύ έντερο, και γι'αυτό το λόγο τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί ραγδαία το ενδιαφέρον γύρω από τα κύτταρα αυτά στα πλαίσια της κατανόησης της παθοφυσιολογίας του

καρκίνου. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα του εντέρου αποτελούνται κυρίως από τους υποεπιθηλιακούς μυεντερικούς ινοβλάστες, τους ινοβλάστες που βρίσκονται στο χόριο του βλεννογόνιου χιτώνα, τα περικύτταρα, τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που προέρχονται συνήθως από το μυελό των οστών καθώς και τις λείες μυικές ίνες της βλεννογόνιας μυικής στοιβάδας, της εξωτερικής μυικής στοιβάδας του εντέρου και των λεμφαγγείων αυτού (Mifflin et al., 2011; Powell et al., 2011). Παράλληλα έχουν περιγραφεί και άλλα είδη ‘μη συμβατικών’ μεσεγχυματικών κυττάρων στο έντερο (όπως τα διάμεσα κύτταρα του Cajal και τα ινοκύτταρα) τα οποία συνήθως επιτελούν κάποιες πιο εξειδικευμένες λειτουργίες (Reilkoff et al., 2011; Sanders et al., 2014).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα μεσεγχυματικά κύτταρα του εντέρου, και κυρίως οι ινοβλάστες, παίζουν κομβικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του εντέρου μέσω της παραγωγής εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και της ρύθμισης του πολλαπλασιασμού και της λειτουργίας των επιθηλιακών κυττάρων. Ταυτόχρονα συμμετέχουν και στην άμυνα του οργανισμού μέσω της αντιγονοπαρουσιαστικής τους ικανότητας αλλά και του υποστηρικτικού ρόλου που παρουσιάζουν προς τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Kalluri and Zeisberg, 2006; Powell et al., 2011; Saada et al., 2006). Η ενεργοποίησή τους ως αντίδραση σε κάποιο τραύμα ή κάποιο παθογόνο ερέθισμα οδηγεί στη μετατροπή τους στους -μορφολογικά και μεταβολικά διαφορετικούς- μυϊνοβλάστες οι οποίοι μέσω της έκκρισης μιας σειράς ουσιών (κυτταροκίνες, χημειοκίνες, προστανοειδή κλπ.) επάγουν την αντιμετώπιση της απειλής, την αποκατάσταση της βλάβης και την ιστική αναδόμηση (Koliaraki et al., 2017; Roulis and Flavell, 2016).

Σε ορισμένες περιπτώσεις ωστόσο, οι ινοβλάστες αυτοί αποκτούν ένα διαφορετικό προφίλ και μετατρέπονται στους λεγόμενους «ινοβλάστες σχετιζόμενους με τον καρκίνο» (Cancer Associated Fibroblasts ή CAFs) οι οποίοι μπορούν να υποστηρίξουν (συνηθέστερα) ή να παρεμποδίσουν (σπανιότερα) την ανάπτυξη ενός καρκίνου σε συνάρτηση πάντα και με το υπόλοιπο μικροπεριβάλλον του όγκου (Augsten, 2014; Bissell and Hines, 2011). Υπό τον όρο «ινοβλάστες σχετιζόμενοι με τον καρκίνο» αναφέρεται συνήθως ένας ετερογενής πληθυσμός μεσεγχυματικών κυττάρων που εντοπίζονται εντός του όγκου και τα οποία είναι μη νεοπλασματικά – μη επιθηλιακά – μη ενδοθηλιακά – μη φλεγμονώδη (Ohlund et al., 2014). Μέσω ποικίλων μηχανισμών (όπως αυτοί περιγράφηκαν αναλυτικά στην παράγραφο 1.4 και απεικονίζονται συνοπτικά και στην εικόνα 1.10) οι σχετιζόμενοι με τον καρκίνο

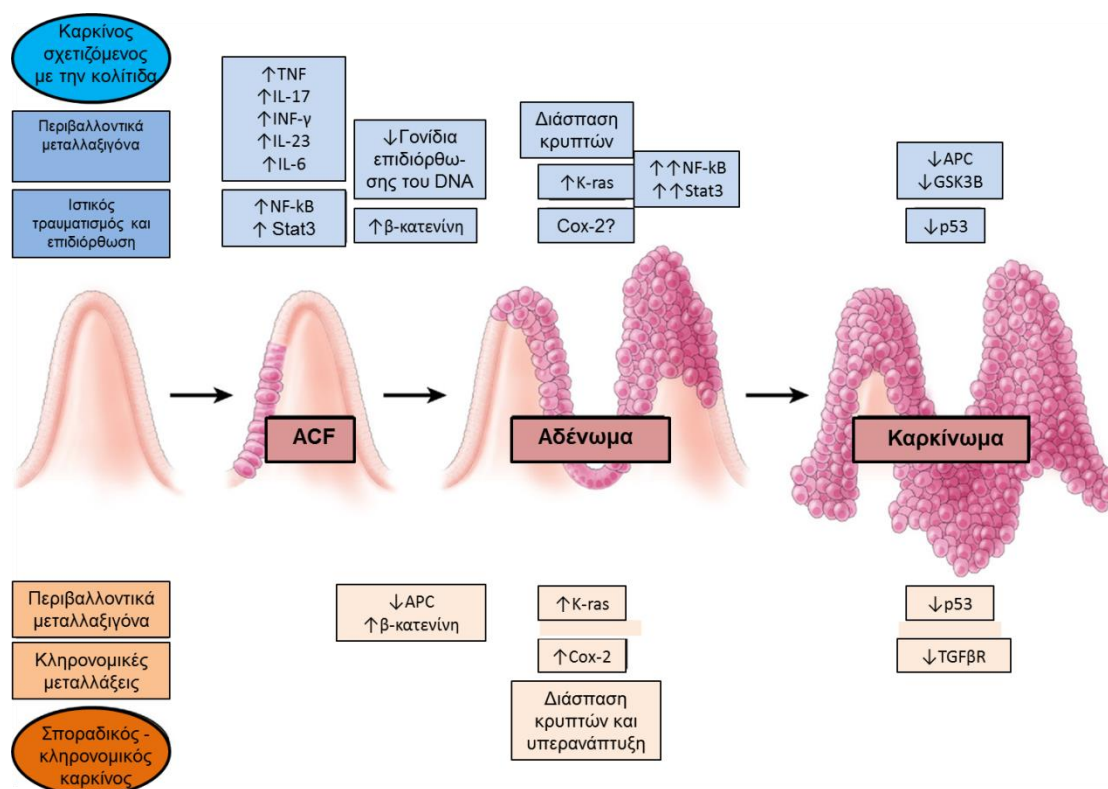
ινοβλάστες συνήθως υποστηρίζουν την έναρξη και προαγωγή ενός καρκίνου επιδρώντας είτε άμεσα στα (προ)καρκινικά κύτταρα είτε μέσω έμμεσων μηχανισμών όπως η διαμόρφωση ενός φιλικού προς την καρκινογένεση μικροπεριβάλλοντος, η ‘ανοσοκατασταλτική’ τους επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα, η αγγειογένεση κοκ. (Goruppi and Dotto, 2013; Quante et al., 2013; Worthley et al., 2010).

3.2.3 Μοριακοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου

Η έναρξη αλλά και η εξέλιξη της νόσου από μοριακής απόψεως, είτε μιλάμε για τις σποραδικές και τις κληρονομικές μορφές καρκίνου του παχέος εντέρου είτε για τις μορφές που σχετίζονται με κάποιο προϋπάρχον φλεγμονώδες νόσημα, έχει περιγραφεί αρκετά αναλυτικά τα τελευταία χρόνια (Fearon and Vogelstein, 1990; Terzic et al., 2010).

Η έναρξη της καρκινογένεσης στις σποραδικές και τις κληρονομικές μορφές καρκίνου πραγματοποιείται ως αποτέλεσμα της συσσώρευσης μεταλλάξεων τόσο σε ογκοκατασταλτικά γονίδια όσο και σε ογκογονίδια σε ένα ή περισσότερα κύτταρα. Κάποια στιγμή, οι μεταλλάξεις αυτές (πχ η μετάλλαξη στο γονίδιο APC) οδηγούν στην ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της β-κατενίνης και στη δημιουργία μιας ή περισσότερων εστιών που περιέχουν κρύπτες οι οποίες εμφανίζουν ανώμαλο πολλαπλασιασμό. Η περαιτέρω συσσώρευση μεταλλάξεων (εξαιτίας και του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού των κυττάρων) και η ενεργοποίηση διαφόρων μηχανισμών όπως για παράδειγμα η ανάπτυξη τοπικής φλεγμονής, οδηγεί στην εξέλιξη των παθολογικών αυτών κρυπτών σε αδένωμα και εν συνεχεία σε αδenoκαρκίνωμα. Από την άλλη μεριά, η χρόνια φλεγμονή που προϋπάρχει στις περιπτώσεις καρκίνου του παχέος εντέρου σχετιζόμενου με την κολίτιδα χαρακτηρίζεται από την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, χημειοκινών, αυξητικών παραγόντων, ενεργών ριζών οξυγόνου κοκ. Όλα αυτά τα μόρια επάγουν μέσω διαφόρων μηχανισμών τη συσσώρευση μεταλλάξεων σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια (πχ APC, p54, K-ras), τη γενετική αστάθεια των κυττάρων, τη δυσλειτουργία των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA, τις επιγενετικές τροποποιήσεις των προκαρκινικών κυττάρων καθώς και την ανοσολογική απόκριση εναντίον του όγκου. Η επιμένουσα φλεγμονή πέραν της έναρξης της ογκογένεσης (μέσω της ενεργοποίησης του πολλαπλασιασμού αλλά και των αντιαποπτωτικών ιδιοτήτων των προκαρκινικών κυττάρων), ενισχύει και την

μετέπειτα εξέλιξη του όγκου αλλά και τις μεταστάσεις αυτού (Εικόνα 3.4) (Mantovani et al., 2008; Quante et al., 2013; Terzic et al., 2010).

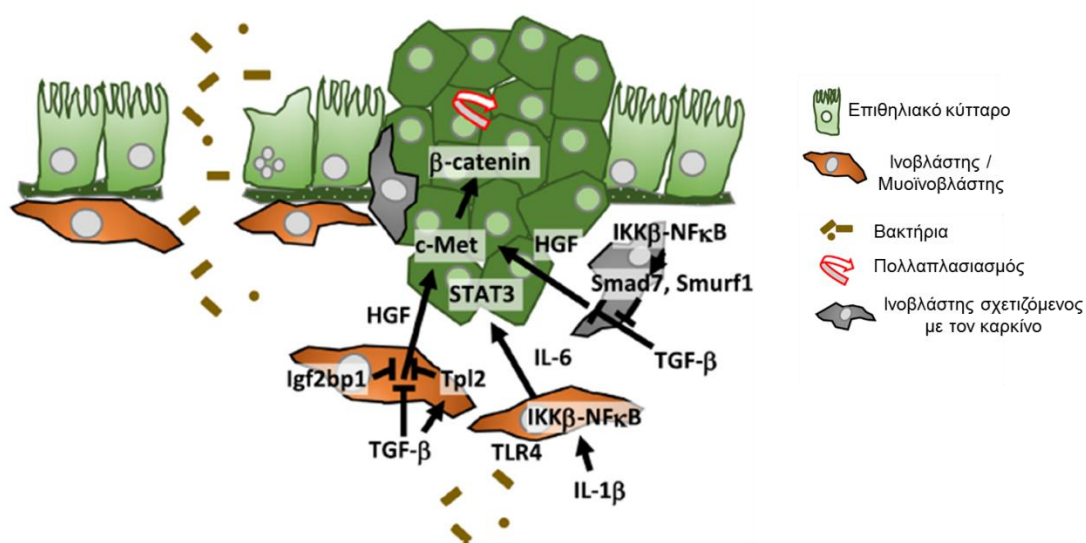


Εικόνα 3.4. Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων σταδίων ανάπτυξης του καρκίνου του εντέρου καθώς και των κύριων μηχανισμών που καθοδηγούν την εξέλιξη αυτή.

ACF (Aberrant Crypt Foci) = Εστίες κρυπτών με ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό
[Μετάφραση και τροποποίηση από τους (Terzic et al., 2010)]

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ένας από τους σημαντικότερους τύπους κυττάρων που επηρεάζει την έναρξη και την εξέλιξη της νόσου είναι τα μεσεγχυματικά κύτταρα του εντέρου. Διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια που ξεκινούν από τα κύτταρα αυτά έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν καθοριστικά τη διαδικασία της καρκινογένεσης, όπως έχει αποδειχτεί με τη χρήση πειραματικών προτύπων ποντικών. Για παράδειγμα, ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας TGF-β, η κινάση Trp2 και η πρωτεΐνη IGF2BP1, ρυθμίζουν την παραγωγή ηπατικού αυξητικού παράγοντα (HGF) από τα μεσεγχυματικά κύτταρα του εντέρου, ο οποίος με τη σειρά του, μέσω του υποδοχέα του c-MET οδηγεί σε ενεργοποίηση του μονοπατιού της β-κατενίνης και ενίσχυση της πιθανότητας ανάπτυξης καρκίνου (Hamilton et al., 2015; Koliaraki et al., 2012; Roulis et al., 2011; Vermeulen et al., 2010). Επίσης, η κινάση IKKβ μέσω της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού του NFκB μπορεί είτε να ενισχύσει είτε να παρεμποδίσει την καρκινογένεση που σχετίζεται με την κολίτιδα, ανάλογα με

το συγκεκριμένο τύπο μεσεγχυματικών κυττάρων αλλά και με το περιβάλλον στο οποίο δρα. Από τη μία μεριά, η ενεργοποίησή της μέσω της ιντερλευκίνης 1β ή του υποδοχέα TLR-4 (ως αποτέλεσμα της αναγνώρισης παθογόνων) οδηγεί στην έκκριση διαφόρων μορίων όπως η ιντερλευκίνη 6, τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν την πρωτεΐνη STAT3 και ενισχύουν την καρκινογένεση (Koliaraki et al., 2015). Από την άλλη μεριά, η ενεργοποίηση της κινάσης IKKβ σε ένα διαφορετικό τύπο μεσεγχυματικών κυττάρων του εντέρου, οδηγεί μέσω της ενεργοποίησης των πρωτεϊνών SMAD7 και SMURF1 στην παρεμπόδιση της σηματοδότησης μέσω του TGF-β και του HGF κι επομένως εμποδίζει την καρκινογένεση (Εικόνα 3.5) (Pallangyo et al., 2015).



Εικόνα 3.5. Σχηματική απεικόνιση της συμμετοχής των μεσεγχυματικών κυττάρων του εντέρου στη διαδικασία της καρκινογένεσης.

Τα μοριακά μονοπάτια που απεικονίζονται έχουν προκύψει από μελέτες σε πειραματικά πρότυπα ποντικών κυρίως γύρω από την καρκινογένεση σχετιζόμενη με την κολίτιδα.

[Μετάφραση και τροποποίηση από τους (Roulis and Flavell, 2016)]

Τέλος, από μελέτες που έγιναν σε βιοψίες ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου βρέθηκε ότι η ύπαρξη στο μικροπεριβάλλον του όγκου ενός αυξημένου αριθμού σχετιζόμενων με τον καρκίνο ινοβλαστών (CAFs) καθώς και η ομοιότητα του μοριακού/μεταγραφικού προφίλ του μικροπεριβάλλοντος με το αντίστοιχο προφίλ των CAFs, σχετίζονται με κακή πρόγνωση της νόσου, υψηλή ανθεκτικότητά της στις θεραπείες αλλά και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης μεταστάσεων (Calon et al., 2015; Isella et al., 2015).

3.2.4 Ο ρόλος της κυκλοοξυγενάσης-2 (Cox-2) στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου

Η κυκλοοξυγενάση είναι ένα ένζυμο το οποίο συναντάται με τη μορφή δύο ισοενζύμων, ήτοι της κυκλοοξυγενάσης-1 (Cox-1) και της κυκλοοξυγενάσης-2 (Cox-2, γνωστή και ως PTGS-2). Η κυκλοοξυγενάση αποτελεί ένα από τα κομβικά μόρια που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος και την παραγωγή προσταγλανδινών και θρομβοξανίων, τα οποία με τη σειρά τους ρυθμίζουν ποικίλες λειτουργίες τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες (για τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού) όσο και σε παθολογικές καταστάσεις (Araujo et al., 2005; FitzGerald and Patrono, 2001). Για παράδειγμα, έχει βρεθεί αυξημένη σε ασθενείς τόσο με καρκίνο του παχέος εντέρου όσο και σε ασθενείς με προκακοήθεις βλάβες ή κακοήθεις συμπαγείς όγκους όπως του στομάχου, του ήπατος, του παγκρέατος, της κεφαλής, του προστάτη, της ουροδόχου κύστης κοκ, ενώ τα αυξημένα αυτά επίπεδα συσχετίστηκαν και με χειρότερη πρόγνωση των ασθενών αυτών (de Groot et al., 2007; Newcomb et al., 2007; Ogino et al., 2008; Wang and Dubois, 2010). Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι η κυκλοοξυγενάση-1 παράγεται σε όλους τους ιστούς του σώματος ακόμη και υπό φυσιολογικές συνθήκες, ενώ η έκφραση της κυκλοοξυγενάσης-2 θεωρούνταν μέχρι πρότινος ότι επάγεται μόνο σε περιπτώσεις φλεγμονής ή καρκίνου. Ωστόσο πρόσφατα αποδείχτηκε ότι και η κυκλοοξυγενάση-2 εκφράζεται σε κάποιους ιστούς υπό φυσιολογικές συνθήκες συμβάλλοντας στη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών αυτών (Kirkby et al., 2016).

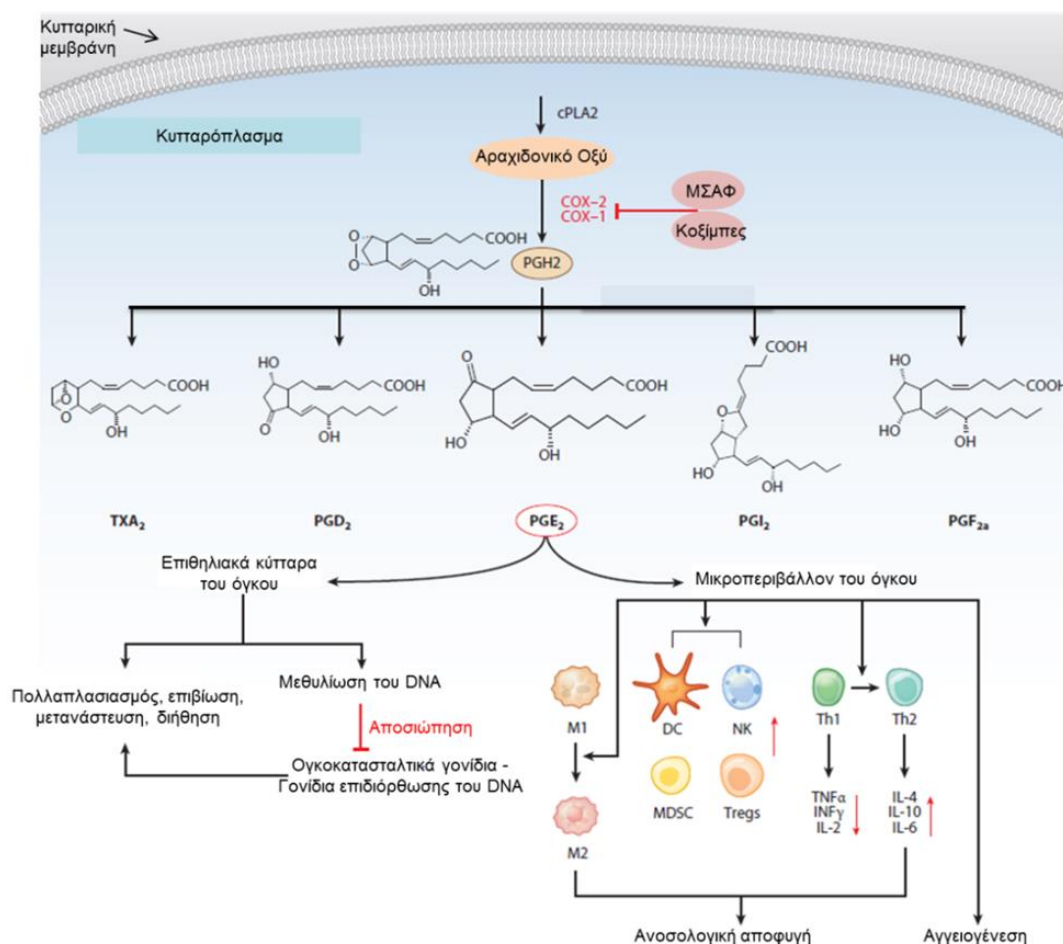
Κύριο προϊόν της δράσης της κυκλοοξυγενάσης-2 αποτελεί η προσταγλανδίνη E2 (PGE2). Η PGE2 δρα μέσω τεσσάρων υποδοχέων (EP1, EP2, EP3, EP4) και ρυθμίζει ποικίλες λειτουργίες σε επίπεδο κυττάρου αλλά και ιστού, όπως για παράδειγμα ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική επιβίωση, η φλεγμονή, η αγγειογένεση και η ανάπτυξη καρκίνου (Greenhough et al., 2009; Wang and Dubois, 2010). Είναι χαρακτηριστικό δε το γεγονός ότι η PGE2 αποτελεί την πιο συχνά και σε μεγαλύτερες ποσότητες απαντώμενη προσταγλανδίνη σε μια σειρά από καρκίνους όπως του παχέος εντέρου, του μαστού, του πνεύμονα, της κεφαλής, και του τραχήλου κοκ, και συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση των ασθενών αυτών (Hambek et al., 2007; McLemore et al., 1988; Rigas et al., 1993; Wang and Dubois, 2004).

Στο έντερο, η κύρια πηγή της Cox-2 είναι τα μεσεγχυματικά κύτταρα και κυρίως τα μεσεγχυματικά κύτταρα που βρίσκονται στο χόριο του βλεννογόνιου χιτώνα ακριβώς κάτω από το επιθήλιο. Η έκφραση της Cox-2 ρυθμίζεται από διάφορες κυτταροκίνες

(όπως ο TNF και η ιντερλευκίνη 1), από προϊόντα των μικροβίων που ζουν στον πεπτικό σωλήνα (όπως οι λιποπολυσακχαρίτες) και από διάφορους αυξητικούς παράγοντες (όπως ο IGF2BP1 και ο FGF9) (Brown et al., 2007; Manieri et al., 2012; Rodriguez Perez et al., 2011; Roulis et al., 2014; Walker et al., 2010). Επίσης έχει βρεθεί ότι τόσο η Cox-2 όσο και η PGE2 είναι αυξημένες σε φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου όπως η νόσος του Crohn καθώς και σε περιπτώσεις καρκίνου του παχέος εντέρου, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στις παθήσεις αυτές. Μάλιστα έχει δείχτει από αρκετές μελέτες σε ασθενείς και πειραματικά πρότυπα ποντικών ότι και στις περιπτώσεις αυτές η Cox-2 και η PGE2 προέρχονται κατά κύριο λόγο από τα μεσεγχυματικά κύτταρα του εντέρου (Adegboyega et al., 2004; Eberhart et al., 1994; Hull et al., 2006; Roulis et al., 2014; Sonoshita et al., 2002).

Μέχρι στιγμής έχουν περιγραφεί αρκετοί διαφορετικοί μηχανισμοί μέσω των οποίων η -παραγόμενη από την Cox-2 - PGE2 επηρεάζει την ανάπτυξη του καρκίνου είτε επιδρώντας άμεσα στα καρκινικά κύτταρα είτε στοχεύοντας το μικροπεριβάλλον του όγκου ειδικά σε ότι αφορά τον καρκίνο του παχέος εντέρου (Εικόνα 3.6) (Wang and DuBois, 2013). Πρώτον, η PGE2 προάγει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων ενώ παράλληλα αναστέλλει την απόπτωσή τους μέσω ενεργοποίησης διαφόρων μοριακών μονοπατιών, όπως του NFkB, του GSK3β/b-catenin και του PI3K-Akt-PPARδ (Poligone and Baldwin, 2001; Sheng et al., 1998; Wang et al., 2004) αλλά και μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων σε επίπεδο DNA (Xia et al., 2012). Παράλληλα προάγει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών βλαστοκυττάρων καθώς και την τοπική διήθηση των καρκινικών κυττάρων στους γύρω ιστούς αλλά και τη δημιουργία απομακρυσμένων μεταστάσεων (Buchanan et al., 2006; Buchanan et al., 2003; Wang et al., 2015). Δεύτερον, είναι γνωστό ότι η φλεγμονή που αναπτύσσεται στο περιβάλλον του όγκου συμβάλλει στη διαδικασία της καρκινογένεσης προάγοντας τον κακοήγη μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων, την ανάπτυξη του όγκου, τη νεοαγγειογένεση και τέλος τη μετάσταση (Noonan et al., 2008). Η PGE2, όντας μια μείζονα προφλεγμονώδης προσταγλανδίνη, συμβάλλει στη δημιουργία φλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος γύρω από τον όγκο (ειδικά στα πλαίσια χρόνιων φλεγμονωδών παθήσεων του εντέρου όπως η νόσος του Crohn), ενισχύοντας την προσέλκυση και ενεργοποίηση σειράς κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα T-λεμφοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα ουδετερόφιλα (Sheibanie et al., 2007). Τρίτον, η PGE2 συμβάλλει στην αποφυγή της ανοσολογικής αντίδρασης έναντι του όγκου μέσω ποικίλων

μηχανισμών. Αφενός μεν μετατρέποντας τις ανοσολογικές αντιδράσεις στο μικροπεριβάλλον του όγκου από ογκοκατασταλτικές (Th1 αντιδράσεις) σε ανοσοκατασταλτικές (Th2 αντιδράσεις) μέσω της μείωσης της παραγωγής κυτταροκινών όπως ο TNF, η ιντερφερόνη- γ και η ιντερλευκίνη-2 και της ταυτόχρονης αύξησης της παραγωγής κυτταροκινών όπως η οι ιντερλευκίνες 4,6 και 10 (Huang et al., 1998; Snijdwint et al., 1993; Stolina et al., 2000). Αφετέρου δε, επιδρά άμεσα στα διάφορα κυτταροτοξικά κύτταρα αναστέλλοντας τη δράση τους, αλλά και στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα καταστέλλοντας την αντιγονοπαρουσίαση (Ahmadi et al., 2008; Baratelli et al., 2005; Zeddou et al., 2005). Τέταρτον, η PGE₂ προάγει τη νεοαγγειογένεση μέσω της αλληλεπίδρασής της τόσο με τα επιθηλιακά κύτταρα του όγκου όσο και με τα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος και κυρίως τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Από τη μία μεριά ενισχύει την έκκριση διαφόρων προαγγειογενετικών παραγόντων όπως ο VEGF και ο CXCL1 (Sonoshita et al., 2001; Wang et al., 2006) και από την άλλη επιδρά άμεσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα προάγοντας τόσο την παραγωγή προαγγειογενετικών παραγόντων όσο και την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και τη διασπορά τους ώστε να σχηματίσουν νέα αγγεία (Dormond et al., 2002; Pai et al., 2001; Salcedo et al., 2003).



Εικόνα 3.6. Η παραγωγή της PGE2 ως αποτέλεσμα της δράσης της Cox-2 συμβάλλει στην καρκινογένεση. Η δράση της PGE2 στην καρκινογένεση γίνεται μέσω ποικίλων μηχανισμών οι οποίοι επιδρούν είτε άμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα του όγκου είτε έμμεσα στο μικροπεριβάλλον αυτού. Αντίστοιχα, η χρήση των Μη Στεροειδών Αντιφλεγμονωδών Φαρμάκων (ΜΣΑΦ) ή των Κοξίμπων η οποία μπλοκάρει τη δράση της Cox-2 και άρα την παραγωγή PGE2 επιδρά σε όλους αυτούς τους μηχανισμούς παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη του όγκου.

TXA₂=Θρομβοξάνιο A₂, PGD₂=Προσταγλανδίνη D₂, PGI₂=Προστακυκλίνη, PGF_{2α}=Προσταγλανδίνη F_{2α}, PGH₂=Προσταγλανδίνη H₂, DC=Δενδριτικά κύτταρα, Th1-Th2=Βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα τύπου 1 ή 2, NK=Κύτταρα φυσικοί φονείς, MDSC=Κατασταλτικά κύτταρα προερχόμενα από το μυελό, Tregs=Ρυθμιστικά Τ-λεμφοκύτταρα, M1-M2=Μακροφάγα πολωμένα προς το φαινότυπο 1 ή 2 [Μετάφραση και τροποποίηση από τους (Wang and DuBois, 2013)]

Ταυτόχρονα υπάρχουν αρκετά δεδομένα από *in vivo* πειράματα με ποντικούς τα οποία επιβεβαιώνουν το σημαντικότατο ρόλο που παίζει η Cox-2 και η PGE2 στην καρκινογένεση του εντέρου. Η γενετική απαλοιφή της κυκλοοξυγενάσης-2 ή η φαρμακολογική της παρεμπόδιση σε ποντικούς οι οποίοι αναπτύσσουν όγκους στο πεπτικό τους σύστημα (*APC^{min/+}* και *APC^{Δ716}* ποντικοί) μείωσε σημαντικά τον αριθμό των όγκων αυτών (Chulada et al., 2000; Oshima et al., 1996; Oshima et al., 2001). Παρόμοια αποτελέσματα έδωσε και η γενετική απαλοιφή του ενζύμου μικροσωμιακή συνθάση της προσταγλανδίνης E2 (mPGES-1) η οποία είχε ως αποτέλεσμα τη μειωμένη ενδογενή παραγωγή PGE2 (Nakanishi et al., 2008). Επίσης παρόμοια αποτελέσματα έδωσε και η γενετική απαλοιφή των υποδοχέων της PGE2, χωρίς ωστόσο να έχει αποδειχτεί ποιος είναι ο κύριος υποδοχέας μέσω του οποίου η PGE2 προάγει την καρκινογένεση του εντέρου (Mutoh et al., 2002; Sonoshita et al., 2001; Watanabe et al., 1999). Αντίθετα, η θεραπεία με εξωγενή χορήγηση PGE2 στους παραπάνω ποντικούς αλλά και σε ποντικούς οι οποίοι αναπτύσσουν όγκους στο παχύ τους έντερο μετά από χορήγηση αζοξυμεθανίου (AOM), οδήγησε σε σημαντική αύξηση του αριθμού των όγκων που ανέπτυξαν (Hansen-Petrik et al., 2002; Kawamori et al., 2003; Wang et al., 2004).

Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, η χρήση φαρμάκων τα οποία μπλοκάρουν τη δράση της κυκλοοξυγενάσης-2 έχει προταθεί από νωρίς για την αντιμετώπιση διαφόρων μορφών καρκίνου με προεξάρχον τον καρκίνο του παχέος εντέρου στους ανθρώπους (Elder and Paraskeva, 1998; Wang and Dubois, 2010). Κλινικές δοκιμές που έγιναν με τη χρήση είτε Μη Στεροειδών Αντιφλεγμονωδών Φαρμάκων (τα οποία μπλοκάρουν ταυτόχρονα και την Cox-1 και την Cox-2) είτε ειδικών αναστολέων της Cox-2 (οι λεγόμενες Κοξίμπες - Coxibs), παρουσίασαν θετικά και πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε ότι αφορά τόσο την πρόληψη όσο και τη θεραπεία των διαφόρων μορφών καρκίνου του εντέρου (Wang and DuBois, 2013). Ωστόσο το γεγονός ότι τόσο τα ΜΣΑΦ όσο και οι Κοξίμπες εμφανίζουν σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες κυρίως από το πεπτικό και το καρδιαγγειακό σύστημα (μάλιστα κάποιες Κοξίμπες

έχουν αποσυρθεί από την αγορά εξ' αιτίας σημαντικότητας ανεπιθύμητων ενεργειών από το καρδιαγγειακό), καθιστά δύσκολη την καθιέρωση και ευρεία χρήση τους για την πρόληψη ή/και τη θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου (Cuzick et al., 2009).

Φαίνεται λοιπόν ότι η σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού Cox-2 – PGE2 παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Επομένως κρίνεται επιτακτική η ανάγκη ανεύρεσης κυττάρων-στόχων αλλά και περισσότερο εξειδικευμένων θεραπειών που θα στοχεύουν το μονοπάτι αυτό χωρίς όμως τις αντίστοιχες ανεπιθύμητες ενέργειες.

3.3 Πειραματικά πρότυπα ποντικών για τη μελέτη του καρκίνου του παχέος εντέρου

Παρά τις σημαντικότερες προόδους που έχουν γίνει τις τελευταίες δεκαετίες στη γνώση μας γύρω από τη φυσιολογία και την παθοφυσιολογία του καρκίνου και παρά την αναγνώριση των σημαντικότερων μοριακών μονοπατιών που καθοδηγούν την όλη διαδικασία της καρκινογένεσης, ακόμη δεν έχει καταστεί δυνατή η πλήρης ίαση όλων των μορφών καρκίνου ειδικά όταν αναφερόμαστε στα προχωρημένα στάδια της νόσου. Οι κλασσικές θεραπείες – χειρουργικές επεμβάσεις, ακτινοβολίες, χημειοθεραπείες – συνεπικουρούμενες από νέες μορφές θεραπειών όπως οι ανοσοθεραπείες κλπ., ναι μεν έχουν συμβάλει στη συνολική αύξηση της επιβίωσης των περισσότερων ασθενών με καρκίνο, ωστόσο ακόμη παρουσιάζουν σημαντικές αδυναμίες (Kersten et al., 2017; Sharma and Allison, 2015). Πολλές φορές, μετά την αντιμετώπιση ενός όγκου, η νόσος επανεμφανίζεται παρουσιάζοντας μάλιστα επιθετικότερο προφίλ (Blatter and Rottenberg, 2015; Kottke et al., 2013). Επιπρόσθετα, ένα άλλο ακόμη πρόβλημα αποτελούν οι μεταστάσεις οι οποίες συνιστούν και τη σημαντικότερη αιτία θανάτου (>90% των περιπτώσεων) σχετιζόμενου με τον καρκίνο (Weigelt et al., 2005).

Αντίστοιχα προβλήματα παρουσιάζονται και στους ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου παρά την όποια πρόοδο έχει συντελεστεί τα τελευταία χρόνια και στον τομέα αυτό (Van Cutsem et al., 2010). Εκτός από την -προς το παρόν- ατελή και μη πλήρη γνώση/κατανόηση όλων των μηχανισμών και μοριακών μονοπατιών που καθοδηγούν την καρκινογένεση στο έντερο, μια σειρά άλλοι παράγοντες συμβάλλουν στην αδυναμία πλήρους αντιμετώπισης και ίασης της νόσου. Αρχικά, δεν έχουν αναπτυχθεί

ακόμη οι κατάλληλοι βιολογικοί δείκτες οι οποίοι να μπορούν να προβλέψουν έγκαιρα την (πρώιμη) έναρξη ή την υποτροπή της νόσου, την ευαισθησία της σε διάφορες θεραπείες αλλά και την ανάπτυξη μεταστάσεων (Walther et al., 2009). Επίσης, τα καρκινικά κύτταρα μέσω ποικίλων μηχανισμών, και κυρίως μέσω της απόκτησης νέων μεταλλάξεων, εμφανίζουν ή αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στις διάφορες διαθέσιμες θεραπείες, πολλές φορές ακόμη και μετά την έναρξη και αρχική επιτυχία της θεραπείας (Garraway and Janne, 2012). Τέλος, σημαντικό πρόβλημα αποτελεί η πολύ χαμηλή αποτελεσματικότητα στην ανάπτυξη νέων θεραπειών και στην αξιοποίηση αυτών στην κλινική πράξη, καθώς μόνο το 5% των χημικών ενώσεων που δείχνουν θετικά αποτελέσματα στις προκλινικές μελέτες καταφέρνουν να περάσουν τις κλινικές δοκιμές και να πάρουν έγκριση (Sharpless and Depinho, 2006; Voskoglou-Nomikos et al., 2003).

Για την αντιμετώπιση όλων των παραπάνω προβλημάτων και την ανάπτυξη νέων αποτελεσματικότερων θεραπειών αξιοποιούνται διάφορα πειραματικά πρότυπα ποντικών τα οποία μιμούνται την ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου. Η χρήση ζωντανών οργανισμών όπως οι ποντικοί είναι απαραίτητη καθώς η χρήση κυτταροκαλλιιεργειών (ακόμη και με την αξιοποίηση πιο σύνθετων πρωτοκόλλων όπως η συν-καλλιέργεια επιθηλιακών-μεσεγχυματικών κυττάρων ή η καλλιέργεια οργανοειδών κλπ.) ή (καρκινικών) κυτταρικών σειρών δεν μπορεί να υποκαταστήσει τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις που υπάρχουν μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος του όγκου *in vivo* (Ernst and Ramsay, 2012; Huh et al., 2011; Medema and Vermeulen, 2011; Sato et al., 2009).

Σε ότι αφορά λοιπόν τα διάφορα πειραματικά πρότυπα ποντικών τα οποία χρησιμοποιούνται σήμερα για τη μελέτη της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο, υπάρχουν τέσσερις βασικές κατηγορίες (Johnson and Fleet, 2013; McIntyre et al., 2015):

- 1) Γενετικά τροποποιημένοι ποντικοί. Οι ποντικοί αυτοί είτε είναι διαγονιδιακοί είτε είναι ποντικοί στους οποίους έχει γίνει γενετική απαλοιφή κάποιας πρωτεΐνης με το σύστημα της Cre-ανασυνδυάσης. Γίνεται δηλαδή στοχευμένη υπερέκφραση ή απαλοιφή ενός ή περισσότερων από τα γονίδια τα οποία έχει βρεθεί ότι παίζουν κάποιο ρόλο στην καρκινογένεση του εντέρου όπως για παράδειγμα το γονίδιο APC το οποίο έχει βρεθεί ότι είναι μεταλλαγμένο στο 80% των περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου (Torre et al., 2015). Ο

Πίνακας 3.1 αναφέρει τους συχνότερα χρησιμοποιούμενους σήμερα γενετικά τροποποιημένους ποντικούς καθώς και κάποια βασικά χαρακτηριστικά του φαινοτύπου που παρουσιάζουν.

Πίνακας 3.1. Τα συχνότερα γενετικά τροποποιημένα πειραματικά πρότυπα ποντικών που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Στέλεχος ποντικού	Μηχανισμός και σκεπτικό δημιουργίας	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
<i>Apc^{min/+}</i> (Moser et al., 1990; Su et al., 1992)	-Τυχαία σημειακή μετάλλαξη μετά από τη χρήση Εθυλνιτροζουρίας	-Αναπαριστά επαρκώς το Σύνδρομο Οικογενούς Αδενωματώδους Πολυποδίασης -Πάνω από 80% των σποραδικών όγκων παρουσιάζουν μετάλλαξη στο γονίδιο APC -Μικρή διάρκεια ζωής των ποντικών ώστε να ολοκληρώνονται γρήγορα οι αναλύσεις	-Ανάπτυξη εκατοντάδων χαμηλού βαθμού αδενωμάτων -Μικρή διάρκεια ζωής των ποντικών λόγω εντερικής απόφραξης, πρόπτωσης ή αιμορραγίας -Η μικρή διάρκεια ζωής συνεπάγεται τη μη συσσώρευση αρκετών επιπλέον μεταλλάξεων ώστε τα αδενώματα να μετατραπούν σε αδενοκαρκινώματα και να δώσουν μεταστάσεις -Τα αδενώματα/όγκοι αναπτύσσονται πρωτίστως στο λεπτό έντερο και όχι στο παχύ
<i>Msh2^{-/-}</i> (Reitmair et al., 1995)	-Οι μεταλλάξεις στο συγκεκριμένο γονίδιο είναι συχνές στον καρκίνο του παχέος εντέρου	-Αναπαριστά το Σύνδρομο του Κληρονομικού Μη-Πολυποειδούς Καρκίνου του Παχέος Εντέρου (HNPCC ή σύνδρομο Lynch - ~3% των περιπτώσεων καρκίνου του εντέρου)	-Οι ποντικοί αυτοί εμφανίζουν τη μετάλλαξη σε όλα τα κύτταρα του σώματός τους και παρουσιάζουν αυξημένη προδιάθεση για την ανάπτυξη λεμφωμάτων
<i>Villin-Cre/ Msh2^{LoxP}</i> (Kucherlapati et al., 2010)	-Περιορισμός της μετάλλαξης του Msh2 στο έντερο, ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη λεμφώματος	-Ανάπτυξη αδενωμάτων και αδενοκαρκινωμάτων του εντέρου -Δεν πεθαίνουν οι ποντικοί από λεμφώματα	-Δεν αναπτύσσονται μεταστάσεις
<i>Apc^{580S/580S}</i> (Shibata et al., 1997)	-Εμφάνιση μικρότερου αριθμού όγκων οι οποίοι εντοπίζονται στο	-Διάρκεια ζωής των ποντικών >1 έτους -Αναπτύσσονται 2-3 εντερικά αδενώματα -Κάποιοι ποντικοί	-Δεν αναπτύσσονται μεταστάσεις -Το ανενεργό αλληλίο του APC οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της

	παχύ έντερο με σκοπό την αναπαράσταση προχωρημένου καρκίνου του παχέος εντέρου	αναπτύσσουν αδενοκαρκινώματα	πρωτεΐνης αυτής σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού προδιαθέτοντας στην ανάπτυξη ηπατοκυτταρικών όγκων
<i>Apc^{Lox15/+}; Fabpl-Cre</i> (Robanus-Maandag et al., 2010)	-Εμφάνιση μικρότερου αριθμού όγκων οι οποίοι εντοπίζονται στο παχύ έντερο με σκοπό την αναπαράσταση προχωρημένου καρκίνου του παχέος εντέρου	-Διάρκεια ζωής των ποντικών >1 έτους -Αναπτύσσονται 2-3 εντερικά αδενώματα -Κάποιοι ποντικοί αναπτύσσουν αδενοκαρκινώματα	-Δεν αναπτύσσονται μεταστάσεις
<i>Apc^{min/+} Trp53^{-/-}</i> (Clarke et al., 1995)	-Προσθήκη μεταλλάξεων σε επιπλέον 'συνεργαζόμενα με το APC' γονίδια (p53) με σκοπό την αναπαράσταση προχωρημένου καρκίνου του παχέος εντέρου		-Δεν αναπτύσσονται μεταστάσεις
<i>Apc^{2Lox14/+} Kras^{LSL-G12D} και Fabpl-Cre</i> (Haigis et al., 2008)	-Προσθήκη μεταλλάξεων σε επιπλέον 'συνεργαζόμενα με το APC' γονίδια (Kras) με σκοπό την αναπαράσταση προχωρημένου καρκίνου του παχέος εντέρου	-Αναπτύσσονται περισσότεροι όγκοι σε σύγκριση με τους ποντικούς που εμφανίζουν μετάλλαξη μόνο στο ένα από τα δύο γονίδια (APC ή Kras)	-Δεν αναπτύσσονται μεταστάσεις
Ποντικοί με μεταλλάξεις στο APC και ταυτόχρονη διαταραχή στα 2 Tgfr2, Smad2, Smad4 (Hamamoto et al., 2002; Munoz et al., 2006; Takaku et al., 1998)	-Προσθήκη μεταλλάξεων σε επιπλέον 'συνεργαζόμενα με το APC' γονίδια με σκοπό την αναπαράσταση προχωρημένου καρκίνου του παχέος εντέρου	-Αναπτύσσονται περισσότεροι όγκοι σε σύγκριση με τους ποντικούς που εμφανίζουν μετάλλαξη μόνο στο ένα από αυτά τα γονίδια	-Δεν αναπτύσσονται μεταστάσεις
<i>Apc^{min/+} Villin-Cre Fbxw7^(AG)</i> (Babaei-Jadidi et al., 2011)	-Προσθήκη μεταλλάξεων σε επιπλέον 'συνεργαζόμενα	-Μειωμένη διάρκεια ζωής των ποντικών -Αυξημένος αριθμός όγκων	-Δεν αναπτύσσονται αδενοκαρκινώματα ή μεταστάσεις

	με το APC' γονίδια (Fbxw) με σκοπό την αναπαράσταση προχωρημένου καρκίνου του παχέος εντέρου		
<i>Apc^{CKO/CKO}-LSL-G12D; Kras^{tm4tyj/+}</i> (Hung et al., 2010)	-Προσθήκη μεταλλάξεων σε επιπλέον 'συνεργαζόμενα με το APC' γονίδια (Kras) με σκοπό την αναπαράσταση προχωρημένου καρκίνου του παχέος εντέρου -Περιορισμός της καρκινογένεσης στο κόλον -Μείωση του αριθμού των όγκων	-Ανάπτυξη αδενοκαρκινωμάτων μετά από 5 μήνες -Ανάπτυξη απομακρυσμένων μεταστάσεων (πχ στο ήπαρ) μετά από 6 μήνες -Παρακολούθηση in vivo μέσω κολονοσκόπησης	-Απαιτείται κοπιώδης χειρουργική επέμβαση για τη χορήγηση του αδενοϊού που θα προκαλέσει την απαλοιφή των γονιδίων στόχων μόνο στο κόλον

[Μετάφραση και τροποποίηση από τους (McIntyre et al., 2015)]

- 2) Πειραματικά πρότυπα μεταμόσχευσης καρκινικών κυττάρων σε ποντικούς με αποτέλεσμα την τοπική ή απομακρυσμένη ανάπτυξη όγκου. Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα ή κομμάτια όγκου από ασθενείς ή ποντικούς ή ακόμη και από καρκινικές σειρές ενίονται ή μεταμοσχεύονται χειρουργικά σε ποντικούς με αποτέλεσμα την τοπική ανάπτυξη όγκου. Κάποιες φορές η τοπική αυτή ανάπτυξη όγκου συνοδεύεται και από ανάπτυξη μεταστάσεων. Η τεχνική αυτή, όταν αφορά τη μεταφορά καρκινικού υλικού από ανθρώπους ή από ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές σε ποντικούς, συνήθως πραγματοποιείται σε ποντικούς οι οποίοι είναι ανοσοανεπαρκείς ούτως ώστε να αποφευχθεί η απόρριψη του 'μοσχεύματος' λόγω προέλευσής του από διαφορετικό είδος (Chen et al., 2015; Forbes et al., 2011; Johnson and Fleet, 2013; Karim and Huso, 2013; Kersten et al., 2017; Klijn et al., 2015; McIntyre et al., 2015). Στον Πίνακα 3.2 φαίνονται οι σημαντικότερες κατηγορίες 'μεταμόσχευσης' καρκινικών κυττάρων σε ποντικούς που εφαρμόζονται σήμερα.

Πίνακας 3.2. Τα σημαντικότερα χρησιμοποιούμενα πειραματικά πρότυπα «ξеноμεταμόσχευσης» καρκινικού υλικού σε ποντικούς για τη μελέτη του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Πειραματικό πρότυπο μεταμόσχευσης	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
<u>Υποδόριο ξενομόσχευμα:</u> Υποδόρια ένεση κυττάρων («ξενομόσχευμα») που προέρχονται από καρκινική σειρά καρκίνου του παχέος εντέρου (Flatmark et al., 2004).	-Χαμηλό κόστος -Ταχεία ανάπτυξη του όγκου (2 βδομάδες) -Χρήση καλά χαρακτηρισμένων κυτταρικών σειρών -Δυνατότητα γενετικής τροποποίησης των κυττάρων πριν τη μεταμόσχευση -Εύκολα προσβάσιμο σε όλα τα εργαστήρια	-Αντιπροσωπευτικό της προχωρημένης νόσου -Η καλλιέργεια οδηγεί σε κλωνική επιλογή -Διαφορές μεταξύ της περιοχής προέλευσης των καρκινικών κυττάρων και της περιοχής υποδοχής τους -Αναντιστοιχία μεταξύ καρκινικών κυττάρων του ανθρώπου και κυττάρων του στρώματος του ποντικού -Ανοσοανεπαρκής ξενιστής -Σπάνιες μεταστάσεις
<u>Ορθοτοπικό ξενομόσχευμα:</u> Ένεση ξενομοσχεύματος προερχόμενου από κυτταρική σειρά καρκίνου του παχέος εντέρου στους ορογόνους του εντέρου ανοσοανεπαρκών ποντικών (Cespedes et al., 2007; Jin et al., 2011; Pocard et al., 1996).	-Όπως παραπάνω -Πιο «φυσιολογικό» περιβάλλον για τα καρκινικά κύτταρα -Κάποια μοσχεύματα δίνουν ακόμη και μεταστάσεις στο ήπαρ	-Όπως παραπάνω (εκτός από τις μεταστάσεις οι οποίες δεν είναι τόσο σπάνιες) -Συχνά απαιτείται χειρουργείο για τη μεταμόσχευση των κυττάρων
<u>Ξενομόσχευμα προερχόμενο από ασθενείς (Patient-Derived Xenografts/PDXs):</u> Κομμάτια μεγέθους 1-2mm από ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου συρράπτονται στο έντερο ανοσοανεπαρκών ποντικών (Fu et al., 1991).	-Μεταστάσεις στο ήπαρ -Αποφυγή της επικράτησης κάποιου συγκεκριμένου κλώνου μετά από μακράς διάρκειας καλλιέργεια -Προσωρινή διατήρηση της επικοινωνίας όγκου-στρώματος από το ίδιο είδος -Πιο «φυσιολογικό» περιβάλλον για τα καρκινικά κύτταρα	-Τα κύτταρα του στρώματος του ποντικού αντικαθιστούν αυτά του ανθρώπου σε λίγες βδομάδες -Ανοσοανεπαρκής ξενιστής -Περιορισμένος αριθμός χειρουργικών δειγμάτων προς μεταμόσχευση -Ακριβή και χρονοβόρα μέθοδος
<u>Συνμόσχευμα/ισομόσχευμα:</u> Συρραφή τμήματος καρκινικού ιστού ή καρκινικής σειράς προερχόμενης από ποντικό σε έναν άλλο γενετικά παρόμοιο και ανοσοεπαρκή ποντικό (Voskoglou-Nomikos et al., 2003).	-Καμία αναντιστοιχία λόγω είδους μεταξύ όγκου και στρώματος -Ο ξενιστής έχει ακέραιο ανοσοποιητικό σύστημα κι επομένως μπορούν να μελετηθούν και ανοσοτροποποιητικά αντικαρκινικά φάρμακα	-Ακριβή και χρονοβόρα μέθοδος -Το πειραματικό αυτό πρότυπο δεν είναι ανθρώπινο

- 3) Πειραματικά πρότυπα χημικής καρκινογένεσης στα οποία μία καρκινογόνος ουσία χορηγείται στους ποντικούς μέσω διαφόρων οδών χορήγησης (πχ ενδοπεριτοναϊκή έγχυση, διορθική χορήγηση κλπ.) και οδηγεί στην επαγωγή καρκινογένεσης. Μέχρι στιγμής έχουν δοκιμαστεί ποικίλες χημικές ουσίες όπως για παράδειγμα η Διμεθυλνυδραζίνη (DMH), το αζοξυμεθάνιο (AOM), το θειικό άλας δεξτράνης (DSS), η 2-αμινο-1-μεθυλ-6-φενυλ-ιμιδαζολική πυριδίνη (PhIP) κοκ. Τα πειραματικά αυτά πρότυπα προσπαθούν να μιμηθούν τη σποραδική καρκινογένεση αλλά η απόκριση των ποντικών σε αυτά ποικίλει και εξαρτάται τόσο από το μοτίβο χορήγησης (οδός χορήγησης, διάρκεια, δοσολογία κοκ) όσο και από το γενετικό υπόβαθρο του ποντικού (Andreassen et al., 2002; Karim and Huso, 2013; Neufert et al., 2007).
- 4) Πειραματικά πρότυπα ποντικών που σκοπό έχουν να προσομοιάσουν στον καρκίνο του εντέρου που αναπτύσσεται σε έδαφος χρόνιας φλεγμονής. Η φλεγμονή αυτή επάγεται είτε αυτόματα ως αποτέλεσμα γενετικής απαλοιφής γονιδίων όπως η ιντερλευκίνη 10 (IL-10^{-/-} ποντικοί), η ιντερλευκίνη 2 (IL-2^{null} ποντικοί) και η βλεννίνη 2 (Muc2^{-/-} ποντικοί) (Sohn et al., 2001; Van der Sluis et al., 2006) είτε πειραματικά μέσω της χρήσης θειικού άλατος δεξτράνης (DSS) στο νερό των ποντικών (Cooper et al., 2000). Επίσης, σε συνδυασμό με την πειραματική πρόκληση κολίτιδας με τη χρήση του DSS, έχει δοκιμαστεί και η ταυτόχρονη χορήγηση της καρκινογόνου ουσίας αζοξυμεθάνης (AOM) η οποία οδηγεί σε αυξημένη επίπτωση καρκινογένεσης στους ποντικούς αυτούς (De Robertis et al., 2011).

3.4 Συμπεράσματα

Ο καρκίνος αποτελεί σήμερα μια από τις συχνότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως ενώ στις πρώτες θέσεις θανάτου από καρκίνο βρίσκονται οι ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο του παχέος εντέρου. Η πολυπλοκότητα των μοριακών μηχανισμών/μονοπατιών που καθοδηγούν την όλη διαδικασία της καρκινογένεσης καθώς και οι διαρκείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ των (προ)καρκινικών κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος που τα περιβάλλει καθιστούν αρκετά δύσκολη την αποτελεσματική αντιμετώπιση και θεραπεία της νόσου αυτής. Επομένως υπάρχει

επιτακτική ανάγκη για την ανεύρεση νέων πιο εξειδικευμένων θεραπειών με λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες. Ένας αρκετά ενδιαφέρον στόχος θα μπορούσε να είναι το σύστημα της κυκλοοξυγενάσης-2 – Προσταγλανδίνης E2 το οποίο έχει δείχτει ότι παίζει κομβικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου του εντέρου. Ωστόσο οι ήδη υπάρχουσες θεραπείες που στοχεύουν το σύστημα αυτό, αν και πολλά υποσχόμενες, εντούτοις συνοδεύονται από σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες οι οποίες καθιστούν δύσκολη την ευρεία χρήση τους. Παράλληλα υπάρχει ανάγκη για την ανεύρεση νέων μοριακών δεικτών οι οποίοι έγκαιρα θα προειδοποιούν για την έναρξη ή υποτροπή της νόσου καθώς και για την ευαισθησία της σε διάφορες θεραπείες.

Βιβλιογραφία

Adegboyega, P.A., Ololade, O., Saada, J., Mifflin, R., Di Mari, J.F., and Powell, D.W. (2004). Subepithelial myofibroblasts express cyclooxygenase-2 in colorectal tubular adenomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 5870-5879.

Ahmadi, M., Emery, D.C., and Morgan, D.J. (2008). Prevention of both direct and cross-priming of antitumor CD8+ T-cell responses following overproduction of prostaglandin E2 by tumor cells in vivo. *Cancer research* 68, 7520-7529.

Allen, M., and Louise Jones, J. (2011). Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *The Journal of pathology* 223, 162-176.

Andreassen, A., Mollersen, L., Vikse, R., Steffensen, I.L., Mikalsen, A., Paulsen, J.E., and Alexander, J. (2002). One dose of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) or 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) induces tumours in Min/+ mice by truncation mutations or LOH in the Apc gene. *Mutation research* 517, 157-166.

Araujo, L.F., Soeiro Ade, M., Fernandes Jde, L., and Serrano Junior, C.V. (2005). [Cardiovascular events: a class effect by COX-2 inhibitors]. *Arquivos brasileiros de cardiologia* 85, 222-229.

Augsten, M. (2014). Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Frontiers in oncology* 4, 62.

Babaei-Jadidi, R., Li, N., Saadeddin, A., Spencer-Dene, B., Jandke, A., Muhammad, B., Ibrahim, E.E., Muraleedharan, R., Abuzinadah, M., Davis, H., *et al.* (2011). FBXW7 influences murine intestinal homeostasis and cancer, targeting Notch, Jun, and DEK for degradation. *The Journal of experimental medicine* 208, 295-312.

Balkwill, F.R., Capasso, M., and Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *Journal of cell science* 125, 5591-5596.

Baratelli, F., Lin, Y., Zhu, L., Yang, S.C., Heuze-Vourc'h, N., Zeng, G., Reckamp, K., Dohadwala, M., Sharma, S., and Dubinett, S.M. (2005). Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. *Journal of immunology* 175, 1483-1490.

Bissell, M.J., and Hines, W.C. (2011). Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nature medicine* 17, 320-329.

Blatter, S., and Rottenberg, S. (2015). Minimal residual disease in cancer therapy--Small things make all the difference. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 21-22, 1-10.

Brown, S.L., Riehl, T.E., Walker, M.R., Geske, M.J., Doherty, J.M., Stenson, W.F., and Stappenbeck, T.S. (2007). Myd88-dependent positioning of Ptgs2-expressing stromal cells maintains colonic epithelial proliferation during injury. *The Journal of clinical investigation* 117, 258-269.

Buchanan, F.G., Gorden, D.L., Matta, P., Shi, Q., Matrisian, L.M., and DuBois, R.N. (2006). Role of beta-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 1492-1497.

Buchanan, F.G., Wang, D., Bargiacchi, F., and DuBois, R.N. (2003). Prostaglandin E2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry* 278, 35451-35457.

Butler, J.M., Kobayashi, H., and Rafii, S. (2010). Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. *Nature reviews Cancer* 10, 138-146.

Calon, A., Lonardo, E., Berenguer-Llargo, A., Espinet, E., Hernando-Mombona, X., Iglesias, M., Sevillano, M., Palomo-Ponce, S., Tauriello, D.V., Byrom, D., *et al.* (2015). Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nature genetics* 47, 320-329.

Cespedes, M.V., Espina, C., Garcia-Cabezas, M.A., Trias, M., Boluda, A., Gomez del Pulgar, M.T., Sancho, F.J., Nistal, M., Lacal, J.C., and Manges, R. (2007). Orthotopic microinjection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites. *The American journal of pathology* 170, 1077-1085.

Chen, S., Sanjana, N.E., Zheng, K., Shalem, O., Lee, K., Shi, X., Scott, D.A., Song, J., Pan, J.Q., Weissleder, R., *et al.* (2015). Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell* 160, 1246-1260.

Chulada, P.C., Thompson, M.B., Mahler, J.F., Doyle, C.M., Gaul, B.W., Lee, C., Tiano, H.F., Morham, S.G., Smithies, O., and Langenbach, R. (2000). Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer research* 60, 4705-4708.

Clarke, A.R., Cummings, M.C., and Harrison, D.J. (1995). Interaction between murine germline mutations in p53 and APC predisposes to pancreatic neoplasia but not to increased intestinal malignancy. *Oncogene* 11, 1913-1920.

Cooper, H.S., Murthy, S., Kido, K., Yoshitake, H., and Flanigan, A. (2000). Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation. *Carcinogenesis* 21, 757-768.

Cuzick, J., Otto, F., Baron, J.A., Brown, P.H., Burn, J., Greenwald, P., Jankowski, J., La Vecchia, C., Meyskens, F., Senn, H.J., *et al.* (2009). Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement. *The Lancet Oncology* 10, 501-507.

de Groot, D.J., de Vries, E.G., Groen, H.J., and de Jong, S. (2007). Non-steroidal anti-inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic. *Critical reviews in oncology/hematology* 61, 52-69.

De Robertis, M., Massi, E., Poeta, M.L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., Signori, E., and Fazio, V.M. (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *Journal of carcinogenesis* 10, 9.

Dormond, O., Bezzi, M., Mariotti, A., and Ruegg, C. (2002). Prostaglandin E2 promotes integrin alpha Vbeta 3-dependent endothelial cell adhesion, rac-activation, and spreading through cAMP/PKA-dependent signaling. *The Journal of biological chemistry* 277, 45838-45846.

Eberhart, C.E., Coffey, R.J., Radhika, A., Giardiello, F.M., Ferrenbach, S., and DuBois, R.N. (1994). Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 107, 1183-1188.

Elder, D.J., and Paraskeva, C. (1998). COX-2 inhibitors for colorectal cancer. *Nature medicine* 4, 392-393.

- Ernst, M., and Ramsay, R.G. (2012). Colorectal cancer mouse models: integrating inflammation and the stroma. *Journal of gastroenterology and hepatology* 27, 39-50.
- Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.
- FitzGerald, G.A., and Patrono, C. (2001). The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *The New England journal of medicine* 345, 433-442.
- Flatmark, K., Maeldandsmo, G.M., Martinsen, M., Rasmussen, H., and Fodstad, O. (2004). Twelve colorectal cancer cell lines exhibit highly variable growth and metastatic capacities in an orthotopic model in nude mice. *European journal of cancer* 40, 1593-1598.
- Forbes, S.A., Bindal, N., Bamford, S., Cole, C., Kok, C.Y., Beare, D., Jia, M., Shepherd, R., Leung, K., Menzies, A., *et al.* (2011). COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic acids research* 39, D945-950.
- Fu, X.Y., Besterman, J.M., Monosov, A., and Hoffman, R.M. (1991). Models of human metastatic colon cancer in nude mice orthotopically constructed by using histologically intact patient specimens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 9345-9349.
- Gala, M., and Chung, D.C. (2011). Hereditary colon cancer syndromes. *Seminars in oncology* 38, 490-499.
- Garraway, L.A., and Janne, P.A. (2012). Circumventing cancer drug resistance in the era of personalized medicine. *Cancer discovery* 2, 214-226.
- Goruppi, S., and Dotto, G.P. (2013). Mesenchymal stroma: primary determinant and therapeutic target for epithelial cancer. *Trends in cell biology* 23, 593-602.
- Greenhough, A., Smartt, H.J., Moore, A.E., Roberts, H.R., Williams, A.C., Paraskeva, C., and Kaidi, A. (2009). The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 30, 377-386.
- Grivnennikov, S.I. (2013). Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Seminars in immunopathology* 35, 229-244.
- Gruber, S.B., Ellis, N.A., Scott, K.K., Almog, R., Kolachana, P., Bonner, J.D., Kirchhoff, T., Tomsho, L.P., Nafa, K., Pierce, H., *et al.* (2002). BLM heterozygosity and the risk of colorectal cancer. *Science* 297, 2013.
- Haigis, K.M., Kendall, K.R., Wang, Y., Cheung, A., Haigis, M.C., Glickman, J.N., Niwa-Kawakita, M., Sweet-Cordero, A., Sebolt-Leopold, J., Shannon, K.M., *et al.* (2008). Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nature genetics* 40, 600-608.
- Hamamoto, T., Beppu, H., Okada, H., Kawabata, M., Kitamura, T., Miyazono, K., and Kato, M. (2002). Compound disruption of smad2 accelerates malignant progression of intestinal tumors in apc knockout mice. *Cancer research* 62, 5955-5961.
- Hambek, M., Baghi, M., Wagenblast, J., Schmitt, J., Baumann, H., and Knecht, R. (2007). Inverse correlation between serum PGE2 and T classification in head and neck cancer. *Head & neck* 29, 244-248.
- Hamilton, K.E., Chatterji, P., Lundsmith, E.T., Andres, S.F., Giroux, V., Hicks, P.D., Noubissi, F.K., Spiegelman, V.S., and Rustgi, A.K. (2015). Loss of Stromal IMP1 Promotes a Tumorigenic Microenvironment in the Colon. *Molecular cancer research : MCR* 13, 1478-1486.
- Hanahan, D., and Coussens, L.M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell* 21, 309-322.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hansen-Petrik, M.B., McEntee, M.F., Jull, B., Shi, H., Zemel, M.B., and Whelan, J. (2002). Prostaglandin E(2) protects intestinal tumors from nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced regression in Apc(Min/+) mice. *Cancer research* 62, 403-408.
- Huang, M., Stolina, M., Sharma, S., Mao, J.T., Zhu, L., Miller, P.W., Wollman, J., Herschman, H., and Dubinett, S.M. (1998). Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-

dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer research* 58, 1208-1216.

Huh, D., Hamilton, G.A., and Ingber, D.E. (2011). From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in cell biology* 21, 745-754.

Hull, M.A., Faluyi, O.O., Ko, C.W., Holwell, S., Scott, D.J., Cuthbert, R.J., Poulsom, R., Goodlad, R., Bonifer, C., Markham, A.F., *et al.* (2006). Regulation of stromal cell cyclooxygenase-2 in the ApcMin/+ mouse model of intestinal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 27, 382-391.

Hung, K.E., Maricevich, M.A., Richard, L.G., Chen, W.Y., Richardson, M.P., Kunin, A., Bronson, R.T., Mahmood, U., and Kucherlapati, R. (2010). Development of a mouse model for sporadic and metastatic colon tumors and its use in assessing drug treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 1565-1570.

Isella, C., Terrasi, A., Bellomo, S.E., Petti, C., Galatola, G., Muratore, A., Mellano, A., Senetta, R., Cassenti, A., Sonetto, C., *et al.* (2015). Stromal contribution to the colorectal cancer transcriptome. *Nature genetics* 47, 312-319.

Jasperson, K.W., Tuohy, T.M., Neklason, D.W., and Burt, R.W. (2010). Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 138, 2044-2058.

Jin, H., Yang, Z., Wang, J., Zhang, S., Sun, Y., and Ding, Y. (2011). A superficial colon tumor model involving subcutaneous colon translocation and orthotopic transplantation of green fluorescent protein-expressing human colon tumor. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 32, 391-397.

Johnson, R.L., and Fleet, J.C. (2013). Animal models of colorectal cancer. *Cancer metastasis reviews* 32, 39-61.

Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature reviews Cancer* 3, 422-433.

Kalluri, R., and Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature reviews Cancer* 6, 392-401.

Karim, B.O., and Huso, D.L. (2013). Mouse models for colorectal cancer. *American journal of cancer research* 3, 240-250.

Kawamori, T., Uchiya, N., Sugimura, T., and Wakabayashi, K. (2003). Enhancement of colon carcinogenesis by prostaglandin E2 administration. *Carcinogenesis* 24, 985-990.

Kersten, K., de Visser, K.E., van Miltenburg, M.H., and Jonkers, J. (2017). Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine. *EMBO molecular medicine* 9, 137-153.

Kirkby, N.S., Chan, M.V., Zaiss, A.K., Garcia-Vaz, E., Jiao, J., Berglund, L.M., Verdu, E.F., Ahmetaj-Shala, B., Wallace, J.L., Herschman, H.R., *et al.* (2016). Systematic study of constitutive cyclooxygenase-2 expression: Role of NF-kappaB and NFAT transcriptional pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, 434-439.

Klijn, C., Durinck, S., Stawiski, E.W., Haverty, P.M., Jiang, Z., Liu, H., Degenhardt, J., Mayba, O., Gnad, F., Liu, J., *et al.* (2015). A comprehensive transcriptional portrait of human cancer cell lines. *Nature biotechnology* 33, 306-312.

Koliaraki, V., Pallangyo, C.K., Greten, F.R., and Kollias, G. (2017). Mesenchymal Cells in Colon Cancer. *Gastroenterology*.

Koliaraki, V., Pasparakis, M., and Kollias, G. (2015). IKKbeta in intestinal mesenchymal cells promotes initiation of colitis-associated cancer. *The Journal of experimental medicine* 212, 2235-2251.

Koliaraki, V., Roulis, M., and Kollias, G. (2012). Tpl2 regulates intestinal myofibroblast HGF release to suppress colitis-associated tumorigenesis. *The Journal of clinical investigation* 122, 4231-4242.

Kottke, T., Boisgerault, N., Diaz, R.M., Donnelly, O., Rommelfanger-Konkol, D., Pulido, J., Thompson, J., Mukhopadhyay, D., Kaspar, R., Coffey, M., *et al.* (2013). Detecting and targeting tumor relapse by its resistance to innate effectors at early recurrence. *Nature medicine* 19, 1625-1631.

Kucherlapati, M.H., Lee, K., Nguyen, A.A., Clark, A.B., Hou, H., Jr., Rosulek, A., Li, H., Yang, K., Fan, K., Lipkin, M., *et al.* (2010). An Msh2 conditional knockout mouse for studying intestinal cancer and testing anticancer agents. *Gastroenterology* 138, 993-1002 e1001.

Ligtenberg, M.J., Kuiper, R.P., Chan, T.L., Goossens, M., Hebeda, K.M., Voorendt, M., Lee, T.Y., Bodmer, D., Hoenselaar, E., Hendriks-Cornelissen, S.J., *et al.* (2009). Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nature genetics* 41, 112-117.

Manieri, N.A., Drylewicz, M.R., Miyoshi, H., and Stappenbeck, T.S. (2012). Igfbp1 is required for full induction of Ptg2 mRNA in colonic mesenchymal stem cells in mice. *Gastroenterology* 143, 110-121 e110.

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436-444.

McIntyre, R.E., Buczacki, S.J., Arends, M.J., and Adams, D.J. (2015). Mouse models of colorectal cancer as preclinical models. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 37, 909-920.

McLemore, T.L., Hubbard, W.C., Litterst, C.L., Liu, M.C., Miller, S., McMahon, N.A., Eggleston, J.C., and Boyd, M.R. (1988). Profiles of prostaglandin biosynthesis in normal lung and tumor tissue from lung cancer patients. *Cancer research* 48, 3140-3147.

Medema, J.P., and Vermeulen, L. (2011). Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature* 474, 318-326.

Mifflin, R.C., Pinchuk, I.V., Saada, J.I., and Powell, D.W. (2011). Intestinal myofibroblasts: targets for stem cell therapy. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 300, G684-696.

Moser, A.R., Pitot, H.C., and Dove, W.F. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 247, 322-324.

Munoz, N.M., Upton, M., Rojas, A., Washington, M.K., Lin, L., Chytil, A., Sozmen, E.G., Madison, B.B., Pozzi, A., Moon, R.T., *et al.* (2006). Transforming growth factor beta receptor type II inactivation induces the malignant transformation of intestinal neoplasms initiated by Apc mutation. *Cancer research* 66, 9837-9844.

Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., and Lewis, C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nature reviews Cancer* 8, 618-631.

Mutoh, M., Watanabe, K., Kitamura, T., Shoji, Y., Takahashi, M., Kawamori, T., Tani, K., Kobayashi, M., Maruyama, T., Kobayashi, K., *et al.* (2002). Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP(4) in colon carcinogenesis. *Cancer research* 62, 28-32.

Nakanishi, M., Montrose, D.C., Clark, P., Nambiar, P.R., Belinsky, G.S., Claffey, K.P., Xu, D., and Rosenberg, D.W. (2008). Genetic deletion of mPGES-1 suppresses intestinal tumorigenesis. *Cancer research* 68, 3251-3259.

NCI (2015). National Cancer Institute: Understanding cancer > What is cancer?

Neufert, C., Becker, C., and Neurath, M.F. (2007). An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nature protocols* 2, 1998-2004.

Newcomb, P.A., Baron, J., Cotterchio, M., Gallinger, S., Grove, J., Haile, R., Hall, D., Hopper, J.L., Jass, J., Le Marchand, L., *et al.* (2007). Colon Cancer Family Registry: an international resource for studies of the genetic epidemiology of colon cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 16, 2331-2343.

Noonan, D.M., De Lerma Barbaro, A., Vannini, N., Mortara, L., and Albini, A. (2008). Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions. *Cancer metastasis reviews* 27, 31-40.

Ogino, S., Kirkner, G.J., Nosho, K., Irahara, N., Kure, S., Shima, K., Hazra, A., Chan, A.T., Dehari, R., Giovannucci, E.L., *et al.* (2008). Cyclooxygenase-2 expression is an independent predictor of poor prognosis in colon cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 8221-8227.

Ohlund, D., Elyada, E., and Tuveson, D. (2014). Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *The Journal of experimental medicine* 211, 1503-1523.

Oshima, M., Dinchuk, J.E., Kargman, S.L., Oshima, H., Hancock, B., Kwong, E., Trzaskos, J.M., Evans, J.F., and Taketo, M.M. (1996). Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 87, 803-809.

Oshima, M., Murai, N., Kargman, S., Arguello, M., Luk, P., Kwong, E., Taketo, M.M., and Evans, J.F. (2001). Chemoprevention of intestinal polyposis in the Apcdelta716 mouse by rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer research* 61, 1733-1740.

Pai, R., Szabo, I.L., Soreghan, B.A., Atay, S., Kawanaka, H., and Tarnawski, A.S. (2001). PGE(2) stimulates VEGF expression in endothelial cells via ERK2/JNK1 signaling pathways. *Biochemical and biophysical research communications* 286, 923-928.

Pallangyo, C.K., Ziegler, P.K., and Greten, F.R. (2015). IKKbeta acts as a tumor suppressor in cancer-associated fibroblasts during intestinal tumorigenesis. *The Journal of experimental medicine* 212, 2253-2266.

Pocard, M., Tsukui, H., Salmon, R.J., Dutrillaux, B., and Poupon, M.F. (1996). Efficiency of orthotopic xenograft models for human colon cancers. *In vivo* 10, 463-469.

Poligone, B., and Baldwin, A.S. (2001). Positive and negative regulation of NF-kappaB by COX-2: roles of different prostaglandins. *The Journal of biological chemistry* 276, 38658-38664.

Powell, D.W., Pinchuk, I.V., Saada, J.I., Chen, X., and Mifflin, R.C. (2011). Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. *Annual review of physiology* 73, 213-237.

Quante, M., Varga, J., Wang, T.C., and Greten, F.R. (2013). The gastrointestinal tumor microenvironment. *Gastroenterology* 145, 63-78.

Rasanen, K., and Vaheri, A. (2010). Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Experimental cell research* 316, 2713-2722.

Reilkoff, R.A., Bucala, R., and Herzog, E.L. (2011). Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation. *Nature reviews Immunology* 11, 427-435.

Reitmair, A.H., Schmits, R., Ewel, A., Bapat, B., Redston, M., Mitri, A., Waterhouse, P., Mittrucker, H.W., Wakeham, A., Liu, B., *et al.* (1995). MSH2 deficient mice are viable and susceptible to lymphoid tumours. *Nature genetics* 11, 64-70.

Rigas, B., Goldman, I.S., and Levine, L. (1993). Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 122, 518-523.

Robanus-Maandag, E.C., Koelink, P.J., Breukel, C., Salvatori, D.C., Jagmohan-Changur, S.C., Bosch, C.A., Verspaget, H.W., Devilee, P., Fodde, R., and Smits, R. (2010). A new conditional Apc-mutant mouse model for colorectal cancer. *Carcinogenesis* 31, 946-952.

Rodriguez Perez, C.E., Nie, W., Sinnett-Smith, J., Rozengurt, E., and Yoo, J. (2011). TNF-alpha potentiates lysophosphatidic acid-induced COX-2 expression via PKD in human colonic myofibroblasts. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 300, G637-646.

Roulis, M., Armaka, M., Manoloukos, M., Apostolaki, M., and Kollias, G. (2011). Intestinal epithelial cells as producers but not targets of chronic TNF suffice to cause murine Crohn-like pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 5396-5401.

Roulis, M., and Flavell, R.A. (2016). Fibroblasts and myofibroblasts of the intestinal lamina propria in physiology and disease. *Differentiation; research in biological diversity* 92, 116-131.

Roulis, M., Nikolaou, C., Kotsaki, E., Kaffe, E., Karagianni, N., Koliarakis, V., Salpea, K., Ragoussis, J., Aidinis, V., Martini, E., *et al.* (2014). Intestinal myofibroblast-specific Tpl2-Cox-2-PGE2 pathway links innate sensing to epithelial homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, E4658-4667.

Saada, J.I., Pinchuk, I.V., Barrera, C.A., Adegboyega, P.A., Suarez, G., Mifflin, R.C., Di Mari, J.F., Reyes, V.E., and Powell, D.W. (2006). Subepithelial myofibroblasts are novel nonprofessional APCs in the human colonic mucosa. *Journal of immunology* 177, 5968-5979.

Salcedo, R., Zhang, X., Young, H.A., Michael, N., Wasserman, K., Ma, W.H., Martins-Green, M., Murphy, W.J., and Oppenheim, J.J. (2003). Angiogenic effects of prostaglandin E2 are mediated by up-regulation of CXCR4 on human microvascular endothelial cells. *Blood* 102, 1966-1977.

Sanders, K.M., Ward, S.M., and Koh, S.D. (2014). Interstitial cells: regulators of smooth muscle function. *Physiological reviews* 94, 859-907.

Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., *et al.* (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262-265.

Sharma, P., and Allison, J.P. (2015). The future of immune checkpoint therapy. *Science* 348, 56-61.

Sharpless, N.E., and Depinho, R.A. (2006). The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. *Nature reviews Drug discovery* 5, 741-754.

Sheibanie, A.F., Yen, J.H., Khayrullina, T., Emig, F., Zhang, M., Tuma, R., and Ganea, D. (2007). The proinflammatory effect of prostaglandin E2 in experimental inflammatory bowel disease is mediated through the IL-23-->IL-17 axis. *Journal of immunology* 178, 8138-8147.

Sheng, H., Shao, J., Morrow, J.D., Beauchamp, R.D., and DuBois, R.N. (1998). Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer research* 58, 362-366.

Shibata, H., Toyama, K., Shioya, H., Ito, M., Hirota, M., Hasegawa, S., Matsumoto, H., Takano, H., Akiyama, T., Toyoshima, K., *et al.* (1997). Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene. *Science* 278, 120-123.

Snijdwint, F.G., Kalinski, P., Wierenga, E.A., Bos, J.D., and Kapsenberg, M.L. (1993). Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *Journal of immunology* 150, 5321-5329.

Sohn, K.J., Shah, S.A., Reid, S., Choi, M., Carrier, J., Comiskey, M., Terhorst, C., and Kim, Y.I. (2001). Molecular genetics of ulcerative colitis-associated colon cancer in the interleukin 2- and beta(2)-microglobulin-deficient mouse. *Cancer research* 61, 6912-6917.

Sonoshita, M., Takaku, K., Oshima, M., Sugihara, K., and Taketo, M.M. (2002). Cyclooxygenase-2 expression in fibroblasts and endothelial cells of intestinal polyps. *Cancer research* 62, 6846-6849.

Sonoshita, M., Takaku, K., Sasaki, N., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Narumiya, S., Oshima, M., and Taketo, M.M. (2001). Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc(Delta 716) knockout mice. *Nature medicine* 7, 1048-1051.

Stolina, M., Sharma, S., Lin, Y., Dohadwala, M., Gardner, B., Luo, J., Zhu, L., Kronenberg, M., Miller, P.W., Portanova, J., *et al.* (2000). Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *Journal of immunology* 164, 361-370.

Su, L.K., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Preisinger, A.C., Moser, A.R., Luongo, C., Gould, K.A., and Dove, W.F. (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* 256, 668-670.

Sugimoto, H., Mundel, T.M., Kieran, M.W., and Kalluri, R. (2006). Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer biology & therapy* 5, 1640-1646.

- Takaku, K., Oshima, M., Miyoshi, H., Matsui, M., Seldin, M.F., and Taketo, M.M. (1998). Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell* 92, 645-656.
- Terzic, J., Grivennikov, S., Karin, E., and Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 138, 2101-2114 e2105.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* 65, 87-108.
- Van Cutsem, E., Nordlinger, B., Cervantes, A., and Group, E.G.W. (2010). Advanced colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for treatment. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 21 Suppl 5, v93-97.
- Van der Sluis, M., De Koning, B.A., De Bruijn, A.C., Velcich, A., Meijerink, J.P., Van Goudoever, J.B., Buller, H.A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I.B., *et al.* (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131, 117-129.
- Vermeulen, L., De Sousa, E.M.F., van der Heijden, M., Cameron, K., de Jong, J.H., Borovski, T., Tuynman, J.B., Todaro, M., Merz, C., Rodermond, H., *et al.* (2010). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nature cell biology* 12, 468-476.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine* 10, 789-799.
- Voskoglou-Nomikos, T., Pater, J.L., and Seymour, L. (2003). Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9, 4227-4239.
- Walker, M.R., Brown, S.L., Riehl, T.E., Stenson, W.F., and Stappenbeck, T.S. (2010). Growth factor regulation of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2) expression in colonic mesenchymal stem cells. *The Journal of biological chemistry* 285, 5026-5039.
- Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., and Kerr, D. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature reviews Cancer* 9, 489-499.
- Wang, D., and Dubois, R.N. (2004). Cyclooxygenase-2: a potential target in breast cancer. *Seminars in oncology* 31, 64-73.
- Wang, D., and Dubois, R.N. (2010). The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene* 29, 781-788.
- Wang, D., and DuBois, R.N. (2013). The role of anti-inflammatory drugs in colorectal cancer. *Annual review of medicine* 64, 131-144.
- Wang, D., Fu, L., Sun, H., Guo, L., and DuBois, R.N. (2015). Prostaglandin E2 Promotes Colorectal Cancer Stem Cell Expansion and Metastasis in Mice. *Gastroenterology* 149, 1884-1895 e1884.
- Wang, D., Wang, H., Brown, J., Daikoku, T., Ning, W., Shi, Q., Richmond, A., Strieter, R., Dey, S.K., and DuBois, R.N. (2006). CXCL1 induced by prostaglandin E2 promotes angiogenesis in colorectal cancer. *The Journal of experimental medicine* 203, 941-951.
- Wang, D., Wang, H., Shi, Q., Katkuri, S., Walhi, W., Desvergne, B., Das, S.K., Dey, S.K., and DuBois, R.N. (2004). Prostaglandin E(2) promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Cancer cell* 6, 285-295.
- Watanabe, K., Kawamori, T., Nakatsugi, S., Ohta, T., Ohuchida, S., Yamamoto, H., Maruyama, T., Kondo, K., Ushikubi, F., Narumiya, S., *et al.* (1999). Role of the prostaglandin E receptor subtype EP1 in colon carcinogenesis. *Cancer research* 59, 5093-5096.
- Wei, E.K., Giovannucci, E., Wu, K., Rosner, B., Fuchs, C.S., Willett, W.C., and Colditz, G.A. (2004). Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *International journal of cancer* 108, 433-442.

Weigelt, B., Peterse, J.L., and van 't Veer, L.J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature reviews Cancer* 5, 591-602.

WHO (2017). International Agency for Research on Cancer: Cancer Today.

Worthley, D.L., Giraud, A.S., and Wang, T.C. (2010). Stromal fibroblasts in digestive cancer. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society* 3, 117-125.

Xia, D., Wang, D., Kim, S.H., Katoh, H., and DuBois, R.N. (2012). Prostaglandin E2 promotes intestinal tumor growth via DNA methylation. *Nature medicine* 18, 224-226.

Yaeger, R., Shah, M.A., Miller, V.A., Kelsen, J.R., Wang, K., Heins, Z.J., Ross, J.S., He, Y., Sanford, E., Yantiss, R.K., *et al.* (2016). Genomic Alterations Observed in Colitis-Associated Cancers Are Distinct From Those Found in Sporadic Colorectal Cancers and Vary by Type of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 151, 278-287 e276.

Zeddou, M., Greimers, R., de Valensart, N., Nayjib, B., Tasken, K., Boniver, J., Moutschen, M., and Rahmouni, S. (2005). Prostaglandin E2 induces the expression of functional inhibitory CD94/NKG2A receptors in human CD8+ T lymphocytes by a cAMP-dependent protein kinase A type I pathway. *Biochemical pharmacology* 70, 714-724.

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Στόχοι της διδακτορικής διατριβής

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε σαν αντικείμενό της τη μελέτη του ρόλου των μεσεγχυματικών κυττάρων τόσο στη φυσιολογία όσο και στη νόσο στον ποντικό και κατ'επέκταση και στα υπόλοιπα θηλαστικά όπως ο άνθρωπος. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η συμβολή των κυττάρων αυτών στη σωματική αύξηση αλλά και τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Σκοπός της μελέτης ήταν η καλύτερη κατανόηση του ρόλου και των μηχανισμών στους οποίους εμπλέκονται τα μεσεγχυματικά κύτταρα τόσο στην υγεία όσο και στη νόσο, ώστε να μπορέσουν να αναπτυχθούν νέες πιο στοχευμένες θεραπείες για την αντιμετώπιση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων όπως για παράδειγμα ο καρκίνος.

Η μελέτη του ρόλου των μεσεγχυματικών κυττάρων στη σωματική αύξηση, θέμα το οποίο ελάχιστα έχει μελετηθεί στη βιβλιογραφία, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μιας νέας διαγονιδιακής σειράς ποντικών που δημιουργήσαμε στο εργαστήριό μας η οποία ονομάζεται TgC6hrp55. Οι διαγονιδιακοί αυτοί ποντικοί είναι σχεδιασμένοι να εκφράζουν το διαγονίδιο-στόχο σε συγκεκριμένα μεσεγχυματικά κύτταρα διαφόρων ιστών τους υπό τον έλεγχο του υποκινητή του Κολλαγόνου VI. Ένας πρώτος αδρός φαινοτυπικός χαρακτηρισμός αποκάλυψε ότι οι διαγονιδιακοί ποντικοί παρουσίαζαν αυξημένο μέγεθος σώματος (βάρος και μήκος σώματος) ήδη από τις πρώτες βδομάδες της ζωής τους. Επομένως, σκοπός μας ήταν η καλύτερη μελέτη και ο βαθύτερος φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των ποντικών αυτών, καθώς και η περιγραφή των μοριακών μηχανισμών που εκκινούν από τα μεσεγχυματικά κύτταρα και οδηγούν στην εμφάνισή του.

Σε ότι αφορά τον καρκίνο του παχέος εντέρου, χρησιμοποιήσαμε κυρίως το πειραματικό πρότυπο των $APC^{min/+}$ ποντικών οι οποίοι φέρουν μια σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο APC με αποτέλεσμα να εμφανίζουν δεκάδες αδενώματα/όγκους στο πεπτικό τους σύστημα (Moser et al., 1990). Τόσο στο συγκεκριμένο όσο και σε άλλα πειραματικά πρότυπα καρκινογένεσης έχει δειχτεί ότι η συνολική γενετική απαλοιφή της κυκλοοξυγενάσης-2 οδηγεί σε σημαντική μείωση του σχηματισμού πολυπόδων (Chulada et al., 2000), ενώ η εξειδικευμένη αδρανοποίησή της από τα μακροφάγα/κοκκιοκύτταρα ή από τα επιθηλιακά κύτταρα

του εντέρου είτε δε μειώνει τον αριθμό των πολυπόδων είτε οδηγεί σε μέτρια μείωσή του μόνο σε θηλυκούς ποντικούς (Cherukuri et al., 2014; Ishikawa and Herschman, 2006). Ταυτόχρονα έχειδειχτεί ότι η προσταγλανδίνη-E2 αλληλεπιδρά με τη σηματοδότηση της πρωτεΐνης Wnt προάγοντας την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών βλαστοκυττάρων (Goessling et al., 2009; Wang et al., 2004). Επομένως, στους $APC^{min/+}$ ποντικούς αδρανοποιήσαμε ιστοειδικά την κυκλοοξυγενάση-2 (Cox-2) στους μυοϊνοβλάστες του εντέρου με τη χρήση των διαγονιδιακών ποντικών ColVI-Cre (Armaka et al., 2008). Σκοπός μας ήταν να μελετήσουμε το ρόλο που παίζει η παραγόμενη από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες κυκλοοξυγενάση-2 καθώς και η επαγόμενη από αυτήν προσταγλανδίνη E2 στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου. Η καλύτερη περιγραφή των κυττάρων-στόχων που συμβάλλουν στην καρκινογένεση του εντέρου μέσω του μονοπατιού της κυκλοοξυγενάσης-2 και της προσταγλανδίνης E2, θα δώσει τη δυνατότητα ανάπτυξης αποτελεσματικότερων θεραπειών με λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες αλλά και την ανάπτυξη πιθανών μοριακών δεικτών που θα προβλέπουν την επιθετικότητα του όγκου αλλά και την ανταπόκρισή του σε συγκεκριμένες θεραπείες.

Βάσει των παραπάνω ακολούθως παρουσιάζονται:

- 1) Η δημοσιευμένη εργασία που αναφέρεται στον εκτενή φαινοτυπικό και μοριακό χαρακτηρισμό των διαγονιδιακών ποντικών TgC6hp55 οι οποίοι παρουσιάζουν ενισχυμένη σωματική αύξηση
- 2) Αποτελέσματα από τη μελέτη του ρόλου της κυκλοοξυγενάσης-2 που προέρχεται από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες αλλά και την επαγόμενη από αυτήν προσταγλανδίνη E2 στην καρκινογένεση του εντέρου.

Βιβλιογραφία

- Armaka, M., Apostolaki, M., Jacques, P., Kontoyiannis, D.L., Elewaut, D., and Kollias, G. (2008). Mesenchymal cell targeting by TNF as a common pathogenic principle in chronic inflammatory joint and intestinal diseases. *The Journal of experimental medicine* 205, 331-337.
- Cherukuri, D.P., Ishikawa, T.O., Chun, P., Catapang, A., Elashoff, D., Grogan, T.R., Bugni, J., and Herschman, H.R. (2014). Targeted Cox2 gene deletion in intestinal epithelial cells decreases tumorigenesis in female, but not male, *Apc*(Min/+) mice. *Mol Oncol* 8, 169-177.
- Chulada, P.C., Thompson, M.B., Mahler, J.F., Doyle, C.M., Gaul, B.W., Lee, C., Tiano, H.F., Morham, S.G., Smithies, O., and Langenbach, R. (2000). Genetic disruption of Ptg-1, as well as Ptg-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer research* 60, 4705-4708.

Goessling, W., North, T.E., Loewer, S., Lord, A.M., Lee, S., Stoick-Cooper, C.L., Weidinger, G., Puder, M., Daley, G.Q., Moon, R.T., *et al.* (2009). Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. *Cell* 136, 1136-1147.

Ishikawa, T.O., and Herschman, H.R. (2006). Conditional knockout mouse for tissue-specific disruption of the cyclooxygenase-2 (Cox-2) gene. *Genesis* 44, 143-149.

Moser, A.R., Pitot, H.C., and Dove, W.F. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 247, 322-324.

Wang, D., Wang, H., Shi, Q., Katkuri, S., Walhi, W., Desvergne, B., Das, S.K., Dey, S.K., and DuBois, R.N. (2004). Prostaglandin E(2) promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Cancer cell* 6, 285-295.

2. Ο εκτεταμένος φαινοτυπικός χαρακτηρισμός ενός νέου διαγονιδιακού ποντικού αποκαλύπτει πλειοτροπικές διαταραχές στη φυσιολογία λόγω της μεσεγχυματικής έκφρασης του μινι-γονιδίου της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης

2.1. Εισαγωγή

Από νωρίς κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των διαφόρων διαγονιδιακών τεχνικών στους ποντικούς έγινε κατανοητό ότι ομόλογες και ετερόλογες ιντρονικές αλληλουχίες καθώς και σήματα πολυαδενυλώσης είναι ουσιώδη για τη σταθεροποίηση και επαρκή έκφραση του διαγονιδίου ενδιαφέροντος (Brinster et al., 1988; Palmiter et al., 1991). Ήταν στις αρχές της δεκαετίας του 1990 όταν οι επιστήμονες, για αυτόν ακριβώς το σκοπό, ξεκίνησαν να χρησιμοποιούν το αποκαλούμενο *hGH minigene* το οποίο αποτελείται από ολόκληρη την κωδικοποιητική περιοχή του γονιδίου της αυξητικής ορμόνης του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένων των ιντρονίων και ενός σήματος πολυαδενυλώσης (Chaffin et al., 1990; Orban et al., 1992). Εκείνη την περίοδο και για πολλά χρόνια αργότερα, υπήρχε η πεποίθηση ότι εφόσον το *hGH minigene* ήταν το δεύτερο κιστρόνιο στο mRNA που κωδικοποιείτο από το διαγονίδιο, δε θα εκφραζόταν. Γι' αυτόν το λόγο η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε ευρέως για τη δημιουργία νέων διαγονιδιακών σειρών (Hara et al., 2003; Herrera, 2000; Kellendonk et al., 2000; Postic et al., 1999; Vassar and Fuchs, 1991; Zimmerman et al., 1994), ειδικά για ποντικούς οι οποίοι εκφράζουν την Cre-ανασυνδυάση. Ο αριθμός των ποντικών που φέρουν το *hGH minigene* σήμερα ξεπερνά τα 200 (Brouwers and Creemers, 2015) [ενδεικτικά, μόνο οι διαφορετικοί διαγονιδιακοί ποντικοί που είναι ειδικοί για την έκφραση διαγονιδίων στη β-κύτταρα του παγκρέατος είναι τουλάχιστον 22 όπως αναφέρθηκε από τους Brouwers et al. (Brouwers et al., 2014)].

Ωστόσο, κατά τη διάρκεια των τελευταίων χρόνων υπήρξε ένας αυξανόμενος αριθμός δημοσιεύσεων οι οποίες ανέφεραν την έκφραση αυτού του μινι-γονιδίου με επακόλουθες επιπτώσεις στο φαινότυπο του ποντικού (Baan et al., 2015; Brouwers et al., 2014; Chen et al., 1972a; Declercq et al., 2015; Nuytens et al., 2014; Oropeza et al., 2015; Pruniau et al., 2013). Για παράδειγμα η έκφραση του *hGH minigene* ειδικά στα β-κύτταρα του παγκρέατος του ποντικού επηρεάζει αρνητικά τη φυσιολογία του β-κυττάρου καθώς και την ομοιόσταση της γλυκόζης και της ινσουλίνης (Baan et al.,

2015; Brouwers et al., 2014; Chen et al., 1972a; Oropeza et al., 2015). Επιπρόσθετα, η έκφραση του *hGH minigene* στον εγκέφαλο των ποντικών (είτε στον υποθάλαμο είτε στην υπόφυση) οδηγεί σε ελλειμματική σωματική αύξηση και σε μεταβολική απορρύθμιση μέσω της αλληλεπίδρασής του με τον ενδογενή άξονα εκλυτική ορμόνη της αυξητικής ορμόνης (GHRH) – αυξητική ορμόνη (GH) – ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας 1 (IGF1) (Declercq et al., 2015; Nuytens et al., 2014; Pruniau et al., 2013). Το εύρημα ότι η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη μπορεί να συνδεθεί και να ενεργοποιήσει τόσο τον υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης του ποντικού όσο και τον υποδοχέα της προλακτίνης του ποντικού (PRLR) (Goffin et al., 1996) προσθέτει ένα ακόμα επίπεδο πολυπλοκότητας στις επιπτώσεις της μη σχεδιασμένης έκφρασης του *hGH minigene*.

Δυστυχώς ωστόσο, στη μεγάλη πλειοψηφία των 200 διαγονιδιακών ποντικών που αναφέρθηκαν παραπάνω, οι συγγραφείς δεν εξέτασαν την πιθανή έκφραση του *hGH minigene*, και όσοι το έκαναν, δεν εξέτασαν το εάν η παραγόμενη ανθρώπινη αυξητική ορμόνη ήταν λειτουργική (Klee et al., 2011; Miyazaki et al., 2010; Postic et al., 1999; Sanvito et al., 1995). Επιπλέον, οι δημοσιεύσεις που περιέγραψαν την παραγωγή και λειτουργικότητα της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης (η οποία προερχόταν από το *hGH minigene*) μελέτησαν μόνο τις τοπικές της επιπτώσεις στους ιστούς στους οποίους εκφραζόταν και δεν αξιολόγησαν τις πιθανές συστηματικές επιπτώσεις της κυκλοφορούσας ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης οι οποίες θα μπορούσαν να προκύψουν μέσω λιγότερο προβλέψιμων μηχανισμών (Baan et al., 2015; Brouwers et al., 2014; Chen et al., 1972a; Declercq et al., 2015; Nuytens et al., 2014; Oropeza et al., 2015; Pruniau et al., 2013). Για το λόγο αυτό, η ‘ασφάλεια’ ή/και καταλληλότητα της χρήσης ποντικών που περιέχουν το συγκεκριμένο *minigene* παραμένει αμφισβητήσιμη καθώς μόλις τώρα έχουμε αρχίσει να ανακαλύπτουμε τις ‘παγίδες’ που σχετίζονται με την τεχνική αυτή η οποία χρησιμοποιείται για πάνω από 20 χρόνια.

Έχουμε αποδείξει παλαιότερα ότι η σηματοδότηση του TNF μέσω του υποδοχέα του τύπου 1 (TNFR1) στο μεσέγχυμα είναι επαρκής για να οδηγήσει την παθογένεση της νόσου σε μοντέλα ασθενειών για τη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα και τη Φλεγμονώδη Νόσο του Εντέρου που προσομοιάζει τη νόσο του Crohn σε ποντικούς (Armaka et al., 2008). Από τους δύο υποδοχείς του TNF οι οποίοι ονομάζονται TNFR1 και TNFR2, ο ανθρώπινος TNFR1 μπορεί να αναγνωρίσει τον TNF του ποντικού και το αντίστροφο, ενώ αυτό δεν ισχύει για τον TNFR2 (Bossen et al., 2006). Με σκοπό

λοιπόν να μελετήσουμε το ρόλο της σηματοδότησης μέσω του TNF-TNFR1 στο μεσέγχυμα σε ένα εξανθρωπισμένο περιβάλλον, δημιουργήσαμε τους TgC6hrp55 διαγονιδιακούς ποντικούς οι οποίοι, εκτός του *Tnfr1* του ποντικού, εκφράζουν και τον TNFR1 του ανθρώπου ειδικά στο μεσέγχυμα υπό τον έλεγχο του υποδοχέα του κολλαγόνου VI (ή απλούστερα CollagenVI ή ColVI) (Braghetta et al., 1996). Έχει αποδειχτεί πρωτύτερα σε διαγονιδιακά έμβρυα ότι ο υποδοχέας του κολλαγόνου VI είναι ενεργός στα μεσεγχυματικά κύτταρα σε πολλούς διαφορετικούς ιστούς όπως τα σημεία εισόδου των επιφανειακών απονευρώσεων στο δέρμα, οι αρθρώσεις, τα νεύρα, οι μεσοσπονδύλιοι δίσκοι, τα μουστάκια, οι σκελετικοί μύες, οι μήνιγγες, οι τένοντες, το υποεπιδερμικό μεσέγχυμα, η καρδιά, τα αγγεία, ο λιπώδης ιστός, ο χόνδρος, το κεντρικό νευρικό σύστημα και ο αμφιβληστροειδής (έκτοπη έκφραση), ενώ υπάρχουν κάποιες ενδείξεις για έκφραση σε άλλους ιστούς όπως οι πνεύμονες, το έντερο, ο νεφρός, το περιόστεο, το περιχόνδριο, οι ορογόνοι υμένες, η ουροδόχος κύστη (Braghetta et al., 1996).

Στην παρούσα εργασία δείχνουμε ότι η έκφραση του *hGH minigene* στα μεσεγχυματικά κύτταρα που εκφράζουν κολλαγόνο VI σε διάφορους ιστούς μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στη φυσιολογία του ποντικού οι οποίες δεν έχουν περιγραφεί. Ο εκτενής φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των διαγονιδιακών ποντικών TgC6hrp55 δεν ανέδειξε στοιχεία αυτόματης φλεγμονής ή/και αυτοανοσίας, αλλά αποκάλυψε μια ποικιλία διαταραχών σε πολλές διαφορετικές πλευρές της φυσιολογίας όπως η σωματική αύξηση και τα σκελετικά χαρακτηριστικά, αλλά και ιστολογικές αλλαγές στο ήπαρ και το λιπώδη ιστό οι οποίες υποδηλώνουν αυξημένη αποθήκευση λιπιδίων. Πολλά ευρήματα προσομοιάζουν με τις επιπτώσεις που έχει η διαγονιδιακή συστηματική έκφραση της αυξητικής ορμόνης. Η μοριακή μας ανάλυση αποκάλυψε την έκφραση του *hGH minigene* σε διάφορους ιστούς ενώ τα φαρμακολογικά μας πειράματα επιβεβαίωσαν την αιτιώδη σχέση μεταξύ της παραγόμενης ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης και του παρατηρούμενου φαινοτύπου. Τα ευρήματά μας περιγράφουν για πρώτη φορά την πληθώρα των τοπικών ή/και συστηματικών επιπτώσεων που μπορεί να έχει το *hGH minigene* όταν εκφράζεται στο μεσέγχυμα.

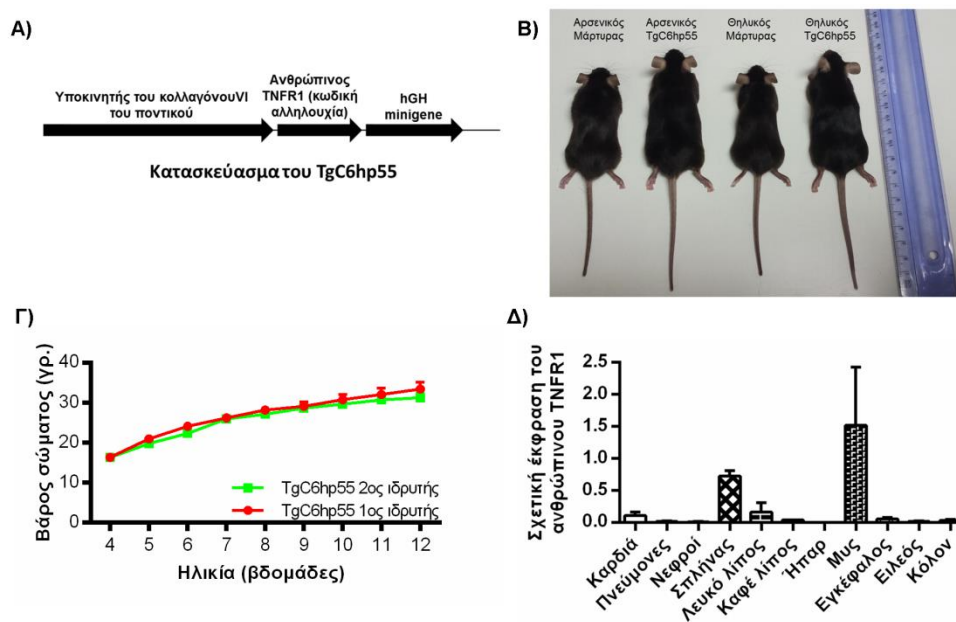
2.2. Αποτελέσματα

2.2.1. Δημιουργία των διαγονιδιακών ποντικών TgC6hrp55 και αξιολόγηση της έκφρασης του διαγονιδίου

Για τη δημιουργία των διαγονιδιακών ποντικών TgC6hrp55, ένα τμήμα γενετικού υλικού μεγέθους 1.5 χιλιάδων βάσεων το οποίο περιείχε την κωδική αλληλουχία του DNA του ανθρώπινου TNFR1 (*hTNFR1* coding DNA sequence - CDS) (Buckley et al., 1985) εισήχθη αμέσως μετά το 3' άκρο του μεγέθους 7.5 χιλιάδων βάσεων υποκινητή του κολλαγόνου 6(α1) (Braghetta et al., 1996), ακολουθούμενο από το μεγέθους 2.1 χιλιάδων βάσεων *hGH* minigene (Jones et al., 1995) (**Εικόνα 1Α**). Η ενσωμάτωση του διαγονιδίου στο γενετικό υλικό των ποντικών επιβεβαιώθηκε με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Ένας αρσενικός ποντικός ο οποίος βρέθηκε να έχει ενσωματώσει το διαγονίδιο χρησιμοποιήθηκε για την ίδρυση και καθιέρωση της διαγονιδιακής σειράς TgC6hrp55 (**1^{ος} ιδρυτής**) (**Εικόνα 1Β**). Έπειτα, ακολουθώντας την ίδια διαδικασία, δημιουργήσαμε ένα δεύτερο ποντικό ο οποίος μετέφερε το ίδιο διαγονίδιο (**2^{ος} ιδρυτής**). Οι δύο αυτές διαγονιδιακές σειρές διασταυρώθηκαν για πάνω από 8 γενιές με ποντικούς γενετικού υποβάθρου C57BL/6J. Ο υπολογισμός του αριθμού των αντιγράφων των διαγονιδίων τα οποία είχαν εισαχθεί σε κάθε διαγονιδιακή σειρά πραγματοποιήθηκε με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Q-PCR) και ανέδειξε την ενσωμάτωση 2 αντιγράφων του διαγονιδίου στο γονιδίωμα του 1^{ου} ποντικού-ιδρυτή και 14 αντιγράφων στο γονιδίωμα του 2^{ου}. Παρά τη διαφορά στον αριθμό των αντιγράφων που ενσωματώθηκαν στο γονιδίωμα του κάθε ιδρυτή, οι δύο διαγονιδιακές σειρές παρουσίασαν το ίδιο ακριβώς βάρος σώματος υποδηλώνοντας ότι η διαφορά στον αριθμό των ενσωματωμένων αντιγράφων δεν επηρεάζει τα κύρια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (**Εικόνα 1Γ**). Επομένως, και για να αποφύγουμε τις όποιες έξτρα επιλοκές λόγω του αυξημένου αριθμού ενσωματωμένων αντιγράφων στο 2^ο ιδρυτή, εστίασαμε την ανάλυσή μας στον 1^ο.

Η ανάλυση με τη χρήση Q-PCR σε διαφορετικούς ιστούς των ποντικών TgC6hrp55 επιβεβαίωσε την έκφραση του ανθρώπινου TNFR1 ως αποτέλεσμα της έκφρασης του διαγονιδίου. Υψηλά επίπεδα έκφρασης εντοπίστηκαν στους σκελετικούς μύες και το σπλήνα ακολουθούμενα από χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στο ενδοκοιλιακό λευκό λιπώδη ιστό (Λευκό Λίπος) και την καρδιά, οριακή έκφραση στους πνεύμονες, τους νεφρούς, τον καφέ λιπώδη ιστό (Καφέ Λίπος), τον εγκέφαλο, τον ειλέο και το κόλον, ενώ δεν ανιχνεύθηκε έκφραση (ή ήταν χαμηλότερη από τα όρια ανίχνευσης) στο ήπαρ (**Εικόνα 1Δ**). Ο σκελετικός μυς, η καρδιά και το έντερο, αποτελούν τυπικές

θέσεις έκφρασης του κολλαγόνου VI, ενώ οι πνεύμονες, οι νεφροί, το ήπαρ, ο εγκέφαλος και ο λιπώδης ιστός έχει επίσης αναφερθεί να εκφράζουν κολλαγόνο VI σε κάποιες περιπτώσεις (Armaka et al., 2008; Braghetta et al., 1996). Σε ότι αφορά το σπλήνα, παρόλο που δε θεωρείται ως ένας τυπικός ιστός που εκφράζει κολλαγόνο VI, έχουμε δείξει πρόσφατα ότι υπάρχουν κύτταρα και σε αυτόν που το εκφράζουν (Chen et al., 1972b). Συνολικά, το μοτίβο έκφρασης του διαγονιδίου μας συμφωνεί με τη μεσεγχυματική έκφραση του κολλαγόνου VI σε διάφορους ιστούς.



Εικόνα 1. Οι TgC6hrp55 ποντικοί εκφράζουν τον ανθρώπινο TNFR1 υπό τον έλεγχο του υποκινητή του κολλαγόνου VI και παρουσιάζουν αυξημένο μέγεθος σώματος.

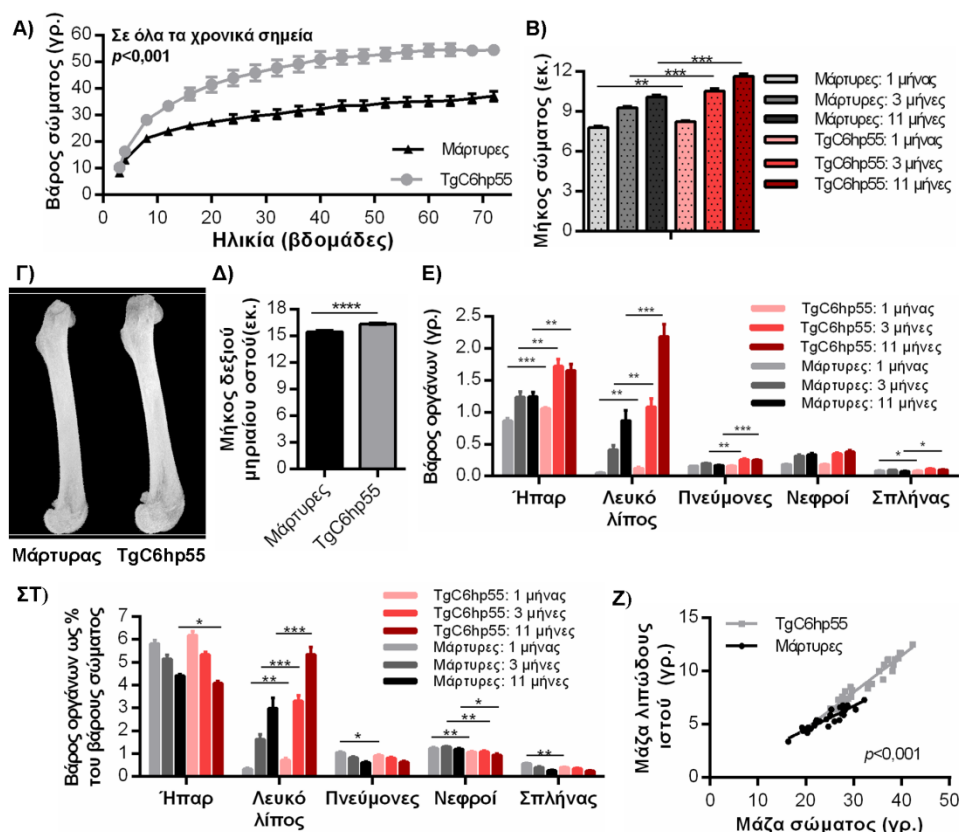
(Α) Το κατασκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία των TgC6hrp55 ποντικών. **(Β)** Μακροσκοπική σύγκριση αρσενικών και θηλυκών διαγονιδιακών ποντικών με τα άγριου τύπου αδέρφια τους στην ηλικία των 3 μηνών. **(Γ)** Σύγκριση του βάρους σώματος των δύο ποντικών-ιδρυτών και των διαγονιδιακών ποντικών που προέρχονται από αυτούς. Σε όλα τα χρονικά σημεία δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο καμπυλών. **(Δ)** Ανάλυση με τη χρήση Q-PCR για τον εντοπισμό του mRNA του ανθρώπινου TNFR1 σε διάφορους ιστούς από $n=3$ TgC6hrp55 ποντικούς.

2.2.2. Οι διαγονιδιακοί ποντικοί TgC6hrp55 παρουσιάζουν ενισχυμένη σωματική αύξηση συνοδευόμενη από αλλαγές σε διάφορες παραμέτρους της φυσιολογίας τους

Ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των ποντικών TgC6hrp55 σε συνεργασία με την Γερμανική κλινική German Mouse Clinic (GMC) περιλάμβανε τόσο τη μακροσκοπική τους εξέταση όσο και εξετάσεις που αφορούσαν τη μορφολογία των οστών και του σκελετού, αιματολογικές και βιοχημικές παραμέτρους, το ανοσοποιητικό σύστημα, το νευρικό σύστημα, την αλγαισθησία, τις αλλεργίες, το καρδιαγγειακό σύστημα και τη μορφολογία/λειτουργία των οφθαλμών (Shibli-Rahhal

and Schlechte, 2009; Ueki et al., 2000). (Πιο αναλυτικά οι παραπάνω εξετάσεις περιγράφονται στο τμήμα των Υλικών και Μεθόδων).

Οι διαγονιδιακοί ποντικοί TgC6hrp55 παρουσίασαν ήδη από την ηλικία των 3 εβδομάδων αυξημένο σωματικό βάρος σε σύγκριση με τα άγριου τύπου αδέρφια τους (**Εικόνα 2Α. Και Συμπληρωματική εικόνα S1**) καθώς και αυξημένο μήκος σώματος σε τρία διαφορετικά χρονικά σημεία (1 μήνας, 3 μήνες και 11 μήνες) (**Εικόνα 2Β**). Η εξέταση του δεξιού μηριαίου οστού με τη χρήση μικρο-αξονικού τομογράφου (microCT) έδειξε ότι οι TgC6hrp55 ποντικοί είχαν αυξημένο μήκος οστών (**Εικόνες 2Γ και 2Δ**). Στα ίδια χρονικά σημεία, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 2Ε**, τα περισσότερα όργανα των διαγονιδιακών ποντικών ήταν βαρύτερα από αυτά των ποντικών-μαρτύρων. Επιπλέον, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2ΣΤ**, το κανονικοποιημένο βάρος αυτών των οργάνων δε διέφερε σημαντικά από αυτών των ποντικών-μαρτύρων, υποδηλώνοντας μια γενικευμένη ενίσχυση της σωματικής αύξησης. Μόνο το κανονικοποιημένο βάρος του ενδοκοιλιακού λευκού λιπώδους ιστού (Λευκό Λίπος) παρουσιάστηκε αυξημένο στους διαγονιδιακούς ποντικούς, υποδηλώνοντας έναν επιπλέον φαινότυπο που προσομοιάζει με παχυσαρκία. Η ανάλυση της σύστασης ολόκληρου του σώματος που πραγματοποιήθηκε στην ηλικία των 13 εβδομάδων (και επαναλήφθηκε στις 19 εβδομάδες) με τη χρήση ποσοτικού Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (qNMR) ανέδειξε αύξηση τόσο στην άλιπη μάζα όσο και στη μάζα του λιπώδους ιστού στους διαγονιδιακούς ποντικούς (**Συμπληρωματική εικόνα S2**). Όταν οι μάζες αυτές κανονικοποιήθηκαν ως προς το συνολικό βάρος σώματος, η μάζα του λιπώδους ιστού βρέθηκε αυξημένη στους διαγονιδιακούς ποντικούς ενώ η άλιπη μάζα βρέθηκε ελαφρώς μειωμένη (**Συμπληρωματική εικόνα S2**). Η περαιτέρω ανάλυση της μάζας του λιπώδους ιστού σε συνάρτηση με το βάρος σώματος χρησιμοποιώντας γραμμική παλινδρόμηση (**Fig. 2Ζ**) σύμφωνα με τους Packard και Boardman (Dazzi et al., 2006) επιβεβαίωσε το αποτέλεσμα ότι το βάρος του συνολικού λιπώδους ιστού ήταν αυξημένο στους διαγονιδιακούς ποντικούς.



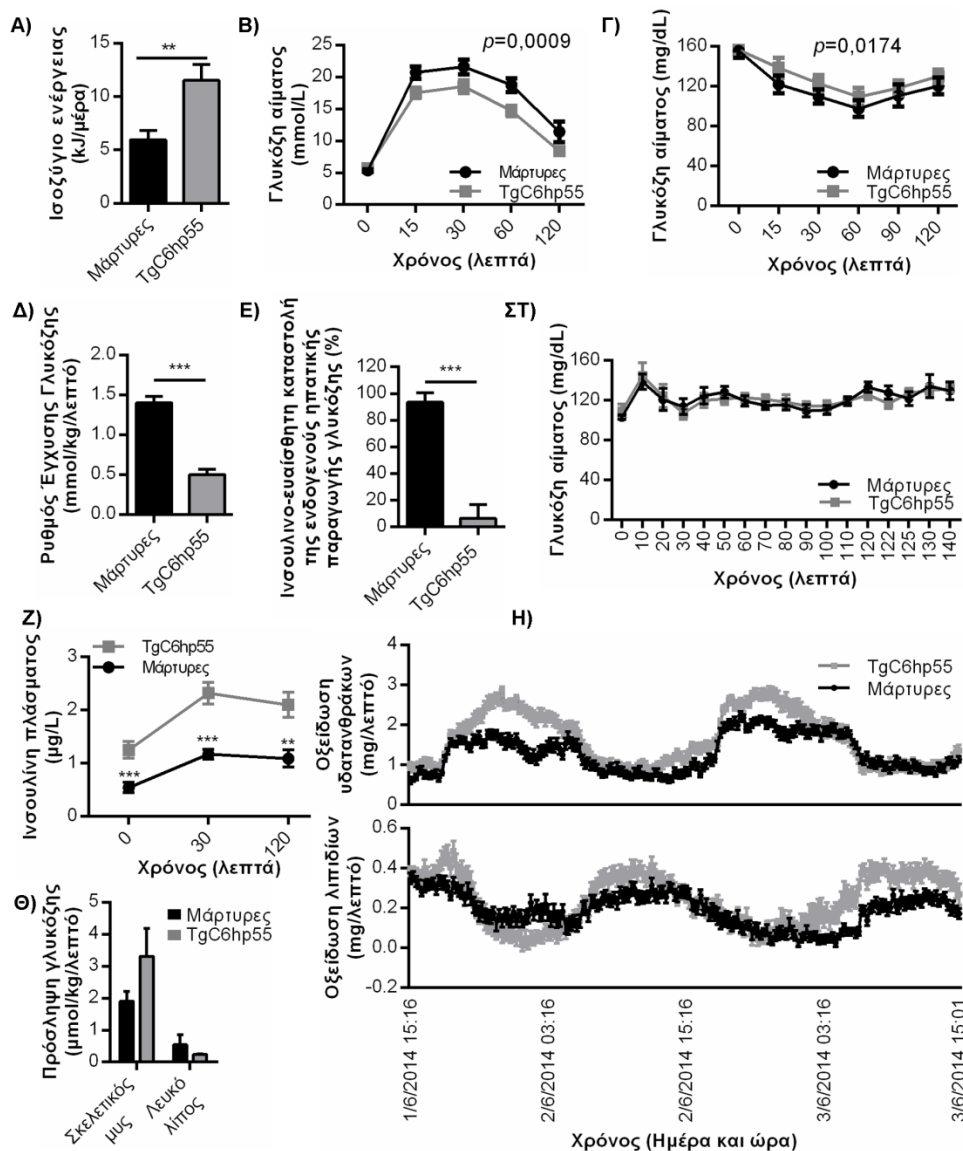
Εικόνα 2. Οι TgC6hr55 ποντικοί παρουσιάζουν ενισχυμένη σωματική αύξηση με κάποια επιπλέον χαρακτηριστικά που προσομοιάζουν με παχυσαρκία.

(Α) Καμπύλη βάρους σώματος που πραγματοποιήθηκε σε $n=10$ μάρτυρες και $n=10$ TgC6hr55 ποντικούς που προέρχονταν από τον 1^ο ιδρυτή. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν από την ηλικία των 3 μέχρι και την ηλικία των 72 εβδομάδων. (Β) Σύγκριση του μήκους σώματος μεταξύ μαρτύρων και TgC6hr55 ποντικών στην ηλικία των 1, 3 και 11 μηνών. Ως μήκος σώματος μετρήσαμε την απόσταση από την κορυφή της μύτης του κάθε ποντικού έως τη βάση της ουράς του. Στον 1 μήνα συγκρίναμε $n=10$ μάρτυρες και $n=10$ TgC6hr55 ποντικούς, στους 3 μήνες $n=8$ μάρτυρες και $n=8$ TgC6hr55 ποντικούς και στους 11 μήνες $n=7$ μάρτυρες και $n=9$ TgC6hr55 ποντικούς. (Γ) Σύγκριση του μήκους του δεξιού μηριαίου οστού σε ($n=7$) μάρτυρες και ($n=6$) TgC6hr55 ποντικούς στην ηλικία των 3 μηνών με τη χρήση μικροαζονικής τομογραφίας. (Δ) Ποσοτικοποίηση των δεδομένων της μικροαζονικής τομογραφίας που παρουσιάστηκε στην εικόνα 2Γ). (Ε) Σύγκριση του βάρους του ήπατος, του ενδοκοιλιακού λευκού λιπώδους ιστού, των πνευμόνων (και των δύο), των νεφρών (και των δύο) και του σπλήνα μεταξύ των μαρτύρων και TgC6hr55 ποντικών που φαίνονται στην εικόνα 2B) στην ηλικία των 1, 3 και 11 μηνών. (ΣΤ) Σύγκριση του κανονικοποιημένου βάρους των οργάνων που φαίνονται στην εικόνα 2Ε) εκφρασμένο ως % του βάρους σώματος των ποντικών στην ηλικία των 1, 3 και 11 μηνών. (Ζ) Ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης του λιπώδους ιστού σε συνάρτηση με τη μάζα σώματος σε ($n=30$) μάρτυρες και ($n=29$) TgC6hr55 ποντικούς στην ηλικία των 13 εβδομάδων. Λευκό Λίπος: Ενδοκοιλιακός Λευκός Λιπώδης Ιστός. Τα δεδομένα απεικονίζουν τη μέση τιμή (mean) $\pm$ τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM)

Η 48ωρη έμμεση θερμιδομετρία σε συνδυασμό με την καταγραφή της πρόσληψης τροφής αποκάλυψε ότι οι TgC6hr55 ποντικοί από τη μία είναι υπερφαγικοί (αυξημένη πρόσληψη ενέργειας) και από την άλλη υπερμεταβολικοί (αυξημένη κατανάλωση ενέργειας) (Συμπληρωματική εικόνα S3) με το συνολικό ημερήσιο ενεργειακό ισοδύναμό τους (ημερήσια πρόσληψη μεταβολίσιμης ενέργειας μείον την ημερήσια κατανάλωση ενέργειας) να είναι θετικό και αυξημένο σε σύγκριση με τους ποντικούς-μάρτυρες (Εικόνα 3Α). Επιπλέον, η μελέτη της ομοιόστασης της γλυκόζης

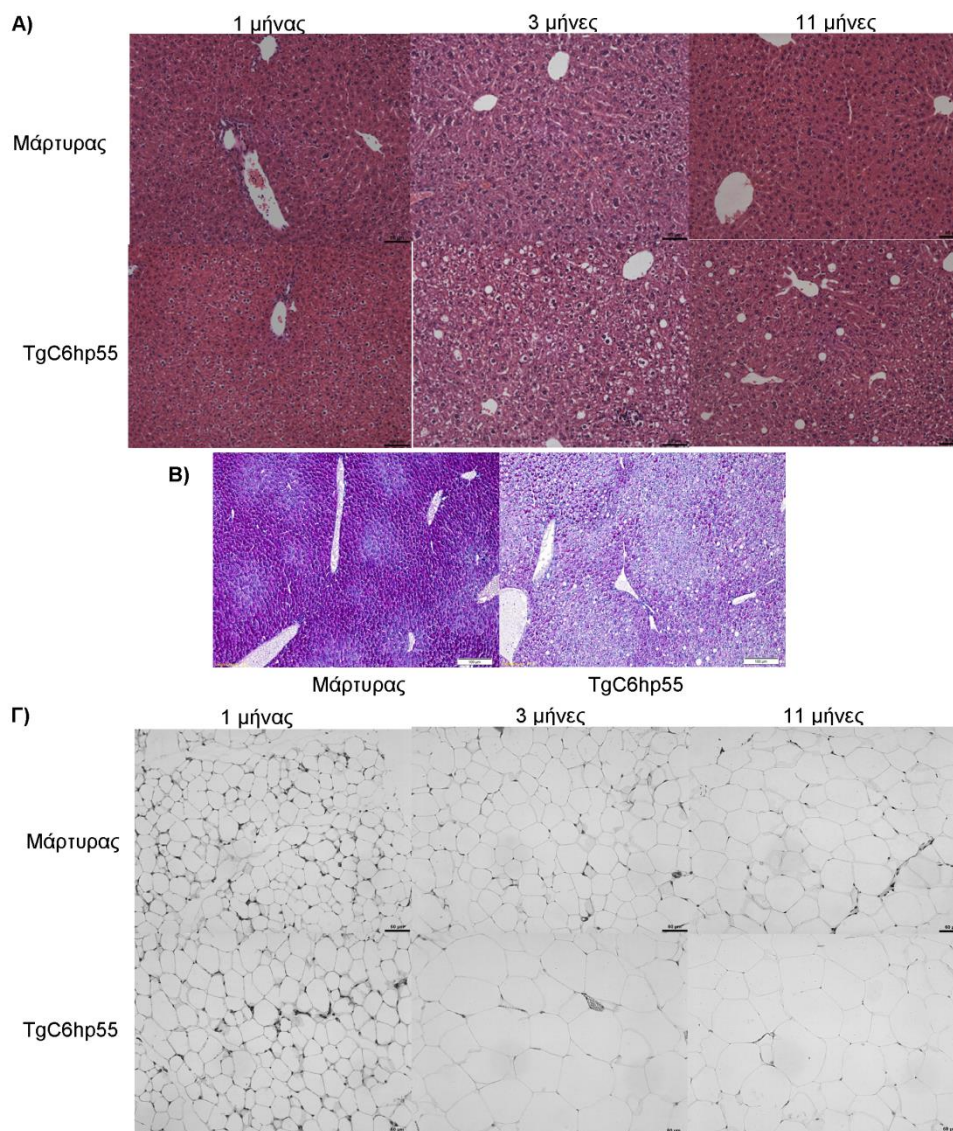
καθώς και της ευαισθησίας στην ινσουλίνη με την εφαρμογή ενδοπεριτοναϊκής Δοκιμασίας Ανοχής στη Γλυκόζη (**Εικόνα 3B**), ενδοπεριτοναϊκής Δοκιμασίας Ανοχής στην Ινσουλίνη (**Εικόνα 3Γ**) αλλά και υπερινσουλιναιμικής-ευγλυκαιμικής καμπύλης [συμπεριλαμβανομένου του Ρυθμού Έγχυσης Γλυκόζης (**Εικόνα 3Δ**) και της Ινσουλिनοευαίσθητης Καταστολής της Ηπατικής Παραγωγής Γλυκόζης (**Εικόνα 3Ε**)] αποκάλυψε ότι οι TgC6hr55 ποντικοί εμφάνιζαν ανοχή στην ινσουλίνη. Παρ'όλα αυτά, παρέμεναν νορμογλυκαιμικοί υπό φυσιολογικές συνθήκες ηρεμίας (**Εικόνα 3ΣΤ**) εξ'αιτίας της υπερινσουλιναιμίας που επιδείκνυαν και η οποία συνοδευόταν από αυξημένη Έκκριση Ινσουλίνης Επαγόμενη από τη Γλυκόζη (**Εικόνα 3Ζ**). Αποτέλεσμα των παραπάνω ήταν η φυσιολογική πρόσληψη γλυκόζης από τους σκελετικούς μύες και το λευκό λιπώδη ιστό (**Εικόνα 3Η**). Επίσης, αυτή η ενισχυμένη -επαγόμενη από τη γλυκόζη- έκκριση ινσουλίνης μπορεί να εξηγήσει τα μειωμένα επίπεδα γλυκόζης αίματος που παρατηρήθηκαν στους TgC6hr55 ποντικούς κατά τη διάρκεια της Δοκιμασίας Ανοχής στη Γλυκόζη που φαίνεται στην **Εικόνα 3B**. Τέλος, η 48ωρη έμμεση θερμιδομετρία αποκάλυψε μια ενδιαφέρουσα αύξηση στην κινητοποίηση υδατανθράκων από τους διαγονιδιακούς ποντικούς κατά τη διάρκεια της νύχτας (η περίοδος κατά την οποία τα νυκτόβια ζώα όπως οι ποντικοί παρουσιάζουν αυξημένες ενεργειακές ανάγκες), ενώ η αξιοποίηση λιπιδίων δεν ήταν επηρεασμένη (**Εικόνα 3Θ**). Σε συμφωνία με τα μεταβολικά χαρακτηριστικά των διαγονιδιακών ποντικών που περιγράψαμε παραπάνω, η ιστολογική τους εξέταση εντόπισε μια προοδευτική συσσώρευση λιπιδίων στο ήπαρ των TgC6hr55 ποντικών η οποία μάλιστα εξελίχθηκε σε μέτρια μακροοζώδη ηπατική στεάτωση (**Εικόνα 4Α**) συνοδευόμενη από μειωμένη ηπατική αποθήκευση γλυκογόνου (**Εικόνα 4B**) καθώς και αυξημένο μέγεθος λιποκυττάρων (**Εικόνα 4Γ**). Επιπρόσθετα και σε συνάρτηση με τα παραπάνω ευρήματα, η ανάλυση στη γονιδιακή έκφραση του ήπατος των TgC6hr55 ποντικών αποκάλυψε αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που έχουν συσχετιστεί λειτουργικά με το μεταβολισμό των λιπιδίων, των υδατανθράκων και των πρωτεϊνών, με μεταβολικές νόσους όπως η παχυσαρκία αλλά και με φλεγμονώδεις διεργασίες (**GSE95345**).

Τέλος, επιπλέον διαφορές σχετιζόμενες με το φαινότυπο που περιγράψαμε παραπάνω βρέθηκαν και στη μορφολογία και το μεταβολισμό των οστών (μείζονες διαφορές) καθώς και σε αιματολογικές, βιοχημικές και ανοσολογικές παραμέτρους (ελάσσονες διαφορές) και φαίνονται στις **συμπληρωματικές εικόνες S4-S5**.



Εικόνα 3. Οι TgC6hrp55 ποντικοί παρουσιάζουν αυξημένο ισοζύγιο ενέργειας και παραμένουν νορμογλυκαιμικοί παρά τη διαταραγμένη ευαισθησία τους στην ινσουλίνη.

(A) Σύγκριση του καθημερινού ενεργειακού ισοζυγίου μεταξύ μαρτύρων και TgC6hrp55 ποντικών ($n=15$ μάρτυρες και $n=11$ TgC6hrp55 ποντικοί). (B) Ενδοπεριτοναϊκή Δοκιμασία Ανοχής στη Γλυκόζη που πραγματοποιήθηκε σε $n=16$ μάρτυρες και $n=13$ TgC6hrp55 ποντικούς. Η τιμή p αντιπροσωπεύει τη σύγκριση του Εμβαδού Υπό της Καμπύλης μαρτύρων και TgC6hrp55 ποντικών. (C) Ενδοπεριτοναϊκή Δοκιμασία Ανοχής στην Ινσουλίνη που πραγματοποιήθηκε σε μάρτυρες ($n=16$) και TgC6hrp55 ($n=13$) ποντικούς. Η τιμή p αντιπροσωπεύει τη σύγκριση του Εμβαδού Υπό της Καμπύλης μεταξύ μαρτύρων και TgC6hrp55 ποντικών. (D) Σύγκριση του Ρυθμού Έγχυσης Γλυκόζης που απαιτείται ώστε να διατηρηθεί ευγλυκαιμία στους ποντικούς κατά τη διάρκεια της υπερινσουλιναϊκής-ευγλυκαιμικής καμπύλης ($n=7$ μάρτυρες και $n=6$ TgC6hrp55 ποντικοί). (E) Σύγκριση της Ινσουλινο-ευαίσθητης Καταστολής της Ενδογενούς Ηπατικής Παραγωγής Γλυκόζης κατά τη διάρκεια της υπερινσουλιναϊκής-ευγλυκαιμικής καμπύλης σε $n=8$ μάρτυρες και $n=7$ TgC6hrp55 ποντικούς. (F) Επίπεδα γλυκόζης αίματος κατά τη βασική περίοδο της υπερινσουλιναϊκής-ευγλυκαιμικής καμπύλης. (G) Μέτρηση της Επαγόμενης από τη Γλυκόζη Έκκριση Ινσουλίνης κατά τη διάρκεια της Ενδοπεριτοναϊκής Δοκιμασίας Ανοχής στη Γλυκόζη που παρουσιάστηκε στην εικόνα 3Γ. (H) Σύγκριση της πρόσληψης γλυκόζης από το σκελετικό μυ (γαστροκνήμιος μυς) και το λευκό λιπώδη ιστό (επιδιδυμικός λευκός λιπώδης ιστός) σε μάρτυρες ($n=6$) και TgC6hrp55 ($n=6$) ποντικούς. (I) Σύγκριση της οξείδωσης υδατανθράκων και λιπιδίων κατά τη διάρκεια 48ωρης θερμομετρίας σε $n=16$ μάρτυρες και $n=15$ TgC6hrp55 ποντικούς. Μόνο οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στην οξείδωση των υδατανθράκων ήταν στατιστικά σημαντικές.



Εικόνα 4. Οι TgC6hr55 ποντικοί παρουσιάζουν ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στο ήπαρ και το λευκό λιπώδη ιστό τους.

(A) Ιστοπαθολογική αξιολόγηση της προοδευτικής συσσώρευσης λιπιδίων στο ήπαρ των μαρτύρων και των TgC6hr55 ποντικών στην ηλικία των 1, 3 και 11 μηνών (χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης). (B) Ιστοπαθολογική σύγκριση του αποθηκευμένου γλυκογόνου στο ήπαρ μαρτύρων και TgC6hr55 ποντικών στην ηλικία των 3 μηνών (χρώση PAS). (Γ) Ιστοπαθολογική σύγκριση του μεγέθους των λιποκυττάρων που προέρχονται από τον ενδοκοιλιακό λευκό λιπώδη ιστό μαρτύρων και TgC6hr55 ποντικών στην ηλικία των 1, 3 και 11 μηνών (χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης). N=7-10 μάρτυρες και n=7-10 TgC6hr55 ποντικοί. Οι φωτογραφίες (A) και (Γ) είναι σε μεγέθυνση 200x / κλίμακα=60μm ενώ η φωτογραφία (B) είναι σε μεγέθυνση 100x / κλίμακα=100μm. PAS: Χρώση Periodic acid-Schiff.

2.2.3. Ο φαινότυπος των TgC6hr55 ποντικών είναι ανεξάρτητος από τον TNF, τον TNFR1 και την ενσωμάτωση του διαγονιδίου

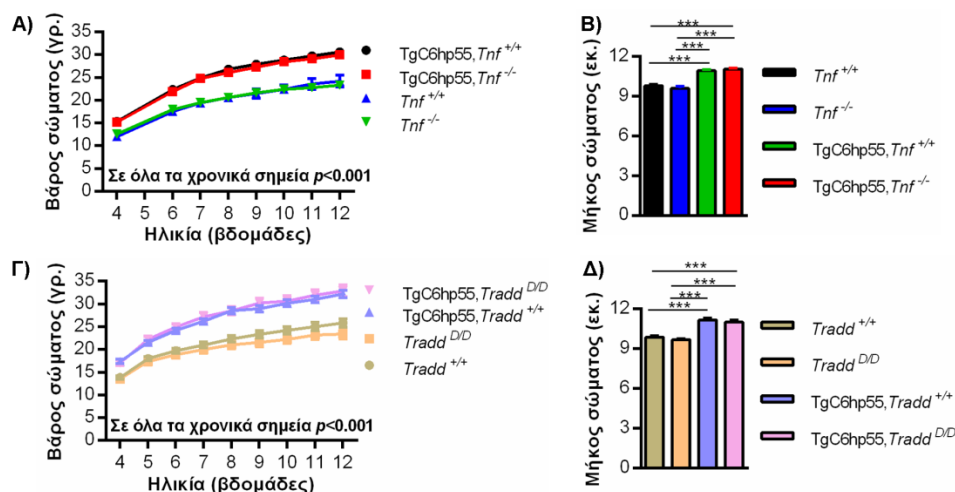
Για να εξετάσουμε τον τρόπο με τον οποίο η ενσωμάτωση του διαγονιδίου με τον - καθοδηγούμενο από τον υποκινητή του κολλαγόνου VI- ανθρώπινο TNFR1 στο γονιδίωμα οδήγησε στο φαινότυπο που περιγράψαμε παραπάνω αρχικά προσπαθήσαμε να επιβεβαιώσουμε ότι ο φαινότυπος αυτός εξαρτάται από τη

σηματοδότηση μέσω του TNF/TNFR1. Για το σκοπό αυτό διασταυρώσαμε τους TgC6hrp55 ποντικούς με ποντικούς στους οποίους είτε ο TNF (*Tnf*^{-/-} ποντικοί) (Pasparakis et al., 1996) είτε ο TRADD (*Tradd*^{D/D} ποντικοί) (Ermolaeva et al., 2008) έχουν απαλειφθεί γενετικά. Στους *Tnf*^{-/-} ποντικούς, ο TNF δεν παράγεται κι επομένως δεν ενεργοποιεί τον TNFR1, δεδομένου ότι ο TNF είναι ο κύριος συνδέτης που προσδένεται και ενεργοποιεί τον TNFR1 [ο οποίος ωστόσο μπορεί να ενεργοποιηθεί και από τη Λεμφοτοξίνη α (Campagnoli et al., 2001)]. Επιπλέον, στους *Tradd*^{D/D} ποντικούς, ο TRADD ο οποίος αποτελεί το σημαντικότερο κομμάτι των περισσότερων σηματοδοτικών μονοπατιών κάτω από τον TNFR1 (συμπεριλαμβανομένης της απόπτωσης και της ενεργοποίησης του NFκB μονοπατιού) (Ermolaeva et al., 2008; Wilson et al., 1990) λείπει, κι έτσι, μετά την ενεργοποίηση του TNFR1 (είτε του ανθρώπου είτε του ποντικού), αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια δε μπορούν να ενεργοποιηθούν.

Προς έκπληξή μας, τόσο οι TgC6hrp55*Tnf*^{-/-} ποντικοί όσο και οι TgC6hrp55*Tradd*^{D/D} ποντικοί δεν παρουσίασαν ουδεμία βελτίωση του φαινοτύπου. Συνέχισαν να εμφανίζουν αυξημένο βάρος (**Εικόνες 5A,Γ**) και μήκος σώματος (**Εικόνες 5B,Δ**) καθώς και αυξημένο βάρος οργάνων. Επιπλέον, το κανονικοποιημένο -ως % του συνολικού βάρους σώματος- βάρος των οργάνων τους δε παρουσίαζε μείζονες διαφορές, με εξαίρεση το λευκό λιπώδη ιστό το βάρος του οποίου παρέμενε αυξημένο (**Συμπληρωματική εικόνα S6**). Τέλος, στην ιστολογική εξέταση, παρουσίαζαν διήθηση λιπιδίων στο ήπαρ τους και αυξημένο μέγεθος λιποκυττάρων στο λευκό λιπώδη ιστό τους (**Συμπληρωματική εικόνα S7**). Όλα αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι ο φαινότυπος των TgC6hrp55 ποντικών είναι ανεξάρτητος από τη σηματοδότηση μέσω του Tnf και του Tnfr1.

Ένα άλλο σενάριο το οποίο έπρεπε να λάβουμε υπόψη μας και να εξετάσουμε ήταν αυτό των πιθανών επιπτώσεων της ενσωμάτωσης του διαγονιδίου στο γονιδίωμα του ποντικού. Χρησιμοποιώντας την τεχνική Targeted Locus Amplification (TLA) (de Vree et al., 2014), καταφέραμε να αναγνωρίσουμε το μοναδικό σημείο ενσωμάτωσης του διαγονιδίου το οποίο βρισκόταν στο χρωμόσωμα 10 και συγκεκριμένα στην περιοχή Chr10:77533719-77533707. Επιπρόσθετα, βρήκαμε ότι η ενσωμάτωση αυτή διατάραξε τα γονίδια *Icoslg* και *Dnmt3l* τα οποία βρίσκονται ακριβώς δίπλα στην περιοχή αυτή εξ' αιτίας της απαλοιφής κάποιων από τα εξώνιά τους. Επομένως, για να εξακριβώσουμε ότι η ενσωμάτωση του διαγονιδίου στη συγκεκριμένη θέση και οι τοπικές διαταραχές που αυτή προκάλεσε στο αρχικό DNA δεν ήταν η αιτία του

φαινοτύπου των TgC6hp55 ποντικών, δημιουργήσαμε έναν δεύτερο ποντικό-ιδρυτή (όπως περιγράφηκε παραπάνω). Αυτός ο ποντικός επίσης παρουσίαζε τον ίδιο φαινότυπο αυξημένου μεγέθους σώματος όπως και ο αρχικός ιδρυτής (Συμπληρωματική εικόνα S8), επιβεβαιώνοντας ότι ο TgC6hp55 φαινότυπος δεν είναι δευτεροπαθής ως αποτέλεσμα (μονάχα) της ενσωμάτωσης του διαγονιδίου.



Εικόνα 5. Ο φαινότυπος TgC6hp55 είναι πρωτοπαθής και ανεξάρτητος από τον TNF, τον TNFR1 και τις επιπτώσεις της ενσωμάτωσης του διαγονιδίου.

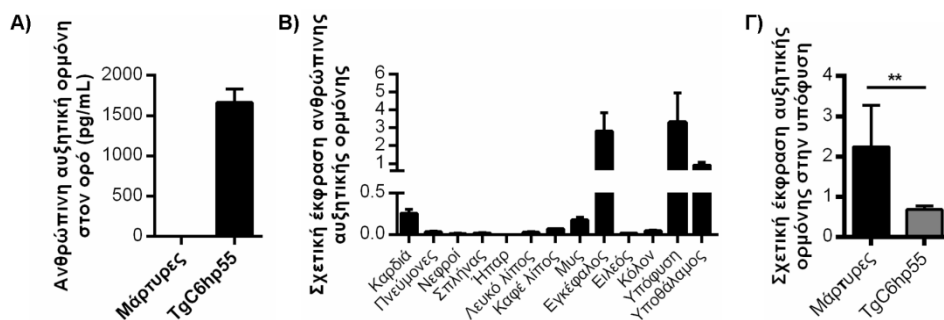
(A) Καμπύλη βάρους σώματος των $Tnf^{+/+}$ (v=12), $Tnf^{-/-}$ (v=24), $TgC6hp55Tnf^{+/+}$ (v=12) και $TgC6hp55Tnf^{-/-}$ (v=21) ποντικών. (B) Σύγκριση του μήκους σώματος των $Tnf^{+/+}$ (v=6), $Tnf^{-/-}$ (v=11), $TgC6hp55Tnf^{+/+}$ (v=6) και $TgC6hp55Tnf^{-/-}$ (v=9) ποντικών. (C) Καμπύλη βάρους σώματος των $Tradd^{+/+}$ (v=15), $Tradd^{D/D}$ (v=11), $TgC6hp55Tradd^{+/+}$ (v=19) και $TgC6hp55Tradd^{D/D}$ (v=8) ποντικών. (D) Σύγκριση του μήκους σώματος των $Tradd^{+/+}$ (v=8), $Tradd^{D/D}$ (v=7), $TgC6hp55Tradd^{+/+}$ (v=7) και $TgC6hp55Tradd^{D/D}$ (v=7) ποντικών. Τα δεδομένα απεικονίζουν τη μέση τιμή (mean)±τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM).

2.2.4. Το *hGH* minigene εκφράζεται στους TgC6hp55 ποντικούς οδηγώντας σε τοπική και συστηματική παραγωγή ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης και καταστολή της ενδογενούς αυξητικής ορμόνης

Καθώς δε φαινόταν να υπάρχει κάποια άλλη πιθανή εξήγηση για τον TgC6hp55 φαινότυπο, αποφασίσαμε να εξετάσουμε την πιθανότητα να εκφράζεται το *hGH* minigene. Πράγματι, η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη ανιχνεύθηκε με τη χρήση της τεχνικής ELISA στον ορό των TgC6hp55 ποντικών σε επίπεδα περίπου 1.6 ng/mL (Εικόνα 6A). Ο περαιτέρω έλεγχος με τη χρήση qPCR σε διάφορους ιστούς εντόπισε υψηλά επίπεδα του mRNA της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης στον εγκέφαλο (τόσο συνολικά σε όλο τον ιστό όσο και στην υπόφυση και τον υποθάλαμο) καθώς επίσης κι έκφραση στην καρδιά και το σκελετικό μυ. Οι υπόλοιποι ιστοί που εξετάστηκαν (πνεύμονες, νεφροί, σπλήνας, λευκός λιπώδης ιστός, καφέ λιπώδης ιστός, ειλεός και

κόλον) παρουσίασαν πολύ χαμηλή έκφραση της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης ενώ στο ήπαρ δεν παρατηρήθηκε ουδεμία έκφραση (**Εικόνα 6B**). Όπως εξηγήσαμε νωρίτερα, ο σκελετικός μυς και η καρδιά είναι δύο ιστοί στους οποίους ο υποκινητής του κολλαγόνου VI αναμένεται να είναι ενεργός, ενώ η έκφρασή του, ειδικά η έκτοπη έκφρασή του στον εγκέφαλο, έχει επίσης περιγραφεί στους υπόλοιπους ιστούς (Armaka et al., 2008; Braghetta et al., 1996). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η έκφραση του *hGH minigene* ελέγχεται από τον υποκινητή του κολλαγόνου VI. Το γεγονός ότι το μοτίβο έκφρασης του *hGH minigene* δεν είναι πανομοιότυπο με αυτό του TNFR1 θα μπορούσε να εξηγηθεί από την πιθανά διαφορετική ρύθμιση της έκφρασης και επεξεργασίας του mRNA των hTNFR1 και hGH στους διάφορους ιστούς. Για παράδειγμα, ενώ το mRNA του hTNFR1 είναι γνωστό ότι ρυθμίζεται ελάχιστα στο επίπεδο της σταθερότητας του mRNA, υπάρχουν ενδείξεις που υποδηλώνουν ότι το mRNA του hGH ακολουθεί πιο περίπλοκα πρότυπα ρύθμισης για παράδειγμα στον εγκέφαλο (Jones et al., 1995).

Τέλος, όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες διαγονιδιακές σειρές ποντικών (Declercq et al., 2015; Nuytens et al., 2014; Pruniau et al., 2013), η έκφραση της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης στον εγκέφαλο και ειδικά στην υπόφυση και τον υποθάλαμο των TgC6hrp55 ποντικών οδήγησε σε μια κατά 50% μείωση της παραγωγής της ενδογενούς αυξητικής ορμόνης (του ποντικού) από την υπόφυσή τους (**Εικόνα 6Γ**).



Εικόνα 6. Εντοπισμός της έκφρασης του *hGH minigene* στους TgC6hrp55 ποντικούς.

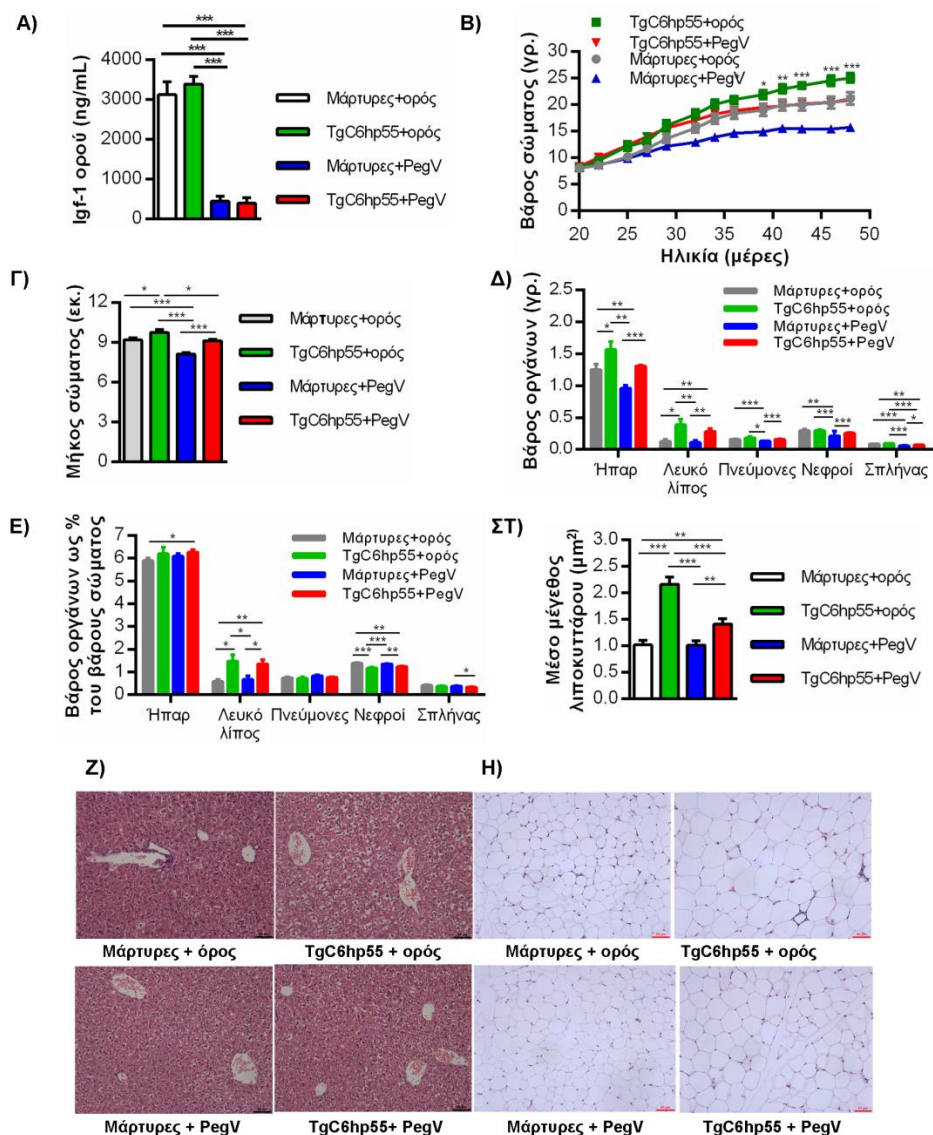
(A) Εντοπισμός της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης στον ορό των TgC6hrp55 ποντικών με τη χρήση της τεχνικής ELISA ($n=10$ μάρτυρες και $n=10$ TgC6hrp55 ποντικοί). **(B)** Q-PCR ανάλυση για τον εντοπισμό του mRNA της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης σε διάφορους ιστούς σε 3 TgC6hrp55 ποντικούς. Λευκό λίπος: Ενδοκοιλιακός Λευκός Λιπώδης Ιστός· Καφέ λίπος: Καφέ Λιπώδης Ιστός. **(Γ)** Σύγκριση με τη χρήση Q-PCR της ενδογενούς αυξητικής ορμόνης που παράγεται στην υπόφυση μαρτύρων ($n=6$) και TgC6hrp55 ($n=6$) ποντικών στην ηλικία των 2,5 μηνών. Τα δεδομένα απεικονίζουν τη μέση τιμή (mean) $\pm$ τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM).

2.2.5. Η φαρμακολογική παρεμπόδιση της σηματοδότησης μέσω της αυξητικής ορμόνης αντιστρέφει τα περισσότερα από τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των TgC6hr55 ποντικών

Για να εξετάσουμε εάν η έκφραση της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης εμπλέκεται αιτιολογικά στην ανάπτυξη του TgC6hr55 φαινοτύπου, χρησιμοποιήσαμε έναν ανταγωνιστή του υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης (πεγβισομάντη ή pegvisomant ή PegV). Το αντίσωμα αυτό μπλοκάρει φαρμακολογικά τη σηματοδότηση μέσω της αυξητικής ορμόνης μέσω της σύνδεσής του με τον υποδοχέα της και την παρεμπόδιση της πρόσδεσής της σε αυτόν (Charbord et al., 1996). Αρχικά, χωρίσαμε τους ποντικούς σε 4 διαφορετικές ομάδες: ποντικοί μάρτυρες στους οποίους χορηγήθηκε PegV (wt+PegV), ποντικοί μάρτυρες στους οποίους χορηγήθηκε αλατούχος ορός (wt+ορός), TgC6hr55 ποντικοί στους οποίους χορηγήθηκε PegV (TgC6hr55+PegV) και TgC6hr55 ποντικοί στους οποίους χορηγήθηκε αλατούχος ορός (TgC6hr55+ορός). Ξεκινώντας από την ηλικία των 20 ημερών (ακριβώς πριν οι TgC6hr55 ποντικοί αρχίσουν να εμφανίζουν διαφορά στο βάρος σώματος), το σχήμα χορήγησης -το οποίο είχε ως σκοπό την πρόληψη της εμφάνισης του φαινοτύπου- περιελάμβανε τη χορήγηση του φαρμάκου (ή του ορού) 3 φορές την εβδομάδα. Για να επιβεβαιώσουμε τη δραστηριότητα και την αποτελεσματικότητα της πεγβισομάντης στην παρεμπόδιση της σηματοδότησης της μέσω αυξητικής ορμόνης μετρήσαμε τα επίπεδα του IGF-1 (Baker et al., 1992; Palmiter et al., 1983; Stewart et al., 1992) στον ορό και των 4 ομάδων. Όπως φαίνεται και στην **εικόνα 7Α**, και οι δύο ομάδες στις οποίες χορηγήθηκε το PegV παρουσίασαν μείωση στα κυκλοφορούντα επίπεδα του IGF-1, επιβεβαιώνοντας την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Μετά από 4 εβδομάδες θεραπείας, οι ποντικοί της ομάδας TgC6hr55+PegV ήταν παρόμοιοι με αυτούς της ομάδας wt+ορός σε ότι αφορά το βάρος και το μήκος σώματος, ενώ ήταν σημαντικά μικρότεροι από αυτούς της ομάδας TgC6hr55+ορός (**Εικόνες 7Β,Γ**). Αναφορικά με τα απόλυτα και τα κανονικοποιημένα βάρη των οργάνων τους (**Εικόνες 7Δ,Ε**), τα αποτελέσματα δε μας οδήγησαν σε κάποιο συμπέρασμα, καθώς κάποια όργανα (όπως το ήπαρ ή οι πνεύμονες) δε μεγάλωσαν τόσο πολύ στην ομάδα στην οποία χορηγήθηκε το PegV σε σύγκριση με την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε ορός, ενώ άλλα (όπως ο λευκός λιπώδης ιστός) μεγάλωσαν περισσότερο. Πιθανότατα, στην τόσο νεαρή αυτή ηλικία στην οποία εξετάσαμε τους ποντικούς οι διαφορές δεν είναι ακόμη τόσο μεγάλες, κι επίσης ίσως να απαιτείται μεγαλύτερη διάρκεια θεραπείας ώστε να επηρεαστεί σημαντικά το μέγεθος των οργάνων. Ωστόσο, δε μπορούμε να αποκλείσουμε τη μικρή πιθανότητα η αποτελεσματικότητα του PegV

ή/και κάποια κομμάτια του TgC6hr55 φαινοτύπου να είναι ανεξάρτητα από την αυξητική ορμόνη και να αποδίδονται σε άλλους μηχανισμούς όπως η έκφραση και δράση του ανθρώπινου TNFR1 μέσω του διαγονιδίου ή άλλες περίπλοκες επιπτώσεις της ενσωμάτωσης αυτού στο γονιδίωμα. Τέλος, η παρεμπόδιση της σηματοδότησης μέσω της αυξητικής ορμόνης στην ομάδα TgC6hr55+PegV απέτρεψε την αυξημένη εναπόθεση λιπιδίων στο ήπαρ των ποντικών αυτών το οποίο φαινόταν απολύτως φυσιολογικό (**Εικόνα 7ΣΤ**). Στο λευκό λιπώδη ιστό, τα λιποκύτταρα αυτών των ποντικών, παρόλο που ήταν μεγαλύτερα από αυτά της ομάδας wt+ορός, ήταν σημαντικά μικρότερα από αυτά της ομάδας TgC6hr55+ορός (**Εικόνες 7Ζ,Η**). Συνολικά όλα τα παραπάνω δεδομένα επιβεβαιώνουν ότι η ανάπτυξη των κύριων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των TgC6hr55 ποντικών μπορεί να προληφθεί από την παρεμπόδιση της σηματοδότησης μέσω της αυξητικής ορμόνης, υποδηλώνοντας ότι η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη παίζει καίριο ρόλο στην ανάπτυξη του TgC6hr55 φαινοτύπου.

Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η αυξητική ορμόνη μπορεί να δράσει τόσο τοπικά μέσω αυτοκρινών/παρακρινών οδών όσο και συστηματικά είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω του IGF-1 (Daughaday et al., 1972; Woychik and Alagramam, 1998). Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιήσαμε τα κυκλοφορούντα επίπεδα του IGF-1 ως δείκτη πιθανών συστηματικών επιδράσεων τη ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης (Baker et al., 1992). Όπως φαίνεται ξανά στην **εικόνα 7Α**, οι διαγονιδιακοί ποντικοί είχαν τα ίδια επίπεδα IGF-1 στον ορό τους με αυτά των μαρτύρων τους. Αυτό το εύρημα σημαίνει ότι η κυκλοφορούσα ανθρώπινη αυξητική ορμόνη ασκεί τις δράσεις της είτε ανεξάρτητα από τον παραγόμενο στο ήπαρ IGF-1 είτε μέσω της τοπικής παραγωγής και δράσης της σε διάφορους ιστούς είτε μέσω και των δύο μηχανισμών.



Εικόνα 7. Η φαρμακολογική παρεμπόδιση της σηματοδότησης μέσω της αυξητικής ορμόνης αντιστρέφει τα περισσότερα από τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των TgC6hr55 ποντικών.

4 ομάδες ποντικών: 8 μάρτυρες έλαβαν αλατούχο ορό, 8 μάρτυρες έλαβαν πεγβισομάντη (PegV), 8 TgC6hr55 έλαβαν αλατούχο ορό και 8 TgC6hr55 έλαβαν πεγβισομάντη PegV. **(Α)** Επίπεδα Igf-1 στον ορό και των 4 ομάδων. **(Β)** Καμπύλη βάρους σώματος. Τα * αντιπροσωπεύουν τη σύγκριση μεταξύ της ομάδας TgC6hr55+ορός και της ομάδας TgC6hr55+PegV. **(Γ)** Σύγκριση μήκους σώματος. **(Δ)** Σύγκριση του βάρους του ήπατος, του ενδοκοιλιακού λευκού λιπώδους ιστού (λευκό λίπος), των πνευμόνων (και των δύο), των νεφρών (και των δύο) και του σπλήνα μεταξύ των 4 ομάδων. **(Ε)** Σύγκριση του κανονικοποιημένου βάρους των οργάνων από την εικόνα 7Δ) εκφρασμένο ως % του βάρους σώματος των ποντικών. **(ΣΤ)** Ιστοπαθολογική αξιολόγηση της συσσώρευσης λιπιδίων στο ήπαρ και των τεσσάρων ομάδων (χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης). **(Ζ)** Ιστοπαθολογική σύγκριση του μεγέθους των λιποκυττάρων από τον ενδοκοιλιακό λευκό λιπώδη ιστό και των τεσσάρων ομάδων (χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης). **(Η)** Ποσοτικοποίηση του μεγέθους των λιποκυττάρων που παρουσιάστηκαν στην εικόνα 7ΣΤ. Οι φωτογραφίες (ΣΤ) και (Ζ) είναι σε μεγέθυνση 200x / κλίμακα=60μm. Τα δεδομένα απεικονίζουν τη μέση τιμή (mean)±τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM).

2.3. Συζήτηση

Παρόλο που δεν είναι η πρώτη φορά που το *hGH minigene* έχει βρεθεί να εκφράζεται σε μια διαγονιδιακή σειρά ποντικών (Baan et al., 2015; Brouwers et al., 2014; Chen et al., 1972a; Declercq et al., 2015; Nuytens et al., 2014; Oropeza et al., 2015; Pruniau et al., 2013), με αυτή μας τη δουλειά παρέχουμε πρωτότυπες αποδείξεις για τις επιδράσεις της έκφρασης αυτής όταν αυτή καθοδηγείται από το μεσεγχυματικό υποκινητή του κολλαγόνου VI. Όπως φαίνεται και στον **πίνακα 1**, μέχρι σήμερα, η ‘απρόσμενη’ έκφραση του *hGH minigene* και οι συνέπειές της στο φαινότυπο των ποντικών έχει μελετηθεί και περιγραφεί μόνο σε λίγες γραμμές ποντικών οι οποίες χρησιμοποίησαν υποκινητές ειδικούς είτε για το πάγκρεας είτε για το ήπαρ είτε για το νευρικό σύστημα και γι’ αυτό οδήγησε σε μια λιγότερο ή περισσότερο περιορισμένη έκφραση της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης σε συγκεκριμένες περιοχές όπως ο εγκέφαλος και τα νησίδια του παγκρέατος. Από την άλλη πλευρά, στη δική μας διαγονιδιακή σειρά, την TgC6hp55, το *hGH minigene* βρέθηκε να εκφράζεται σε μια σειρά ιστούς υπό τον έλεγχο του υποκινητή του κολλαγόνου VI και είναι η πρώτη φορά, απ’ όσο γνωρίζουμε, που η έκφραση του *hGH minigene* περιγράφεται να οδηγεί σε ενισχυμένη σωματική αύξηση καθώς και μια πληθώρα αλλαγών σε ποικίλους παραμέτρους της φυσιολογίας του ποντικού όπως αναφέραμε νωρίτερα. Επιπρόσθετα, με τη φαρμακολογική παρεμπόδιση της σηματοδότησης μέσω της αυξητικής ορμόνης παρουσιάζουμε άμεσες αποδείξεις για την αιτιολογική σχέση μεταξύ της έκφρασης του *hGH minigene* και του παρατηρούμενου φαινοτύπου.

Σε κάποιες από τις μελέτες που αναφέρονται στον πίνακα 1, η τοπική έκφραση του *hGH minigene* στην υπόφυση και τον υποθάλαμο ποντικών οδήγησε σε μειωμένη σωματική αύξηση εξ’ αιτίας της καταστολής της ενδογενούς παραγωγής αυξητικής ορμόνης (Declercq et al., 2015; Nuytens et al., 2014; Pruniau et al., 2013), ενώ στα υπόλοιπα, στα οποία το *minigene* δεν εκφραζόταν στον εγκέφαλό τους, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στο μέγεθος του σώματος (Baan et al., 2015; Brouwers et al., 2014; Oropeza et al., 2015). Ένα σημαντικό ζήτημα το οποίο δε διευκρινίζεται στις περισσότερες από τις προαναφερθείσες μελέτες (Brouwers et al., 2014; Chen et al., 1972a; Declercq et al., 2015; Oropeza et al., 2015; Pruniau et al., 2013) είναι το εάν η τοπικά παραγόμενη ανθρώπινη αυξητική ορμόνη καταφέρνει να βγει στη συστηματική κυκλοφορία ή όχι. Οι 2 μελέτες που εξέτασαν το ζήτημα αυτό δεν

κατάφεραν να ανιχνεύσουν την ανθρώπινη αυξητική ορμόνη στην κυκλοφορία (Baan et al., 2015; Nuytens et al., 2014).

Πίνακας 1. Άλλες δημοσιεύσεις που μελέτησαν τις επιπτώσεις της έκφρασης του hGH.

Δημοσίευση	Γραμμή ποντικών	Ειδική για	Σημείο έκφρασης	Ανθρώπινη αυξητική ορμόνη στον ορό	Μέθοδος ανίχνευσης	Επιπτώσεις που αποδίδονται στην ανθρώπινη αυξητική ορμόνη
Pruniau et al. 2013	AlfpCre	Ηπατοκύτταρα	Υποθάλαμος, υπόφυση	Δεν εξετάστηκε	Q-PCR, ELISA	Ηπατική στεάτωση, μειωμένη αύξηση
Nuytens et al. 2014	Nbea ^{+/-} GH240B	Μη ειδική	Υποθάλαμος, υπόφυση	Όχι	Q-PCR, WB, ELISA, IF	Μειωμένη αύξηση, παχυσαρκία
Browsers et al. 2014	Pdx1Cre ^{Late}	α και β κύτταρα του παγκρέατος	β κύτταρα του παγκρέατος	Δεν εξετάστηκε	Q-PCR, WB, IHC	Τροποποιημένη φυσιολογία των β κυττάρων και της ρύθμισης της γλυκόζης και της ινσουλίνης
Browsers et al. 2014	MIPCre, RIPCre	β κύτταρα του παγκρέατος	β κύτταρα του παγκρέατος	Δεν εξετάστηκε	Q-PCR, WB, IF	
Baan et al. 2015	MIPFoxM1	β κύτταρα του παγκρέατος	β κύτταρα του παγκρέατος	Όχι	Q-PCR, WB, ELISA	Τροποποιημένη φυσιολογία των β κυττάρων
Declercq et al. 2015	NestinCre	Νευρικό σύστημα	Υποθάλαμος, υπόφυση	Δεν εξετάστηκε	Q-PCR, ELISA	Υποϋποφυσισμός, μειωμένη αύξηση, ηπατική στεάτωση, Συμπεριφορικά προβλήματα
Oropeza et al. 2015, Carboneau et al. 2016	MIPCreERT ^{1Lphi}	β κύτταρα του παγκρέατος	β κύτταρα του παγκρέατος, υποθάλαμος	Δεν εξετάστηκε	Q-PCR, WB	Τροποποιημένη φυσιολογία των β κυττάρων και της ρύθμισης της γλυκόζης και της ινσουλίνης

WB: Αποτύπωση κατά Western' IHC: Ανοσοϊστοχημεία' IF: Ανοσοφθορισμός

Είναι ενδιαφέρον ωστόσο το γεγονός ότι οι TgC6hrp55 ποντικοί παρουσίαζαν αυξημένο μέγεθος σώματος χωρίς να εμφανίζουν αλλαγές στα συστηματικά επίπεδα του Igf-1, παρά την κατά τουλάχιστον 50% μείωση της ενδογενούς αυξητικής ορμόνης. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να εξηγηθεί μέσω είτε των τοπικών επιπτώσεων της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης είτε των συστηματικών δράσεων της κυκλοφορούσας ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης είτε μέσω και των δύο μηχανισμών. Από τη μία μεριά έχει δειχτεί ότι η αυξητική ορμόνη μπορεί να δρα τόσο τοπικά όσο

και συστηματικά χωρίς να αλλάζει τα επίπεδά του Igf-1 στον ορό (Baker et al., 1992; Stewart et al., 1992). Από την άλλη μεριά, η τοπικά παραγόμενη αυξητική ορμόνη, ακόμη κι αν έχει πρόσβαση στη συστηματική κυκλοφορία, μπορεί να μην εμφανίζει καμία συστηματική επίδραση (Baker et al., 1992). Οι περισσότεροι ιστοί που εξετάστηκαν στους TgC6hr55 ποντικούς έδωσαν θετικό σήμα για την έκφραση της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης, κάτι το οποίο υποδηλώνει τοπική δραστηριότητα αυτής. Επιπλέον, τα κυκλοφορούντα επίπεδά της δεν εμφανίζονται αρκετά υψηλά ώστε να αυξήσουν τα συστηματικά επίπεδα του Igf-1. Ωστόσο, φαίνεται πως ακόμη κι έτσι, η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη έχει κάποιες συστηματικές επιδράσεις όπως για παράδειγμα στο ήπαρ όπου δε βρέθηκε να παράγεται τοπικά. Επομένως, κατά πάσα πιθανότητα, στους TgC6hr55 ποντικούς η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη δρα κυρίως σε τοπικό επίπεδο, με κάποιες επιπλέον επιπτώσεις της να αποδίδονται και σε συστηματική δράση αυτής. Φυσικά όλες αυτές οι υποθέσεις είναι πολύ ενδιαφέρουσες για να μελετηθούν σε δεύτερο χρόνο.

Ένα άλλο ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των TgC6hr55 ποντικών το οποίο μελετήσαμε και περιγράψαμε ενδελεχώς είναι η διαταραγμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη καθώς και ο (διαταραγμένος) μεταβολισμός των υδατανθράκων. Διαγονιδιακοί ποντικοί οι οποίοι εκφράζουν το *hGH minigene* επίσης παρουσίασαν ανάλογες διαταραχές (Baan et al., 2015; Brouwers et al., 2014; Chen et al., 1972a; Oropeza et al., 2015). Ωστόσο, αυτοί οι ποντικοί εξέφραζαν το *hGH minigene* στα νησίδια του παγκρέατος ή πιο εξειδικευμένα στα β-κύτταρα των νησιδίων, καθιστώντας έτσι πολύ πιο εύκολο για την ανθρώπινη αυξητική ορμόνη να αλληλεπιδράσει άμεσα μέσω αυτοκρινών/παρακρινών μονοπατιών με την παραγωγή της ινσουλίνης. Επιπρόσθετα, είναι γνωστό ότι η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη μπορεί να προσδεθεί και να ενεργοποιήσει και τον υποδοχέα της προλακτίνης (Goffin et al., 1996) κι επομένως να μιμηθεί την επίδραση των λακτογόνων στα β-κύτταρα του παγκρέατος του ποντικού (Parsons et al., 1995). Επίσης, σε συμφωνία και με προηγούμενες μελέτες (Brouwers et al., 2014), βρήκαμε αυξημένη έκφραση σεροτονίνης στα παγκρεατικά νησίδια των TgC6hr55 ποντικών (**Συμπληρωματική εικόνα S9**). Καθώς η σεροτονίνη χρησιμοποιείται ως δείκτης της ενεργοποίησης του υποδοχέα της προλακτίνης στο πάγκρεας (Goyvaerts et al., 2016; Schraenen et al., 2010), αυτό το εύρημα υποδηλώνει ότι τουλάχιστον στο πάγκρεας των TgC6hr55 ποντικών, η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη προσδένεται και ενεργοποιεί και τον υποδοχέα της προλακτίνης. Επομένως, κάποιες από τις επιπτώσεις της που περιγράφηκαν παραπάνω σχετικά με

το μεταβολισμό των υδατανθράκων μπορούν να εξηγηθούν μέσω αυτού του μηχανισμού (Brouwers et al., 2014).

Επιπλέον, η ενεργοποίηση του υποδοχέα της προλακτίνης από την ανθρώπινη αυξητική ορμόνη θα μπορούσε να εξηγήσει και κάποια άλλα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των TgC6hrp55 ποντικών όπως η ηπατομεγαλία (Buckley et al., 1985; Chen et al., 1972a; Chen et al., 1972b), ενώ έρχεται σε αντίθεση με άλλα ευρήματα από τους ποντικούς αυτούς όπως για παράδειγμα η αυξημένη οστική πυκνότητα και η αυξημένη μάζα λιπώδους ιστού (Ling et al., 2000; Shibli-Rahhal and Schlechte, 2009). Ωστόσο, το γεγονός ότι ο φαρμακολογικός αποκλεισμός του υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης ανέστρεψε τα περισσότερα από τα κύρια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των TgC6hrp55 ποντικών (ενισχυμένη σωματική αύξηση, ηπατική στεάτωση, αυξημένο μέγεθος λιποκυττάρων κλπ.), υποδηλώνει ότι οι κύριες δράσεις της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης μέσω των οποίων καθοδηγεί τον TgC6hrp55 φαινότυπο πραγματοποιούνται μέσω αυτού του υποδοχέα, ενώ ο υποδοχέας της προλακτίνης παίζει έναν πιο δευτερεύοντα ρόλο. Πάρα ταύτα, θα ήταν ενδιαφέρον να απαντηθεί αυτό το ερώτημα με μεγαλύτερη λεπτομέρεια σε μελλοντικές μελέτες.

Επιπρόσθετα, οι TgC6hrp55 ποντικοί παρουσίασαν έναν ενδιαφέροντα φαινότυπο αυξημένης πρόσληψης τροφής σε συνδυασμό με αυξημένο μεταβολικό ρυθμό καθώς και μια ιδιαίτερη προτίμηση στην κινητοποίηση υδατανθράκων με σκοπό την κάλυψη των αυξημένων ενεργειακών τους αναγκών κατά τις νυκτερινές ώρες, φαινότυπος ο οποίος δεν έχει περιγραφεί ξανά στο παρελθόν σε συνάρτηση με το *hGH minigene*.

Οι διαγονιδιακοί ποντικοί που εκφράζουν το *hGH minigene* και εν συνεχεία εμφανίζουν μείωση της ενδογενώς παραγόμενης αυξητικής ορμόνης αλλά και μειωμένη σωματική ανάπτυξη (όπως περιγράψαμε παραπάνω) (Declercq et al., 2015; Nuytens et al., 2014; Pruniau et al., 2013) παρουσιάζουν επίσης διαταραχές στο μεταβολισμό των λιπιδίων (αυξημένα τριγλυκερίδια, αυξημένη μάζα λιπώδους ιστού, ηπατική στεάτωση και απορρυθμισμένη έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων) παρόμοιες με τα δικά μας ευρήματα, παρά το αυξημένο μέγεθος σώματος των TgC6hrp55 ποντικών (Yakar et al., 1999). Ωστόσο, τα ίδια χαρακτηριστικά έχουν περιγραφεί νωρίτερα στα πλαίσια της αντοχής στην ινσουλίνη ή/και της παχυσαρκίας (Boren et al., 2013; Wilcox, 2005) όπως για παράδειγμα σε διαγονιδιακούς ποντικούς που υπερεκφράζουν τη χοιρινή αυξητική ορμόνη στο κεντρικό νευρικό τους σύστημα με αποτέλεσμα να εμφανίζουν παχυσαρκία λόγω

υπερφαγίας (Bohlooly et al., 2005). Αυτός ο μηχανισμός (της παχυσαρκίας που προκύπτει λόγω της υπερφαγίας) θα μπορούσε να εξηγήσει τα ευρήματα της αυξημένης μάζας του λιπώδους ιστού στους TgC6hrp55 ποντικούς και θα μπορούσε να αποτελεί μια νέα δευτερογενή ‘παρενέργεια’ της έκφρασης του *hGH minigene* στον εγκέφαλο. Φυσικά δε μπορούμε να αποκλείσουμε επιπλέον τοπικές επιδράσεις της τοπικά παραγόμενης (έστω και σε πολύ χαμηλά επίπεδα) ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης στο λευκό λιπώδη ιστό, καθώς η υπάρχουσα βιβλιογραφία γύρω από το συγκεκριμένο ζήτημα ακόμη δεν έχει καταλήξει σε κάποιο συμπέρασμα (Berryman et al., 2004; Fleenor et al., 2006; Kawai et al., 2007). Τέλος, οι υπόλοιπες αλλαγές που παρατηρήθηκαν κατά τη σκελετική, βιοχημική και αιματολογική εξέταση των TgC6hrp55 ποντικών επίσης δεν έχουν περιγραφεί ξανά στο παρελθόν σε συνάρτηση με την έκφραση του *hGH minigene*.

Όλα μαζί τα αποτελέσματα της ανάλυσής μας δείχνουν ότι η μη σχεδιασμένη έκφραση του *hGH minigene*, εάν/όταν συμβαίνει και σε συνάρτηση με το πλαίσιο στο οποίο δρα, μπορεί να έχει μια πληθώρα επιπτώσεων οι οποίες μπορεί να περιορίζονται στον ιστό στον οποίο γίνεται η έκφραση, αλλά μπορεί και να ξεπερνούν τα όρια αυτού. Πιο εξειδικευμένα, δείξαμε ότι η τοπική έκφραση αυτού του *minigene* στα μεσεγχυματικά κύτταρα που εκφράζουν το κολλαγόνο VI μπορεί να επηρεάσει ποικίλες παραμέτρους της φυσιολογίας του ποντικού όχι μόνο τοπικά αλλά και συστηματικά. Ωστόσο, δε μπορούμε με ασφάλεια να διακρίνουμε ποια από τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που περιγράφηκαν στους TgC6hrp55 ποντικούς μπορούν να αποδοθούν πρωτοπαθώς στην έκφραση του *hGH minigene* και ποια είναι δευτεροπαθή ως αποτέλεσμα της γενικά ενισχυμένης αύξησης των ποντικών αυτών. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας αυτής μαζί με τα αποτελέσματα άλλων πρόσφατων μελετών, υπογραμμίζουν τη σημασία για όσους χρησιμοποιούμε το *hGH minigene* στο μοντέλα ποντικών μας να εξετάζουμε εάν αυτό εκφράζεται ή όχι καθώς και τις πιθανές επιπτώσεις που μπορεί να έχει στους περιγραφόμενους φαινοτύπους, καθώς η απουσία εμφανών αλλαγών μεγέθους δε σημαίνει απαραίτητα ότι το *minigene* δεν εκφράζεται. Τέλος, θα ήταν σημαντικό να εξετάζουμε αυτούς τους ποντικούς με μια πιο συστηματική προσέγγιση και να μην εστιάζουμε μόνο τοπικά, καθώς, όπως δείξαμε και στην παρούσα εργασία, οι ‘παρενέργειες’ της έκφρασης του *hGH minigene* μπορεί να μην περιορίζονται πάντα σε τοπικό επίπεδο.

2.4. Υλικά και μέθοδοι

2.4.1. Ποντικοί

Όλοι οι ποντικοί αναθράφηκαν και διατηρήθηκαν σε C57BL/6J γενετικό υπόβαθρο στις ζωικές εγκαταστάσεις του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών ‘Αλέξανδρος Φλέμιγκ’ κάτω από ειδικές συνθήκες χωρίς παθογόνα. Τα πειράματα εγκρίθηκαν από την αρμόδια Επιτροπή Αξιολόγησης Πρωτοκόλλων σε συνεργασία με τη Διεύθυνση της Κτηνιατρικής Υπηρεσίας της Ελληνικής Δημοκρατίας της Περιφέρειας Αττικής σύμφωνα με όλη την ισχύουσα Ευρωπαϊκή και εθνική νομοθεσία και πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με όλες τις σχετικές οδηγίες και κανονισμούς. Όλοι οι ποντικοί στεγάζονταν σε πρότυπα κλουβιά (με πριονίδι για υπόστρωμα) σε 12ωρο κύκλο ημέρας/νύκτας και ταΐζονταν με πρότυπη τροφή για τρωκτικά.

2.4.2. Δημιουργία των διαγονιδιακών ποντικών TgC6hp55

Η διαδικασία για τη δημιουργία των TgC6hp55 ποντικών έχει περιγραφεί στο κομμάτι των Αποτελεσμάτων. Η προπυρηνική ένεση του διαγονιδίου σε γονιμοποιημένα (C57BL/6JXCBA/J)F2 ωοκύτταρα πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα Διαγένεσης του Ε.ΚΕ.Β.Ε. Αλέξανδρος Φλέμιγκ. Ο υποκινητής του κολλαγόνου VI(a1) ήταν μια ευγενική χορηγία του G. Bressan (University of Padova, Padova, Italy) (Braghetta et al., 1996). Η κωδική αλληλουχία DNA του ανθρώπινου TNFR1 ήταν μια ευγενική χορηγία του D. Wallach (The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) (Buckley et al., 1985). Το hGH minigene ήταν μια ευγενική χορηγία του R. Perlmutter (Howard Hughes Medical Institute, University of Washington, Washington, USA) (Jones et al., 1995). Για τη γονοτύπηση των ποντικών, οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε ήταν: Πρόσθιος: AGG AAA TGG GTC AGG TGG AG και Ανάστροφος: CTC AAT CTG GGG TAG GCA CA. Οι συνθήκες πραγματοποίησης της PCR ήταν οι ακόλουθες: επανασυγκόλληση των μονών ελίκων του DNA με τους εκκινητές για 30 δευτερόλεπτα στους 66°C με μείωση κατά 1°C ανά κύκλο μέχρι τους 57°C και μετά στους 57°C για 30 ακόμη κύκλους, επιμήκυνση για 1 λεπτό στους 72°C. Η δημιουργία των *Tnf*^{-/-} ποντικών έχει περιγραφεί προηγουμένως (Pasparakis et al., 1996) ενώ οι *Tradd*^{D/D} ποντικοί ήταν μια ευγενική χορηγία του Μ. Πασπαράκη (University of Cologne, Cologne, Germany) (Ermolaeva et al., 2008).

Σε όλα τα πειράματα προσπαθήσαμε να χρησιμοποιήσουμε ίσους αριθμούς αρσενικών και θηλυκών ποντικών από κάθε γονότυπο. Επιπρόσθετα, σε όλα τα πειράματα, τα ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από την ίδια γέννα ή τουλάχιστον ‘συστεγάζονταν’ στο ίδιο κλουβί από την ημέρα του απογαλακτισμού τους.

2.4.3. Q-PCR

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε πιάτα 96 πηγαδιών στο μηχάνημα PTC200 Thermal Cycler από την MJ Research (USA) και τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Opticon Monitor 3.

2.4.3.1. Υπολογισμός του αριθμού των αντιγράφων

Για τον υπολογισμό του αριθμού των αντιγράφων του διαγονιδίου τα οποία ενσωματώθηκαν στο γονιδίωμα κάθε ποντικού-ιδρυτή και των απογόνων του, απομονώσαμε γενετικό υλικό από την ουρά των ποντικών χρησιμοποιώντας το κλασσικό πρωτόκολλο εξαγωγής DNA με φαινόλη:χλωροφόρμιο. Όλα τα δείγματα αραιώθηκαν σε τελική συγκέντρωση 12,5 ng/μl και 2 μl από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν στην κάθε αντίδραση. Για τον πολλαπλασιασμό του διαγονιδίου χρησιμοποιήσαμε εκκινητές που ανιχνεύουν το εξώνιο 3 του ανθρώπινου TNFR1 ενώ το γονίδιο MAP3K8 χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Τέλος, χρησιμοποιήσαμε ποντικούς στους οποίους ο Tnfr1 (ή αλλιώς p55) έχει αντικατασταθεί από τον ανθρώπινο, ως δείγματα ελέγχου τα οποία περιέχουν 2 αντίγραφα από τον ανθρώπινο TNFR1 (ή p55)(Van Hauwermeiren et al., 2013). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: ανθρώπινος TNFR1 (εξώνιο 3) πρόσθιος: 5' – TAC AAT GAC TGT CCA GGC CCG – 3', ανθρώπινος TNFR1 (εξώνιο 3) ανάστροφος: 5' – GCA TTT GGA GCA GCT GAG GC – 3', MAP3K8 πρόσθιος: 5' - TCC AGG CCT GTT TCC GGC – 3', MAP3K8 ανάστροφος: 5'- CCT CCC TCG CCG GCT TCC – 3'. Οι συνθήκες της Q-PCR ήταν: επανασυγκόλληση των μονών ελίκων του DNA με τους εκκινητές στους 59°C για 30 δευτερόλεπτα, επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του Quantitect Real-time PCR kit από την Qiagen (Cato No. 204143).

2.4.3.2. Επίπεδα έκφρασης του ανθρώπινου TNFR1, της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης και της αυξητικής ορμόνης του ποντικού

Μετά την ευθανασία των ποντικών, οι ιστοί που μας ενδιέφεραν (καρδιά, πνεύμονες, νεφροί, σπλήνας, ήπαρ, μυς, εγκέφαλος, ιλεός, κόλον, ενδοκοιλιακός λευκός λιπώδης ιστός, μεσοπλατιαίος καφέ λιπώδης ιστός, όρχεις, υπόφυση και υποθάλαμος καταψύχθηκαν ακαριαία μέσα σε υγρό άζωτο. Το συνολικό RNA απομονώθηκε από τους ιστούς και το DNA που περιείχε καταστράφηκε με τη χρήση DNAασης μέσω του Absolutely RNA Miniprep Kit από την Agilent Technologies (Cat. No. 400800). Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την M-MLV αντίστροφη μεταγραφάση της Promega (Cat. No. M1705). Τα δείγματα κανονικοποιήθηκαν ως προς το B2M (B2M πρόσθιος εκκινητής: 5' – TTC TGG TGC TTG TCT CAC TGA – 3'; B2M ανάστροφος εκκινητής: 5' – CAG TAT GTT CGG CTT CCC ATT C – 3'). Οι εκκινητές για τον ανθρώπινο TNFR1 αγοράστηκαν από την Qiagen (QT00216993). Οι εκκινητές για την ανθρώπινη αυξητική ορμόνη έχουν περιγραφεί από τους Brouwers et al. (Brouwers et al., 2014), οι εκκινητές για την αυξητική ορμόνη του ποντικού έχουν περιγραφεί από τους Martari et al. (Martari et al., 2009). Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του Quantitect Real-time PCR kit της Qiagen (Cat. No. 204143). Οι συνθήκες των αντιδράσεων ήταν: ανθρώπινος TNFR1: επανασυγκόλληση των μονών ελίκων του DNA με τους εκκινητές στους 55°C για 30 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα· ανθρώπινη αυξητική ορμόνη: επανασυγκόλληση των μονών ελίκων του DNA με τους εκκινητές στους 58°C για 30 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση στους 72°C για 40 δευτερόλεπτα.

2.4.4. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός

2.4.4.1. Καμπύλη βάρους σώματος

Για τη δημιουργία της καμπύλης βάρους σώματος ζυγίζαμε τους ποντικούς μία φορά τη βδομάδα ξεκινώντας από την ηλικία των 4 εβδομάδων. Επιπλέον, σε ότι αφορά τους TgC6hr55 ποντικούς, συγκρίναμε και τα σωματικά τους βάρη (ως προς τα άγριου τύπου αδέρφια τους) στη 1 βδομάδα, τις 11 μέρες, τις 2 βδομάδες και τις 3 βδομάδες.

2.4.4.2. Μικροαξονική τομογραφία (microCT)

Η εξέταση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε έναν μικροαξονικό τομογράφο Skyscan 1172 (Brucker). Τα δείγματα οστών (δεξιό μηριαίο οστό) τυλίχθηκαν με

γάζα που είχε εμποτιστεί σε αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικά (PBS) και αποθηκεύτηκαν στους -20°C . Πριν από την εξέτασή του, αφέθηκαν να ξεπαγώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Οι παράμετροι ελέγχου τέθηκαν στα 49kV και 100μΑ, η ανάλυση ήταν 1332x960 και το φίλτρο που χρησιμοποιήθηκε ήταν Al 0,5mm. Η ανασύσταση των εικόνων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος NRecon (SkyScan, Brucker).

2.4.5. Αλγόριθμος της διαδικασίας φαινοτυπικού χαρακτηρισμού στην German Mouse Clinic

2.4.5.1. Ενδοπεριτοναϊκή Δοκιμασία Ανοχής της Γλυκόζης

Οι ποντικοί που συμμετείχαν σε αυτή τη δοκιμασία τέθηκαν σε νηστεία κατά τη διάρκεια της νύκτας για 16-18 ώρες. Κατά την έναρξη του τεστ, μετρήθηκε το βάρος σώματος των ποντικών. Για τον προσδιορισμό των επιπέδων γλυκόζης νηστείας στο αίμα, η άκρη της ουράς χαραχτηκε με αποστειρωμένο νυστέρι και μια μικρή σταγόνα αίματος χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση με το μετρητή σακχάρου Accu-Chek Aviva (Roche/Mannheim). Έπειτα, χορηγήθηκαν στους ποντικούς ενδοπεριτοναϊκά 2 γραμμάρια γλυκόζης/κίλο βάρους σώματος με τη χρήση διαλύματος γλυκόζης 20%, σύριγγας 1ml και βελόνας 25G. Στα 15, 30, 60 και 120 λεπτά μετά την ένεση της γλυκόζης, συλλέχθηκαν επιπλέον δείγματα αίματος (μία σταγόνα σε κάθε χρονικό σημείο) για τον προσδιορισμό των επιπέδων σακχάρου και ινσουλίνης (στα 30 και 60 λεπτά) αίματος όπως περιγράφηκε νωρίτερα. Η επαναλαμβανόμενη αιμορραγία προκλήθηκε με αφαίρεση του πήγματος αίματος από την αρχική τομή και εν συνεχεία με μαλάξεις της ουράς του ποντικού. Μόλις ολοκληρώθηκε η δοκιμασία, οι ποντικοί τοποθετήθηκαν σε κλουβιά με άφθονη παροχή νερού και τροφής (Yakar et al., 2002).

Τα επίπεδα ινσουλίνης μετρήθηκαν με τη χρήση της τεχνικής ELISA (Mercodia, Sweden).

2.4.5.2. Δοκιμασία Ανοχής στην Ινσουλίνη

Η δοκιμασία ανοχής στην ινσουλίνη πραγματοποιήθηκε νωρίς το απόγευμα μετά από 6 ώρες στέρησης τροφής η οποία ξεκίνησε το ίδιο πρωί. Η ινσουλίνη (0.7 μονάδες/κίλο βάρους σώματος) χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά μετά τη μέτρηση του αρχικού επιπέδου σακχάρου αίματος από δείγματα αίματος που ελήφθησαν από την φλέβα της ουράς των ποντικών. Επιπλέον δείγματα αίματος ελήφθησαν στα 15, 30, 60, 90 και 120 λεπτά μετά την ένεση. Τα επίπεδα σακχάρου του αίματος

προσδιορίστηκαν με τη χρήση του μετρητή σακχάρου χειρός ACCU CHECK Aviva (Roche Diagnostics / Mannheim, Germany).

2.4.5.3. Υπερινσουλιναϊμική-ευγλυκαιμική καμπύλη

Για την προετοιμασία αυτής της δοκιμασίας, 6-7 μέρες πριν την πραγματοποίησή της τοποθετήθηκε στους πειραματικούς ποντικούς υπό αναισθησία ένας μόνιμος σφαγιτιδικός φλεβικός καθετήρας. Πριν από την έναρξη της καμπύλης, οι ποντικοί στερήθηκαν της τροφής τους για 6 ώρες ξεκινώντας από νωρίς το πρωί. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, οι ποντικοί είχαν πλήρη συνείδηση και ελευθερία κινήσεων αλλά είχαν τοποθετηθεί σε υπερμεγέθεις περιοριστές κινήσεων για αρουραίους και προθερμάνθηκαν με ειδικά θερμαντικά μαξιλάρια. Για τη χορήγηση των διαλυμάτων, οι καθετήρες ήταν συνδεδεμένοι σε αντλίες χορήγησης τύπου CMA402 (Axel Semrau, Sprockhoevel, Germany). Μετά από 110 λεπτά αρχικής συνεχούς έγχυσης [$3\text{-}^3\text{H}$] γλυκόζης (1.85 kBq/λεπτό), συλλέχθηκε δείγμα αίματος για τον προσδιορισμό της ινσουλίνης πλάσματος καθώς και της συγκέντρωσης γλυκόζης αλλά και [$3\text{-}^3\text{H}$] γλυκόζης ώστε να υπολογιστεί η βασική ενδογενής παραγωγή γλυκόζης. Έπειτα ξεκίνησε η χορήγηση [$3\text{-}^3\text{H}$] γλυκόζης (3.7 kBq/λεπτό) μαζί με ινσουλίνη (15 pmol·κιλό⁻¹·λεπτό⁻¹ - HumulinR, Lilly, Indianapolis, IN). Οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης στο αίμα καταγράφονταν κάθε 10 λεπτά. Τα επιδιωκόμενα επίπεδα γλυκόζης αίματος επιτεύχθηκαν με την τροποποίηση του ρυθμού χορήγησης γλυκόζης. 120 λεπτά μετά την έναρξη του πειράματος, χορηγήθηκε ενδοφλεβίως 2- [^{14}C] δεοξυ-γλυκόζη (370 kBq) για να εκτιμηθεί ο ρυθμός πρόσληψης γλυκόζης από τους διάφορους ιστούς. Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος οι ποντικοί υποβλήθηκαν σε ευθανασία με τη χορήγηση υπερβολικής δόσης κεταμίνης/ξυλαζίνης. Έπειτα συλλέχθηκαν διάφοροι ιστοί, καταψύχθηκαν ακαριαία σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80°C . Κατά τη διάνοιξη των ποντικών συλλέχθηκε επίσης αίμα και προσδιορίστηκε η ^3H και ^{14}C ραδιενέργεια του πλάσματος (αφού πρώτα αφαιρέθηκαν οι πρωτεΐνες του) πριν και μετά την εξάτμιση του ραδιενεργού $^3\text{H}_2\text{O}$ ώστε να υπολογιστεί ο ρυθμός γλυκόλυσης. Σε δείγματα λιωμένου ήπατος η 2- [^{14}C] δεοξυ-6-φωσφορική-γλυκόζη διαχωρίστηκε από τη 2- [^{14}C] δεοξυ-γλυκόζη με τη χρήση κολώνας ανταλλαγής ιόντων (Poly-Prep AG1-X8, Bio-Rad, Germany). Οι ρυθμοί πρόσληψης γλυκόζης υπολογίστηκαν πολλαπλασιάζοντας τη μέση συγκέντρωση γλυκόζης πλάσματος μεταξύ 120 και 140 λεπτών (mmol/ml) με το περιεχόμενο των ιστών σε 2- [^{14}C] δεοξυ-γλυκόζη (dpm/100g ιστού), διαιρούμενο με το εμβαδόν υπό την καμπύλη της συγκέντρωσης

πλάσματος της 2-[¹⁴C] δεοξυ-γλυκόζης στην ίδια χρονική περίοδο. Πηγή ραδιενεργών ισοτόπων: Perkin Elmer· τα δείγματα μετρήθηκαν με τη χρήση του κοκτέιλ σπινθηροβολίας Ultima-Gold (Tri-Carb2910TR, Perkin-Elmer, Weissenstein, Germany). Η εναπόθεση γλυκόζης σε όλο το σώμα (M value) υπολογίστηκε από το ρυθμό έγχυσης, την ειδική δραστηριότητα της [3-³H] γλυκόζης και το βάρος σώματος.

2.4.5.4. Έμμεση θερμιδομετρία

Η 48ωρη έμμεση θερμιδομετρία πραγματοποιήθηκε σε ποντικούς με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό (32 κλουβιά PhenoMaster με έναν ποντικό το καθένα και δυνατότητα καταγραφής της δραστηριότητας αλλά και της κατανάλωσης φαγητού και νερού, TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Germany). Η καταγραφή έγινε σε 4 χρονικά σημεία ανά ώρα (κατανάλωση οξυγόνου, παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα, λόγος ανταλλαγής αναπνευστικών αερίων, μεταβολικός ρυθμός) με αποτέλεσμα τη συλλογή στοιχείων από 192 χρονικά σημεία. Από τα δεδομένα ανταλλαγής αερίων υπολογίσαμε τους ρυθμούς οξείδωσης υδατανθράκων και λιπιδίων (Ling et al., 2000). Παράλληλα με την καταγραφή των ενεργειακών δαπανών, καταγράφηκε προσεκτικά και η κατανάλωση τροφής. Η κατανάλωση τροφής μετατράπηκε σε πρόσληψη μεταβολίσιμης ενέργειας χρησιμοποιώντας ως παράγοντα μετατροπής τα 13.047 kJ ανά γραμμάριο τροφής (Altromin 1324, Altromin, Lage, Germany) τα οποία είχαν υπολογιστεί πριν από την έμμεση θερμιδομετρία στηριζόμενα σε μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα τροφής και κοπράνων με τη χρήση ειδικού θερμιδομετρητή ανάφλεξης.

2.4.5.5. Ποσοτικός Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (qNMR)

Η ανάλυση της σύστασης του σώματος των ποντικών πραγματοποιήθηκε μη επεμβατικά με τη χρήση ποσοτικού πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού - qNMR (Bruker MiniSpec LF50, Bruker, Ettlingen, Germany).

2.4.5.6. Κλινική Χημεία

Τα δείγματα αίματος για τις αναλύσεις κλινικής χημείας συλλέχθηκαν σε σωληνάκια καλυμμένα με λίθιο/ηπαρίνη μετά από ολονύχτια στέρηση της τροφής των ποντικών αλλά και μετά από κατά βούληση λήψη τροφής. Τα δείγματα πλάσματος αναλύθηκαν με τη χρήση ενός αυτόματου αναλυτή AU480 (Olympus, Germany) και προσαρμοσμένα αντιδραστήρια τα οποία μας παρείχε η Beckman-Coulter, Wako Chemicals GmbH ή η Randox σύμφωνα με τις πρότυπες διαδικασίες της GMC (Kahn et al., 1988). Ένα μικρό δείγμα αίματος αναμεμιγμένο με EDTA χρησιμοποιήθηκε

για τον ανοσολογικό έλεγχο με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής ενεργοποιούμενης με φθορισμό (FACS).

2.4.5.7. Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής (FACS) των λευκοκυττάρων περιφερικού αίματος

Τα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος απομονώθηκαν από την πελέτα κυττάρων που προέκυψε από 500μl ολικού αίματος μετά από φυγοκέντρηση. Η πελέτα κυττάρων διαλύθηκε σε 600 μl διαλύματος λύσης ερυθροκυττάρων βασισμένο σε NH₄Cl και ρυθμισμένο με Tris, και 150μl μεταφέρθηκαν σε μικροπιάτα 96 πηγαδιών. Μετά τα επακόλουθα βήματα πλυσίματος με διάλυμα χρώσης για το FACS (PBS, 0.5%BSA, 0.02%sodium azide, pH 7.45), τα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος επώαστηκαν για 20 λεπτά με αντίσωμα Fc block (clone 2.4G2, PharMingen, San Diego, USA). Έπειτα τα κύτταρα βάφτηκαν με μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές (PharMingen). Μετά την επώαση με τα αντισώματα προστέθηκε ιωδιούχο προπίδιο για την αναγνώριση των νεκρών κυττάρων ή των κυττάρων που πεθαίνουν(Schraenen et al., 2010), και τα οποία θα μπορούσαν να προσδέσουν αντισώματα μη ειδικά ή/και να απελευθερώσουν ειδικά αντιγόνα κατά την απόπτωση(Goyvaerts et al., 2016). Τα δείγματα ελήφθησαν από τα 96αρια πιάτα και μετρήθηκαν σε έναν από τους κυτταρομετρητές ροής 3 λέιζερ-10 χρωμάτων (LSRII, Becton Dickinson, USA; Gallios, Beckman Coulter, USA). Επιτεύχθηκε ένας συνολικός αριθμός 10.000- 30.000 ζωντανών CD45+ κυττάρων ανά δείγμα. Αρχικά για την ανάλυση τα ανέπαφα κύτταρα αναγνωρίστηκαν με βάση το προφίλ πρόσθιας/πλάγιας σκέδασής τους (FSC/SSC). Αυτά τα κύτταρα εξετάστηκαν με βάση το φθορισμό που εξέπεμπαν λόγω του ιωδιούχου προπιδίου/χρώση PE (αντισταθμιστικές παράμετροι), αποκλείοντας έτσι τα νεκρά κύτταρα. Έπειτα τα ζωντανά κύτταρα εξετάστηκαν με βάση το σήμα τους για την πλάγια σκέδαση/CD45, και αποκλείστηκαν έτσι τα ερυθροκύτταρα, τα θρομβοκύτταρα και τα κυτταρικά υπολείμματα(Weaver et al., 2002). Στη συνέχεια τα CD45+ κύτταρα αναλύθηκαν με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού (Flowjo, TreeStar Inc, USA; SPICE)(Roederer et al., 2011). Σε προηγούμενα πειράματα, δείγματα από άγριου τύπου ποντικούς-μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ως FMO (Φθορισμός μείον ένα) μάρτυρες για τον καθορισμό των 'θετικών' και 'αρνητικών' περιοχών(Baumgarth and Roederer, 2000).

2.4.5.8. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση

Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ιστό μονιμοποιημένο σε παραφίνη με τη χρήση της μεθόδου στρεπταβιδίνης-βιοτίνης και την αξιοποίηση ενός

αυτόματου μηχανήματος πραγματοποίησης ανοσοϊστοχημικών χρώσεων (DiscoveryXT; Roche, Penzberg, Germany). Μετά την ανάκτηση -μέσω θέρμανσης- του αντιγόνου με τη χρήση εθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος (EDTA) με pH=8, χρησιμοποιήσαμε το πρωτογενές αντίσωμα έναντι της σεροτονίνης (5-HT) ABIN617893 σε αραίωση 1:100 το οποίο προμηθευτήκαμε από το <https://www.antibodies-online.com/antibody/617893/anti-5-Hydroxytryptamine>. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 2 φορές με τον κατάλληλο θετικό (νευροενδοκρινικά κύτταρα από το έντερο ποντικών) και αρνητικό (χωρίς το πρωτογενές αντίσωμα) μάρτυρα για να επιβεβαιωθεί η ειδικότητα της χρώσης. Το δευτερογενές αντίσωμα καθώς και το μπλοκάρισμα έναντι μη ειδικής πρόσδεσης των αντισωμάτων πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του αντισώματος. Η 3-3'-διαμινο-βενζιδίνη (DAB) και η αιματοξυλίνη ως μέσο αντίθεσης χρησιμοποιήθηκαν για την οπτικοποίηση της αντίδρασης πεπτίδιο-ορμόνη-αντίσωμα. Η κυταροπλασματική χρώση θεωρήθηκε ως θετική αντίδραση. Η δημιουργία εικόνων για δημοσίευση πραγματοποιήθηκε με το σύστημα σκαναρίσματος αντικειμενοφόρων πλακών NanoZoomer 2.0 HT (Hamamatsu Photonics K.K.; Hamamatsu City, Japan).

2.4.5.9. Απορροφησιμετρία ακτίνων X διπλής ενέργειας (DEXA)

Μετά την επίτευξη αναισθησίας, καταγράφηκε το βάρος και το μήκος του κάθε ποντικού και ο ποντικός τοποθετήθηκε μέσα στον αναλυτή (pDEXA Sabre X-ray Bone Densitometer, Norland Medical Systems Inc., Basingstoke, Hampshire, UK). Πραγματοποιήθηκε ανάλυση όλου του σώματος εκτός του κρανίου (ταχύτητα σκαναρίσματος 20 mm/s, ανάλυση 0.5 mm x 1.0 mm, HAW 0.020).

2.4.6. Ιστοπαθολογική ανάλυση

Οι ιστοί απομονώθηκαν από τους ποντικούς, πλύθηκαν με PBS και μονιμοποιήθηκαν σε φορμαλίνη στους 4°C όλη τη νύχτα. Έπειτα τοποθετήθηκαν μέσα σε παραφίνη, κόπηκαν με μικροτόμο και βάφτηκαν είτε με Αιματοξυλίνη/Ηωσίνη (H/E) είτε με χρώση Periodic acid-Schiff (PAS). Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με το μικροσκόπιο Nikon Eclipse E800 εξοπλισμένο με κάμερα Q Imaging ExiAqua και με τη βοήθεια του προγράμματος Bioquant Q-capture Pro7. Το μέγεθος των λιποκυττάρων υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Adiposoft.

2.4.7. Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης

Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σε ήπαρ προερχόμενο από ν=4 TgC6hp55 και ν=4 άγριου τύπου αρσενικούς ποντικούς στην ηλικία των 21 εβδομάδων

πραγματοποιήθηκε μετά από ολική απομόνωση RNA (RNAeasy Midi kit, Qiagen). Εν συνεχεία χρησιμοποιήθηκαν ειδικά τσιπ Illumina Mouse Ref-8 v2.0 Expression BeadChips όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως (Kugler et al., 2013). Το πρόγραμμα Illumina GenomeStudio 2011.1 χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των δεδομένων (καμπύλες παρεμβολής) και η στατιστική ανάλυση για τον εντοπισμό της τροποποιημένης γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε με την τεχνική SAM (Significance Analysis of Microarrays, fold change > 1.7, FDR < 1%) (Tusher et al., 2001). Για τον προσδιορισμό των λειτουργιών στις οποίες εμπλέκονται τα γονίδια των οποίων η έκφραση βρέθηκε αλλαγμένη χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen Redwood City). Τα δεδομένα που συζητούνται σε αυτή τη δημοσίευση έχουν αποθηκευτεί και στη βάση δεδομένων Gene Expression Omnibus (Barrett et al., 2013) του NCBI και είναι διαθέσιμα μέσω του σειριακού αριθμού πρόσβασης GEO: GSE95345.

2.4.8. Αναγνώριση του σημείου ενσωμάτωσης του διαγονιδίου

Η αναγνώριση του σημείου ενσωμάτωσης του διαγονιδίου πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Cergentis (Utrecht, Netherlands) με τη χρήση της τεχνικής TLA (Targeted Locus Amplification) (de Vree et al., 2014).

2.4.9. Ανίχνευση της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης και του IGF-1 του ποντικού

Η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη ανιχνεύτηκε και ποσοτικοποιήθηκε στον ορό των TgC6hp55 ποντικών με τη χρήση του Growth Hormone (GH) Human SimpleStep ELISA Kit από την Abcam (ab190811). Ο ορός των ποντικών μαρτύρων δεν έδωσε κάποιο σήμα. Ο IGF-1 του ποντικού ανιχνεύθηκε και ποσοτικοποιήθηκε στον ορό των ποντικών-μαρτύρων και των TgC6hp55 ποντικών με τη χρήση της IGF-1 (mouse/rat) ELISA από την ALPCO (Cat. No. 22-IG1MS-E01).

2.4.10. Θεραπεία με πεγβισομάντη

Η πεγβισομάντη ήταν μια ευγενική χορηγία της Pfizer (New York, USA).

Ξεκινώντας από την ηλικία των 20 εβδομάδων, οι ποντικοί αρχικά ζυγίζονταν και εν συνεχεία ακολουθούσε η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση είτε 250mg/κιλό βάρους σώματος πεγβισομάντης (πειραματικές ομάδες) είτε ίδιου όγκου αλατούχου διαλύματος (ομάδες μάρτυρες) κάθε Δευτέρα-Τετάρτη-Παρασκευή πρωί σύμφωνα με τους Liao et al. (Liao et al., 2006) για 4 εβδομάδες. Με το τέλος αυτής της περιόδου οι ποντικοί υποβλήθηκαν σε ευθανασία, τα όργανά τους ζυγίστηκαν, ενώ το ήπαρ και

ο λευκός λιπώδης ιστός τους συλλέχθηκαν για ιστοπαθολογική εξέταση. Επιπρόσθετα, συλλέχθηκε ορός αίματος με σκοπό να μετρήσουμε τα επίπεδα του IGF-1 των ποντικών ως δείκτη της αποτελεσματικότητας της θεραπείας.

2.4.11. Στατιστική ανάλυση

Σε κάθε σύγκριση που πραγματοποιήσαμε, αρχικά εξετάσαμε εάν τα δεδομένα σε κάθε ομάδα ακολουθούν κανονική (Γκαουσιανή) κατανομή χρησιμοποιώντας το D'Agostino-Pearson Omnibus τεστ κανονικότητας, το Shapiro-Wilk τεστ και το Kolmogorov-Smirnov τεστ με την Dallal-Wilkison-Lilliefors P value. Εάν τα δεδομένα όντως ακολουθούσαν κανονική κατανομή, τότε τα συγκρίναμε χρησιμοποιώντας το απλό t-test (unpaired t-test) ή το απλό t-test με τη διόρθωση κατά Welch εάν οι διακυμάνσεις των τιμών των υπό σύγκριση ομάδων διέφεραν σημαντικά σύμφωνα με το F-test. Από την άλλη μεριά, εάν τα δεδομένα δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή, τα συγκρίναμε χρησιμοποιώντας το Mann-Whitney τεστ. Τέλος, για πολλαπλές στατιστικές συγκρίσεις σε ένα συγκεκριμένο σετ δεδομένων χρησιμοποιήσαμε το ANOVA τεστ. Η στατιστική σημαντικότητα απεικονίζεται στις γραφικές παραστάσεις ως $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$.

Βιβλιογραφία

Armaka, M., Apostolaki, M., Jacques, P., Kontoyiannis, D.L., Elewaut, D., and Kollias, G. (2008). Mesenchymal cell targeting by TNF as a common pathogenic principle in chronic inflammatory joint and intestinal diseases. *The Journal of experimental medicine* 205, 331-337.

Baan, M., Kibbe, C.R., Bushkofsky, J.R., Harris, T.W., Sherman, D.S., and Davis, D.B. (2015). Transgenic expression of the human growth hormone minigene promotes pancreatic beta-cell proliferation. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 309, R788-794.

Baker, A.R., Hollingshead, P.G., Pitts-Meek, S., Hansen, S., Taylor, R., and Stewart, T.A. (1992). Osteoblast-specific expression of growth hormone stimulates bone growth in transgenic mice. *Molecular and cellular biology* 12, 5541-5547.

Barrett, T., Wilhite, S.E., Ledoux, P., Evangelista, C., Kim, I.F., Tomashevsky, M., Marshall, K.A., Phillippy, K.H., Sherman, P.M., Holko, M., *et al.* (2013). NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Res* 41, D991-995.

Baumgarth, N., and Roederer, M. (2000). A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *Journal of immunological methods* 243, 77-97.

Berryman, D.E., List, E.O., Coschigano, K.T., Behar, K., Kim, J.K., and Kopchick, J.J. (2004). Comparing adiposity profiles in three mouse models with altered GH signaling. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 14, 309-318.

Bohlooly, Y.M., Olsson, B., Bruder, C.E., Linden, D., Sjogren, K., Bjursell, M., Egecioglu, E., Svensson, L., Brodin, P., Waterton, J.C., *et al.* (2005). Growth hormone overexpression in the central nervous system results in hyperphagia-induced obesity associated with insulin resistance and dyslipidemia. *Diabetes* 54, 51-62.

- Boren, J., Taskinen, M.R., Olofsson, S.O., and Levin, M. (2013). Ectopic lipid storage and insulin resistance: a harmful relationship. *Journal of internal medicine* 274, 25-40.
- Bossen, C., Ingold, K., Tardivel, A., Bodmer, J.L., Gaide, O., Hertig, S., Ambrose, C., Tschopp, J., and Schneider, P. (2006). Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. *The Journal of biological chemistry* 281, 13964-13971.
- Braghetta, P., Fabbro, C., Piccolo, S., Marvulli, D., Bonaldo, P., Volpin, D., and Bressan, G.M. (1996). Distinct regions control transcriptional activation of the alpha1(VI) collagen promoter in different tissues of transgenic mice. *The Journal of cell biology* 135, 1163-1177.
- Brinster, R.L., Allen, J.M., Behringer, R.R., Gelinas, R.E., and Palmiter, R.D. (1988). Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 836-840.
- Brouwers, B., and Creemers, J.W. (2015). Human Growth Hormone in Transgenesis: A Growing Problem? *Diabetes* 64, 3648-3650.
- Brouwers, B., de Faudeur, G., Osipovich, A.B., Goyvaerts, L., Lemaire, K., Boesmans, L., Cauwelier, E.J., Granvik, M., Pruniau, V.P., Van Lommel, L., *et al.* (2014). Impaired islet function in commonly used transgenic mouse lines due to human growth hormone minigene expression. *Cell metabolism* 20, 979-990.
- Buckley, A.R., Putnam, C.W., and Russell, D.H. (1985). Prolactin is a tumor promoter in rat liver. *Life sciences* 37, 2569-2575.
- Campagnoli, C., Roberts, I.A., Kumar, S., Bennett, P.R., Bellantuono, I., and Fisk, N.M. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98, 2396-2402.
- Chaffin, K.E., Beals, C.R., Wilkie, T.M., Forbush, K.A., Simon, M.I., and Perlmutter, R.M. (1990). Dissection of thymocyte signaling pathways by in vivo expression of pertussis toxin ADP-ribosyltransferase. *The EMBO journal* 9, 3821-3829.
- Charbord, P., Tavian, M., Humeau, L., and Peault, B. (1996). Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment. *Blood* 87, 4109-4119.
- Chen, H.W., Hamer, D.H., Heiniger, H.J., and Meier, H. (1972a). Stimulation of hepatic RNA synthesis in dwarf mice by ovine prolactin. *Biochimica et biophysica acta* 287, 90-97.
- Chen, H.W., Meier, H., Heiniger, H.J., and Huebner, R.J. (1972b). Tumorigenesis in strain DW-J mice and induction by prolactin of the group-specific antigen of endogenous C-type RNA tumor virus. *Journal of the National Cancer Institute* 49, 1145-1154.
- Daughaday, W.H., Hall, K., Raben, M.S., Salmon, W.D., Jr., van den Brande, J.L., and van Wyk, J.J. (1972). Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* 235, 107.
- Dazzi, F., Ramasamy, R., Glennie, S., Jones, S.P., and Roberts, I. (2006). The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood reviews* 20, 161-171.
- de Vree, P.J., de Wit, E., Yilmaz, M., van de Heijning, M., Klous, P., Verstegen, M.J., Wan, Y., Teunissen, H., Krijger, P.H., Geeven, G., *et al.* (2014). Targeted sequencing by proximity ligation for comprehensive variant detection and local haplotyping. *Nature biotechnology* 32, 1019-1025.
- Declercq, J., Brouwers, B., Pruniau, V.P., Stijnen, P., de Faudeur, G., Tuand, K., Meulemans, S., Serneels, L., Schraenen, A., Schuit, F., *et al.* (2015). Metabolic and Behavioural Phenotypes in Nestin-Cre Mice Are Caused by Hypothalamic Expression of Human Growth Hormone. *PloS one* 10, e0135502.
- Ermolaeva, M.A., Michallet, M.C., Papadopoulou, N., Utermohlen, O., Kranidioti, K., Kollias, G., Tschopp, J., and Pasparakis, M. (2008). Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. *Nature immunology* 9, 1037-1046.
- Fleenor, D., Arumugam, R., and Freemark, M. (2006). Growth hormone and prolactin receptors in adipogenesis: STAT-5 activation, suppressors of cytokine signaling, and regulation of insulin-like growth factor I. *Hormone research* 66, 101-110.

Goffin, V., Shiverick, K.T., Kelly, P.A., and Martial, J.A. (1996). Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals. *Endocrine reviews* 17, 385-410.

Goyvaerts, L., Schraenen, A., and Schuit, F. (2016). Serotonin competence of mouse beta cells during pregnancy. *Diabetologia* 59, 1356-1363.

Hara, M., Wang, X., Kawamura, T., Bindokas, V.P., Dizon, R.F., Alcoser, S.Y., Magnuson, M.A., and Bell, G.I. (2003). Transgenic mice with green fluorescent protein-labeled pancreatic beta -cells. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 284, E177-183.

Herrera, P.L. (2000). Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development* 127, 2317-2322.

Jones, B.K., Monks, B.R., Liebhaber, S.A., and Cooke, N.E. (1995). The human growth hormone gene is regulated by a multicomponent locus control region. *Molecular and cellular biology* 15, 7010-7021.

Kahn, D., Gavaler, J.S., Makowka, L., Chapchap, P., Mazzaferro, V., Casavilla, A., Smith, M.S., Eagon, P.K., Starzl, T.E., and Van Thiel, D.H. (1988). Does hyperprolactinemia affect hepatic regeneration independent of sex steroids? *The Journal of laboratory and clinical medicine* 112, 644-651.

Kawai, M., Namba, N., Mushiake, S., Etani, Y., Nishimura, R., Makishima, M., and Ozono, K. (2007). Growth hormone stimulates adipogenesis of 3T3-L1 cells through activation of the Stat5A/5B-PPARgamma pathway. *Journal of molecular endocrinology* 38, 19-34.

Kellendonk, C., Opherk, C., Anlag, K., Schutz, G., and Tronche, F. (2000). Hepatocyte-specific expression of Cre recombinase. *Genesis* 26, 151-153.

Klee, P., Lamprianou, S., Charollais, A., Caille, D., Sarro, R., Cederroth, M., Haefliger, J.A., and Meda, P. (2011). Connexin implication in the control of the murine beta-cell mass. *Pediatric research* 70, 142-147.

Kugler, J.E., Horsch, M., Huang, D., Furusawa, T., Rochman, M., Garrett, L., Becker, L., Bohla, A., Holter, S.M., Prehn, C., *et al.* (2013). High mobility group N proteins modulate the fidelity of the cellular transcriptional profile in a tissue- and variant-specific manner. *J Biol Chem* 288, 16690-16703.

Liao, L., Dearth, R.K., Zhou, S., Britton, O.L., Lee, A.V., and Xu, J. (2006). Liver-specific overexpression of the insulin-like growth factor-I enhances somatic growth and partially prevents the effects of growth hormone deficiency. *Endocrinology* 147, 3877-3888.

Ling, C., Hellgren, G., Gebre-Medhin, M., Dillner, K., Wennbo, H., Carlsson, B., and Billig, H. (2000). Prolactin (PRL) receptor gene expression in mouse adipose tissue: increases during lactation and in PRL-transgenic mice. *Endocrinology* 141, 3564-3572.

Martari, M., Sagazio, A., Mohamadi, A., Nguyen, Q., Hauschka, S.D., Kim, E., and Salvatori, R. (2009). Partial rescue of growth failure in growth hormone (GH)-deficient mice by a single injection of a double-stranded adeno-associated viral vector expressing the GH gene driven by a muscle-specific regulatory cassette. *Human gene therapy* 20, 759-766.

Miyazaki, S., Taniguchi, H., Moritoh, Y., Tashiro, F., Yamamoto, T., Yamato, E., Ikegami, H., Ozato, K., and Miyazaki, J. (2010). Nuclear hormone retinoid X receptor (RXR) negatively regulates the glucose-stimulated insulin secretion of pancreatic ss-cells. *Diabetes* 59, 2854-2861.

Nuytens, K., Tuand, K., Fu, Q., Stijnen, P., Pruniau, V., Meulemans, S., Vankelecom, H., and Creemers, J.W. (2014). The dwarf phenotype in GH240B mice, haploinsufficient for the autism candidate gene Neurobeachin, is caused by ectopic expression of recombinant human growth hormone. *PloS one* 9, e109598.

Orban, P.C., Chui, D., and Marth, J.D. (1992). Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 6861-6865.

Oropeza, D., Juvet, N., Budry, L., Campbell, J.E., Bouyakdan, K., Lacombe, J., Perron, G., Bergeron, V., Neuman, J.C., Brar, H.K., *et al.* (2015). Phenotypic Characterization of MIP-

CreERT1Lphi Mice With Transgene-Driven Islet Expression of Human Growth Hormone. *Diabetes* 64, 3798-3807.

Palmiter, R.D., Norstedt, G., Gelinas, R.E., Hammer, R.E., and Brinster, R.L. (1983). Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science* 222, 809-814.

Palmiter, R.D., Sandgren, E.P., Avarbock, M.R., Allen, D.D., and Brinster, R.L. (1991). Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 478-482.

Parsons, J.A., Bartke, A., and Sorenson, R.L. (1995). Number and size of islets of Langerhans in pregnant, human growth hormone-expressing transgenic, and pituitary dwarf mice: effect of lactogenic hormones. *Endocrinology* 136, 2013-2021.

Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Episkopou, V., and Kollias, G. (1996). Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *The Journal of experimental medicine* 184, 1397-1411.

Postic, C., Shiota, M., Niswender, K.D., Jetton, T.L., Chen, Y., Moates, J.M., Shelton, K.D., Lindner, J., Cherrington, A.D., and Magnuson, M.A. (1999). Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *The Journal of biological chemistry* 274, 305-315.

Pruniau, V.P., Louagie, E., Brouwers, B., Declercq, J., and Creemers, J.W. (2013). The AlfpCre mouse revisited: evidence for liver steatosis related to growth hormone deficiency. *Hepatology* 58, 2209-2210.

Roederer, M., Nozzi, J.L., and Nason, M.C. (2011). SPICE: exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 79, 167-174.

Sanvito, F., Nichols, A., Herrera, P.L., Huarte, J., Wohlwend, A., Vassalli, J.D., and Orci, L. (1995). TGF-beta 1 overexpression in murine pancreas induces chronic pancreatitis and, together with TNF-alpha, triggers insulin-dependent diabetes. *Biochemical and biophysical research communications* 217, 1279-1286.

Schraenen, A., Lemaire, K., de Faudeur, G., Hendrickx, N., Granvik, M., Van Lommel, L., Mallet, J., Vodjdani, G., Gilon, P., Binart, N., *et al.* (2010). Placental lactogens induce serotonin biosynthesis in a subset of mouse beta cells during pregnancy. *Diabetologia* 53, 2589-2599.

Shibli-Rahhal, A., and Schlechte, J. (2009). The effects of hyperprolactinemia on bone and fat. *Pituitary* 12, 96-104.

Stewart, T.A., Clift, S., Pitts-Meek, S., Martin, L., Terrell, T.G., Liggitt, D., and Oakley, H. (1992). An evaluation of the functions of the 22-kilodalton (kDa), the 20-kDa, and the N-terminal polypeptide forms of human growth hormone using transgenic mice. *Endocrinology* 130, 405-414.

Tusher, V.G., Tibshirani, R., and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5116-5121.

Ueki, I., Ooi, G.T., Tremblay, M.L., Hurst, K.R., Bach, L.A., and Boisclair, Y.R. (2000). Inactivation of the acid labile subunit gene in mice results in mild retardation of postnatal growth despite profound disruptions in the circulating insulin-like growth factor system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6868-6873.

Van Hauwermeiren, F., Armaka, M., Karagianni, N., Kranidioti, K., Vandenbroucke, R.E., Loges, S., Van Roy, M., Staelens, J., Puimege, L., Palagani, A., *et al.* (2013). Safe TNF-based antitumor therapy following p55TNFR reduction in intestinal epithelium. *The Journal of clinical investigation* 123, 2590-2603.

Vassar, R., and Fuchs, E. (1991). Transgenic mice provide new insights into the role of TGF-alpha during epidermal development and differentiation. *Genes & development* 5, 714-727.

Weaver, J.L., Broudy, D.D., McKinnon, K., and Germolec, D.R. (2002). Serial phenotypic analysis of mouse peripheral blood leukocytes. *Toxicology mechanisms and methods* 12, 95-118.

Wilcox, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *The Clinical biochemist Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists* 26, 19-39.

Wilson, C., Bellen, H.J., and Gehring, W.J. (1990). Position effects on eukaryotic gene expression. *Annual review of cell biology* 6, 679-714.

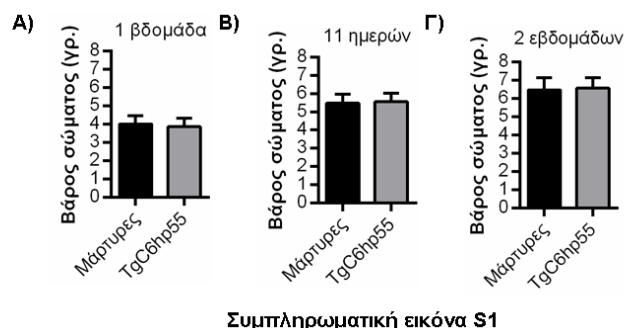
Woychik, R.P., and Alagramam, K. (1998). Insertional mutagenesis in transgenic mice generated by the pronuclear microinjection procedure. *The International journal of developmental biology* 42, 1009-1017.

Yakar, S., Liu, J.L., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Sauer, B., and LeRoith, D. (1999). Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 7324-7329.

Yakar, S., Rosen, C.J., Beamer, W.G., Ackert-Bicknell, C.L., Wu, Y., Liu, J.L., Ooi, G.T., Setser, J., Frystyk, J., Boisclair, Y.R., *et al.* (2002). Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *The Journal of clinical investigation* 110, 771-781.

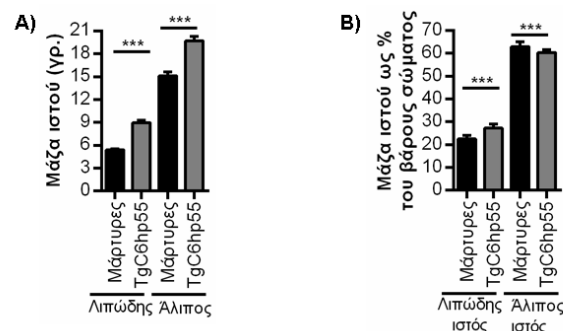
Zimmerman, L., Parr, B., Lendahl, U., Cunningham, M., McKay, R., Gavin, B., Mann, J., Vassileva, G., and McMahon, A. (1994). Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* 12, 11-24.

2.5. Συμπληρωματικές εικόνες

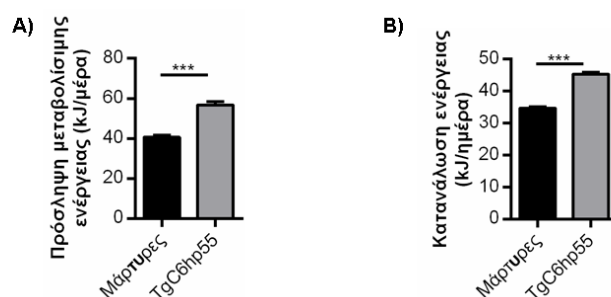


Συμπληρωματική εικόνα S1. Οι TgC6hp55 ποντικοί δεν παρουσιάζουν αυξημένο μέγεθος σώματος κατά τις 2 πρώτες εβδομάδες της ζωής τους.

(A) Σύγκριση του βάρους σώματος στην 1^η εβδομάδα ζωής (n=29 άγριου τύπου και n=22 TgC6hp55 ποντικοί). **(B)** Σύγκριση του βάρους σώματος στις 11 ημέρες ζωής (n=41 άγριου τύπου και n=33 TgC6hp55 ποντικοί). **(C)** Σύγκριση του βάρους σώματος στη 2^η εβδομάδα ζωής (n=41 άγριου τύπου και n=32 TgC6hp55 ποντικοί). Τα δεδομένα απεικονίζουν τη μέση τιμή (mean)±τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM).

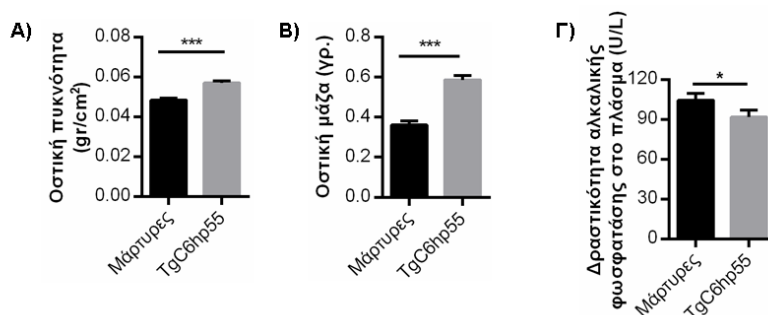


Συμπληρωματική εικόνα S2. (Α) Ανάλυση της σύστασης όλου του σώματος με τη χρήση Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Μέτρηση της άλιπης μάζας και της μάζας του λιπώδους ιστού ολόκληρου του σώματος των ποντικών από άγριου τύπου ($n=30$) και TgC6hrp55 ($n=29$) ποντικούς στην ηλικία των 13 εβδομάδων. **(Β)** Κανονικοποίηση των τιμών της ανάλυσης που παρουσιάζεται στην εικόνα 2Z σύμφωνα με το βάρος σώματος. Τα δεδομένα απεικονίζουν τη μέση τιμή (mean)±τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM).



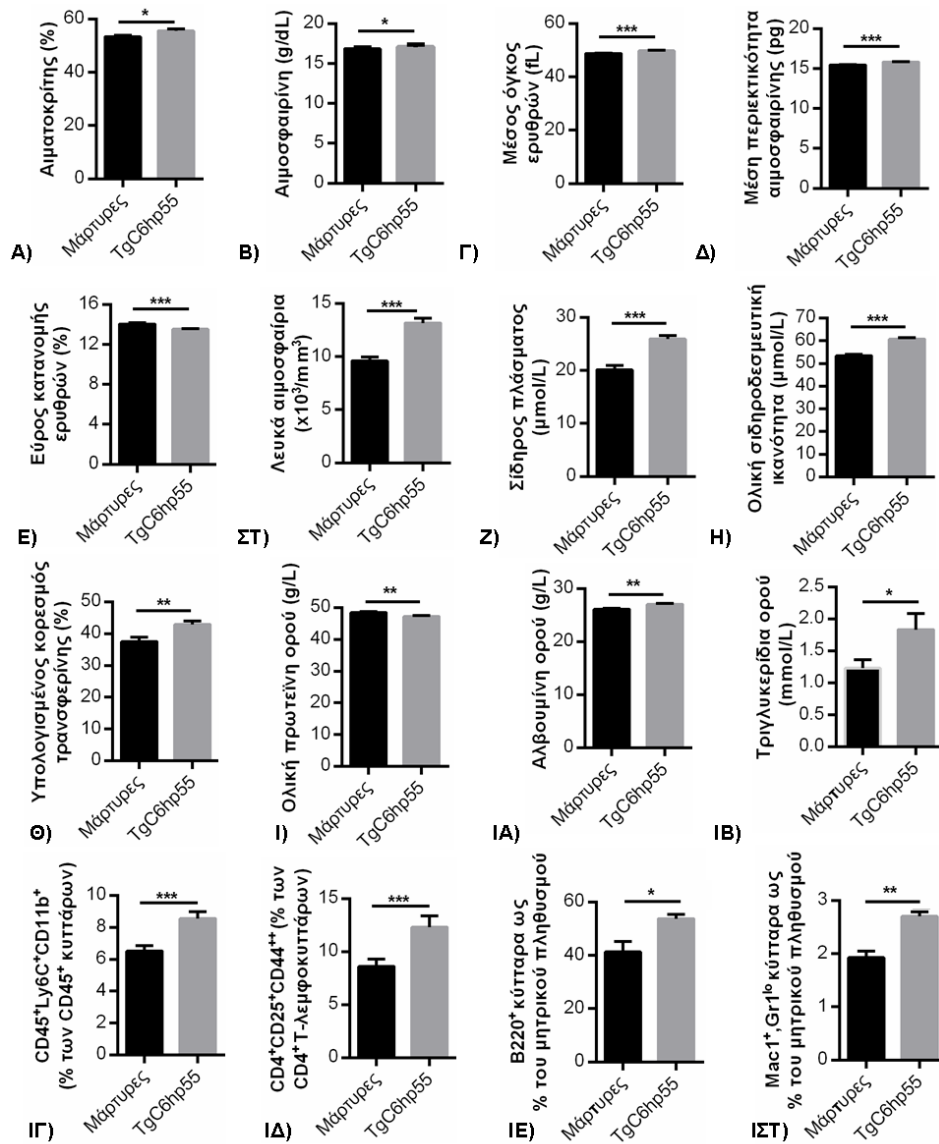
Συμπληρωματική εικόνα S3. Οι TgC6hrp55 ποντικοί παρουσιάζουν αυξημένη κατανάλωση ενέργειας καθώς και αυξημένο μεταβολισμό.

(Α) Ημερήσια πρόσληψη μεταβολίσιμης ενέργειας ($n=15$ άγριου τύπου και $n=11$ TgC6hrp55 ποντικοί). **(Β)** Ημερήσια κατανάλωση ενέργειας ($n=15$ άγριου τύπου και $n=11$ TgC6hrp55 ποντικοί).



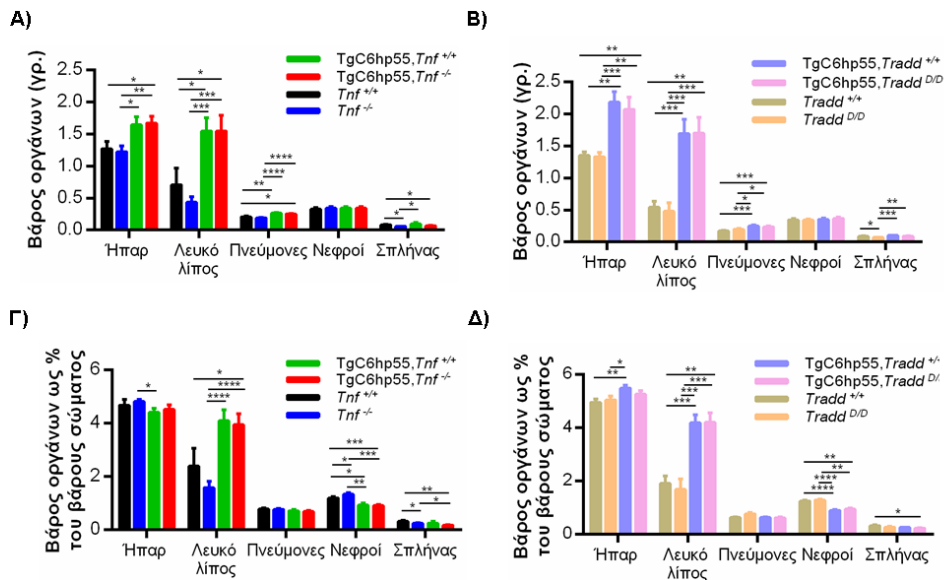
Συμπληρωματική εικόνα S4. Οι TgC6hrp55 ποντικοί παρουσιάζουν διαφορές στη φυσιολογία και το μεταβολισμό των οστών τους.

(Α) Σύγκριση της Οστικής Πυκνότητας μεταξύ άγριου τύπου ($n=20$) και TgC6hrp55 ($n=18$) ποντικών. **(Β)** Σύγκριση της συνολικής οστικής μάζας (πλην του κρανίου) σε $n=20$ άγριου τύπου και $n=18$ TgC6hrp55 ποντικούς. **(Γ)** Σύγκριση της Ενεργότητας της Αλκαλικής Φωσφατάσης ορού μεταξύ άγριου τύπου ($n=29$) και TgC6hrp55 ($n=30$) ποντικών. Τα δεδομένα απεικονίζουν τη μέση τιμή (mean)±τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM).



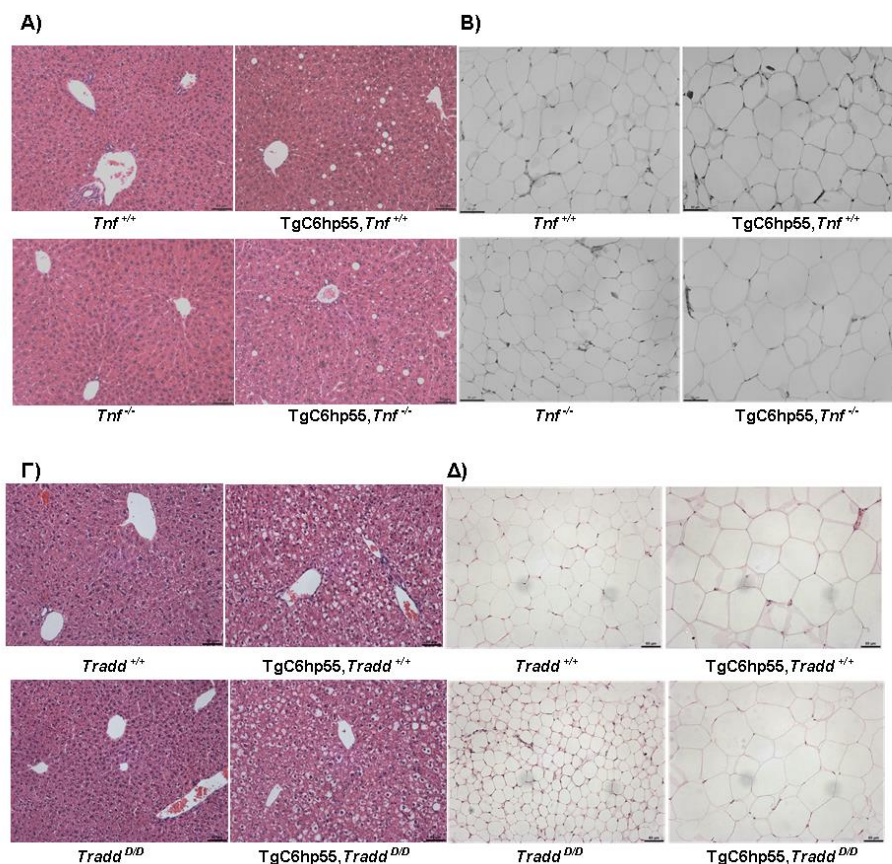
Συμπληρωματική εικόνα S5. Οι TgC6hrp55 ποντικοί παρουσιάζουν διαφορές σε μια πληθώρα παραμέτρων της φυσιολογίας τους.

(Α-ΣΤ) Αιματολογική ανάλυση του ορού των άγριου τύπου ($n=28$) και TgC6hrp55 ($n=28$) ποντικών: (Α) Αιματοκρίτης. (Β) Αιμοσφαιρίνη. (Γ) Μέσος Όγκος Ερυθροκυττάρων (MCV). (Δ) Μέση Ποσότητα Αιμοσφαιρίνης (MCH). (Ε) Εύρος κατανομής των Ερυθροκυττάρων (RDW). (ΣΤ) Λευκά Αιμοσφαίρια. (Ζ-ΙΒ) Βιοχημική ανάλυση του ορού $n=29$ άγριου τύπου και $n=30$ TgC6hrp55 ποντικών: (Ζ) Συγκέντρωση Σιδήρου στο πλάσμα. (Η) Συνολική Δεσμευτική Ικανότητα Σιδήρου (TIBC). (Θ) Υπολογισμένος Κορεσμός Τρανσφερίνης. (Ι) Ολική πρωτεΐνη ορού. (ΙΑ) Αλβουμίνη ορού. (ΙΒ) Τριγλυκερίδια ορού σε ποντικούς ελεύθερα σιτιζόμενους. (ΙΓ-ΙΔ) Ανοσολογική ανάλυση του περιφερικού αίματος των άγριου τύπου και TgC6hrp55 ποντικών: (ΙΓ) LyC6^+ μονοκύτταρα από άγριου τύπου ($n=22$) και TgC6hrp55 ($n=23$) ποντικούς. (ΙΔ) $\text{CD4}^+\text{CD45}^+\text{CD44}^{**}$ T λεμφοκύτταρα από άγριου τύπου ($n=29$) και TgC6hrp55 ($n=30$) ποντικούς. (ΙΕ-ΙΣΤ) Ανοσολογική ανάλυση του σπλήνα των άγριου τύπου ($n=4$) και TgC6hrp55 ($n=4$) ποντικών: (ΙΕ) B220^+ κύτταρα. (ΙΣΤ) $\text{Mac1}^+\text{Gr1}^{\text{lo}}$ κύτταρα. Τα δεδομένα απεικονίζουν τη μέση τιμή (mean)±τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM).



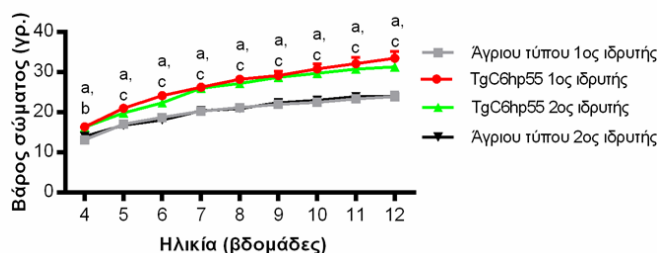
Συμπληρωματική εικόνα S6. Οι $TgC6hp55Tnf^{-/-}$ και $TgC6hp55Tradd^{D/D}$ ποντικοί παρουσιάζουν αυξημένο βάρος οργάνων παρόμοιο με αυτό των $TgC6hp55$ ποντικών.

(A) Σύγκριση του βάρους του ήπατος, του ενδοκοιλιακού λευκού λιπώδους ιστού (Λευκό λίπος), των πνευμόνων (και των δύο), των νεφρών (και των δύο) και του σπλήνα μεταξύ των $Tnf^{+/+}$ (v=6), $Tnf^{-/-}$ (v=11), $TgC6hp55Tnf^{+/+}$ (v=6) και $TgC6hp55Tnf^{-/-}$ (v=9) ποντικών. (B) Σύγκριση του βάρους των ίδιων οργάνων με το A) μεταξύ των $Tradd^{+/+}$ (v=8), $Tradd^{D/D}$ (v=7), $TgC6hp55Tradd^{+/+}$ (v=7) και $TgC6hp55Tradd^{D/D}$ (v=7) ποντικών. (Γ) Σύγκριση του κανονικοποιημένου βάρους των οργάνων της εικόνας (S6A) εκφρασμένου ως % του βάρους σώματος των ποντικών. (Δ) Σύγκριση του κανονικοποιημένου βάρους των οργάνων της εικόνας (S6B) εκφρασμένου ως % του βάρους σώματος των ποντικών.



Συμπληρωματική εικόνα S7. Οι TgC6hrp55Tnf^{-/-} και TgC6hrp55Tradd^{D/D} ποντικοί παρουσιάζουν ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στο ήπαρ και το λευκό λιπώδη ιστό τους παρόμοιες με αυτές των TgC6hrp55 ποντικών.

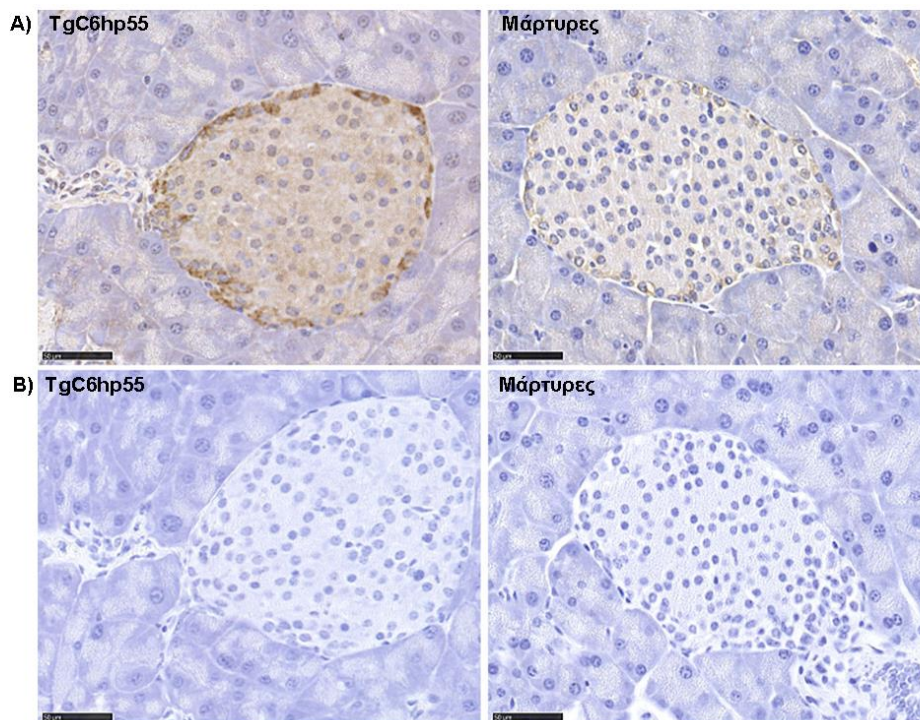
(A) Ιστοπαθολογική αξιολόγηση της συσσώρευσης λιπιδίων στο ήπαρ των Tnf^{+/+}, Tnf^{-/-}, TgC6hrp55Tnf^{+/+} και TgC6hrp55Tnf^{-/-} ποντικών (χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης). (B) Ιστοπαθολογική σύγκριση του μεγέθους των λιποκυττάρων που προέρχονται από το λευκό λιπώδη ιστό των Tnf^{+/+}, Tnf^{-/-}, TgC6hrp55Tnf^{+/+} και TgC6hrp55Tnf^{-/-} ποντικών (χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης). (Γ) Ιστοπαθολογική αξιολόγηση της συσσώρευσης λιπιδίων στο ήπαρ των Tradd^{+/+}, Tradd^{D/D}, TgC6hrp55Tradd^{+/+} και TgC6hrp55Tradd^{D/D} ποντικών (χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης). (Δ) Ιστοπαθολογική σύγκριση του μεγέθους των λιποκυττάρων που προέρχονται από το λευκό λιπώδη ιστό των Tradd^{+/+}, Tradd^{D/D}, TgC6hrp55Tradd^{+/+} και TgC6hrp55Tradd^{D/D} ποντικών (χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης). Tnf^{+/+} (v=6), Tnf^{-/-} (v=11), TgC6hrp55Tnf^{+/+} (v=6) και TgC6hrp55Tnf^{-/-} (v=9), Tradd^{+/+} (v=8), Tradd^{D/D} (v=7), TgC6hrp55Tradd^{+/+} (v=7) και TgC6hrp55Tradd^{D/D} (v=7) ποντικοί. Όλες οι φωτογραφίες είναι σε μεγέθυνση 200x / κλίμακα=60μm.



Συμπληρωματική εικόνα S8. Οι TgC6hrp55 ποντικοί που προέρχονται από το 2^ο ιδρυτή συνεχίζουν να παρουσιάζουν ενισχυμένη σωματική αύξηση ταυτόσημη με αυτή των ποντικών που προέρχονται από τον 1^ο ιδρυτή.

Καμπύλη βάρους σώματος από άγριου τύπου ποντικούς (v=10) και διαγονιδιακούς ποντικούς (v=10) που προέρχονται από τον 1^ο ποντικό-ιδρυτή καθώς και από άγριου τύπου ποντικούς (v=11) και διαγονιδιακούς ποντικούς (v=15) που προέρχονται από τον 2^ο ποντικό-ιδρυτή. Σε όλα τα χρονικά σημεία, οι άγριου τύπου ποντικοί που προέρχονται και από τους δύο ιδρυτές δεν εμφανίζουν κάποια διαφορά στο βάρος τους. Ταυτόχρονα, οι διαγονιδιακοί ποντικοί που προέρχονται και από τους δύο ιδρυτές επίσης δεν παρουσίασαν κάποια διαφορά στο βάρος τους.

Το **a** αντιπροσωπεύει στατιστικά σημαντική διαφορά *** ($p < 0.001$) μεταξύ του βάρους σώματος των TgC6hrp55 ποντικών και των άγριου τύπου ποντικών που προέρχονται από τον 1^ο ιδρυτή. Το **b** αντιπροσωπεύει στατιστικά σημαντική διαφορά ** ($p < 0.01$) μεταξύ του βάρους σώματος των διαγονιδιακών ποντικών και των άγριου τύπου ποντικών που προέρχονται από το 2^ο ιδρυτή. Το **c** αντιπροσωπεύει στατιστικά σημαντική διαφορά *** ($p < 0.001$) μεταξύ του βάρους σώματος των διαγονιδιακών ποντικών και των άγριου τύπου ποντικών που προέρχονται από το 2^ο ιδρυτή. Τα δεδομένα απεικονίζουν τη μέση τιμή (mean) ± τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM).



Συμπληρωματική εικόνα S9. Οι TgC6hp55 ποντικοί παρουσιάζουν αυξημένη παραγωγή σεροτονίνης στα παγκρεατικά στους νησίδια.

A) Αντιπροσωπευτική ανοσοϊστοχημική χρώση για σεροτονίνη (καφέ) στο νευροενδοκρινές πάγκρεας (νησίδια) ενός TgC6hp55 και ενός άγριου τύπου ποντικού. **B)** Η αρνητική χρώση-μάρτυρας στους ίδιους ποντικούς (χωρίς το 1ογενές αντίσωμα). $n=3$ αρσενικοί και 3 θηλυκοί άγριου τύπου ποντικοί και $n=3$ αρσενικοί και 3 θηλυκοί TgC6hp55 ποντικοί. Όλες οι εικόνες είναι σε μεγέθυνση 400x / κλίμακα = 50µm.

3. Συμπληρωματικά αποτελέσματα: Μελέτη του ρόλου της μεσεγχυματικής κυκλοοξυγενάσης-2 στον καρκίνο του εντέρου

3.1. Εισαγωγή

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί την 3^η κατά σειρά συχνότητας και την 4^η κατά σειρά θνησιμότητας μορφή καρκίνου παγκοσμίως (WHO, 2017). Στη βιβλιογραφία περιγράφονται 3 βασικές μορφές καρκίνου του παχέος εντέρου: α) σποραδική (περίπου 75% των περιπτώσεων), β) κληρονομική [κυρίως η Οικογενής Αδενωματώδης Πολυποδίαση (Familial Adenomatous Polyposis – FAP) και ο Κληρονομικός Μη-Πολυποειδής Καρκίνος του Παχέος Εντέρου (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer – HNPCC ή σύνδρομο Lynch)] και γ) σχετιζόμενη με την κολίτιδα (Colitis-associated Cancer) (Gala and Chung, 2011; Jasperson et al., 2010). Οι βασικοί μηχανισμοί και τα στάδια εξέλιξης των παραπάνω μορφών καρκίνου του παχέος εντέρου είναι κοινά, ωστόσο οι διαφορές που παρουσιάζουν σε επιμέρους μηχανισμούς έχουν ως αποτέλεσμα οι μεν κληρονομικές μορφές να παρουσιάζονται σε αρκετά μικρότερη ηλικία, οι δε σχετιζόμενες με την κολίτιδα μορφές να παρουσιάζουν ταχύτερη εξέλιξη, βαρύτερη κλινική εικόνα και χειρότερη πρόγνωση (Gruber et al., 2002; Ligtenberg et al., 2009; Vogelstein and Kinzler, 2004).

Η κυκλοοξυγενάση (Cox) αποτελεί ένα ένζυμο-κλειδί στο μεταβολικό μονοπάτι του αραχιδονικού οξέος και απαντάται σε δύο ισομορφές, την κυκλοοξυγενάση 1 (Cox-1) και την κυκλοοξυγενάση 2 (Cox-2 ή PTGS2). Και οι δύο ισομορφές παίζουν σημαντικότατο ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του εντέρου τόσο στην υγεία όσο και στη νόσο (πχ στη φλεγμονή ή τον καρκίνο) μέσω του μεταβολισμού και της μετατροπής του αραχιδονικού οξέος στα διάφορα προστανοειδή (προσταγλανδίνες και θρομβοξανίνα) (Araujo et al., 2005; FitzGerald and Patrono, 2001; Wang and Dubois, 2010, 2013). Κύριο προϊόν της δράσης της Cox-2 αποτελεί η προσταγλανδίνη E2 (PGE2) η οποία με τη σειρά της δρα μέσω τεσσάρων υποδοχέων (EP1, EP2, EP3 και EP4) και ρυθμίζει ποικίλες λειτουργίες σε επίπεδο κυττάρου αλλά και ιστού όπως ο πολλαπλασιασμός, η επιβίωση, η απόπτωση, η φλεγμονή, η αγγειογένεση και η καρκινογένεση (Greenhough et al., 2009; Wang and Dubois, 2010).

Η μη-εκλεκτική αναστολή του μονοπατιού της κυκλοοξυγενάσης με τη χρήση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦ) καθώς και η εκλεκτική αναστολή της Cox-2 με τη χρήση των κοξιμπών έχειδειχτεί σε κλινικές μελέτες να έχει θετικά αποτελέσματα τόσο στην πρόληψη όσο και στη θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου. Ωστόσο, οι σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με τη χρήση τέτοιων φαρμάκων (ειδικά από το γαστρεντερικό και το καρδιαγγειακό σύστημα) έχει αποτρέψει την καθιέρωσή τους ως μια «ασφαλή» επιλογή για τη θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου (Cuzick et al., 2009; Psaty and Potter, 2006; Wang and DuBois, 2013).

Οι εντερικοί μυοϊνοβλάστες συναντώνται κάτω από τις εντερικές κρύπτες και ο κύριος ρόλος τους είναι να υποστηρίζουν το σχηματισμό και τη λειτουργία των εντερικών βλαστοκυττάρων από τα οποία προέρχονται και τα υπόλοιπα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου (Powell et al., 2011; Shaker and Rubin, 2010). Πρόσφατα αποδείξαμε ότι η εξειδικευμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού των Cox-2 – PGE2 στους εντερικούς μυοϊνοβλάστες παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του εντέρου μετά από τραυματισμό του εντερικού επιθηλίου προάγοντας τον αντιρροπιστικό πολλαπλασιασμό του επιθηλίου στον πυθμένα της εντερικής κρύπτης (Roulis M et al., 2014). Επιπρόσθετα, η PGE2 έχειδειχτεί ότι αλληλεπιδρά με το σηματοδοτικό μονοπάτι της Wnt προάγοντας τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών βλαστοκυττάρων στις εντερικές κρύπτες (Goessling et al., 2009; Wang et al., 2004).

Η ολική γενετική απαλοιφή της Cox-2 στους *Apc^{min/+}* ποντικούς οι οποίοι αποτελούν ένα από τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα πειραματικά πρότυπα για τη μελέτη του καρκίνου του παχέος εντέρου (Moser et al., 1990), οδήγησε σε σημαντική μείωση του αριθμού των εντερικών πολυπόδων που σχηματίστηκαν (Chulada et al., 2000). Αντίθετα, σε ένα αντίστοιχο πειραματικό πρότυπο (στους *APC^{A716}* ποντικούς), η εκλεκτική απαλοιφή της Cox-2 από τα μακροφάγα/κοκκιοκύτταρα δεν επηρέασε τον αριθμό των σχηματιζόμενων εντερικών πολυπόδων, ενώ η εκλεκτική απαλοιφή της από τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα οδήγησε σε μέτρια μείωση του αριθμού αυτού μόνο στους θηλυκούς ποντικούς (Cherukuri et al., 2014; Ishikawa and Herschman, 2006). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι με τη χρήση ενδομικροσκοπικής απεικόνισης στο λεπτό έντερο των *Apc^{min/+}* ποντικών, η κύρια πηγή της Cox-2 βρέθηκε να είναι τα μεσεγχυματικά κύτταρα του στρώματος (Foersch et al., 2013). Επιπλέον, σε ένα άλλο πειραματικό πρότυπο σποραδικής καρκινογένεσης του εντέρου στους ποντικούς στο

οποίο χρησιμοποιούνται επαναλαμβανόμενες ενέσεις της μεταλλαξιγόνου ουσίας αζοξυμεθάνιο (AOM), η ολική γενετική απαλοιφή της Cox-2 φαίνεται να προστατεύει από την ανάπτυξη καρκίνου του εντέρου (Ishikawa and Herschman, 2010). Τέλος, αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί και μετά τη γενετική απαλοιφή των διαφόρων υποδοχέων της PGE2, χωρίς ωστόσο να είναι ξεκάθαρο το ποιος συγκεκριμένος υποδοχέας είναι ο σημαντικότερος για τη διαδικασία της καρκινογένεσης του εντέρου (Mutoh et al., 2002; Sonoshita et al., 2001; Watanabe et al., 1999).

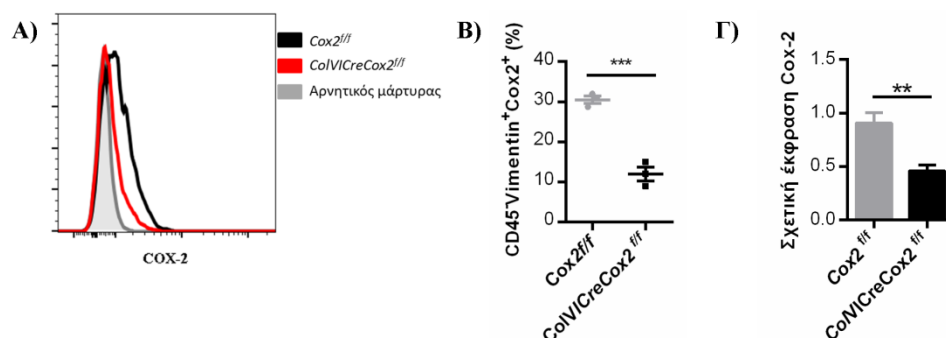
Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε τις επιπτώσεις που έχει η εκλεκτική γενετική απαλοιφή της Cox-2 από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες με τη χρήση των διαγονιδιακών ποντικών ColVI-Cre (Armaka et al., 2008) στην καρκινογένεση του εντέρου. Παράλληλα προσπαθήσαμε να ανακαλύψουμε τα συγκεκριμένα μοριακά μονοπάτια μέσω των οποίων η παραγόμενη από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες Cox-2 επιδρά στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας τα οποία δεν οδήγησαν ακόμη σε κάποια δημοσίευση.

3.2. Αποτελέσματα

3.2.1. Η γενετική απαλοιφή της κυκλοοξυγενάσης-2 από τα μεσεγχυματικά κύτταρα οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή της τόσο σε απομονωμένους εντερικούς μυοϊνοβλάστες όσο και σε επίπεδο ολικού ιστού

Για τη γενετική απαλοιφή της κυκλοοξυγενάσης-2 από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες των ποντικών, διασταυρώσαμε τους *Cox2^{fl/fl}* ποντικούς (Ishikawa and Herschman, 2006) με τους *ColVICre* ποντικούς (Armaka et al., 2008). Η επιβεβαίωση της ιστοειδικής απαλοιφής της κυκλοοξυγενάσης-2 στους *ColVICre, Cox2^{fl/fl}* ποντικούς έγινε με την απομόνωση εντερικών μυοϊνοβλαστών και των έλεγχο της παραγωγής Cox-2 από αυτούς. Όπως έδειξε η ανάλυσή μας, οι εντερικοί μυοϊνοβλάστες των *ColVICre, Cox2^{fl/fl}* ποντικών παράγουν σημαντικά λιγότερη Cox-2 σε αντίθεση με τους μάρτυρές τους (*Cox2^{fl/fl}* ποντικοί) (**Εικόνες 1Α-Β**). Παράλληλα μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης της Cox-2 σε δείγμα ολικού ιστού εντέρου (τελικού ειλεού). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η γενετική απαλοιφή της Cox-2 από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή της ακόμη και σε επίπεδο ολικού ιστού (**Εικόνα 1Γ**). Επομένως θεωρούμε ότι η γενετική απαλοιφή της Cox-2 από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες με τη χρήση των ColVI-Cre ποντικών πραγματοποιείται

σε ικανοποιητικά επίπεδα. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι το ποσοστό του γενετικού ανασυνδυασμού στους συγκεκριμένους ποντικούς ποτέ δεν είναι 100% αλλά ποικίλει (Koliaraki et al., 2015).



Εικόνα 1. Η γενετική απαλοιφή της κυκλοοξυγενάσης-2 από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες οδηγεί σε μείωση της παραγωγής κυκλοοξυγενάσης-2 από αυτούς αλλά και σε μείωση της παραγωγής της σε επίπεδο ολικού ιστού.

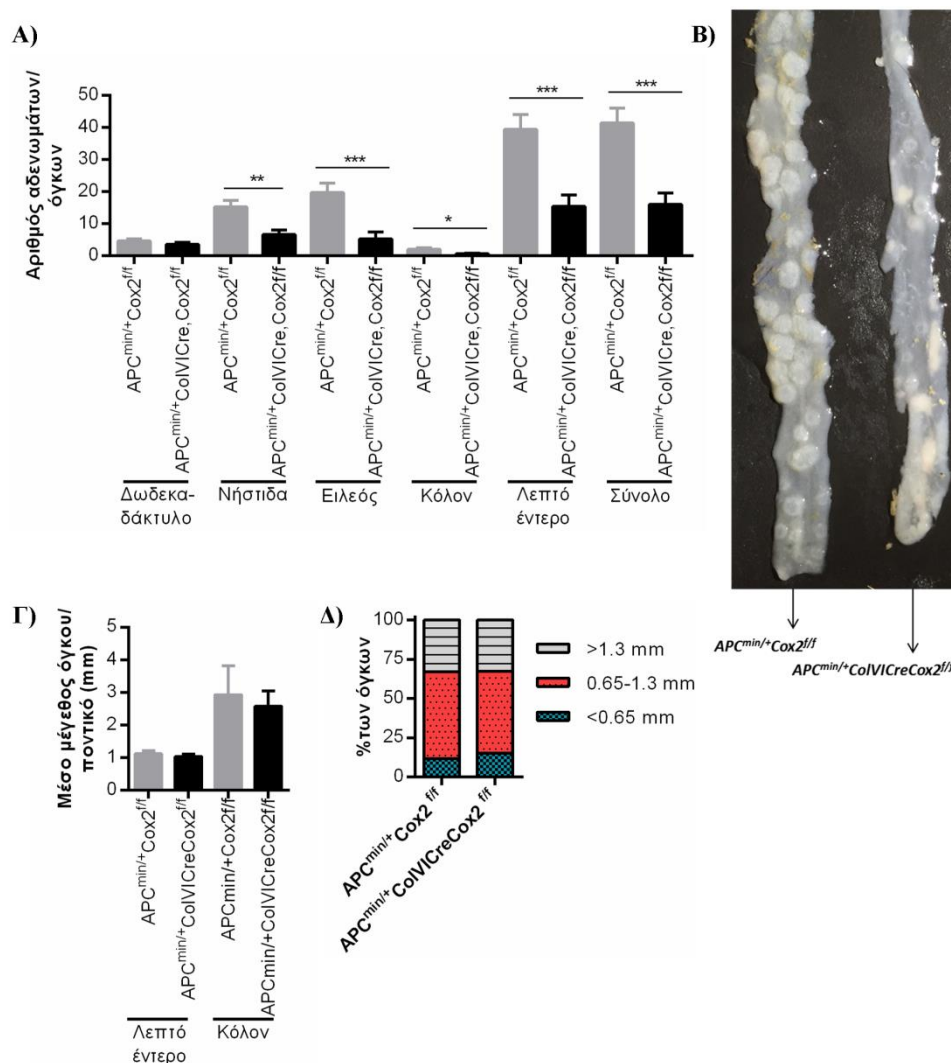
A) Σχηματική απεικόνιση της παραγωγής κυκλοοξυγενάσης-2 από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής (FACS). **B)** Ποσοτική σύγκριση της παραγωγής κυκλοοξυγενάσης-2 από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες της εικόνας (1A) προερχόμενους από $n=3$ $Cox2^{fl/fl}$ και $n=3$ $ColVICre,Cox2^{fl/fl}$ ποντικών. **Γ)** Ανάλυση με τη χρήση real-time PCR της παραγόμενης κυκλοοξυγενάσης-2 σε κομμάτι τελικού ειλεού από $n=7$ $Cox2^{fl/fl}$ και $n=7$ $ColVICre,Cox2^{fl/fl}$ ποντικών. Τα δεδομένα απεικονίζουν τη μέση τιμή (mean)±τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM).

3.2.2. Οι $APC^{min/+}ColVICre,Cox2^{fl/fl}$ ποντικοί εμφανίζουν σημαντικά μικρότερο αριθμό πεπτικών όγκων συνοδευόμενο από ηπιότερη κλινική εικόνα και σημαντική επιμήκυνση της διάρκειας ζωής τους

Η ιστοειδική γενετική απαλοιφή της Cox-2 από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες των $APC^{min/+}$ ποντικών ($APC^{min/+},ColVICre,Cox2^{fl/fl}$ ποντικοί) οδήγησε σε πάνω από 50% μείωση του αριθμού των αναπτυσσόμενων όγκων και πολυπόδων στο έντερο των ποντικών αυτών σε σύγκριση με τους μάρτυρές τους ($APC^{min/+},Cox2^{fl/fl}$ ποντικοί) (**Εικόνες 2Α-Β**). Ταυτόχρονα, η ανάλυση του μέσου μεγέθους των αναπτυσσόμενων όγκων δεν ανέδειξε κάποια διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων (**Εικόνες 2Γ-Δ**). Η ανάλυση έγινε στους 5,5 μήνες ζωής των ποντικών χρονικό σημείο στο οποίο έχουν αναπτυχθεί αρκετά οι όγκοι και η νόσος βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο.

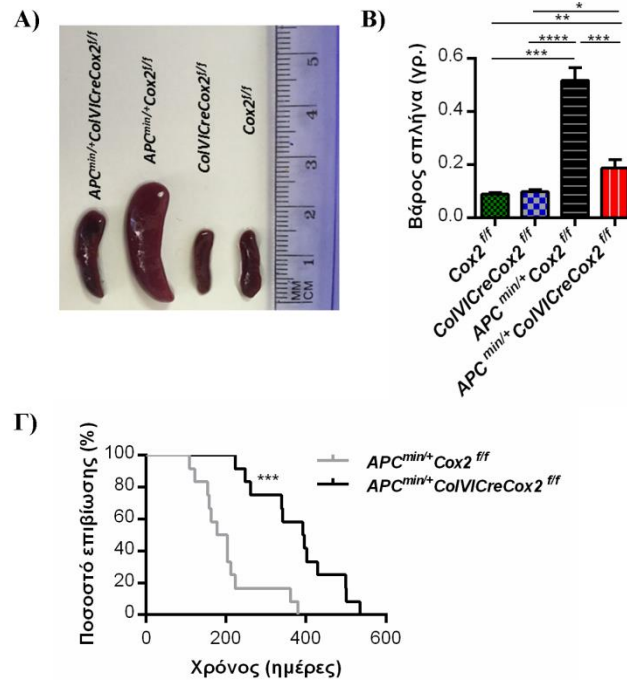
Ταυτόχρονα, η μέτρηση του μεγέθους του σπλήνα ως δείκτη της βαρύτητας της νόσου ανέδειξε μικρότερη σπληνομεγαλία στους $APC^{min/+},ColVICre,Cox2^{fl/fl}$ ποντικούς σε σύγκριση με τους $APC^{min/+},Cox2^{fl/fl}$ ποντικούς, υποδηλώνοντας ηπιότερη βαρύτητα της νόσου (**Εικόνες 3Α-Β**). Η ηπιότερη βαρύτητα της νόσου επιβεβαιώθηκε και στην πράξη από τη σημαντική επιμήκυνση της διάρκειας ζωής των $APC^{min/+},ColVICre,Cox2^{fl/fl}$ ποντικών όπως φαίνεται και στην **εικόνα 3Γ** με την

αντίστοιχη καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier (Faller et al., 2015; Friedrich et al., 2013).



Εικόνα 2 Η γενετική απαλοιφή της κυκλοοξυγενάσης-2 από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες οδηγεί σε μείωση του αριθμού των πεπτικών όγκων που αναπτύσσονται χωρίς να επηρεάζει το μέγεθός τους.

A) Καταγραφή του αριθμού των όγκων στις διαφορετικές περιοχές του εντέρου καθώς και συνολικά σε όλο το έντερο των ποντικών σε ηλικία 5,5 μηνών. **B)** Αντιπροσωπευτική μακροσκοπική εικόνα του εντέρου ενός *APC^{min/+}Cox2^{fl/fl}* και ενός *APC^{min/+},ColVICre,Cox2^{fl/fl}* ποντικού. **Γ)** Μέσο μέγεθος των όγκων που εντοπίστηκαν μακροσκοπικά και μικροσκοπικά στο λεπτό και το παχύ έντερο των ποντικών. **Δ)** Κατανομή των όγκων που εντοπίστηκαν στο λεπτό έντερο των ποντικών με βάση το μέγεθός τους. N= 16 *APC^{min/+},Cox2^{fl/fl}* και n=23 *APC^{min/+},ColVICre,Cox2^{fl/fl}* ποντικοί. Τα δεδομένα απεικονίζουν τη μέση τιμή (mean)±τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM).



Εικόνα 3. Η γενετική απαλοιφή της κυκλοοξυγενάσης-2 από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες οδηγεί σε μείωση της βαρύτητας της νόσου στους $APC^{min/+}$ ποντικούς αλλά και σε επιμήκυνση της διάρκειας ζωής τους.

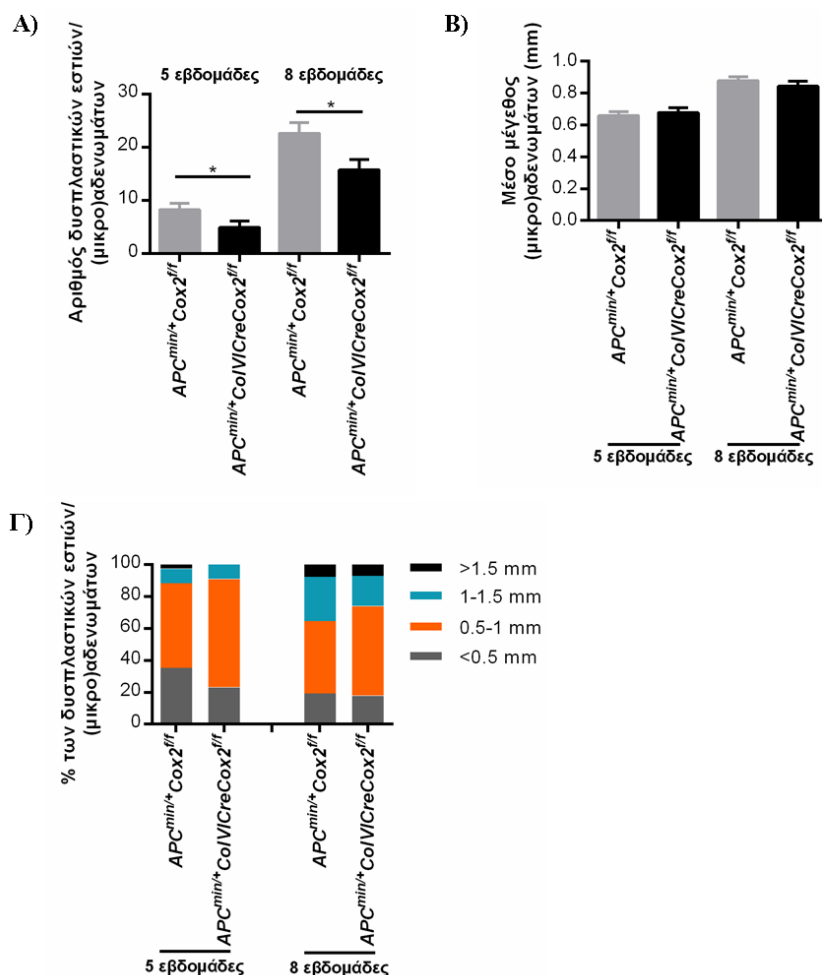
A) Αντιπροσωπευτική μακροσκοπική απεικόνιση των σπληνών των ποντικών. **B)** Σύγκριση του βάρους των σπληνών των ποντικών της εικόνας (3A). $N=6$ $Cox2^{fl/fl}$, $v=6$ $ColVICre,Cox2^{fl/fl}$, $v=8$ $APC^{min/+},Cox2^{fl/fl}$ και $v=6$ $APC^{min/+},ColVICre,Cox2^{fl/fl}$ ποντικοί. **Γ)** Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier σε $v=12$ $APC^{min/+},Cox2^{fl/fl}$ και $v=12$ $APC^{min/+},ColVICre,Cox2^{fl/fl}$ ποντικούς. Τα δεδομένα απεικονίζουν τη μέση τιμή (mean)±τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM).

3.2.3. Οι $APC^{min/+}ColVICre,Cox2^{fl/fl}$ ποντικοί εμφανίζουν σημαντικά μικρότερο αριθμό πεπτικών όγκων ήδη από τα αρχικά στάδια της νόσου

Η παρατηρούμενη μείωση του αριθμού των πεπτικών όγκων στους $APC^{min/+},ColVICre,Cox2^{fl/fl}$ ποντικούς εύλογα γεννά το ερώτημα του κατά πόσον η κυκλοοξυγενάση-2 που προέρχεται από τους μυοϊνοβλάστες του εντέρου επηρεάζει την έναρξη της καρκινογένεσης ή όχι. Για να απαντήσουμε στο ερώτημα αυτό, αποφασίσαμε να εξετάσουμε τους ποντικούς σε δύο πρώιμα στάδια της νόσου. Αρχικά εξετάσαμε ποντικούς ηλικίας 5 εβδομάδων, χρονικό σημείο κατά το οποίο ξεκινάει η διαδικασία της καρκινογένεσης και εμφανίζονται τα πρώτα μικροαδενώματα. Έπειτα εξετάσαμε τους ποντικούς σε ηλικία 8 εβδομάδων, χρονικό σημείο κατά το οποίο η καρκινογένεση έχει ήδη ξεκινήσει με αποτέλεσμα τα ήδη υπάρχοντα μικροαδενώματα να εξελίσσονται σε μακροαδενώματα και όγκους ενώ παράλληλα εμφανίζονται και νέα αδενώματα (Hull et al., 2006; Kettunen et al., 2003). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και σε αυτά τα δύο αρχικά στάδια οι $APC^{min/+},ColVICre,Cox2^{fl/fl}$ ποντικοί παρουσιάζουν μικρότερο αριθμό

αναπτυσσόμενων μικρο- και μακρο-αδενωμάτων (Εικόνα 4Α). Ωστόσο το μέσο μέγεθος των αδενωμάτων αυτών δε διαφέρει μεταξύ των δύο γονοτύπων (Εικόνα 4Β).

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η κυκλοοξυγενάση-2 που προέρχεται από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της καρκινογένεσης του εντέρου και δευτερεύοντα ίσως ρόλο στην εξέλιξη αυτής.



Εικόνα 4. Η γενετική απαλοιφή της κυκλοοξυγενάσης-2 από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες οδηγεί σε μείωση του αριθμού των όγκων στους $APC^{min/+}$ ποντικούς ήδη από τα πολύ αρχικά στάδια της νόσου χωρίς να επηρεάζει το μέγεθός τους.

A) Σύγκριση του συνολικού αριθμού των δυσπλαστικών εστιών και των (μικρο)αδενωμάτων που εντοπίζονται στο έντερο των ποντικών κατά τα αρχικά στάδια της νόσου. **B)** Μέσο μέγεθος των (μικρο)αδενωμάτων που εντοπίστηκαν στο λεπτό έντερο των ποντικών. **Γ)** Κατανομή των (μικρο)αδενωμάτων που εντοπίστηκαν στο λεπτό έντερο των ποντικών με βάση το μέγεθός τους. $n=21$ $APC^{min/+}; Cox2^{ff}$ και $n=17$ $APC^{min/+}; ColVICre; Cox2^{ff}$ ποντικοί ηλικίας 5 εβδομάδων. $n=18$ $APC^{min/+}; Cox2^{ff}$ και $n=14$ $APC^{min/+}; ColVICre; Cox2^{ff}$ ποντικοί ηλικίας 8 εβδομάδων. Τα δεδομένα απεικονίζουν τη μέση τιμή (mean)±τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM).

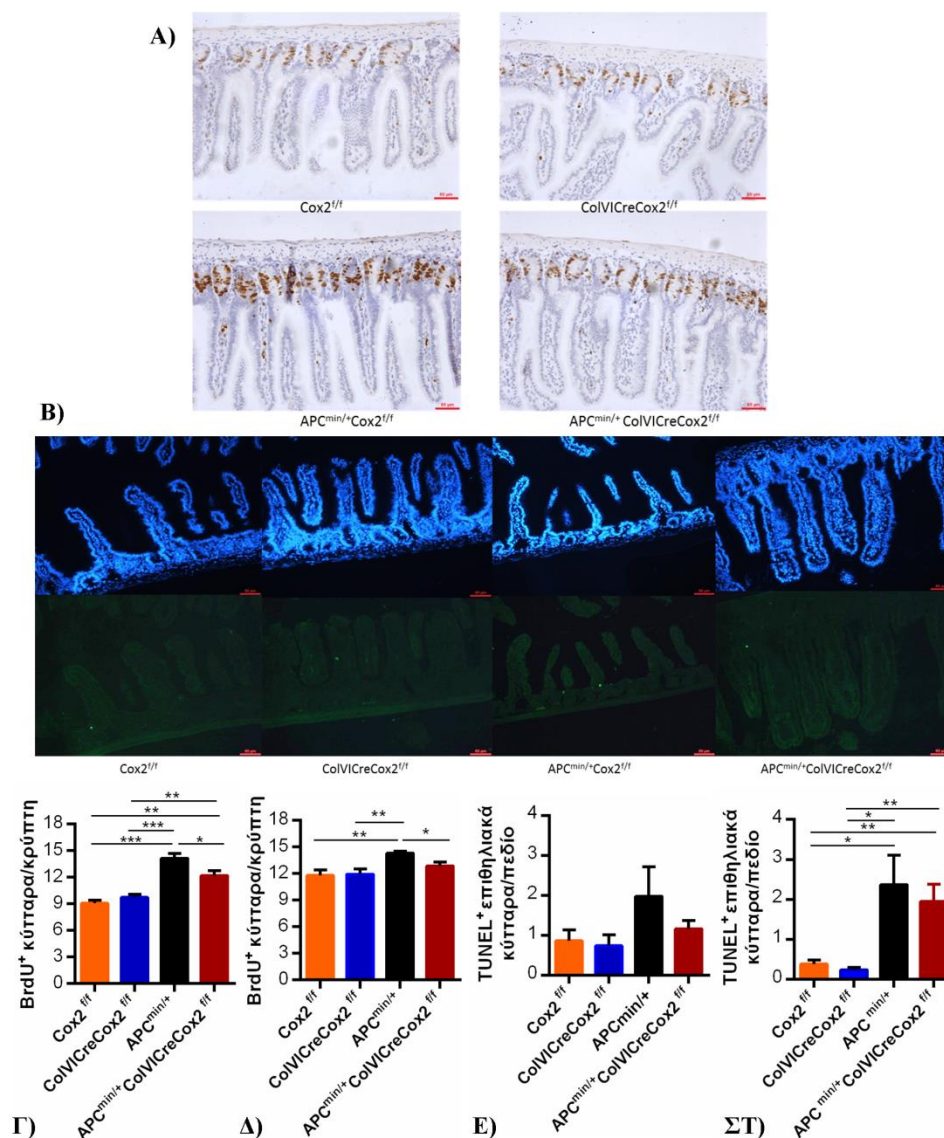
3.2.4. Η αδρανοποίηση της Cox-2 στους εντερικούς μυοϊνοβλάστες των $APC^{min/+}$ ποντικών οδηγεί σε μείωση του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται σε ενεργό πολλαπλασιασμό στις εντερικές κρύπτες χωρίς να επηρεάζει την απόπτωσή τους

Για να μελετήσουμε τα μονοπάτια μέσω των οποίων η κυκλοοξυγενάση-2 που παράγεται από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες συμβάλλει στην καρκινογένεση του εντέρου, αρχικά μελετήσαμε τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου τόσο σε υγιές επιθήλιο όσο και εντός των (μικρο)αδενωμάτων στις 5 και στις 8 εβδομάδες. Για τη μελέτη του πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήσαμε τη χρώση βρωμο-δεοξυ-ουριδίνης (BrdU) (Ritchie et al., 2009), ενώ για τη μελέτη της απόπτωσης την τεχνική TUNEL.

Και στα δύο χρονικά σημεία, στο φαινομενικά ‘υγιές’ ακόμη επιθήλιο παρατηρήθηκε αυξημένος αριθμός επιθηλιακών κυττάρων που πολλαπλασιάζονται ενεργά στους $APC^{min/+}$ ποντικούς σε σύγκριση με τους άγριου τύπου ποντικούς. Ωστόσο, οι $APC^{min/+}, ColVICre, Cox2^{ff}$ ποντικοί παρουσίασαν λιγότερα κύτταρα που βρίσκονται σε ενεργό πολλαπλασιασμό σε σύγκριση με τους $APC^{min/+}, Cox2^{ff}$ ποντικούς (**Εικόνες 5Α, 5Γ και 5Δ**). Εντός των (μικρο)αδενωμάτων δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων (**Εικόνες 6Α, 6Γ και 6Δ**).

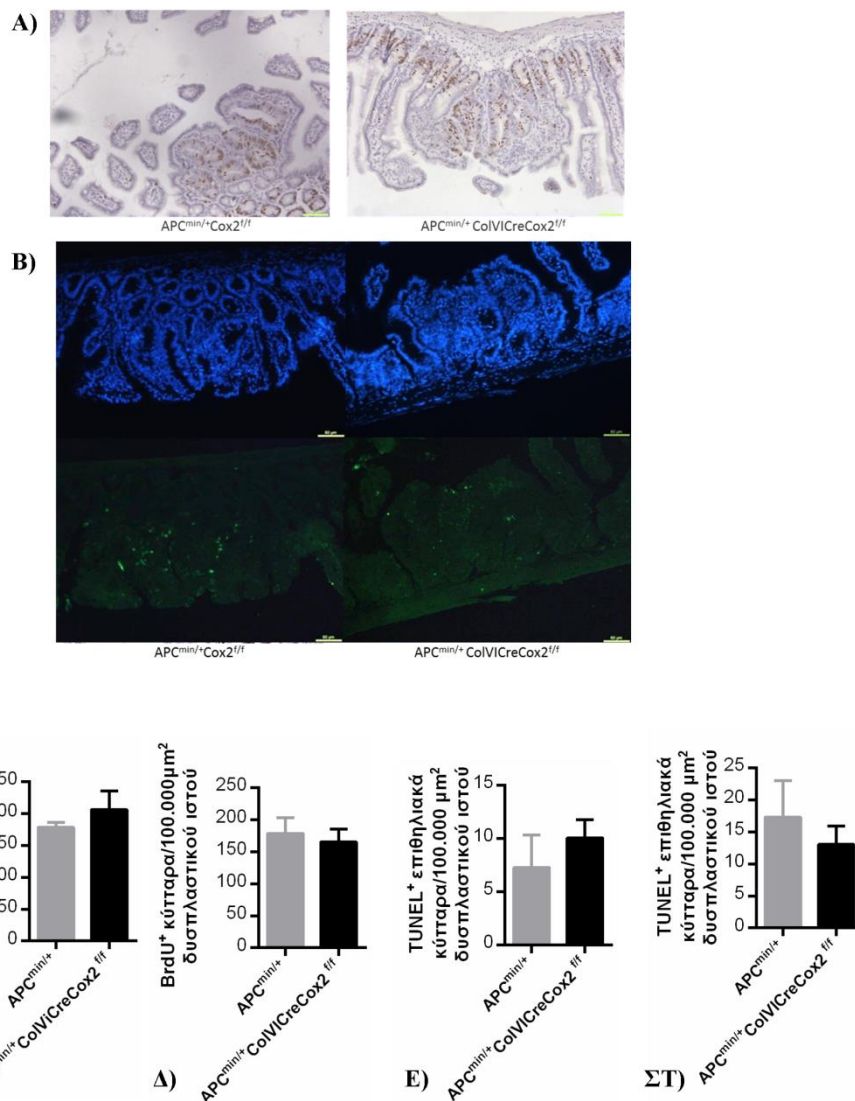
Αντίστοιχα, καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των $APC^{min/+}, ColVICre, Cox2^{ff}$ και των $APC^{min/+}, Cox2^{ff}$ ποντικών ούτε στο ‘υγιές’ επιθήλιο (**Εικόνες 5Β, 5Ε και 5ΣΤ**) ούτε εντός των (μικρο)αδενωμάτων (**Εικόνες 6Β, 6Ε και 6ΣΤ**) σε ότι αφορά την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων. Ωστόσο, στην ηλικία των 8 εβδομάδων οι $APC^{min/+}$ ποντικοί παρουσίαζαν αυξημένο αριθμό κυττάρων που βρίσκονταν σε απόπτωση σε σύγκριση με τους μη $APC^{min/+}$ ποντικούς (**Εικόνα 5ΣΤ**).

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η προερχόμενη από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες Cox-2 επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων στις εντερικές κρύπτες χωρίς όμως να επηρεάζει την απόπτωσή τους.



Εικόνα 5. Η γενετική απαλοιφή της κυκλοοξυγενάσης-2 από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες των ποντικών $APC^{min/+}$ οδηγεί σε μείωση του αριθμού των επιθηλιακών κυττάρων που πολλαπλασιάζονται ενεργά σε υγιή κομμάτια του εντέρου χωρίς να επηρεάζει την απόπτωσή τους.

Α) Αντιπροσωπευτική ιστολογική απεικόνιση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης με βρωμο-δεοξυουριδίνη (BrdU) σε υγιή ιστό (τελικό ειλεό). **Β)** Απεικόνιση μέσω ανοσοφθορισμού των κυττάρων που αποίπτον (τεχνική TUNEL) σε υγιές έντερο (τελικός ειλεός). **Γ)** Ποσοτικοποίηση της χρώσης BrdU σε υγιές έντερο (τελικός ειλεός) στην ηλικία των 5 εβδομάδων από $n=4$ $Cox2^{fl/fl}$, $n=7$ $ColVICre,Cox2^{fl/fl}$, $n=7$ $APC^{min/+},Cox2^{fl/fl}$ και $n=12$ $APC^{min/+},ColVICre,Cox2^{fl/fl}$ ποντικών. **Δ)** Ποσοτικοποίηση της χρώσης BrdU σε υγιές έντερο (τελικός ειλεός) στην ηλικία των 8 εβδομάδων από $n=4$ $Cox2^{fl/fl}$, $n=4$ $ColVICre,Cox2^{fl/fl}$, $n=6$ $APC^{min/+},Cox2^{fl/fl}$ και $n=8$ $APC^{min/+},ColVICre,Cox2^{fl/fl}$ ποντικών. **Ε)** Ποσοτικοποίηση της χρώσης TUNEL σε υγιές έντερο (τελικός ειλεός) στην ηλικία των 5 εβδομάδων από $n=4$ $Cox2^{fl/fl}$, $n=5$ $ColVICre,Cox2^{fl/fl}$, $n=7$ $APC^{min/+},Cox2^{fl/fl}$ και $n=11$ $APC^{min/+},ColVICre,Cox2^{fl/fl}$ ποντικών. **ΣΤ)** Ποσοτικοποίηση της χρώσης TUNEL σε υγιές έντερο (τελικός ειλεός) στην ηλικία των 8 εβδομάδων από $n=8$ $Cox2^{fl/fl}$, $n=8$ $ColVICre,Cox2^{fl/fl}$, $n=8$ $APC^{min/+},Cox2^{fl/fl}$ και $n=8$ $APC^{min/+},ColVICre,Cox2^{fl/fl}$ ποντικών. Οι εικόνες είναι σε μεγέθυνση 200x, κλίμακα=60μm. Η μπλε χρωστική (DAPI) απεικονίζει τους πυρήνες των κυττάρων ενώ με πράσινο φαίνονται τα κύτταρα που αποίπτον. Τα δεδομένα απεικονίζουν τη μέση τιμή (mean)±τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM).



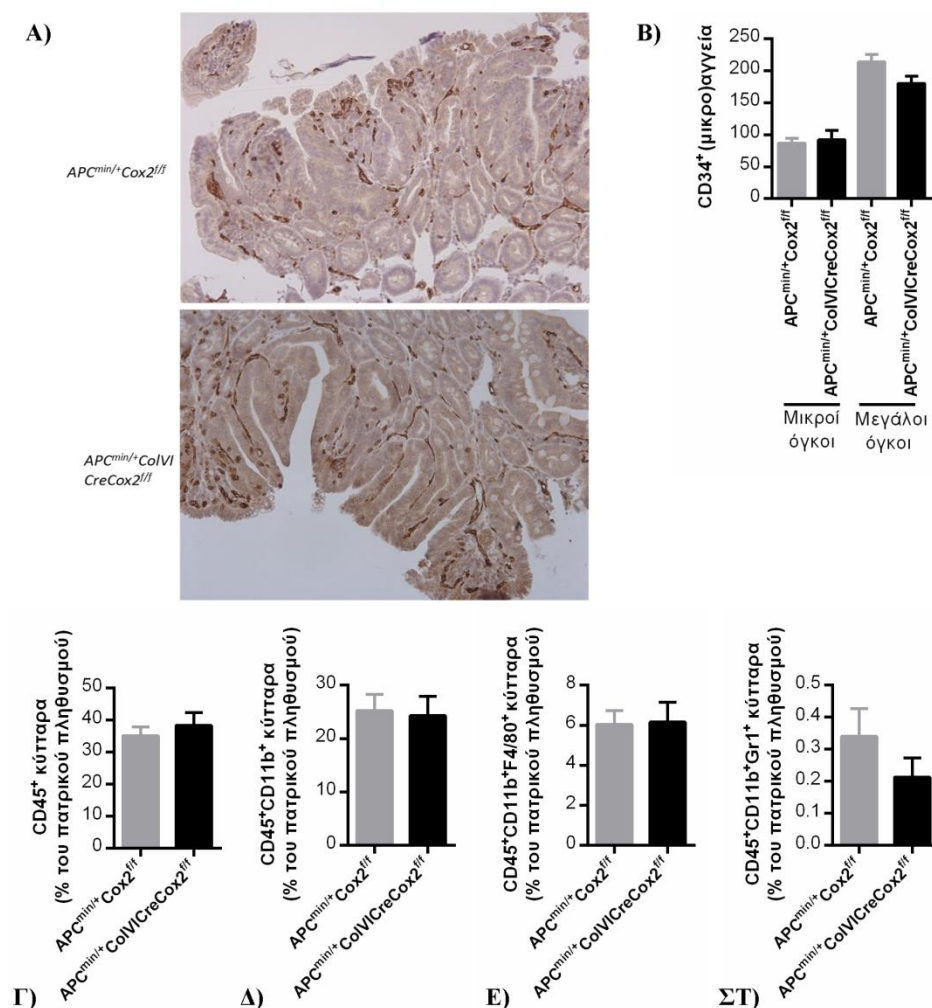
Εικόνα 6. Η γενετική απαλοιφή της κυκλοοξυγενάσης-2 από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες των ποντικών $APC^{min/+}$ δεν επηρεάζει ούτε τον πολλαπλασιασμό ούτε την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων εντός των αδενωμάτων/όγκων.

Α) Αντιπροσωπευτική ιστολογική απεικόνιση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης με βρωμο-δεοξυουριδίνη (BrdU) σε όγκο εντέρου. **Β)** Απεικόνιση μέσω ανοσοφθορισμού των κυττάρων που αποπίπτουν (τεχνική TUNEL) σε αδένωμα εντέρου. **Γ)** Ποσοτικοποίηση της χρώσης BrdU εντός των αδενωμάτων στην ηλικία των 5 εβδομάδων από $n=6$ $APC^{min/+},Cox2^{fl/fl}$ και $n=7$ $APC^{min/+},ColVICre,Cox2^{fl/fl}$ ποντικούς. **Δ)** Ποσοτικοποίηση της χρώσης BrdU εντός των αδενωμάτων στην ηλικία των 8 εβδομάδων από $n=6$ $APC^{min/+},Cox2^{fl/fl}$ και $n=8$ $APC^{min/+},ColVICre,Cox2^{fl/fl}$ ποντικούς. **Ε)** Ποσοτικοποίηση της χρώσης TUNEL εντός των αδενωμάτων στην ηλικία των 5 εβδομάδων από $n=6$ $APC^{min/+},Cox2^{fl/fl}$ και $n=9$ $APC^{min/+},ColVICre,Cox2^{fl/fl}$ ποντικούς. **ΣΤ)** Ποσοτικοποίηση της χρώσης TUNEL εντός των αδενωμάτων στην ηλικία των 8 εβδομάδων από $n=8$ $APC^{min/+},Cox2^{fl/fl}$ και $n=8$ $APC^{min/+},ColVICre,Cox2^{fl/fl}$ ποντικούς. Οι εικόνες είναι σε μεγέθυνση 200x, κλίμακα=60μm. Η μπλε χρωστική (DAPI) απεικονίζει τους πυρήνες των κυττάρων ενώ με πράσινο φαίνονται τα κύτταρα που αποπίπτουν. Τα δεδομένα απεικονίζουν τη μέση τιμή (mean)±τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM).

3.2.5. Η αδρανοποίηση της Cox-2 στους εντερικούς μυοϊνοβλάστες των $APC^{min/+}$ ποντικών δεν επηρεάζει ούτε την αγγείωση των όγκων ούτε τη διήθησή τους από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος

Με τη χρήση ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι της πρωτεΐνης CD34 μελετήσαμε τη (νεο)αγγειογένεση εντός των αδενωμάτων που έχουν σχηματιστεί στους 3 μήνες ζωής των ποντικών. Καμία διαφορά δεν εντοπίστηκε μεταξύ των $APC^{min/+}, ColVICre, Cox2^{ff}$ και των $APC^{min/+}, Cox2^{ff}$ ποντικών ούτε στους μικρού μεγέθους ούτε στους μεγάλου μεγέθους όγκους (Εικόνες 7Α-Β).

Από την άλλη πλευρά, με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής (FACS) μελετήσαμε τη διήθηση του εντέρου των ποντικών από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στο ίδιο χρονικό σημείο (3 μήνες). Ούτε εδώ εντοπίστηκε κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των $APC^{min/+}, ColVICre, Cox2^{ff}$ και των $APC^{min/+}, Cox2^{ff}$ ποντικών (Εικόνες 7Γ-ΣΤ).



Εικόνα 7. Η γενετική απαλοιφή της κυκλοοξυγενάσης-2 από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες δεν επηρεάζει την αγγειογένεση εντός των αναπτυσσόμενων αδενωμάτων/όγκων ούτε τη διήθησή τους από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Α) Απεικόνιση των αγγείων που αναπτύσσονται εντός του όγκου με τη χρήση ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι της πρωτεΐνης CD34. **Β)** Ποσοτικοποίηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης της εικόνας (7Α). **Γ)** Διήθηση του εντέρου των ποντικών (τελικός ειλεός) από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (μυελογενούς προέλευσης). **Δ)** Διήθηση του εντέρου των ποντικών (τελικός ειλεός) από

κοκκιοκύτταρα. **Ε)** Διήθηση του εντέρου των ποντικών (τελικός ειλεός) από μακροφάγα. **ΣΤ)** Διήθηση του εντέρου των ποντικών (τελικός ειλεός) από ενεργοποιημένα μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα. Οι φωτογραφίες είναι σε μεγέθυνση 200x / κλίμακα=60μm. Τα δεδομένα απεικονίζουν τη μέση τιμή (mean)±τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM).

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η ιστοειδική αδρανοποίηση της Cox-2 στους εντερικούς μυοϊνοβλάστες επηρεάζει τη διαδικασία της καρκινογένεσης μέσω μηχανισμών διαφορετικών από τη (νεο)αγγειογένεση ή τη διήθηση του όγκου και του στρώματος αυτού από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

3.2.6. Η αδρανοποίηση της Cox-2 στους εντερικούς μυοϊνοβλάστες επηρεάζει το σηματοδοτικό μονοπάτι της β-κατενίνης καθώς και την έκφραση διαφόρων δεικτών των βλαστοκυττάρων

Για να μπορέσουμε να εντοπίσουμε τα μοριακά μονοπάτια μέσω των οποίων η κυκλοοξυγενάση-2 των εντερικών μυοϊνοβλαστών συμβάλλει στην καρκινογένεση του εντέρου, πραγματοποιήσαμε μια σειρά από αναλύσεις με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR). Στις αναλύσεις αυτές χρησιμοποιήσαμε 4 διαφορετικούς γονοτύπους ποντικών σε προχωρημένη ηλικία (5,5 μηνών) : α) ποντικοί άγριου τύπου ($Cox2^{fl/fl}$), β) ποντικοί άγριου τύπου στους οποίους έχει απαλειφθεί γενετικά η κυκλοοξυγενάση-2 από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες τους ($ColVICre, Cox2^{fl/fl}$), γ) ποντικοί $APC^{min/+}, Cox2^{fl/fl}$ και δ) ποντικοί $APC^{min/+}$ στους οποίους έχει απαλειφθεί γενετικά η κυκλοοξυγενάση-2 από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες τους ($APC^{min/+}, ColVICre, Cox2^{fl/fl}$). Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν είτε σε δείγμα ολικού ιστού από τον τελικό ειλεό είτε συγκρίνοντας 'υγιείς' περιοχές του εντέρου με όγκους που είχαν αναπτυχθεί στον ίδιο ποντικό σε άλλο σημείο του εντέρου. Τα μονοπάτια που μελετήσαμε αφορούσαν κυρίως τη σηματοδότηση μέσω της β-κατενίνης καθώς έχει δειχτεί στη βιβλιογραφία ότι αυτά τα μονοπάτια παίζουν κομβικό ρόλο στην καρκινογένεση του εντέρου και σχετίζονται και με τον άξονα της Cox-2 / PGE-2 (Castellone et al., 2005; Shao et al., 2005). Επίσης μελετήσαμε και μια σειρά από δείκτες βλαστοκυττάρων.

Σε επίπεδο ολικού ιστού παρατηρήσαμε διαφορές τόσο σε μόρια που βρίσκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι της β-κατενίνης (c-Myc και CyclinD1) (**Εικόνες 8Α-Δ**) όσο και σε μόρια-δείκτες βλαστοκυττάρων του εντέρου όπως ο Lgr5 και ο Sox-9 (**Εικόνες 9Α-Δ**). Οι δείκτες αυτοί ήταν αυξημένοι στους $APC^{min/+}, Cox2^{fl/fl}$ ποντικούς ενώ η απαλοιφή της Cox-2 από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες των ποντικών

επανεφερε τους δείκτες αυτούς στα φυσιολογικά επίπεδα που παρατηρήθηκαν και στους ποντικούς-μάρτυρες.

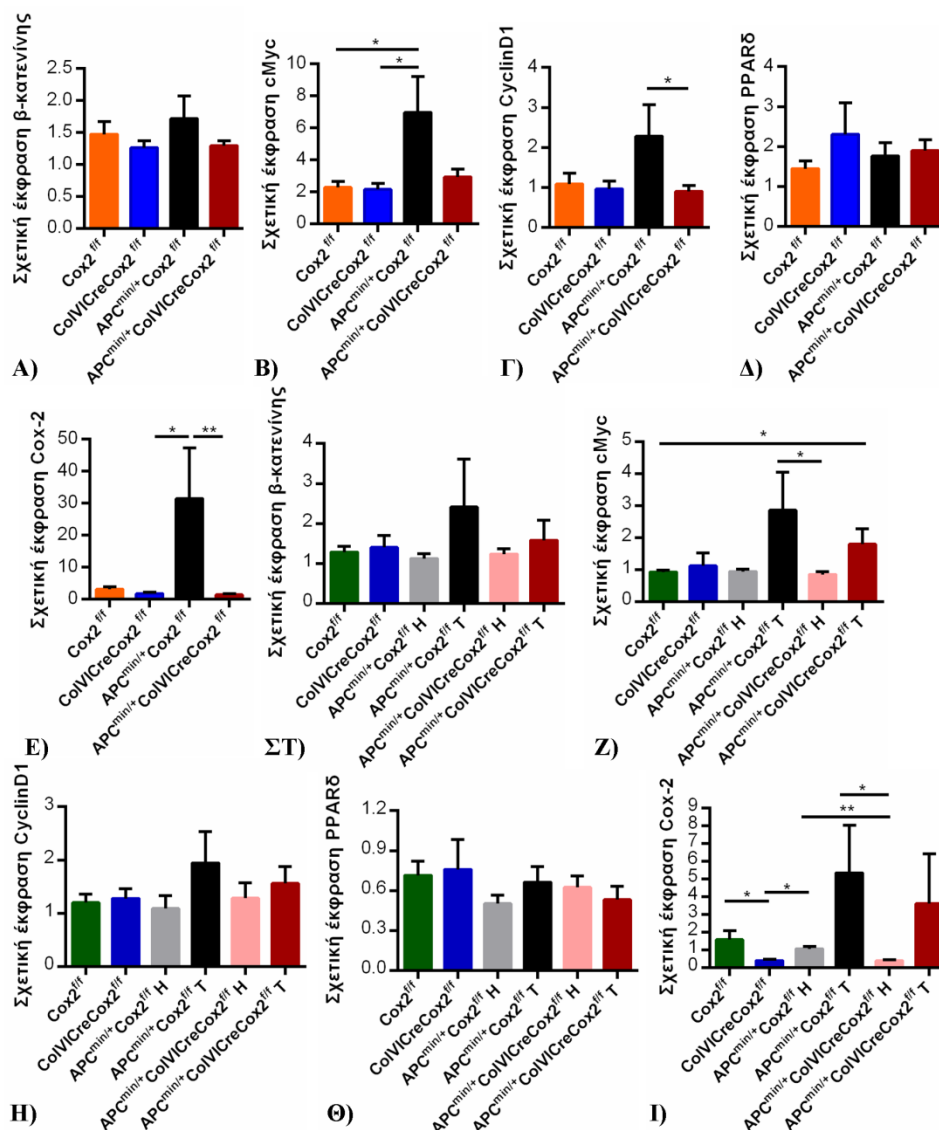
Τα ίδια αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό και κατά τη σύγκριση όγκων από τους $APC^{min/+}$ ποντικούς με φυσιολογικό ιστό είτε από $APC^{min/+}$ ποντικούς είτε από μη $APC^{min/+}$ ποντικούς (**Εικόνες 8ΣΤ-Θ και 9ΣΤ-Ι**). Ωστόσο η σύγκριση όγκων μεταξύ $APC^{min/+}, Cox2^{ff}$ ποντικών και $APC^{min/+}, ColVICre, Cox2^{ff}$ ποντικών δεν ανέδειξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι οι όγκοι οι οποίοι εν τέλει αναπτύσσονται στους $APC^{min/+}, ColVICre, Cox2^{ff}$ ποντικούς πιθανότατα ξεφεύγουν από την αδρανοποίηση της Cox-2 κι επομένως εμφανίζουν «φυσιολογική» ανάπτυξη.

Τέλος, η σύγκριση των επιπέδων της παραγόμενης Cox-2 τόσο σε επίπεδο ολικού ιστού όσο και εντός των όγκων ανέδειξε αντίστοιχες διαφορές επιβεβαιώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της γενετικής απαλοιφής της (**Εικόνες 8Ε και 8Ι**). Η απουσία σημαντικής διαφοράς στα επίπεδα της παραγόμενης Cox-2 εντός των όγκων των $APC^{min/+}, Cox2^{ff}$ και των $APC^{min/+}, ColVICre, Cox2^{ff}$ ποντικών, υποστηρίζει περεταίρω την υπόθεση ότι οι όγκοι που αναπτύσσονται στους $APC^{min/+}, ColVICre, Cox2^{ff}$ ποντικούς πιθανότατα ξεφεύγουν από την αδρανοποίηση της Cox-2 κι επομένως εμφανίζουν «φυσιολογική» ανάπτυξη.

Επιπλέον, η απουσία διαφορών μεταξύ των όγκων που προέρχονται από τους $APC^{min/+}, Cox2^{ff}$ και τους $APC^{min/+}, ColVICre, Cox2^{ff}$ ποντικούς, σε συνδυασμό με την ανεύρεση διαφορών κατά την εξέταση ολόκληρου του ιστού από τους παραπάνω ποντικούς οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανότατα οι παρατηρούμενες διαφορές οφείλονται στο σημαντικά μικρότερο αριθμό όγκων που παρατηρείται στους $APC^{min/+}, ColVICre, Cox2^{ff}$ ποντικούς. Επίσης, η απουσία διαφορών μεταξύ του 'υγιούς' ιστού που προέρχεται από άγριου τύπου ποντικούς και του 'υγιούς' ιστού που προέρχεται από $APC^{min/+}$ ποντικούς υποδηλώνει ότι για την ανάπτυξη τέτοιων διαφορών πιθανότατα απαιτείται η απώλεια και του δεύτερου (του φυσιολογικού δηλαδή) αλληλίου των $APC^{min/+}$ ποντικών [όπως είναι γνωστό, οι $APC^{min/+}$ ποντικοί έχουν ένα φυσιολογικό αλληλίο του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη APC και ένα μεταλλαγμένο το οποίο δεν οδηγεί στην παραγωγή πρωτεΐνης (Moser et al., 1990)].

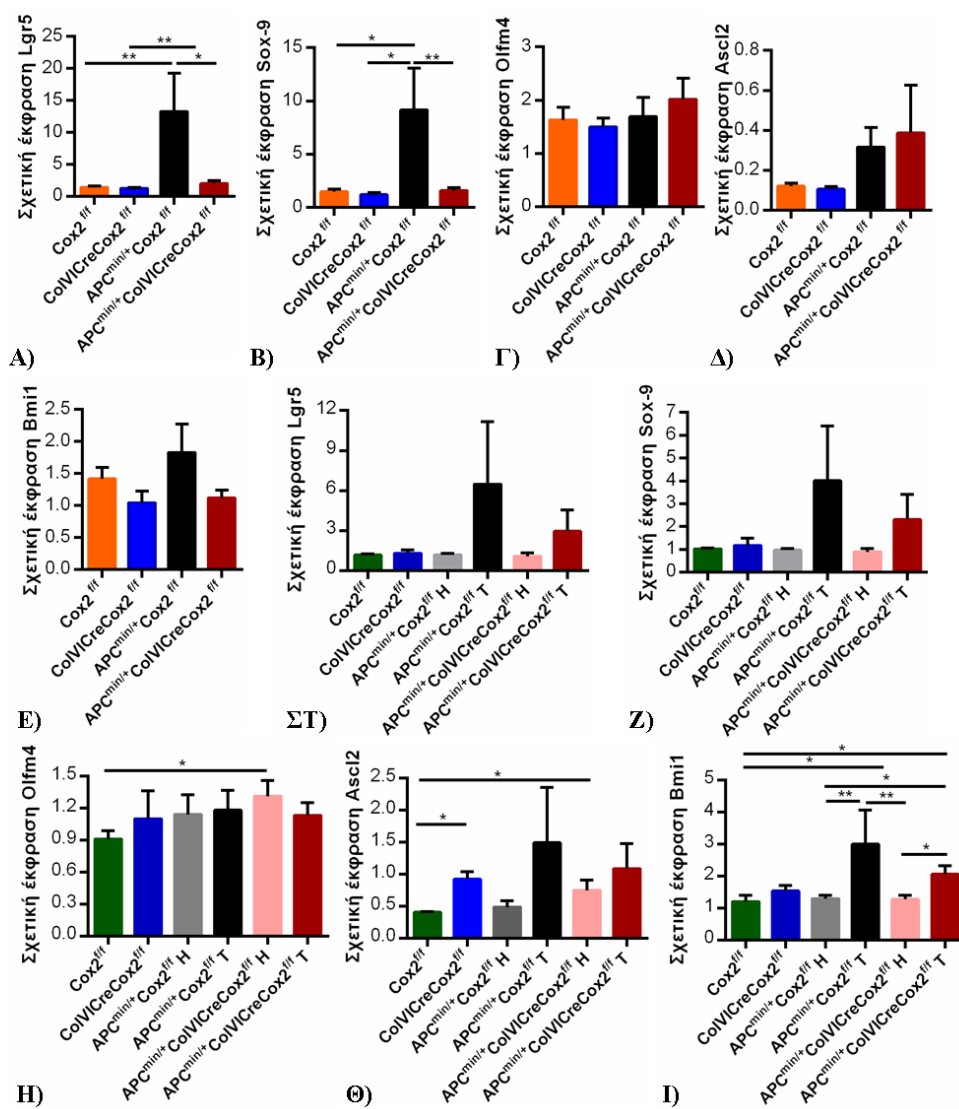
Συνολικά τα αποτελέσματα της παραπάνω ανάλυσης υποδηλώνουν ότι σε μοριακό επίπεδο η σηματοδότηση μέσω της Cox-2 που παράγεται από τους εντερικούς

μυοϊνοβλάστες επηρεάζει τη διαδικασία της καρκινογένεσης μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών της β-κατενίνης αλλά και μέσω της επίδρασής της στα εντερικά βλαστοκύτταρα.



Εικόνα 8. Η γενετική απαλοιφή της κυκλοοξυγενάσης-2 από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες εμποδίζει την παραγωγή *Cox-2* και την ενεργοποίηση μορίων που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι της β-κατενίνης σε επίπεδο ολικού ιστού αλλά όχι εντός των όγκων.

A-E) Ανάλυση με τη χρήση real-time PCR της έκφρασης διαφόρων μορίων σε δείγμα ολικού ιστού από τον τελικό ειλεό. **A)** Έκφραση της β-κατενίνης. **B)** Έκφραση του cMyc. **Γ)** Έκφραση του CyclinD1. **Δ)** Έκφραση του PPARδ. **Ε)** Έκφραση της *Cox-2*. **ΣΤ-I)** Ανάλυση με τη χρήση real-time PCR της έκφρασης διαφόρων μορίων σε δείγμα υγιούς ιστού από τον τελικό ειλεό αλλά και ιστού προερχόμενου από όγκους. **ΣΤ)** Έκφραση της β-κατενίνης. **Ζ)** Έκφραση του cMyc. **Η)** Έκφραση του CyclinD1. **Θ)** Έκφραση του PPARδ. **Ι)** Έκφραση της *Cox-2*. Για τον ολικό ιστό $n=5$ *Cox2^{ff}*, $n=5$ *ColVICre,Cox2^{ff}*, $n=7$ *APC^{min/+}*, *Cox2^{ff}* και $n=6$ *APC^{min/+}*, *ColVICre,Cox2^{ff}* ποντικοί ηλικίας 5,5 μηνών. Για τη σύγκριση υγιούς ιστού και όγκων $n=4$ *Cox2^{ff}*, $n=4$ *ColVICre,Cox2^{ff}*, $n=5$ *APC^{min/+}*, *Cox2^{ff}* και $n=5$ *APC^{min/+}*, *ColVICre,Cox2^{ff}* ποντικοί ηλικίας 5,5 μηνών. Από κάθε *APC^{min/+}* ποντικό χρησιμοποιήθηκε δείγμα από όγκο αλλά και από υγίή ιστό ως μάρτυρας ελέγχου. Τα δεδομένα απεικονίζουν τη μέση τιμή (mean)±τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM).



Εικόνα 9. Η γενετική απαλοιφή της κυκλοοξυγενάσης-2 από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες εμποδίζει την αύξηση δεικτών βλαστοκυττάρων σε επίπεδο ολικού ιστού αλλά όχι εντός των όγκων.

A-E) Ανάλυση με τη χρήση real-time PCR της έκφρασης διαφόρων μορίων σε δείγμα ολικού ιστού από τον τελικό ειλεό. **A)** Έκφραση του Lgr5. **B)** Έκφραση του Sox-9. **Γ)** Έκφραση του Olfm4. **Δ)** Έκφραση του Ascl2. **Ε)** Έκφραση του Bmi1. **ΣΤ-I)** Ανάλυση με τη χρήση real-time PCR της έκφρασης διαφόρων μορίων σε δείγμα υγιούς ιστού από τον τελικό ειλεό αλλά και ιστού προερχόμενου από όγκους **ΣΤ)** Έκφραση του Lgr5. **Z)** Έκφραση του Sox-9. **H)** Έκφραση του Olfm4. **Θ)** Έκφραση του Ascl2. **I)** Έκφραση του Bmi1. Για τον ολικό ιστό $n=5$ Cox2^{fl/fl}, $n=5$ ColVICre,Cox2^{fl/fl}, $n=7$ APC^{min/+},Cox2^{fl/fl} και $n=6$ APC^{min/+},ColVICre,Cox2^{fl/fl} ποντικοί ηλικίας 5,5 μηνών. Για τη σύγκριση υγιούς ιστού και όγκων $n=4$ Cox2^{fl/fl}, $n=4$ ColVICre,Cox2^{fl/fl}, $n=5$ APC^{min/+},Cox2^{fl/fl} και $n=5$ APC^{min/+},ColVICre,Cox2^{fl/fl} ποντικοί ηλικίας 5,5 μηνών. Από κάθε APC^{min/+} ποντικό χρησιμοποιήθηκε δείγμα από όγκο αλλά και από υγιή ιστό ως μάρτυρας ελέγχου. Τα δεδομένα απεικονίζουν τη μέση τιμή (mean)±τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (SEM).

3.3. Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε το σημαντικότερο ρόλο που παίζει η κυκλοοξυγενάση-2 που παράγεται από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες στη διαδικασία της καρκινογένεσης του εντέρου *in vivo*. Πιο συγκεκριμένα, δείξαμε ότι η γενετική απαλοιφή της κυκλοοξυγενάσης-2 από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες ποντικών που αναπτύσσουν αυθόρμητα δεκάδες αδενώματα/όγκους στο λεπτό κυρίως έντερο ($APC^{min/+}$ ποντικοί) επηρεάζει κυρίως την έναρξη της καρκινογένεσης (και δευτερευόντως ίσως την εξέλιξη αυτής) οδηγώντας σε σημαντική μείωση του αριθμού των αδενωμάτων/όγκων που αναπτύσσονται και εν συνεχεία σε μειωμένη βαρύτητα της νόσου και σημαντική επιμήκυνση της διάρκειας ζωής τους. Ωστόσο όπως αναφέραμε παραπάνω, η αποτελεσματικότητα του ανασυνδυασμού μέσω της Cre κατά τη χρήση του υποκινητή του κολλαγόνου VI δεν είναι 100%. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχουν εντερικοί μυοϊνοβλάστες που εκφράζουν το κολλαγόνο VI οι οποίοι συνεχίζουν να παράγουν Cox-2 και οι οποίοι θα μπορούσαν να υποστηρίξουν τη 'φυσιολογική' ανάπτυξη ενός όγκου. Επίσης είναι γνωστό ότι υπάρχουν και άλλοι εντερικοί μυοϊνοβλάστες οι οποίοι δεν εκφράζουν το κολλαγόνο VI κι επομένως δεν επηρεάζονται από την Cre ανασυνδυάση με τη χρήση του συγκεκριμένου υποκινητή, με αποτέλεσμα να παράγουν κανονικά την Cox-2 (Koliaraki et al., 2015). Άρα τα αποτελέσματα που παρατηρήσαμε θα μπορούσαν να είναι ακόμη πιο θετικά εάν η απαλοιφή της Cox-2 γινόταν με επιτυχία 100%.

Από μηχανιστικής απόψεως, στη βιβλιογραφία έχουν περιγραφεί πολλοί διαφορετικοί μηχανισμοί ρυθμιζόμενοι από το σηματοδοτικό μονοπάτι της Cox-2 / PGE2 οι οποίοι ενισχύουν τη διαδικασία της καρκινογένεσης του εντέρου επιδρώντας είτε άμεσα στα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα (προάγοντας τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την απόπτωση αλλά και την τοπική ή απομακρυσμένη διήθησή τους), είτε έμμεσα στο μικροπεριβάλλον του όγκου επηρεάζοντας τη (νεο)αγγειογένεση και τη διήθηση του όγκου από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Wang and DuBois, 2013). Σε ότι αφορά τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, φαίνεται ότι η κυκλοοξυγενάση-2 που προέρχεται από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό τους ακόμη και πριν από την εμφάνιση του όγκου (στο φαινομενικά υγιές επιθήλιο). Ωστόσο δε φαίνεται να επηρεάζει την απόπτωση των κυττάρων αυτών. Παράλληλα, σε ότι αφορά το μικροπεριβάλλον του όγκου, η κυκλοοξυγενάση-2 που προέρχεται από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες φαίνεται πως δεν επηρεάζει τη

(νεο)αγγειογένεση εντός του όγκου ή η διήθησή του από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Τέλος, από μοριακής απόψεως ανακαλύψαμε διαφορές σε μόρια που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι της β-κατενίνης αλλά και σε κάποιους δείκτες βλαστοκυττάρων. Οι πρωτεΐνες αυτές βρέθηκαν αυξημένες στους $APC^{min/+}$ ποντικούς σε σύγκριση με τους με τους μη- $APC^{min/+}$ ποντικούς επιβεβαιώνοντας ευρήματα άλλων μελετών από τη βιβλιογραφία (Castellone et al., 2005; Shao et al., 2005). Το γεγονός ότι οι διαφορές αυτές μεταξύ των $APC^{min/+}Cox2^{ff}$ και των $APC^{min/+}ColVICre,Cox2^{ff}$ ποντικών παρατηρήθηκαν μόνο σε επίπεδο ολικού ιστού και όχι μεταξύ όγκων προερχόμενων από τους ποντικούς αυτούς, πιθανότατα οφείλεται στη σημαντική διαφορά που υπάρχει στον αριθμό των όγκων που εμφανίζουν οι ποντικοί αυτοί. Επίσης υποδηλώνει ότι οι όποιες πιθανές διαφορές υπάρχουν μετά την απαλοιφή της κυκλοοξυγενάσης-2 στους εντερικούς μυοϊνοβλάστες, είτε είναι πολύ μικρές γιατί αφορούν ελάχιστα κύτταρα (πχ κάποια βλαστοκύτταρα) από τα οποία ξεκινά ο όγκος είτε δεν αφορούν τα σηματοδοτικά μονοπάτια της β-κατενίνης που μελετήσαμε. Φυσικά, υπάρχει και η πιθανότητα οι όγκοι που εν τέλει αναπτύσσονται στους $APC^{min/+}ColVICre,Cox2^{ff}$ ποντικούς να διαφεύγουν με κάποιον τρόπο τη γενετική απαλοιφή της Cox-2 (πχ αναφέραμε και νωρίτερα ότι ο γενετικός ανασυνδυασμός της Cre στους συγκεκριμένους ποντικούς δεν είναι 100%) και γι'αυτό να παρουσιάζουν «φυσιολογική» ανάπτυξη. Επομένως χρειάζεται περαιτέρω μελέτη και πιο ακριβείς προσεγγίσεις για την ανακάλυψη των μονοπατιών που καθοδηγούν το φαινότυπο που παρατηρήσαμε παραπάνω.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας αποτελούν μια γερή βάση για την περαιτέρω μελέτη του ρόλου του άξονα Cox-2 / PGE2 στον καρκίνο του εντέρου σε συγκεκριμένα κύτταρα στόχους τόσο εντός του όγκου όσο και στο μικροπεριβάλλον αυτού και πιο συγκεκριμένα στην αλληλεπίδραση και ενεργό επικοινωνία μεταξύ μεσεγχυματικών και επιθηλιακών κυττάρων. Προς αυτήν την κατεύθυνση συνεχίζουμε να μελετάμε το ρόλο που παίζουν συγκεκριμένοι υποδοχείς της PGE-2 στο εντερικό επιθήλιο καθώς και τα συγκεκριμένα μονοπάτια που ενεργοποιούνται στα κύτταρα αυτά μετά την ενεργοποίηση των παραπάνω υποδοχέων από την PGE2. Οι γνώσεις αυτές είναι απαραίτητες ώστε αφενός μεν να αναπτυχθούν νέες πιο αποτελεσματικές θεραπείες με λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες, αφετέρου δε να αναπτυχθούν νέοι μοριακοί δείκτες οι οποίοι θα συμβάλλουν στην πιο έγκαιρη

εντόπιση του καρκίνου αλλά και την επιλογή της καταλληλότερης κάθε φορά θεραπείας.

3.4. Υλικά και μέθοδοι

3.4.1. Ποντικοί

Όλοι οι ποντικοί αναθράφηκαν και διατηρήθηκαν σε C57BL/6J γενετικό υπόβαθρο στις ζωικές εγκαταστάσεις του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών ‘Αλέξανδρος Φλέμιγκ’ κάτω από ειδικές συνθήκες χωρίς παθογόνα. Τα πειράματα εγκρίθηκαν από την αρμόδια Επιτροπή Αξιολόγησης Πρωτοκόλλων σε συνεργασία με τη Διεύθυνση της Κτηνιατρικής Υπηρεσίας της Ελληνικής Δημοκρατίας της Περιφέρειας Αττικής σύμφωνα με όλη την ισχύουσα Ευρωπαϊκή και εθνική νομοθεσία και πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με όλες τις σχετικές οδηγίες και κανονισμούς. Όλοι οι ποντικοί στεγάζονταν σε πρότυπα κλουβιά (με πριονίδι για υπόστρωμα) σε 12ωρο κύκλο ημέρας/νύκτας και ταΐζονταν με πρότυπη τροφή για τρωκτικά.

Οι $APC^{min/+}$ ποντικοί (Moser et al., 1990) αγοράστηκαν από τα εργαστήρια Jackson (ΗΠΑ, <https://www.jax.org/>). Οι ποντικοί $Cox-2^{ff}$ ήταν μια ευγενική προσφορά του καθηγητή H.R. Herschman (University of California, Los Angeles, USA) (Ishikawa and Herschman, 2006). Οι ποντικοί CollagenVI-Cre ήταν μια ευγενική προσφορά της Δρ. Αρμακά Μαρίας (Ε.ΚΕ.Β.Ε. Αλέξανδρος Φλέμιγκ, Βάρη, Ελλάδα) (Armaka et al., 2008).

Για τη γονοτύπηση των ποντικών χρησιμοποιήθηκε DNA που απομονώθηκε από την ουρά τους. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε ήταν:

Για την $Cox-2$: Α) 5'- AAT TAC TGC TGA AGC CCA CC-3', Β) 5'- AGA AGG CTT CCC AGC TTT TGT AAC C-3', Γ) 5'- GAA TCT CCT AGA ACT GAC TGG-3'

Για το APC^{min} : Α) 5'- TTC TGA GAA AGA CAG AAG TTA -3', Β) 5' - TTC CAC TTT GGC ATA AGG C - 3', Γ) 5' - GCC ATC CCT TCA CGT TAG - 3'

Για την Cre: Πρόσθιος) 5'-ATT ACC GGT CGA TGC AAC GAG T-3', Ανάστροφος) 5'-CAG GTA TCT CTG ACC AGA GTC A-3'

Οι συνθήκες πραγματοποίησης της PCR ήταν οι ακόλουθες:

Για την Cox-2: επανασυγκόλληση των μονών ελίκων του DNA με τους εκκινητές για 45 δευτερόλεπτα στους 60°C για 35 κύκλους, επιμήκυνση για 1 λεπτό στους 72°C.

Για το APCmin: επανασυγκόλληση των μονών ελίκων του DNA με τους εκκινητές για 2 λεπτά στους 56°C για 29 κύκλους, επιμήκυνση για 3 λεπτά στους 72°C.

Για την Cre: επανασυγκόλληση των μονών ελίκων του DNA με τους εκκινητές για 1 λεπτό στους 57°C και επιμήκυνση για 1 λεπτό στους 72°C για 5 κύκλους, έπειτα επανασυγκόλληση των μονών ελίκων του DNA με τους εκκινητές για 40 δευτερόλεπτα στους 55°C και επιμήκυνση για 1 λεπτό στους 72°C για 25 κύκλους.

Σε όλα τα πειράματα προσπαθήσαμε να χρησιμοποιήσουμε ίσους αριθμούς αρσενικών και θηλυκών ποντικών από κάθε γονότυπο. Επιπρόσθετα, σε όλα τα πειράματα, τα ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από την ίδια γέννα ή τουλάχιστον ‘συστεγάζονταν’ στο ίδιο κλουβί από την ημέρα του απογαλακτισμού τους κι έπειτα.

3.4.2. Μέτρηση όγκων και απομόνωση σπληνών

Για την καταμέτρηση των όγκων, οι ποντικοί υποβλήθηκαν σε ευθανασία με τη χρήση ξηρού πάγου (όπως προβλέπεται από τους διεθνείς κανονισμούς) και απομονώθηκε το έντερο και ο σπλήνας τους. Στην ηλικία των 5,5 μηνών το έντερο μετά την πλύση του με κρύο PBS (Phosphate Buffered Saline) διανοίχτηκε κατά μήκος και καταμετρήθηκαν οι όγκοι που ήταν εμφανείς με το μάτι. Στην ηλικία των 5 και 8 εβδομάδων η μέτρηση έγινε μόνο κατά την εξέταση τομών στο μικροσκόπιο. Σε ότι αφορά τους σπλήνες, επίσης πλύθηκαν σε κρύο PBS και εν συνεχεία ζυγίστηκαν και φωτογραφήθηκαν.

3.4.3. Ιστοπαθολογική ανάλυση

Τα έντερα που απομονώθηκαν από τους ποντικούς, αφού πλύθηκαν με κρύο PBS και διανοίχτηκαν κατά μήκος, μονιμοποιήθηκαν σε φορμαλίνη στους 4°C όλη τη νύχτα. Έπειτα τοποθετήθηκαν μέσα σε παραφίνη, κόπηκαν με μικροτόμο και βάφτηκαν με Αιματοξυλίνη/Ηωσίνη (H/E). Ο υπολογισμός του μεγέθους των αδενωμάτων/όγκων έγινε με τη χρήση του λογισμικού ImageJ. Άβαφες τομές χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή χρώσεων ανοσοϊστοχημείας και ανοσοφθορισμού.

Για τη μελέτη της (νεο)αγγείωσης εντός των όγκων, άβαφες τομές εντέρου επωάστηκαν με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης CD34 (Abcam, ab81289). Έπειτα χρησιμοποιήθηκε βιοτινυλιωμένο δευτερογενές αντίσωμα (Vector Laboratories), ενώ η ανάπτυξη και ενίσχυση του σήματος έγινε με τη χρήση του κιτ της 3,3-διαμινοβενζιδίνης (Vectastain DAB, Vector Laboratories). Ως χρώση αντίθεσης χρησιμοποιήθηκε η απλή χρώση αιματοξυλίνης. Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με το μικροσκόπιο Nikon Eclipse E800 εξοπλισμένο με κάμερα Q Imaging ExiAqua και με τη βοήθεια του προγράμματος Bioquant Q-capture Pro7. Η ποσοτικοποίηση της χρώσης CD34 έγινε με τη χρήση του λογισμικού ImageJ.

3.4.4. Εκτίμηση του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης των επιθηλιακών κυττάρων

Για την εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, χορηγήθηκε στους ποντικούς ενδοπεριτοναϊκά 100mg/kg βρωμο-δεοξυ-ουριδίνη (Roche) 2 ώρες πριν την ευθανασία τους. Οι άβαφες τομές βάφτηκαν με τη χρήση του κιτ BrdU Proliferation Detection kit (BD Biosciences) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή και ως χρώση αντίθεσης χρησιμοποιήθηκε απλή χρώση αιματοξυλίνης. Η καταγραφή των BrdU θετικών κυττάρων έγινε σε τουλάχιστον 20 διαφορετικά οπτικά πεδία καθένα από τα οποία περιείχε πάνω από 1 κρύπτη και σε ότι αφορά τους όγκους κανονικοποιήθηκε ως προς το μέγεθός τους με τη χρήση του λογισμικού ImageJ.

Για την εκτίμηση της κυτταρικής απόπτωσης χρησιμοποιήθηκε το σύστημα DeadEnd Fluorimetric TUNEL (Promega) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τη χρώση των πυρήνων χρησιμοποιήθηκε η χρώση DAPI (Sigma-Aldrich). Η καταγραφή των TUNEL θετικών κυττάρων έγινε σε τουλάχιστον 20 διαφορετικά οπτικά πεδία καθένα από τα οποία περιείχε πάνω από 1 κρύπτη και σε ότι αφορά τους όγκους κανονικοποιήθηκε ως προς το μέγεθός τους με τη χρήση του λογισμικού ImageJ.

Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με το μικροσκόπιο Nikon Eclipse E800 εξοπλισμένο με κάμερα Q Imaging ExiAqua και με τη βοήθεια του προγράμματος Bioquant Q-capture Pro7.

3.4.5. Q-PCR

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε πιάτα 96 πηγαδιών στο μηχάνημα BioRad CFX96 Real-Time System, C1000 Touch Thermal Cyclers (Biorad) και τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Opticon Monitor 3.

Μετά την ευθανασία των ποντικών, κομμάτι του τελικού ειλεού ή υλικό προερχόμενο από πεπτικούς όγκους απομονώθηκαν και καταψύχθηκαν ακαριαία μέσα σε υγρό άζωτο. Το συνολικό RNA απομονώθηκε και το DNA που περιείχε καταστράφηκε με τη χρήση DNAάσης μέσω του Absolutely RNA Miniprep Kit της Agilent Technologies (Cat. No. 400800). Η αντίστροφη μεταγραφή καθώς και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το κιτ QIAGEN OneStep RT-PCR kit (Qiagen, Cat. No. 210212). Τα δείγματα κανονικοποιήθηκαν ως προς το B2M. Οι εκκινητές για όλα τα γονίδια που εξετάστηκαν αγοράστηκαν από την Qiagen: B2M (Cat. No. 01149547), β-κατενίνη (Cat. No. 00160958), cMyc (Cat. No. 00096194), CyclinD1 (Cat. No. 00154595), PPARδ (Cat. No. 00166292), Cox-2 (Cat. No. 00165347), Lgr5 (Cat. No. 00123193), Bmi1 (Cat. No. 00165798), Olfm4 (Cat. No. 01557052), Ascl2 (Cat. No. 01066513) και Sox9 (Cat. No. 00163765). Οι συνθήκες των αντιδράσεων ήταν οι εξής: αρχικά η αντίστροφη μεταγραφή έγινε στους 50°C για 10 λεπτά. Έπειτα η Q-PCR ακολούθησε το εξής πρόγραμμα: αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 10 δευτερόλεπτα, επανασυγκόλληση των μονών ελίκων του DNA με τους εκκινητές και επιμήκυνση στους 60°C για 30 δευτερόλεπτα. Ο κύκλος αυτός επαναλήφθηκε συνολικά 40 φορές.

3.4.6. Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (FACS)

Μετά την ευθανασία των ποντικών, το λεπτό τους έντερο αφαιρέθηκε, κόπηκε σε μικρά κομμάτια (0,5-1 εκ.) και πλύθηκε εκτενώς με κρύο HBSS (Gibco) στο οποίο είχε προστεθεί και διάλυμα αντιβιοτικού-αντιμυκητιακού (Gibco). Έπειτα ο ιστός επώαστηκε σε διάλυμα HBSS που περιείχε 400 U/ml Κολλαγενάση IV (Sigma-Aldrich), 1 mg/ml Διασπάση II (Roche) και 100 U/ml DNAάση I (Sigma-Aldrich) για 30-40 λεπτά στους 37°C. Το εναιώρημα κυττάρων που προέκυψε φιλτραρίστηκε μέσω φίλτρου 70 μm, πλύθηκε και επαναδιαλύθηκε σε PBS συμπληρωμένο με 5% FBS (Fetal Bovine Serum). Η βιωσιμότητα των κυττάρων ελέγχθηκε με τη χρήση της χρωστικής Trypan Blue και τα κύτταρα βάφτηκαν στους 4°C για 30 λεπτά με τα ακόλουθα αντισώματα: συζευγμένο με FITC αντι-CD11b (eBioscience, #11-0112-

85), συζευγμένο με PE αντι-F4/80 (eBioscience, #12-4801-82), συζευγμένο με APC/Cy7 αντι-CD45 (BioLegend, #103116), συζευγμένο με AlexaFluor647 αντι-Gr1 (BioLegend, #108418).

Για την ενδοκυττάρια χρώση έναντι της Cox-2, αρχικά απομονώθηκαν μεσεγχυματικά κύτταρα του εντέρου [όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά από τους (Koliaraki and Kollias, 2016)] τα οποία καλλιιεργήθηκαν για 1,5 εβδομάδα μέχρι να φτάσουν στο 3^ο πέρασμα. Έπειτα απομακρύνθηκαν από τις φλάσκες καλλιέργειας με τη χρήση διαλύματος τριψίνης-EDTA (Gibco, Thermo Fisher Scientific) και βάφτηκαν εξωκυττάρια με τη χρήση του συζευγμένου με AlexaFluor700 αντι-CD45 αντισώματος (BioLegend, #103128). Εν συνεχεία, μονιμοποιήθηκαν και η κυτταρική τους μεμβράνη κατέστη διαπερατή με τη χρήση των αντίστοιχων διαλυμάτων Μονιμοποίησης (Fixation) και Διαπερατότητας (Permeabilization) (eBioscience) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Έπειτα τα κύτταρα βάφτηκαν με συζευγμένο με AlexaFluor647 αντι-vimentin αντίσωμα (Abcam, #ab194719) και με συζευγμένο με FITC αντι-Cox2 αντίσωμα (Cayman, #10010096) σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.

Η ανάλυση όλων των παραπάνω δειγμάτων έγινε με τη χρήση του κυτταρομετρητή ροής FACS Canto II Flow cytometer (BD) και του λογισμικού FACSDiva (BD) ή του λογισμικού FlowJo (FlowJo, LLC).

3.4.7. Στατιστική ανάλυση

Σε κάθε σύγκριση που πραγματοποιήσαμε, αρχικά εξετάσαμε εάν τα δεδομένα σε κάθε ομάδα ακολουθούν κανονική (Γκαουσιανή) κατανομή χρησιμοποιώντας το D'Agostino-Pearson Omnibus τεστ κανονικότητας, το Shapiro-Wilk τεστ και το Kolmogorov-Smirnov τεστ με την Dallal-Wilkison-Lilliefors P value. Εάν τα δεδομένα όντως ακολουθούσαν κανονική κατανομή, τότε τα συγκρίναμε χρησιμοποιώντας το απλό t-test (unpaired t-test) ή το απλό t-test με τη διόρθωση κατά Welch εάν οι διακυμάνσεις των τιμών των υπό σύγκριση ομάδων διέφεραν σημαντικά σύμφωνα με το F-test. Από την άλλη μεριά, εάν τα δεδομένα δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή, τα συγκρίναμε χρησιμοποιώντας το Mann-Whitney τεστ. Τέλος, για πολλαπλές στατιστικές συγκρίσεις σε ένα συγκεκριμένο σετ δεδομένων χρησιμοποιήσαμε το ANOVA τεστ. Η στατιστική σημαντικότητα απεικονίζεται στις γραφικές παραστάσεις ως * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Βιβλιογραφία

- Araujo, L.F., Soeiro Ade, M., Fernandes Jde, L., and Serrano Junior, C.V. (2005). [Cardiovascular events: a class effect by COX-2 inhibitors]. *Arquivos brasileiros de cardiologia* 85, 222-229.
- Armaka, M., Apostolaki, M., Jacques, P., Kontoyiannis, D.L., Elewaut, D., and Kollias, G. (2008). Mesenchymal cell targeting by TNF as a common pathogenic principle in chronic inflammatory joint and intestinal diseases. *The Journal of experimental medicine* 205, 331-337.
- Castellone, M.D., Teramoto, H., Williams, B.O., Druey, K.M., and Gutkind, J.S. (2005). Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science* 310, 1504-1510.
- Cherukuri, D.P., Ishikawa, T.O., Chun, P., Catapang, A., Elashoff, D., Grogan, T.R., Bugni, J., and Herschman, H.R. (2014). Targeted Cox2 gene deletion in intestinal epithelial cells decreases tumorigenesis in female, but not male, Apc(Min/+) mice. *Mol Oncol* 8, 169-177.
- Chulada, P.C., Thompson, M.B., Mahler, J.F., Doyle, C.M., Gaul, B.W., Lee, C., Tiano, H.F., Morham, S.G., Smithies, O., and Langenbach, R. (2000). Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer research* 60, 4705-4708.
- Cuzick, J., Otto, F., Baron, J.A., Brown, P.H., Burn, J., Greenwald, P., Jankowski, J., La Vecchia, C., Meyskens, F., Senn, H.J., *et al.* (2009). Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement. *The Lancet Oncology* 10, 501-507.
- Faller, W.J., Jackson, T.J., Knight, J.R., Ridgway, R.A., Jamieson, T., Karim, S.A., Jones, C., Radulescu, S., Huels, D.J., Myant, K.B., *et al.* (2015). mTORC1-mediated translational elongation limits intestinal tumour initiation and growth. *Nature* 517, 497-500.
- FitzGerald, G.A., and Patrono, C. (2001). The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *The New England journal of medicine* 345, 433-442.
- Foersch, S., Neufert, C., Neurath, M.F., and Waldner, M.J. (2013). Endomicroscopic Imaging of COX-2 Activity in Murine Sporadic and Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Diagnostic and Therapeutic Endoscopy* 2013, 5.
- Friedrich, T., Richter, B., Gaiser, T., Weiss, C., Janssen, K.P., Einwächter, H., Schmid, R.M., Ebert, M.P., and Burgermeister, E. (2013). Deficiency of caveolin-1 in Apc(min/+) mice promotes colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 34, 2109-2118.
- Gala, M., and Chung, D.C. (2011). Hereditary colon cancer syndromes. *Seminars in oncology* 38, 490-499.
- Goessling, W., North, T.E., Loewer, S., Lord, A.M., Lee, S., Stoick-Cooper, C.L., Weidinger, G., Puder, M., Daley, G.Q., Moon, R.T., *et al.* (2009). Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. *Cell* 136, 1136-1147.
- Greenhough, A., Smartt, H.J., Moore, A.E., Roberts, H.R., Williams, A.C., Paraskeva, C., and Kaidi, A. (2009). The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 30, 377-386.
- Gruber, S.B., Ellis, N.A., Scott, K.K., Almog, R., Kolachana, P., Bonner, J.D., Kirchhoff, T., Tomsho, L.P., Nafa, K., Pierce, H., *et al.* (2002). BLM heterozygosity and the risk of colorectal cancer. *Science* 297, 2013.
- Hull, M.A., Faluyi, O.O., Ko, C.W., Holwell, S., Scott, D.J., Cuthbert, R.J., Poulson, R., Goodlad, R., Bonifer, C., Markham, A.F., *et al.* (2006). Regulation of stromal cell cyclooxygenase-2 in the ApcMin/+ mouse model of intestinal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 27, 382-391.
- Ishikawa, T.O., and Herschman, H.R. (2006). Conditional knockout mouse for tissue-specific disruption of the cyclooxygenase-2 (Cox-2) gene. *Genesis* 44, 143-149.
- Ishikawa, T.O., and Herschman, H.R. (2010). Tumor formation in a mouse model of colitis-associated colon cancer does not require COX-1 or COX-2 expression. *Carcinogenesis* 31, 729-736.

- Jasperson, K.W., Tuohy, T.M., Neklason, D.W., and Burt, R.W. (2010). Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 138, 2044-2058.
- Kettunen, H.L., Kettunen, A.S., and Rautonen, N.E. (2003). Intestinal immune responses in wild-type and *Apcmin/+* mouse, a model for colon cancer. *Cancer research* 63, 5136-5142.
- Koliarakis, V., and Kollias, G. (2016). Isolation of Intestinal Mesenchymal Cells from Adult Mice. *Bio-protocol* 6.
- Koliarakis, V., Pasparakis, M., and Kollias, G. (2015). IKKbeta in intestinal mesenchymal cells promotes initiation of colitis-associated cancer. *The Journal of experimental medicine* 212, 2235-2251.
- Ligtenberg, M.J., Kuiper, R.P., Chan, T.L., Goossens, M., Hebeda, K.M., Voorendt, M., Lee, T.Y., Bodmer, D., Hoenselaar, E., Hendriks-Cornelissen, S.J., *et al.* (2009). Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nature genetics* 41, 112-117.
- Moser, A.R., Pitot, H.C., and Dove, W.F. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 247, 322-324.
- Mutoh, M., Watanabe, K., Kitamura, T., Shoji, Y., Takahashi, M., Kawamori, T., Tani, K., Kobayashi, M., Maruyama, T., Kobayashi, K., *et al.* (2002). Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP(4) in colon carcinogenesis. *Cancer research* 62, 28-32.
- Powell, D.W., Pinchuk, I.V., Saada, J.I., Chen, X., and Mifflin, R.C. (2011). Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. *Annual review of physiology* 73, 213-237.
- Psaty, B.M., and Potter, J.D. (2006). Risks and benefits of celecoxib to prevent recurrent adenomas. *The New England journal of medicine* 355, 950-952.
- Ritchie, K.J., Walsh, S., Sansom, O.J., Henderson, C.J., and Wolf, C.R. (2009). Markedly enhanced colon tumorigenesis in *Apc(Min)* mice lacking glutathione S-transferase Pi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 20859-20864.
- Roulis M, Nikolaou C, Kotsaki E, Koliarakis V, Salpea K, Ragoussis J, Martini E, Becker C, Herschman H, Vetrano S, *et al.* (2014). An intestinal myofibroblast-specific Tpl2-Cox-2-PGE2 pathway links innate sensing to epithelial homeostasis. Manuscript under review in PNAS.
- Shaker, A., and Rubin, D.C. (2010). Intestinal stem cells and epithelial-mesenchymal interactions in the crypt and stem cell niche. *Transl Res* 156, 180-187.
- Shao, J., Jung, C., Liu, C., and Sheng, H. (2005). Prostaglandin E2 Stimulates the beta-catenin/T cell factor-dependent transcription in colon cancer. *The Journal of biological chemistry* 280, 26565-26572.
- Sonoshita, M., Takaku, K., Sasaki, N., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Narumiya, S., Oshima, M., and Taketo, M.M. (2001). Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in *Apc(Delta 716)* knockout mice. *Nature medicine* 7, 1048-1051.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine* 10, 789-799.
- Wang, D., and DuBois, R.N. (2010). The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene* 29, 781-788.
- Wang, D., and DuBois, R.N. (2013). The role of anti-inflammatory drugs in colorectal cancer. *Annual review of medicine* 64, 131-144.
- Wang, D., Wang, H., Shi, Q., Katkuri, S., Walhi, W., Desvergne, B., Das, S.K., Dey, S.K., and DuBois, R.N. (2004). Prostaglandin E(2) promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Cancer cell* 6, 285-295.
- Watanabe, K., Kawamori, T., Nakatsugi, S., Ohta, T., Ohuchida, S., Yamamoto, H., Maruyama, T., Kondo, K., Ushikubi, F., Narumiya, S., *et al.* (1999). Role of the prostaglandin E receptor subtype EP1 in colon carcinogenesis. *Cancer research* 59, 5093-5096.
- WHO (2017). International Agency for Research on Cancer: Cancer Today.

III. Περίληψη της διδακτορικής διατριβής

Τίτλος: Μελέτη του ρόλου των μεσεγχυματικών κυττάρων στη σωματική αύξηση και τον καρκίνο

Συγγραφέας: Κακλαμάνος Αιμίλιος

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα, μαζί με τα επιθηλιακά κύτταρα, συνιστούν τα δύο βασικότερα είδη κυττάρων στα σπονδυλωτά ζώα στα οποία ανήκει και ο άνθρωπος. Αποτελούν έναν αρκετά ετερογενή πληθυσμό ο οποίος περιλαμβάνει κύτταρα περισσότερο (πχ οστεοβλάστες, χονδροβλάστες κοκ) ή λιγότερο (πχ μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα) διαφοροποιημένα, και με ποικίλες δυνατότητες διαφοροποίησης σε άλλους κυτταρικούς τύπους. Στη βιβλιογραφία ωστόσο, με τον όρο «μεσεγχυματικά κύτταρα» αναφέρονται συνήθως κύτταρα όπως τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, οι ινοβλάστες και οι μυοϊνοβλάστες, τα οποία δεν είναι τελικώς διαφοροποιημένα/εξειδικευμένα αλλά παρουσιάζουν κάποια πλαστικότητα τόσο ως προς τη δυνατότητά τους να διαφοροποιούνται περαιτέρω ως απάντηση σε διάφορα ερεθίσματα όσο και ως προς τις λειτουργίες τους.

Είναι πλέον γνωστό ότι τα μεσεγχυματικά κύτταρα επιτελούν ποικίλες λειτουργίες οι οποίες είναι απαραίτητες τόσο για τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού (όπως για παράδειγμα κατά την επούλωση ενός τραύματος) όσο και στα πλαίσια της παθοφυσιολογίας κάποιας νόσου (όπως για παράδειγμα η φλεγμονή και ο καρκίνος). Ωστόσο η μεγάλη ετερογένεια μεσεγχυματικών κυττάρων που παρατηρείται μεταξύ των διαφόρων ιστών του οργανισμού αλλά ακόμη και εντός του ίδιου ιστού, καθιστά πολύ δύσκολη την αποσαφήνιση του ξεχωριστού ρόλου που κάθε ένα από αυτά τα κύτταρα παίζει στην υγεία αλλά και στη νόσο. Παράλληλα, αυξάνεται διαρκώς το ενδιαφέρον για τη στόχευση μεσεγχυματικών κυττάρων στα πλαίσια της θεραπείας διαφόρων ασθενειών για τις οποίες οι κλασικές θεραπείες δεν επαρκούν. Είναι επομένως επιτακτική η ανάγκη να μελετηθούν και να κατανοηθούν εις βάθος οι διαφορετικοί ρόλοι που παίζουν τα μεσεγχυματικά κύτταρα ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται και τις συνθήκες στις οποίες δρουν.

Με αυτό το σκοπό λοιπόν σχεδιάστηκε και η συγκεκριμένη μελέτη η οποία είχε δύο σκέλη. Αφενός μεν να μελετήσουμε το ρόλο των μεσεγχυματικών κυττάρων στη

σωματική αύξηση και αφετέρου να μελετήσουμε το ρόλο τους στον καρκίνο και συγκεκριμένα στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Από τη μία μεριά, σε ότι αφορά τη σωματική αύξηση, είναι γνωστό ότι αυτή ρυθμίζεται και καθοδηγείται κυρίως από τον άξονα εκλυτική ορμόνη της αυξητικής ορμόνης – αυξητική ορμόνη – ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας (GHRH - GH - Igf1). Επίσης είναι γνωστό ότι σε επίπεδο ιστού και κυττάρου, τα μεσεγχυματικά κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην υποστήριξη της επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού ποικίλων άλλων κυτταρικών τύπων όπως τα επιθηλιακά κύτταρα, αλλά και στη δημιουργία ολόκληρου του ιστού παρέχοντάς του έναν υποστηρικτικό σκελετό πάνω στον οποίο θα δομηθεί. Ωστόσο ο ρόλος τους στη σωματική αύξηση γενικότερα, δεν έχει μελετηθεί στη βιβλιογραφία.

Η μη αναμενόμενη έκφραση του γονιδίου της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης στα μεσεγχυματικά κύτταρα που εκφράζουν το κολλαγόνο VI στον διαγονιδιακό ποντικό TgC6hrp55 που δημιουργήσαμε στο εργαστήριό μας και ο οποίος παρουσίαζε εμφανή ενίσχυση της σωματικής του αύξησης, μας έδωσε τη δυνατότητα να μελετήσουμε το ρόλο της ιστοειδικής έκφρασης της αυξητικής ορμόνης από το μεσέγχυμα. Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης στους TgC6hrp55 ποντικούς εντοπίστηκε σε διάφορους ιστούς όπως ο εγκέφαλος, η καρδιά και οι σκελετικοί μύες και σε χαμηλότερα επίπεδα οι πνεύμονες, οι νεφροί, ο σπλήνας, ο λιπώδης ιστός (λευκός και καφέ) και το έντερο, αλλά και στη συστηματική κυκλοφορία τους, οδηγώντας σε ποικίλες φαινοτυπικές αλλαγές.

Αρχικά, οι ποντικοί παρουσίαζαν ενισχυμένη σωματική αύξηση (αυξημένο μήκος και βάρος σώματος) ήδη από την 3^η εβδομάδα της ζωής τους. Η αύξηση του σωματικού βάρους οφειλόταν κυρίως στην αναλογική αύξηση του βάρους των εσωτερικών τους οργάνων και γενικότερα της άλιπης μάζας τους, αλλά και σε μια επιπλέον αύξηση του λευκού λιπώδους ιστού η οποία παραπέμπει σε εικόνα ήπιας παχυσαρκίας. Παράλληλα, οι διαγονιδιακοί ποντικοί, πιθανότατα λόγω της έκφρασης της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης στον εγκέφαλό τους και κυρίως στην υπόφυση και τον υποθάλαμο, εμφάνισαν υπερφαγία αλλά και αυξημένο μεταβολισμό με εντονότερη κινητοποίηση υδατανθράκων ως πηγή ενέργειας κατά τις βραδινές ώρες (ώρες αυξημένων αναγκών για τα τροφικά), με το τελικό ημερήσιο ισοζύγιο ενέργειάς τους να είναι θετικό και αυξημένο σε σχέση με τους ποντικούς μάρτυρες.

Το γεγονός αυτό εξηγεί πιθανότατα και την παρατηρούμενη εικόνα παχυσαρκίας. Επιπλέον, σε ότι αφορά το μεταβολικό τους προφίλ, οι TgC6hp55 ποντικοί παρουσίασαν εικόνα παρόμοια με τα αρχικά στάδια του σακχαρώδη διαβήτη στον άνθρωπο, δηλαδή αντοχή στην ινσουλίνη με ταυτόχρονη υπεριουνουλιναιμία, καταφέροντας έτσι να διατηρήσουν την ευγλυκαιμία τους.

Σε συμφωνία με τα παραπάνω, η ιστολογική εξέταση των διαγονιδιακών ποντικών ανέδειξε την προοδευτική συσσώρευση λιπιδίων στο ήπαρ η οποία εξελίχθηκε σε μέτρια μακροοζώδη ηπατική στεάτωση, αλλά και τη μειωμένη αποθήκευση ηπατικού γλυκογόνου, ενώ τα ευρήματα αυτά συνοδεύονταν και από αλλαγές σε επίπεδο έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό λιπιδίων, πρωτεϊνών και υδατανθράκων στο ήπαρ. Επίσης, και τα λιποκύτταρα του λευκού λιπώδους ιστού παρουσίαζαν μεγαλύτερο μέγεθος λόγω μεγαλύτερης συσσώρευσης και αποθήκευσης λιπιδίων. Τέλος, μια σειρά από παραμέτρους της φυσιολογίας των ποντικών όπως είναι κάποιες βιοχημικές παράμετροι (αλβουμίνη, ολική πρωτεΐνη, τριγλυκερίδια, σίδηρος κλπ), κυτταρολογικοί δείκτες (αιματοκρίτης, αιμοσφαιρίνη, λευκά αιμοσφαίρια κλπ) αλλά και δείκτες του μεταβολισμού των οστών (οστική πυκνότητα, αλκαλική φωσφατάση κλπ) παρουσίασαν αλλαγές σε σύγκριση με τους ποντικούς μάρτυρες.

Η παρεμπόδιση της δράσης της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης μέσω του φαρμακολογικού αποκλεισμού του υποδοχέα της, οδήγησε σε αναστροφή των κύριων χαρακτηριστικών του παρατηρούμενου φαινοτύπου, επιβεβαιώνοντας την αιτιολογική σχέση της -παραγόμενης από το μεσέγχυμα- ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης με το φαινότυπο των TgC6hp55 ποντικών.

Η διατήρηση των επιπέδων του Igf-1 στο αίμα των TgC6hp55 ποντικών σε φυσιολογικά επίπεδα παρά την παρουσία της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης στη συστηματική κυκλοφορία τους μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανότατα ο κύριος μηχανισμός δράσης της στους TgC6hp55 ποντικούς ήταν μέσω της τοπικής έκφρασής της από το μεσέγχυμα διαφόρων οργάνων και της εν συνεχεία παρακρινούς δράσης της σε αυτά, συνεπικουρούμενη και από κάποιες συστηματικές δράσεις. Παράλληλα, επειδή η αυξητική ορμόνη του ανθρώπου στον ποντικό ενεργοποιεί και τον υποδοχέα της προλακτίνης, είναι πιθανό κάποια πιο δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του παρατηρούμενου φαινοτύπου να οφείλονται και σε έναν τέτοιο μηχανισμό.

Συνοπτικά, η μελέτη μας έδειξε ότι η τοπική έκφραση της αυξητικής ορμόνης από τα μεσεγχυματικά κύτταρα που εκφράζουν το κολλαγόνο VI, μπορεί να δράσει τόσο σε τοπικό όσο και σε συστηματικό επίπεδο επηρεάζοντας σημαντικά τη σωματική αύξηση του ποντικού αλλά και μια ποικιλία από παραμέτρους της φυσιολογίας του.

Από την άλλη μεριά, σε ότι αφορά τον καρκίνο του παχέος εντέρου, είναι γνωστό ότι πέρα από τα καρκινικά κύτταρα αυτά καθαυτά, σημαντικότερο ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου παίζει και το λεγόμενο «μικροπεριβάλλον» του όγκου το οποίο αποτελείται από μια σειρά άλλα κύτταρα όπως τα μεσεγχυματικά, τα ενδοθηλιακά και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα κύτταρα αυτά, μέσω ποικίλων μορίων που παράγουν κι εκκρίνουν μπορούν να επιδρούν στα καρκινικά κύτταρα και να ενισχύουν την καρκινογένεση. Για παράδειγμα, έχειδειχτεί ότι η κυκλοοξυγενάση-2 που παράγεται στους όγκους, μέσω της παραγωγής προσταγλανδίνης E2 συμβάλει στην ενίσχυση της καρκινογένεσης μέσω πολλών και διαφορετικών μηχανισμών (ενίσχυση του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων αλλά και αποφυγή της απόπτωσης, ενίσχυση της αγγειογένεσης, αποφυγή της ανοσολογικής επιτήρησης κλπ.). Μάλιστα, όλο και περισσότερες μελέτες υποδηλώνουν ως πηγή της κυκλοοξυγενάσης-2 τα μεσεγχυματικά κύτταρα του εντέρου που βρίσκονται κάτω από τις εντερικές κρύπτες. Σκοπός μας λοιπόν ήταν η μελέτη του ρόλου της κυκλοοξυγενάσης-2 που παράγεται από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες στην καρκινογένεση του εντέρου.

Αξιοποιώντας τους CollagenVI-Cre ποντικούς, αδρανοποιήσαμε ιστοειδικά στους εντερικούς μυοϊνοβλάστες την κυκλοοξυγενάση-2 σε ένα πολύ καλά χαρακτηρισμένο πειραματικό πρότυπο καρκινογένεσης του εντέρου, τους ποντικούς APC^{min/+}. Φυσιολογικά, οι ποντικοί αυτοί παρουσιάζουν αυτόματα δεκάδες έως εκατοντάδες αδενώματα-όγκους στο έντερό τους και εμφανίζουν προσδόκιμο επιβίωσης γύρω στους 6 μήνες. Ωστόσο, μετά την αδρανοποίηση της κυκλοοξυγενάσης-2 από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες των ποντικών αυτών (APC^{min/+}ColVICreCox2^{f/f} ποντικοί), ο αριθμός των αναπτυσσόμενων όγκων/αδενωμάτων μειώθηκε κατά τουλάχιστον 50%. Η μείωση αυτή, αν και δε συνοδεύτηκε από μείωση του μεγέθους των αναπτυσσόμενων όγκων, εντούτοις συνοδεύτηκε από βελτιωμένη κλινική εικόνα και κυρίως από σημαντική επέκταση της διάρκειας ζωής των ποντικών. Η παρουσία μειωμένου αριθμού μικροαδενωμάτων κατά τα πολύ αρχικά στάδια της καρκινογένεσης στους APC^{min/+}ColVICreCox2^{f/f} ποντικούς υποδηλώνει ότι η

κυκλοοξυγενάση-2 που παράγεται από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες πιθανότατα επηρεάζει κυρίως την έναρξη της καρκινογένεσης και όχι την εξέλιξη αυτής.

Από μηχανιστικής απόψεως, η μεσεγχυματική κυκλοοξυγενάση-2 φαίνεται να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων ακόμη και στο φαινομενικά «υγιές» έντερο, χωρίς ωστόσο να επιδρά στην απόπτωση αυτών. Επίσης φαίνεται να μην επηρεάζει ούτε την (νεο)αγγειογένεση εντός των όγκων αλλά ούτε και τη διήθησή τους από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Τέλος, σε μοριακό επίπεδο, είδαμε πως η προερχόμενη από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες κυκλοοξυγενάση-2 επιδρά στο σηματοδοτικό μονοπάτι της β-κατενίνης αλλά και στην έκφραση διαφόρων δεικτών μεσεγχυματικών κυττάρων ενισχύοντας έτσι τη διαδικασία της καρκινογένεσης.

Συνοπτικά, η μελέτη μας επιβεβαίωσε *in vivo* το σημαντικότερο ρόλο που παίζει η σηματοδότηση μέσω της κυκλοοξυγενάσης-2 που προέρχεται από τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες για τη διαδικασία της καρκινογένεσης του εντέρου, αλλά και την επικοινωνία που υπάρχει μεταξύ μεσεγχύματος και εντερικού επιθηλίου. Ωστόσο περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες ώστε να διαλευκανθούν τα ακριβή μοριακά μονοπάτια τα οποία καθοδηγούν την εμφάνιση της νόσου αυτής. Επίσης πρέπει να έχουμε κατά νου και μια αδυναμία της μελέτης μας. Η απαλοιφή της κυκλοοξυγενάσης-2 με τη χρήση των ποντικών *CollagenVI-Cre* αφενός μεν δεν πραγματοποιείται με 100% αποτελεσματικότητα μεταξύ των μυοϊνοβλαστών που εκφράζουν το κολλαγόνο VI, κι αφετέρου δεν πραγματοποιείται σε όλους τους εντερικούς μυοϊνοβλάστες (υπάρχουν μυοϊνοβλάστες που δεν εκφράζουν το κολλαγόνο VI), κι επομένως στους *APC^{min/+}ColVICreCox2^{fl/f}* ποντικούς υπάρχουν ακόμη εντερικοί μυοϊνοβλάστες οι οποίοι παράγουν κυκλοοξυγενάση-2. Επομένως, η 100% απαλοιφή της Cox-2 από τους μυοϊνοβλάστες που παράγουν κολλαγόνο VI ή η απαλοιφή της από άλλους πληθυσμούς εντερικών μυοϊνοβλαστών θα μπορούσε να δώσει ακόμη καλύτερα αποτελέσματα και να βοηθήσει στη διαλεύκανση του εξειδικευμένου ρόλου των κυττάρων αυτών στην καρκινογένεση του εντέρου. Γενικότερα λοιπόν, επιπλέον πειράματα που βρίσκονται ήδη σε εξέλιξη τόσο στο εργαστήριό μας όσο και από συνεργάτες μας, θα βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας του καρκίνου του παχέος εντέρου με σκοπό την ανάπτυξη αποτελεσματικότερων και πιο στοχευμένων (με λιγότερες ανεπιθύμητες

ενέργειες) θεραπειών αλλά και την ανάπτυξη δεικτών για την καλύτερη διάγνωση και πρόγνωση των ασθενών με τη νόσο αυτή.

IV. Summary of PhD thesis

Title: Studying the role of mesenchymal cells in somatic growth and cancer

Author: Kaklamanos Aimilios

Mesenchymal and epithelial cells consist two of the main cell types in vertebrates such as humans. Mesenchymal cells constitute a quite heterogeneous population which consists of cells that are more (e.g. osteoblasts, chondroblasts) or less (e.g. mesenchymal stem cells) differentiated, with varying capabilities for differentiation in other cell types. In literature, the term “mesenchymal cells” usually refers to cells like mesenchymal stem cells, fibroblasts and myofibroblasts, which are not terminally differentiated/specialized but exhibit some plasticity both regarding their capabilities for further differentiation as a response to different stimuli and regarding to their functions.

It is now well known that mesenchymal cells play a key role in functions that are essential both for the preservation of homeostasis (e.g. during wound healing) and in the context of a disease (e.g. inflammation or cancer). However, the great heterogeneity of mesenchymal cell types that is observed among different tissues as well as inside the same tissue makes the detection and clarification of the specific roles that each one of these cells plays in health and disease a quite difficult task. In parallel though, there is increased interest in targeting mesenchymal cells as a treatment for different diseases for which the conventional treatments have failed or are ineffective. It is therefore crucial to study and understand deeper the different roles that mesenchymal cells play according to the context and the conditions in which they act.

This was also the aim of this project which consists of two parts. On the one hand, to study the role of mesenchymal cells in somatic growth, and on the other hand to study their role in cancer and specifically in colorectal cancer.

Regarding somatic growth, it is known (and has been described in detail) that it is mainly controlled by the axis growth hormone releasing hormone – growth hormone – insulin-like growth factor 1 (GHRH - GH - Igf1). Additionally, it is known that in the

level of a tissue or a cell, mesenchymal cells play an important role in supporting the survival and proliferation of many other cell types (like the epithelial cells) as well as in the generation of the whole tissue since they provide a scaffold on which the tissue will be formed. However their role in somatic growth has not been studied in literature.

The unexpected expression of the human growth hormone gene in the collagen VI expressing mesenchymal cells of our new transgenic mice (called TgC6hp55) which exhibited enhanced somatic growth gave us the opportunity to study the role of tissue-specific expression of the growth hormone from the mesenchyme. More specifically, the human growth hormone was found to be expressed in many different tissues like brain, heart and skeletal muscle, as well as (although in smaller quantities) in lungs, kidneys, spleen, adipose tissue (both white and brown), intestine, and was also detected in the circulation of the transgenic mice inducing a variety of phenotypic changes in them.

Initially, the transgenic mice exhibited enhanced somatic growth (increased body length and body weight) starting already from the 3rd week of age. The increased body weight could be attributed to the proportionally increased weight of their internal organs and lean mass and also to a disproportional increase in white adipose tissue which points towards a mild obesity-like phenotype. In the same time, probably due to the expression of the human growth hormone in their brain (mainly in their pituitary and hypothalamus), the mice showed hyperphagia as well as increased metabolism and enhanced mobilization of carbohydrates as a source of energy during night (when nocturnal animals have increased energy demands), with the daily energy surplus being positive and increased in comparison to their wt controls. This observation could explain their obesity-like phenotype we described before. Additionally, regarding their metabolic profile, the TgC6hp55 mice presented a phenotype resembling the initial stages of diabetes mellitus in humans since they were insulin resistant but remained normoglycemic due to the increased insulin production they had (hyperinsulinemia).

In accordance with the previous findings, histological examination of the transgenic mice revealed the progressive accumulation of lipids in their livers which developed in a moderate macrovesicular hepatic steatosis, as well as decreased storage of hepatic

glycogen. These findings were followed by alterations in the expression of genes that regulate lipid, protein and carbohydrate metabolism in the liver. Moreover, the adipocytes of the white adipose tissue were also enlarged due to the increased accumulation and storage of lipids inside them. Finally, we detected alterations in a series of physiological parameters of the transgenic mice like biochemical parameters (serum albumin, total protein, triglycerides, iron etc.), cytological parameters (hematocrit, hemoglobin, white blood cells etc.) as well as in markers of bone metabolism (bone mineral density, alkaline phosphatase etc.).

The inhibition of human growth hormone activity through the pharmacological blockade of its receptor led to an inversion of the main phenotypic characteristics of the TgC6hp55 mice, thus confirming the etiological relation between the mesenchymally produced human growth hormone and the observed phenotype.

The fact that the Igf-1 serum levels were unchanged in the TgC6hp55 mice despite the presence of the human growth hormone in their circulation leads to the conclusion that probably the main mechanism of action of this hormone in the TgC6hp55 mice was through its local expression by the mesenchyme of different organs and its subsequent paracrine actions in them, assisted by some additional systemic effects. Simultaneously, since the human growth hormone can activate also the prolactin receptor of the mouse, it is possible that some secondary features of the observed phenotype could be attributed to this mechanism.

As a conclusion, our study showed that the local expression of growth hormone from the collagen VI expressing mesenchymal cells can act both on a local and on a systemic level thus affecting not only somatic growth but also various other physiological parameters of the mouse.

On the other hand, regarding colorectal cancer, it is known that apart from the cancer cells per se, the tumor “microenvironment” plays also a very important role in the initiation and development of the disease. This microenvironment consists of different cell types like mesenchymal, endothelial and immune cells, which through the production of different molecules have the ability to affect the cancer cells and enhance tumorigenesis. For example, it has been shown that cyclooxygenase-2 (Cox-2) that is produced by tumors, through the production of prostaglandin E2 (PGE2), enhances colorectal carcinogenesis via many different mechanisms (enhancement of

the proliferation and survival of cancer cells, avoidance of apoptosis, promotion of angiogenesis, avoidance of the immune surveillance etc.). Interestingly, more and more publications suggest as a source of this Cox-2 the mesenchymal cells that are located underneath the intestinal crypts. Therefore, the aim of our study was to examine the role of Cox-2 that is produced by the intestinal myofibroblasts in colorectal carcinogenesis.

For this reason, we used the CollagenVI-Cre mice in order to genetically delete, in a tissue-specific way, the Cox-2 from the intestinal myofibroblasts in a very common and well characterized mouse model of colorectal carcinogenesis, the $APC^{min/+}$ mouse. Normally these mice develop spontaneously dozens or hundreds of adenomas/tumors in their intestine and therefore have a life expectancy of up to 6 months. However, after the deletion of Cox-2 from their intestinal myofibroblasts ($APC^{min/+}ColVICreCox2^{ff}$ mice), the number of the developed adenomas/tumors was decreased more than 50%. This reduction, despite not being accompanied by a reduction in tumor size, led to a decreased disease severity and an important elongation of the life duration of these mice. The fact that the $APC^{min/+}ColVICreCox2^{ff}$ mice showed fewer microadenomas already from the initial stages of carcinogenesis, suggests that the Cox-2 coming from the intestinal myofibroblasts probably affects the initiation of carcinogenesis and not its development.

From a mechanistic point of view, mesenchymally produced Cox-2 seems to affect proliferation of the intestinal epithelial cells even in the seemingly “healthy” intestine without affecting their apoptosis. Additionally, it seems not to affect (neo)angiogenesis or immune infiltration of the tumor.

Finally, on a molecular level, we found that Cox-2 coming from the intestinal myofibroblasts affects the b-catenin pathway as well as a series of stem cell markers, thus enhancing intestinal carcinogenesis.

As a conclusion, our study confirmed in vivo the important role that the Cox-2 signaling in the intestinal myofibroblasts plays in the procedure of intestinal carcinogenesis, as well as the crosstalk that exists between mesenchyme and intestinal epithelium. However, further studies are needed to elucidate the exact molecular pathways that drive this disease. Moreover, we must be aware of one important

drawback of our study. Genetic deletion of Cox-2 using the CollagenVI-Cre mice, on the one hand is not 100% efficient among CollagenVI⁺ intestinal myofibroblasts, and on the other hand does not affect CollagenVI⁻ intestinal myofibroblasts. Therefore, in the *APC^{min/+}ColVICreCox2^{f/f}* mice there are still intestinal myofibroblasts that keep expressing Cox-2. Complete (100%) genetic deletion of Cox-2 from the CollagenVI intestinal myofibroblasts or even deletion from other types of intestinal myofibroblasts, could give us even better results and help enlighten the specific roles that these cells play in intestinal carcinogenesis. In general, extra experiments that are already running in our lab or in our collaborator's labs will be very helpful for the better understanding of the pathophysiology of colorectal cancer, so that we can develop more effective and targeted (with less side-effects) treatments as well as markers for better diagnosis and prognosis for patients with this devastating disease.

Παράρτημα 1: Αγγλικό πρωτότυπο του Π-2

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Extensive phenotypic characterization of a new transgenic mouse reveals pleiotropic perturbations in physiology due to mesenchymal *hGH* minigene expression

Aimilios Kaklamanos¹, Jan Rozman^{4,5}, Manolis Roulis^{1,9}, Niki Karagianni², Maria Armaka¹, Moya Wu⁴, Laura Brachthäuser^{4,7}, Julia Calzada-Wack⁴, Marion Horsch⁴, Johannes Beckers^{4,5,8}, Birgit Rathkolb^{4,5,6}, Thure Adler⁴, Frauke Neff^{4,7}, Eckhard Wolf^{5,6}, Valerie Gailus-Durner⁴, Helmut Fuchs⁴, Martin Hrabe de Angelis^{4,5,8} & George Kollias^{1,3}

The human growth hormone (*hGH*) minigene used for transgene stabilization in mice has been recently identified to be locally expressed in the tissues where transgenes are active and associated with phenotypic alterations. Here we extend these findings by analyzing the effect of the *hGH* minigene in TgC6hp55 transgenic mice which express the human TNFR1 under the control of the mesenchymal cell-specific CollagenVI promoter. These mice displayed a fully penetrant phenotype characterized by growth enhancement accompanied by perturbations in metabolic, skeletal, histological and other physiological parameters. Notably, this phenotype was independent of TNF-TNFR1 signaling since the genetic ablation of either *Tnf* or *Tradd* did not rescue the phenotype. Further analyses showed that the *hGH* minigene was expressed in several tissues, also leading to increased *hGH* protein levels in the serum. Pharmacological blockade of GH signaling prevented the development of the phenotype. Our results indicate that the unplanned expression of the *hGH* minigene in CollagenVI expressing mesenchymal cells can lead through local and/or systemic mechanisms to enhanced somatic growth followed by a plethora of primary and/or secondary effects such as hyperphagia, hypermetabolism, disturbed glucose homeostasis, altered hematological parameters, increased bone formation and lipid accumulation in metabolically critical tissues.

¹Biomedical Sciences Research Center (B.S.R.C.) "Alexander Fleming", 16672, Vari, Greece. ²Biomedcode Hellas SA, Vari, Greece. ³Department of Physiology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, 11527, Athens, Greece. ⁴German Mouse Clinic, Institute of Experimental Genetics, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health GmbH, Ingolstädter Landstrasse 1, 85764, Neuherberg, Germany. ⁵German Center for Diabetes Research (DZD), Ingolstädter Landstrasse 1, 85764, Neuherberg, Germany. ⁶Ludwig-Maximilians-Universität München, Gene Center, Institute of Molecular Animal Breeding and Biotechnology, Feodor-Lynen Strasse 25, 81377, Munich, Germany. ⁷Institute of Pathology, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, Ingolstädter Landstrasse 1, 85764, Neuherberg, Germany. ⁸Chair of Experimental Genetics, Center of Life and Food Sciences Weihenstephan, Technische Universität München, Ingolstaedter Landstrasse 1, 85354, Freising, Weihenstephan, Germany. ⁹Present address: Department of Immunobiology, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, 06520, USA. Aimilios Kaklamanos and Jan Rozman contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to G.K. (email: kollias@fleming.gr)

Early during the development of transgenic technologies in mice it was realized that homologous and heterologous intronic sequences and polyadenylation signals are essential for the stabilization and efficient expression of the transgene of interest^{1,2}. It was in the early 1990s when scientists, for this exact purpose, started using the so-called *hGH* minigene which consists of the entire human growth hormone coding region, including introns and a polyadenylation signal^{3,4}. At that time and for many years afterwards, it was believed that since the *hGH* minigene was the second cistron in the transgene-encoded mRNA, it would not be expressed. Therefore this technique was widely used in the generation of new transgenic lines^{5–10}, especially in mice designed to express the Cre-recombinase. The number of mice that carry the *hGH* minigene nowadays exceeds 200¹¹ (indicatively, only the different pancreatic β -cell specific transgenic mice are at least 22 as reported by Brouwers *et al.*¹²).

However, during the last years there has been an increasing number of publications reporting the expression of this minigene with subsequent effects on the mouse phenotype^{12–18}. For example the expression of the *hGH* minigene specifically in the pancreatic β -cells of the mouse negatively affects β -cell physiology as well as glucose and insulin homeostasis^{12–14,17}. Additionally, the expression of the *hGH* minigene in the mouse brain (either in the hypothalamus or in the pituitary) leads to growth defects and metabolic deregulations through its interaction with the endogenous GHRH-GH-IGF1 axis^{15,16,18}. The finding that hGH can bind to and activate both the mouse GH receptor and the mouse prolactin receptor (PRLR)¹⁹ adds another level of complexity in the effects of the unplanned *hGH* minigene expression.

Unfortunately though, in the vast majority of the 200 transgenic mice mentioned above, the authors did not examine whether the *hGH* minigene was expressed, and if they did, they did not examine whether the produced hGH was functional^{8,20–22}. Furthermore, the publications that described the production and functionality of the hGH (coming from the *hGH* minigene) examined only the local effects at the tissue-site of expression and did not assess the possible systemic effects of circulating hGH occurring through less predictable mechanisms^{12–18}. Therefore, the ‘safety’ and/or suitability of using mice containing this specific minigene is still debatable since only now we have started discovering the pitfalls related with this technique which has been in use for more than 20 years.

We have previously shown that TNF signaling through its receptor 1 (TNFR1) in the mesenchyme is sufficient to drive pathogenesis in mouse models of Rheumatoid Arthritis and Crohn’s-like Inflammatory Bowel Disease²³. From the two receptors of TNF, named TNFR1 and TNFR2, human TNFR1 can recognize mouse TNF and vice versa, while this is not the case for TNFR2²⁴. In order to study the role of TNF-TNFR1 signaling in the mesenchyme in a humanized background, we generated the TgC6hp55 transgenic mice which, additionally to the mouse *Tnfr1*, express the human TNFR1 specifically in the mesenchymal compartment under the control of the Col6a1 (simply CollagenVI or ColVI) promoter²⁵. It has been previously shown in transgenic embryos that the CollagenVI promoter is active in mesenchymal cells in many different tissues like skin insertions of the superficial aponeurosis, joints, nerves, intervertebral discs, vibrissae, skeletal muscle, meninges, tendons, sub-epidermal mesenchyme, heart, blood vessels, adipose tissue, cartilage, central nervous system and retina (ectopic expression), while there are some hints for expression in other tissues like lungs, intestine, kidney, periosteum, perichondrium, serosae, bladder²⁵.

Here we show that the expression of the *hGH* minigene in the CollagenVI expressing mesenchymal cells in various tissues can lead to previously undescribed alterations in mouse physiology. The extensive phenotypic characterization of the transgenic mice TgC6hp55 discovered no signs of spontaneous inflammation and/or autoimmunity but revealed a variety of perturbations in many different aspects of their physiology including somatic growth, skeletal characteristics, as well as histological alterations in the liver and adipose tissue that suggested enhanced lipid storage. Many findings resemble effects of transgenic systemic growth hormone overexpression. Our molecular analysis uncovered the expression of the *hGH* minigene in different tissues and our pharmacological experiments confirmed the causal relation between the produced hGH and the observed phenotype. Our findings describe for the first time the plethora of local and/or systemic effects that the *hGH* minigene can have when expressed in the mesenchymal compartment.

Results

Generation of the TgC6hp55 transgenic mice and assessment of transgene expression. For the generation of the TgC6hp55 mice, a 1.5 kb fragment encompassing the *hTNFR1* coding DNA sequence (CDS)²⁶ was inserted downstream of the 7.5 kb 5′-flanking region of the *CollagenVI(a1)* promoter²⁵, followed by a 2.1 kb *hGH* minigene²⁷ (Fig. 1A). Transgenic integration was confirmed by PCR analysis. One male mouse that was found to carry the transgene was used for the establishment of the TgC6hp55 mouse line (Founder 1) (Fig. 1B). Next, following the same procedure, we generated a second mouse carrying the same transgene (Founder 2). The mouse lines were backcrossed to a C57BL/6J background for more than 8 generations. Q-PCR analysis of the transgene copy number showed the insertion of 2 copies into the mouse genome of the first founder and of 14 copies into the mouse genome of the second founder. Despite the difference in copy number between the two founders, the two transgenic mouse lines exhibited exactly the same body weight, suggesting that the difference in copy number does not have a different effect on the gross phenotype (Fig. 1C). Therefore, in order to avoid extra complications due to the increased copy number described in the second founder, we focused our main analysis to the first founder.

Q-PCR analysis in different tissues of the TgC6hp55 mice confirmed human TNFR1 expression from the transgene. High expression levels were found in skeletal muscle and spleen, followed by lower levels of expression in abdominal white adipose tissue (WAT) and heart, expression at detection levels in lung, kidney, brown adipose tissue (BAT), brain, ileum and colon and no expression (or expression below detection levels) in the liver (Fig. 1D). Skeletal muscle, heart and intestine are typical sites of CollagenVI expression, while lung, kidney, liver, brain and adipose tissue have also been reported to express CollagenVI in some cases^{23,25}. As for the spleen, although it is not regarded as a typical CollagenVI expressing tissue, we have recently shown that there are cells in

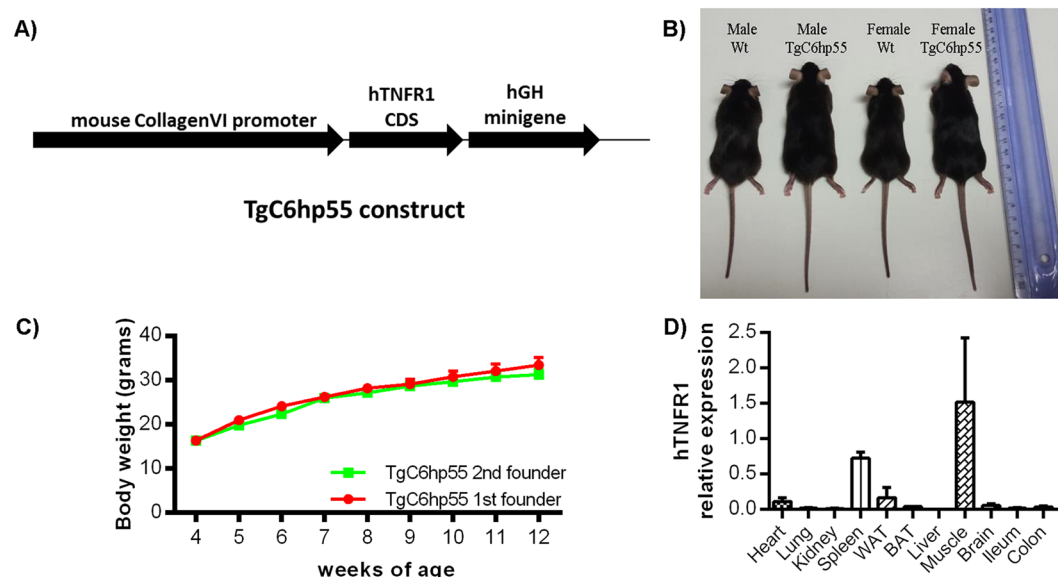


Figure 1. TgC6hp55 mice express the human TNFR1 under the CollagenVI promoter and show increased body size. **(A)** The construct used for the generation of the TgC6hp55 mice. **(B)** Macroscopic comparison of male and female transgenic mice versus their wild type littermates at the age of 3 months. **(C)** Comparison of the body weights of the two founders and the transgenic mice coming from them. At all time points there is no statistically significant difference between the two curves. **(D)** Q-PCR analysis for the detection of the human TNFR1 mRNA in different tissues from $n = 3$ TgC6hp55 mice. WAT, abdominal white adipose tissue; BAT, brown adipose tissue.

the spleen that express CollagenVI²⁸. Therefore the expression pattern of the transgene is in agreement with the mesenchymal expression of CollagenVI in different tissues.

TgC6hp55 transgenic mice show enhanced somatic growth accompanied by alterations in various parameters of their physiology. The phenotypic characterization of the TgC6hp55 mice in collaboration with the German Mouse Clinic (GMC) included macroscopic examination as well as examination regarding bone/skeletal morphology, hematological and biochemical blood parameters, immunology, neurology, nociception, allergies, cardiovascular system and eye morphology/function^{29,30}. (The phenotyping pipeline used is described in detail in the Materials and Methods section).

TgC6hp55 mice showed by 3 weeks of age an increased body weight as compared to their wild type littermates (Fig. 2A and Supplementary Fig. S1) and an increased body length as assessed in three different time points (1 month, 3 months and 11 months old) (Fig. 2B). MicroCT analysis of the right femur showed that TgC6hp55 mice also had increased bone length (Fig. 2C and D). At the same time points, as shown in Fig. 2E, most of the organs from the transgenic mice were heavier than their controls. Furthermore, as shown in Fig. 2F, the normalized weights of these organs did not differ significantly from their controls, indicating a generally enhanced somatic growth. Only white adipose tissue's (WAT) normalized weight was increased in the transgenic mice hinting towards an additional obesity-like phenotype. A whole body composition analysis at the age of 13 weeks (also repeated at 19 weeks) using quantitative Nuclear Magnetic Resonance (qNMR) showed an increase in both lean and fat mass in the transgenic mice (Supplementary Fig. S2). When normalized according to total body weight, the fat mass was found to be increased in the TgC6hp55 mice while the lean mass slightly decreased (Supplementary Fig. S2). Analysis using linear regression analysis of the fat tissue mass weight in correlation to body weight (Fig. 2G) according to Packard and Boardman³¹ confirmed that the normalized total fat tissue weight in the TgC6hp55 mice is bigger than in wt.

A 2-days indirect calorimetry analysis including monitoring of food uptake revealed that TgC6hp55 mice are both hyperphagic (increased energy uptake) and hypermetabolic (increased energy expenditure) (Supplementary Fig. S3) with their total daily energy surplus (daily energy uptake of metabolizable energy minus daily energy expenditure) being positive and increased (Fig. 3A). Additionally, examination of the glucose homeostasis and insulin sensitivity using an intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) (Fig. 3B), an intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT) (Fig. 3C) and a hyperinsulinemic-euglycemic clamp [including glucose infusion rate (GINF) (Fig. 3D) and insulin sensitive suppression of endogenous hepatic glucose production (Fig. 3E)] revealed that the TgC6hp55 mice were insulin resistant. Nevertheless, they stayed normoglycemic under steady-state conditions (Fig. 3F) due to the hyperinsulinemia they were exhibiting accompanied by an enhanced glucose stimulated insulin secretion (GSIS) (Fig. 3G) which both resulted in normal glucose uptake from the skeletal muscle and the WAT (Fig. 3H). This enhanced glucose-stimulated insulin secretion can also explain the decreased blood glucose levels observed in the TgC6hp55 mice during the ipGTT shown in Fig. 3B. Finally, the 2-days indirect calorimetry uncovered an interesting increase in carbohydrate utilization by the transgenic mice during the night (the

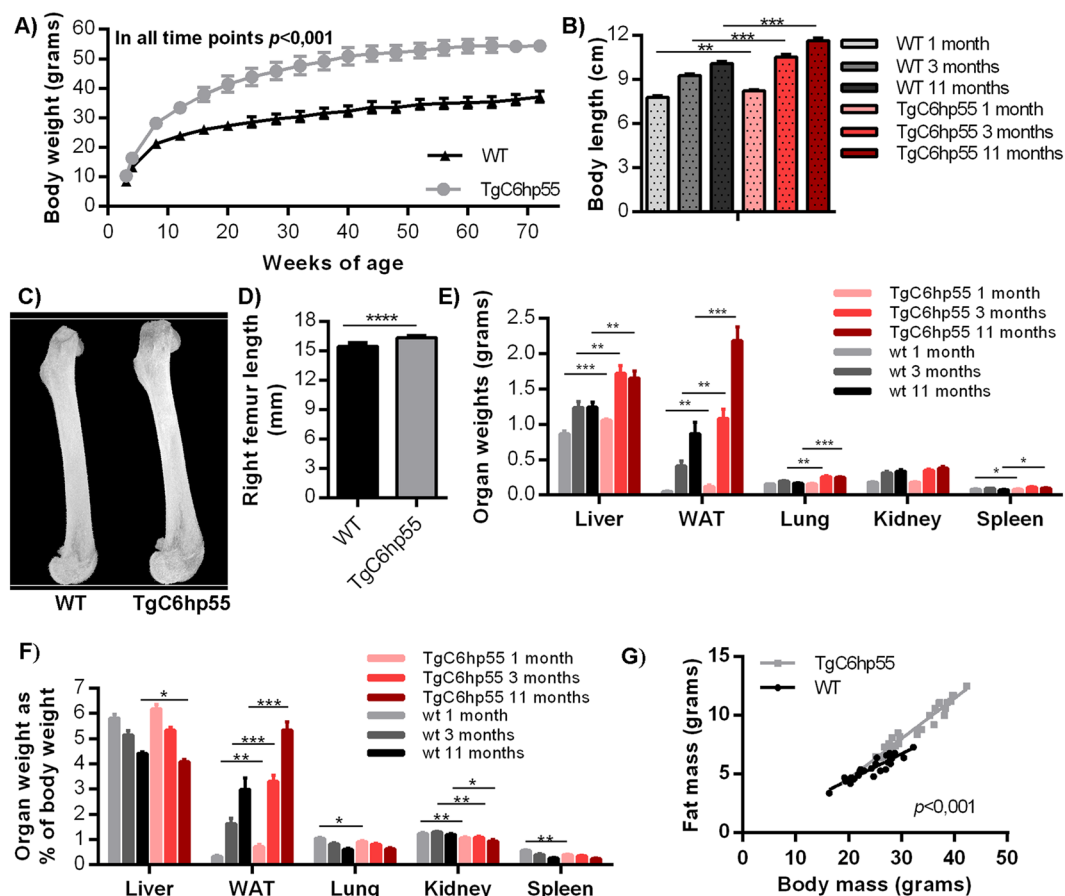


Figure 2. TgC6hp55 mice show enhanced somatic growth with some additional obesity-like characteristics. (A) Body weight curve performed in wt ($n = 10$) and TgC6hp55 ($n = 10$) mice coming from Founder 1 from the age of 3 weeks till the age of 72 weeks. (B) Comparison of the body length of wt and TgC6hp55 mice at the age of 1, 3 and 11 months. As body length we measured the distance from the tip of the mouse nose to the base of its tail. At 1 month $n = 10$ wt and $n = 10$ TgC6hp55 mice were compared, while at 3 months $n = 8$ wt and $n = 8$ TgC6hp55 and at 11 months $n = 7$ wt and $n = 9$ TgC6hp55. (C) Comparison of the right femur length of wt ($n = 7$) and TgC6hp55 ($n = 6$) mice at the age of 3 months using microCT analysis. (D) Quantification of the microCT analysis data presented in (C). (E) Comparison of liver, abdominal white adipose tissue (WAT), lung (both lungs), kidney (both kidneys) and spleen weight of the wt and TgC6hp55 mice shown in (B) at the age of 1, 3 and 11 months. (F) Comparison of the normalized organ weights from (E) expressed as % of the mouse body weight at the age of 1, 3 and 11 months. (G) Linear regression analysis of the fat tissue mass in correlation with body mass in wt ($n = 30$) and TgC6hp55 ($n = 29$) at the age of 13 weeks. Data represent mean $\pm$ SEM.

time when nocturnal animals like mice have increased energy demands), while lipid oxidation was unaffected (Fig. 3I). In agreement to the above described metabolic characteristics of the TgC6hp55 mice, histological analysis detected a progressive lipid accumulation in the liver of the TgC6hp55 mice which developed into a moderate macrovesicular hepatic steatosis (Fig. 4A) accompanied by decreased hepatic glycogen storage (Fig. 4B) as well as increased white adipocyte size (Fig. 4C). Furthermore and in correlation with these findings, gene expression analyses performed in the liver of the TgC6hp55 mice revealed the regulation of genes functionally associated with metabolism of lipids, carbohydrates and proteins, metabolic diseases like obesity and inflammatory processes (GSE95345).

Finally, additional differences associated with the above-described phenotype were found in bone morphology and metabolism (major differences) as well as in hematological, biochemical and immunological exams (minor differences) and are depicted in Supplementary Figs S4 and S5.

The phenotype of the TgC6hp55 mice is TNF-, TNFR1- and transgene insertion-independent.

To examine how the incorporation of the CollagenVI promoter-driven hTNFR1 transgene in the genome led to the above-described phenotype first we aimed to verify that this phenotype depends upon TNF/TNFR1 signaling. For this purpose we crossed TgC6hp55 mice with mice in which either TNF ($Tnf^{-/-}$ mice)³² or TRADD – TNF Receptor Associated Death Domain – ($Tradd^{D/D}$ mice)³³ have been genetically deleted. In the $Tnf^{-/-}$ mice, TNF is not produced and therefore it does not activate TNFR1, since TNF is the main ligand that binds to and activates TNFR1 (which however can also be activated by Lymphotoxin a)³⁴.

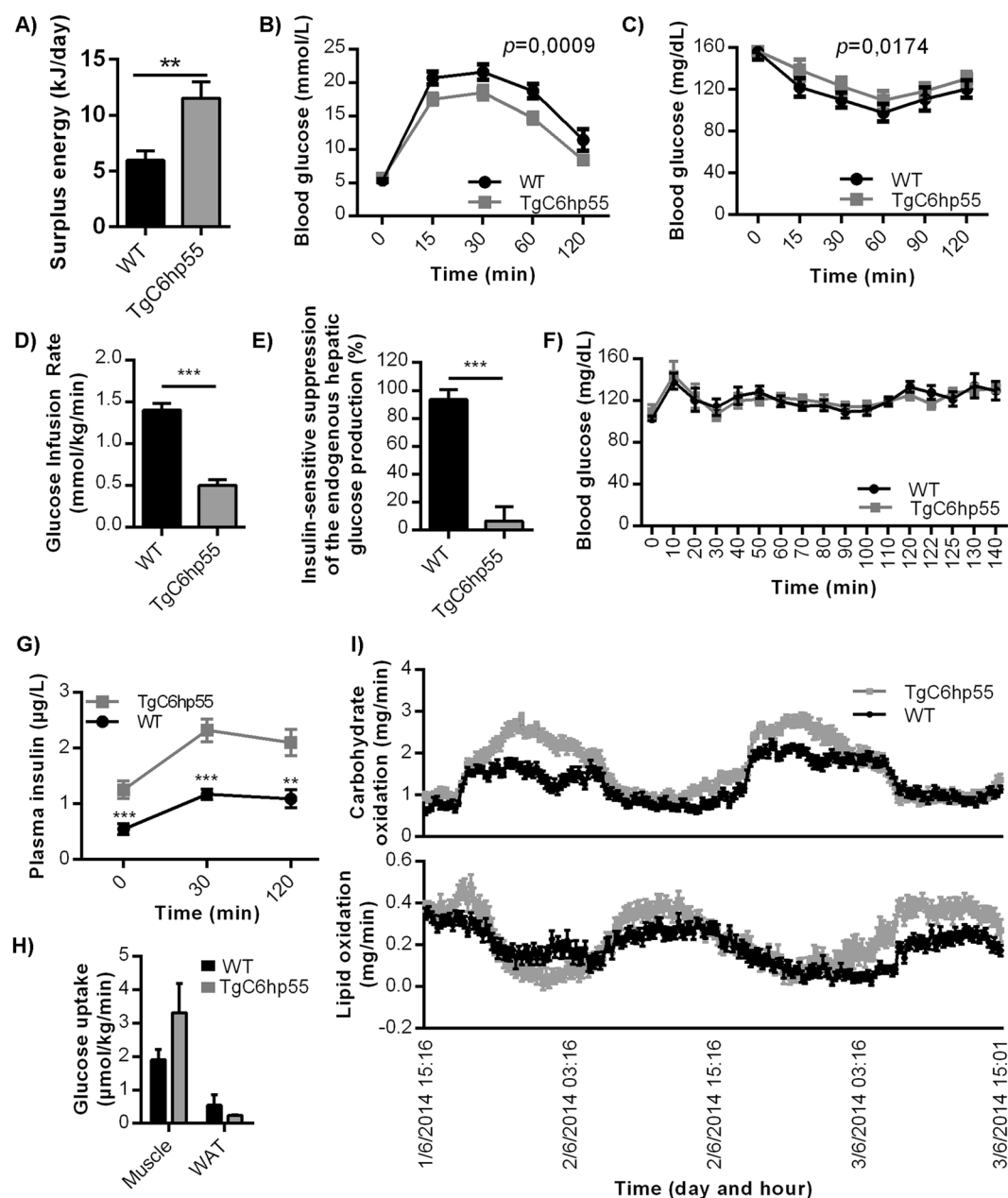


Figure 3. TgC6hp55 mice show increased energy surplus and are normoglycemic despite perturbed insulin sensitivity. **(A)** Comparison of the daily energy surplus between wt and TgC6hp55 mice ($n = 15$ wt and 11 TgC6hp55). **(B)** Intraperitoneal Glucose Tolerance Test (ipGTT) performed in wt ($n = 16$) and TgC6hp55 ($n = 13$) mice. p value represents the comparison between the Area Under the Curve for the wt versus TgC6hp55 mice. **(C)** Intraperitoneal Insulin Tolerance Test (ipITT) performed in wt ($n = 16$) and TgC6hp55 ($n = 13$) mice. p value represents the comparison between the Area Under the Curve for the wt versus TgC6hp55 mice. **(D)** Comparison of the Glucose Infusion Rate needed in order to retain euglycemia in the mice during the hyperinsulinemic-euglycemic clamp ($n = 7$ wt and 6 TgC6hp55 mice). **(E)** Comparison of the Insulin-Sensitive Suppression of the Endogenous Hepatic Glucose Production during the hyperinsulinemic-euglycemic clamp in $n = 8$ wt and $n = 7$ TgC6hp55 mice. **(F)** Blood glucose levels during the basal period of the hyperinsulinemic-euglycemic clamp. **(G)** Measurement of the Glucose Stimulated Insulin Secretion during the ipGTT shown in Fig. 3C. **(H)** Comparison of the glucose uptake from the skeletal muscle (gastrocnemius muscle) and from the white adipose tissue (epididymal white adipose tissue) in wt ($n = 6$) and TgC6hp55 ($n = 6$) mice. **(I)** Comparison of the carbohydrate and lipid oxidation during a 2-days calorimetry in $n = 16$ wt and $n = 15$ TgC6hp55 mice. Only the differences observed in the carbohydrate oxidation were statistically significant.

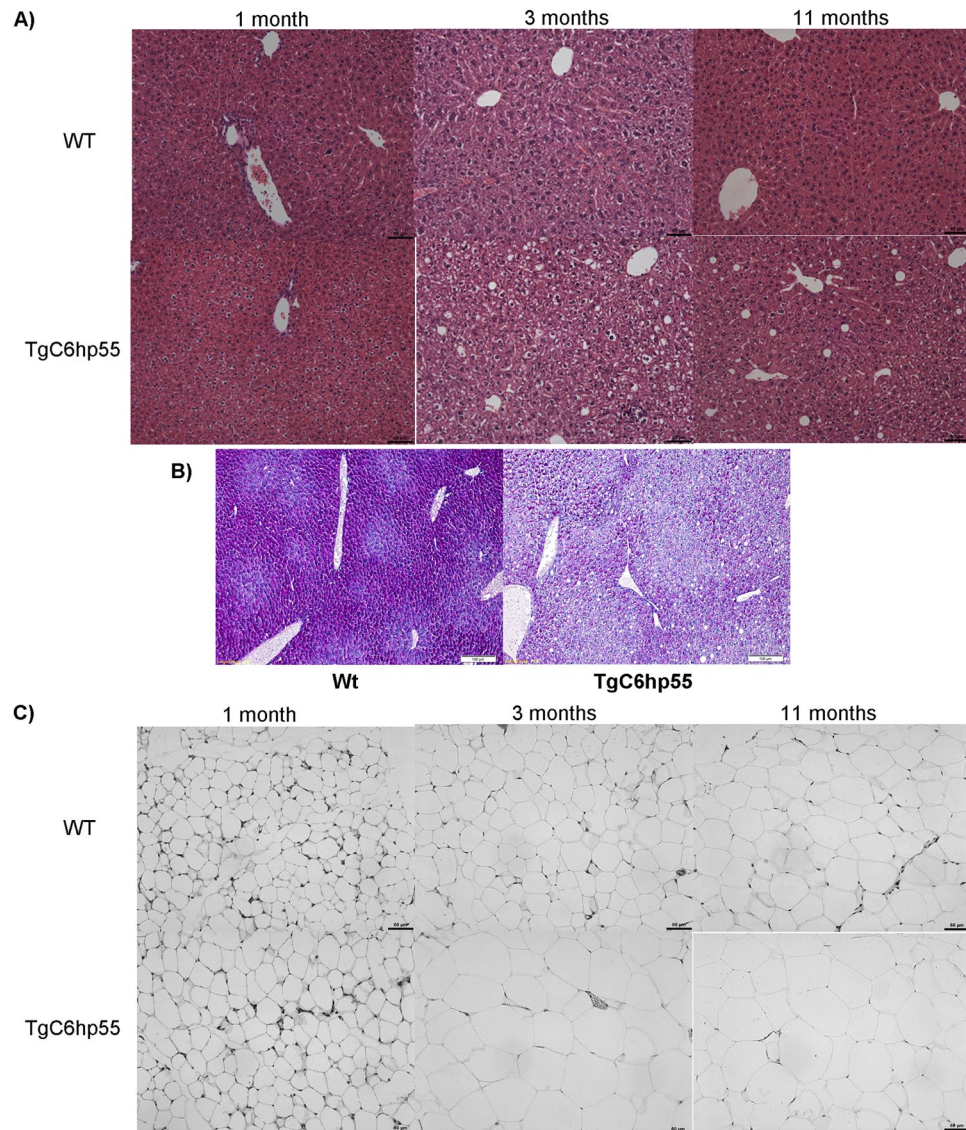


Figure 4. TgC6hp55 mice show histopathological alterations in their liver and white adipose tissue. **(A)** Histopathological assessment of the progressive lipid accumulation in the livers of wt and TgC6hp55 mice at the age of 1, 3 and 11 months (H/E staining). **(B)** Histopathological comparison of the glycogen content of the livers of wt and TgC6hp55 mice at the age of 3 months (PAS staining). **(C)** Histopathological comparison of the adipocyte size from the abdominal white adipose tissue of wt and TgC6hp55 mice at the age of 1, 3 and 11 months (H/E staining). $N = 7-10$ wt and $n = 7-10$ TgC6hp55. **(A)** and **(C)** are in 200x magnification/scale = 60 μm while **(B)** in 100x magnification/scale = 100 μm . PAS, Periodic acid-Schiff Stain.

Additionally, in the *Tradd*^{D/D} mice, TRADD which is a major component of most of the signaling cascades downstream TNFR1 (including apoptosis and NF κ B activation)^{33,35} is missing, so after the activation of (mouse or human) TNFR1, these downstream signaling cascades cannot be activated.

To our surprise, both TgC6hp55*Tnfr1*^{-/-} mice and TgC6hp55*Tradd*^{D/D} mice didn't show any amelioration of the phenotype. They had increased body weight (Fig. 5A,C) and body length (Fig. 5B,D) as well as increased organ weights. Additionally, their normalized, as a % of body weight, organ weights didn't show any major differences apart from normalized WAT weight that was still increased (Supplementary Fig. S6). Finally, in the histological examination, they displayed lipid infiltrations in their liver and increased adipocyte size in their WAT (Supplementary Fig. S7). All these results suggest that the TgC6hp55 phenotype is TNF- and *Tnfr1* signaling-independent.

Another scenario we had to take into consideration was that of a transgene insertion locus effect. Using the Targeted Locus Amplification technique (TLA)³⁶, we managed to identify the single insertion site of the transgene to be located in Chromosome 10 and specifically in the area Chr10:77533719-77533707. Additionally, the insertion was found to interrupt the genes of *Icoslg* and *Dnmt3l* that lie adjacent to this region by deleting some of their exons and therefore, in order to verify that the insertion of the transgene in the specific position and the local disturbances it caused to the native DNA were not the cause of the TgC6hp55 phenotype, we generated a

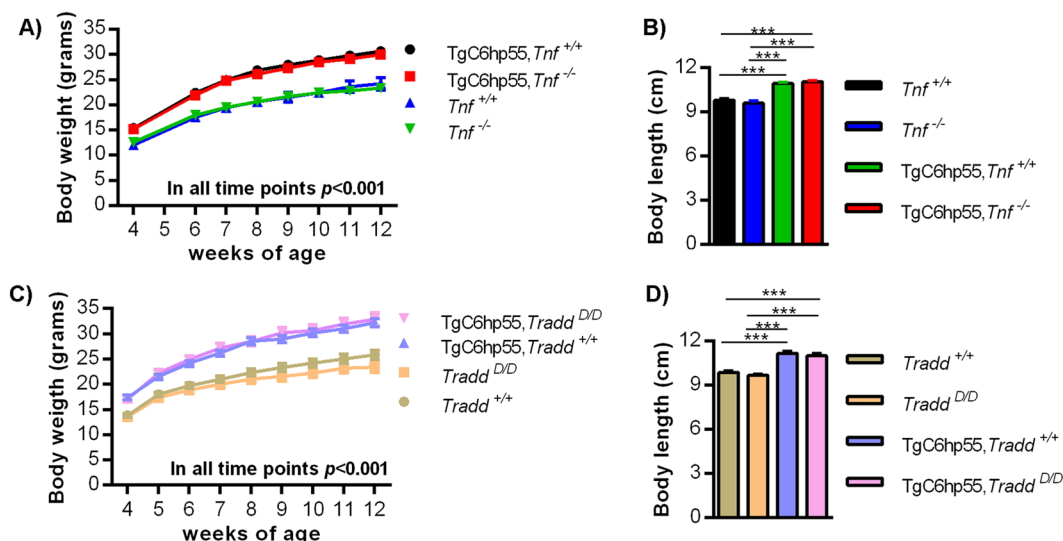


Figure 5. The TgC6hp55 phenotype is primary and independent of TNF, TNFR1 and insertion effects. (A) Body weight curve of *Tnf^{+/+}* (n = 12), *Tnf^{-/-}* (n = 24), *TgC6hp55 Tnf^{+/+}* (n = 12) and *TgC6hp55 Tnf^{-/-}* (n = 21) mice. (B) Body length comparison of *Tnf^{+/+}* (n = 6), *Tnf^{-/-}* (n = 11), *TgC6hp55 Tnf^{+/+}* (n = 6) and *TgC6hp55 Tnf^{-/-}* (n = 9) mice. (C) Body weight curve of *Tradd^{+/+}* (n = 15), *Tradd^{D/D}* (n = 11), *TgC6hp55 Tradd^{+/+}* (n = 19) and *TgC6hp55 Tradd^{D/D}* (n = 8) mice. (D) Body length comparison of *Tradd^{+/+}* (n = 8), *Tradd^{D/D}* (n = 7), *TgC6hp55 Tradd^{+/+}* (n = 7) and *TgC6hp55 Tradd^{D/D}* (n = 7) mice. Data represent mean $\pm$ SEM.

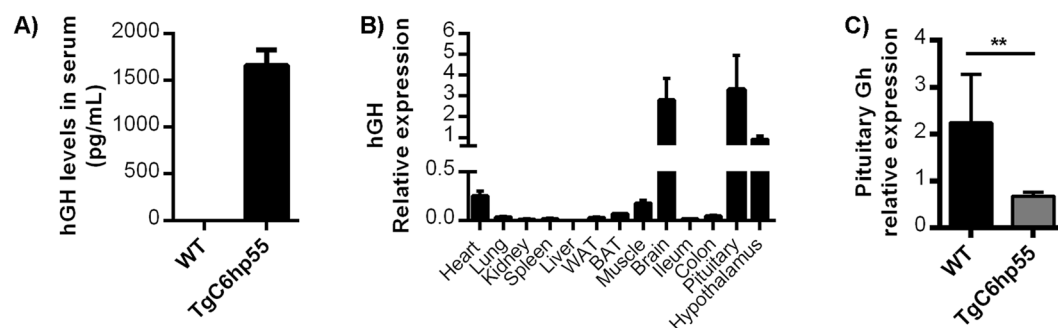


Figure 6. Detection of the *hGH* minigene expression in the TgC6hp55 mice. (A) Detection of the human growth hormone in the serum of TgC6hp55 mice using ELISA (n = 10 wt and n = 10 TgC6hp55 mice). (B) Q-PCR analysis for the detection of the *hGH* mRNA in different tissues of 3 TgC6hp55 mice. WAT, abdominal white adipose tissue; BAT, brown adipose tissue. (C) Q-PCR comparison of the mouse growth hormone produced by the pituitary of wt (n = 6) and TgC6hp55 (n = 6) mice at the age of 2, 5 months. Data represent mean $\pm$ SEM.

second founder (as described previously). This founder also exhibited the same phenotype of increased body size as the first founder (Supplementary Fig. S8), confirming that the TgC6hp55 phenotype is not secondary to an insertion effect.

The *hGH* minigene is expressed in the TgC6hp55 mice leading to local and systemic hGH production and downregulation of endogenous GH. Since there seemed to be no other possible explanation for the TgC6hp55 phenotype, we decided to investigate whether the *hGH* minigene was expressed. Indeed the hGH protein was detected in the serum of TgC6hp55 mice at levels of around 1.6 ng/mL as assessed by ELISA (Fig. 6A). Analysis with qPCR in different tissues detected high levels of the *hGH* mRNA in the brain (both in the whole brain and in the pituitary and the hypothalamus) and also expression in the heart and the skeletal muscle. The rest of the tissues tested (lung, kidney, spleen, WAT, BAT, ileum and colon) showed very low expression levels of hGH while no expression was detected in the liver (Fig. 6B). As explained before, the skeletal muscle and the heart are two tissues where the CollagenVI promoter is expected to be active while its expression, especially the ectopic expression in the brain, has also been described in the rest of the tissues^{23,25}. These results indicate that the expression of our *hGH* minigene is controlled by the CollagenVI promoter. The fact that the expression pattern of the *hGH* minigene is not identical with that of the TNFR1 could be explained by the potentially differential regulation of the hTNFR1 and hGH RNAs in the different tissues. For example while hTNFR1 RNA is known to

be minimally regulated at the mRNA stability level, evidence suggests that hGH mRNA follows more complex patterns of regulation e.g. in brain tissue²⁷.

Finally, as previously reported in other transgenic mouse lines^{15, 16, 18}, the expression of the hGH in the brain and especially in the pituitary and the hypothalamus of the TgC6hp55 mice led to an almost 50% downregulation of the endogenous *mGh* expression in the pituitary. (Fig. 6C).

Pharmacological inhibition of the GH signaling reverses most of the TgC6hp55 phenotypic characteristics.

To examine whether hGH expression is causally involved in the development of the TgC6hp55 phenotype, we used a growth hormone receptor antagonist (pegvisomant or PegV), an antibody which pharmacologically inhibits the growth hormone signaling by binding to the GH receptor and blocking the binding of the GH³⁷. Initially, we separated the mice into 4 different groups: wt mice treated with PegV (wt+PegV), wt mice treated with saline (wt+saline), TgC6hp55 mice treated with PegV (TgC6hp55+PegV) and TgC6hp55 mice treated with saline (TgC6hp55+saline). Starting at 20 days of age (just before the TgC6hp55 mice begin to show a difference in body weight), the mice were injected 3 times per week following a preventive administration scheme. In order to validate the effectiveness of Pegvisomant in blocking GH signaling we measured the levels of serum IGF-1^{38–40} in all 4 groups. As shown in Fig. 7A, both groups treated with PegV showed a decrease in the circulating levels of IGF-1, confirming its effectiveness. After the 4-weeks treatment, the TgC6hp55+PegV mice were similar to the wt+saline mice in terms of body weight and body length and were significantly smaller than the TgC6hp55+saline mice (Fig. 7B,C). As for the raw and normalized organ weights (Fig. 7D,E), the results were not conclusive, since some organs (like liver or lungs) did not grow as much after the PegV treatment as compared to the saline treatment, while others (like WAT) did grow more. Probably at that early age at which we examined the mice the differences are yet not so big and also the treatment might need a longer duration in order to affect organ size substantially. However we cannot exclude the small probability that the effectiveness of PegV and/or some hGH-independent parts of the TgC6hp55 phenotype could be attributed to other mechanisms like the activation of the prolactin receptor or the expression and action of the TNFR1 transgene or some complex insertion effects. Finally, GH inhibition in the TgC6hp55+PegV mice prevented the increased hepatocyte lipid storage in their livers which appeared completely normal (Fig. 7F). In the WAT, the adipocytes of these mice, despite being bigger than the ones of the wt+saline group, they were significantly smaller than those of the TgC6hp55+saline group (Fig. 7G,H). Collectively all these data confirm that the development of the main phenotypic characteristics of the TgC6hp55 mice are prevented by the blockade of growth hormone signaling, indicating that the hGH is a key player in the development of the TgC6hp55 phenotype.

Furthermore, it is well known that GH can act both locally in an autocrine/paracrine way and systemically either directly or indirectly through IGF-1^{41, 42}. Therefore we used the circulating IGF-1 levels as an indicator of the possible systemic effects of the hGH³⁸. As shown again in Fig. 7A, the transgenic mice had the same levels of serum IGF-1 as their wt controls. This finding means that the circulating hGH is effective either independently of the liver-produced IGF-1 or through local production and action in different tissues or both.

Discussion

Although this is not the first time that the *hGH* minigene has been found to be expressed in a transgenic mouse line^{12–18}, in this work we provide original evidence for the effects of this expression when it is driven by the mesenchymal CollagenVI promoter. As shown in Table 1, up to date, the “unexpected” expression of the *hGH* minigene and its consequences on the mouse phenotype have been studied and described only in a few mouse lines which used promoters that are specific for either the pancreas or the liver or the nervous system and therefore led to a more or less confined expression of the hGH in specific areas like the brain or the pancreatic islets. On the contrary, in our transgenic mouse line, the TgC6hp55, the *hGH* minigene expression was found in a series of tissues under the control of the CollagenVI promoter and it is the first time to our knowledge, that the expression of a *hGH* minigene is reported to drive enhanced somatic growth as well as a plethora of alterations in various parameters of the mouse physiology as described before. Additionally, by the pharmacological blockade of GH signaling we present direct evidence of the causal relationship between the *hGH* minigene expression and the observed phenotype.

In some of the studies referred in Table 1, local expression of the *hGH* minigene in the mouse pituitary and hypothalamus led to decreased somatic growth due to downregulation of the endogenous mouse Gh^{15, 16, 18}, while in the rest, where the minigene was not expressed in the brain, no alterations in body size were found^{12, 13, 17}. An important issue not clarified in most of these studies^{12, 14, 15, 17, 18} is whether the locally produced hGH makes its way into the circulation or not. The 2 studies that looked into this issue did not detect any hGH in the circulation^{13, 16}.

Interestingly though, the TgC6hp55 mice exhibited increased body size with unchanged systemic Igf-1 levels, in spite of an almost 50% downregulation of the endogenous Gh. This phenotype could be attributed either to the local or to the systemic effects of the hGH or both. On the one hand, it has been shown that GH can act both locally and systemically without affecting the serum Igf-1 levels^{38, 40}. On the other hand, locally produced GH, even if it accesses the circulation, may still exhibit no systemic effects³⁸. Most of the tissues examined in the TgC6hp55 mice scored positive for hGH expression, which suggests local activity. Additionally, the circulating levels of hGH appear not high enough to increase systemic Igf-1 levels, but they still seem to drive systemic effects as for example in the liver where hGH is not locally produced. Therefore, the most probable explanation in the TgC6hp55 mice is that hGH acts mainly locally with some extra effects being attributed to its systemic action. Of course all these hypotheses would be interesting to be further addressed in the future.

Another interesting characteristic of the TgC6hp55 mice which we studied and described thoroughly is the perturbed insulin sensitivity and carbohydrate metabolism. Transgenic mice expressing the *hGH* minigene have also exhibited analogous effects^{12–14, 17}. However, these mice were expressing the *hGH* minigene in the pancreatic islets or specifically in β -cells, making it much easier for the hGH to directly interact in an autocrine/paracrine

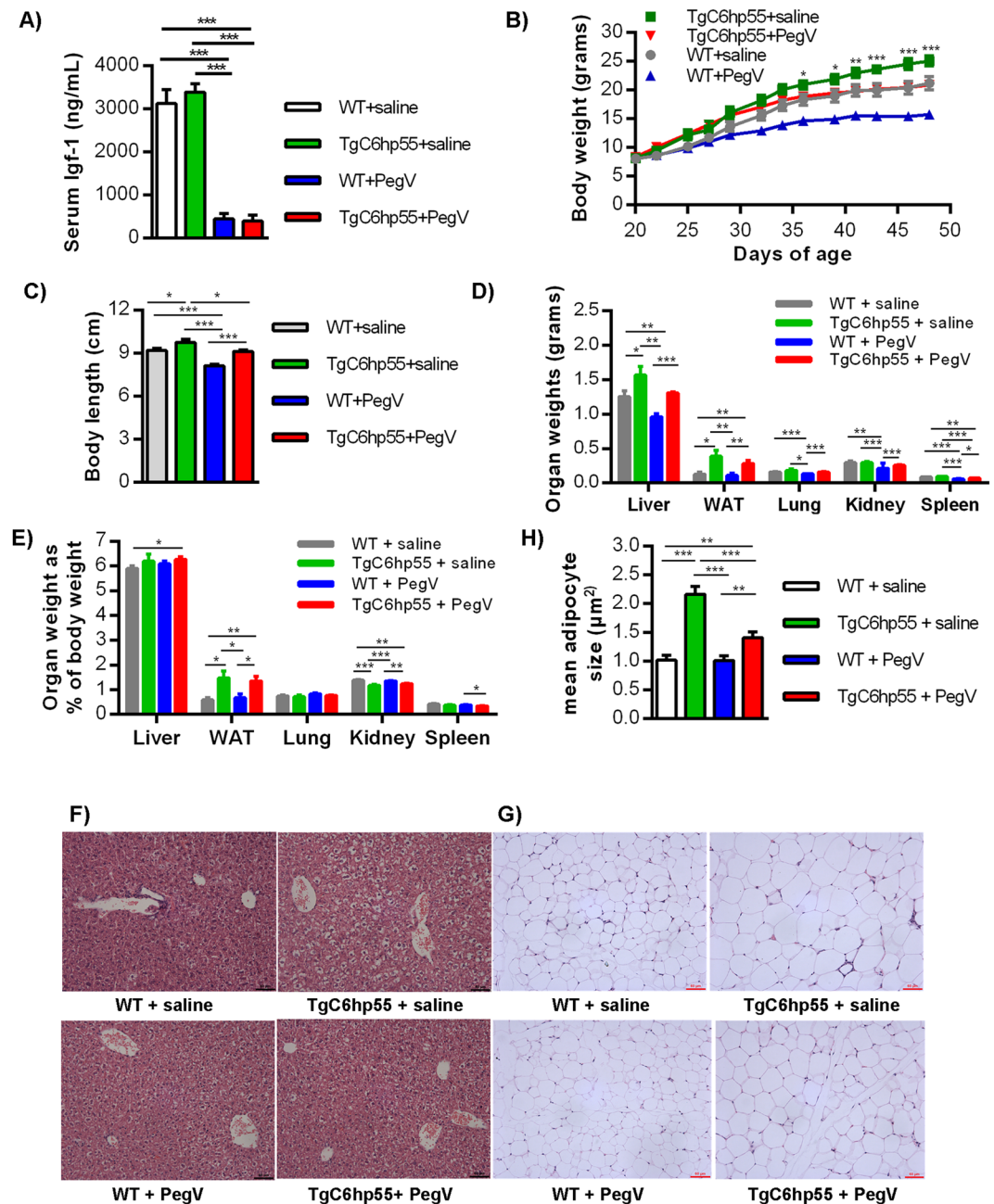


Figure 7. Pharmacological inhibition of the GH signaling reverses most of the TgC6hp55 phenotypic characteristics. 4 groups of mice: 8 wt received saline, 8 wt received pegvisomant (PegV), 8 TgC6hp55 received saline and 8 TgC6hp55 received PegV. **(A)** Serum levels of Igf-1 in all 4 groups. **(B)** Body weight curve. *Represent comparison between TgC6hp55+saline versus TgC6hp55+PegV. **(C)** Body length comparison. **(D)** Comparison of liver, abdominal white adipose tissue (WAT), lung (both lungs), kidney (both kidneys) and spleen weight among 4 groups. **(E)** Comparison of the normalized organ weights from (7D) expressed as % of the mouse body weight. **(F)** Histopathological assessment of the lipid accumulation in the livers of all 4 groups (H/E staining). **(G)** Histopathological comparison of the adipocyte size from the abdominal white adipose tissue of all 4 groups (H/E staining). **(H)** Quantification of the adipocyte size shown in Fig. 7F. (F) and (G) are in 200x magnification/scale = 60 μm. Data represent mean ± SEM.

way with the insulin production. Moreover, it is known that hGH can bind to and activate also the prolactin receptor¹⁹ and therefore mimic the effects of lactogens on mouse β-cells⁴³. In correlation with previous studies¹², we also found increased serotonin expression in the pancreatic islets of the TgC6hp55 mice (Supplementary Fig. S9). Since serotonin is used as a marker of prolactin receptor stimulation in the pancreas^{44,45}, this finding suggests that at least in the pancreas of the TgC6hp55 mice hGH binds to and activates the prolactin receptor. Therefore some of the effects described regarding the carbohydrate metabolism could be explained by this mechanism¹². Moreover, the activation of the prolactin receptor by the hGH could also explain some other phenotypic

Publication	Mouse line	Specific for	Site of expression	Serum hGH	Detection method	Effects attributed to the hGH
Pruniau <i>et al.</i> ¹⁸	AlfpCre	Hepatocytes	Hypothalamus, pituitary	Not examined	Q-PCR, ELISA	liver steatosis, reduced growth
Nuytens <i>et al.</i> ¹⁶	Nbea ^{+/-} -GH240B	no promoter	Hypothalamus, pituitary	No	Q-PCR, WB, ELISA, IF	reduced growth, obesity,
Browers <i>et al.</i> ¹²	Pdx1Cre ^{Late}	pancreatic α - and β -cells	pancreatic β -cells	Not examined	Q-PCR, WB, IHC	altered β -cell physiology and glucose/insulin regulation
Browers <i>et al.</i> ¹²	MIPCre, RIPCre	pancreatic β -cells	pancreatic β -cells	Not examined	Q-PCR, WB, IF	
Baan <i>et al.</i> ¹³	MIPFoxM1	pancreatic β -cells	pancreatic β -cells	No	Q-PCR, WB, ELISA	altered β -cell physiology
Declercq <i>et al.</i> ¹⁵	NestinCre	nervous system	Hypothalamus, pituitary	Not examined	Q-PCR, ELISA	hypopituitarism, reduced growth, liver steatosis, behavioral problems
Oropeza <i>et al.</i> ¹⁷ , Carboneau <i>et al.</i> 2016	MIPCreERT ^{1Lphi}	Pancreatic β -cells	pancreatic β -cells, hypothalamus	Not examined	Q-PCR, WB	altered β -cell physiology and glucose/insulin regulation

Table 1. Other publications studying the effects of hGH minigene expression. WB, Western Blot; IHC, Immunohistochemistry; IF, Immunofluorescence.

characteristics of the TgC6hp55 mice such as hepatomegaly^{14, 26, 28}, while it is contradictory to other findings in these mice like the increased bone mineral density and the increased adipose tissue mass^{30, 46}. However, the fact that the pharmacological blockade of the growth hormone receptor reversed most of the main phenotypic characteristics of the TgC6hp55 mice (enhanced somatic growth, hepatic steatosis, increased adipocyte size etc.), suggests that the major actions of the hGH in mediating the TgC6hp55 phenotype are through this receptor, while the activation of the prolactin receptor plays a more secondary role. Nevertheless, it would be interesting in future studies to address this question in more detail.

Furthermore, the TgC6hp55 mice also exhibited an interesting phenotype of increased food intake in conjunction with increased metabolic rate and a preference in mobilizing carbohydrates in order to cover their increased energy demands during night, that has not been previously described in correlation with the *hGH* minigene.

The *hGH* minigene-expressing transgenic mice with a reduced endogenous Gh production and a reduction in body growth described above^{15, 16, 18} also show perturbations in lipid metabolism (increased triglycerides, increased adipose tissue mass, liver steatosis and deregulated genes that take part in lipid metabolism) similar to our findings, despite the increased body size of the TgC6hp55 mice⁴⁷. However, the same features have been previously described in the context of insulin resistance and/or obesity^{48, 49}, like in the transgenic mice overexpressing bovine GH in their central nervous system causing hyperphagia-induced obesity⁵⁰. This mechanism of hyperphagia-induced obesity could explain the findings of increased adipose tissue mass in the TgC6hp55 mice and it could present a new secondary ‘side-effect’ of the *hGH* minigene expression in the brain. Of course we cannot exclude an additional effect of the locally (even in very small amounts) produced hGH on WAT, since the existing literature regarding such an issue is still debating^{51–53}. Finally, the rest of the alterations observed in the skeletal, biochemical and hematological examination of the TgC6hp55 mice have also never been described before in conjunction with the hGH minigene expression.

Altogether the results from our analysis show that the unplanned expression of the hGH minigene, if/when it happens and depending on the context in which it acts, can have a plethora of effects that are or are not always restricted to the specific tissue of expression. More specifically, we have shown that the local expression of this minigene in the CollagenVI expressing mesenchymal cells can affect various aspects of the mouse physiology not only locally but also systemically. However, we cannot safely distinguish which of the phenotypic characteristics described in the TgC6hp55 mice can primary be attributed to the hGH minigene expression and which are secondary to the generally enhanced growth. The results of our study along with other recent studies underline that it is crucial for all using the hGH minigene in our mouse models to examine if it is expressed or not and the possible effects it might have to the described phenotypes, as the lack of visible growth changes does not necessarily mean that the minigene is not expressed. Finally, it would be important to examine these mice more systemically and to not only focus locally because, as we have shown in the present work, the ‘side-effects’ of the hGH minigene expression might not always be confined to a local level.

Materials and Methods

Mice. All mice were bred and maintained on a C57BL/6J genetic background in the animal facilities of the Biomedical Sciences Research Center “Alexander Fleming” under specific pathogen-free conditions. Experiments were approved by the Institutional Committee of Protocol Evaluation in conjunction with the Veterinary Service Management of the Hellenic Republic Prefecture of Attika according to all current European and national legislation and were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. All mice were housed in standard cages (wood-shaving bedding) on a 12-hour day/night cycle and were fed a standard rodent chow.

Generation of TgC6hp55 transgenic mice. The procedure for the generation of the TgC6hp55 mice has been described in the Results section. Pronuclear injection of the transgene into fertilized (C57BL/6JXCBA/J)F2

oocytes was performed in the BSRC Alexander Fleming Transgenesis Facility. The Collagen VI(a1) promoter was kindly provided by G. Bressan (University of Padova, Padova, Italy)²⁵. The hTNFR1 CDS was kindly provided by D. Wallach (The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel)²⁶. The hGH minigene was kindly provided by R. Perlmutter (Howard Hughes Medical Institute, University of Washington, Washington, USA)²⁷. For the genotyping of the mice, the primers that we used were: Forward: AGGAAATGGGTCAGGTGGAG and Reverse: CTCAATCTGGGGTAGGCACA. The conditions of the PCR were as following: annealing for 30 seconds at 66 °C declining by 1 °C per cycle until 57 °C and then at 57 °C for 30 more cycles; elongation for 1 minute at 72 °C. The generation of the *Tnf*^{-/-} mice has been described previously³² while the *Tradd*^{D/D} mice were kindly provided to us by M. Pasparakis (University of Cologne, Cologne, Germany)³³.

In all the experiments we tried to use equal numbers of males and females from each genotype. Additionally, in all experiments the mice that were used were littermates or at least cohoused since their weaning day.

Q-PCR. All reactions were performed in 96 well plates in a PTC200 Thermal Cycler from MJ Research (USA) and the data were analyzed using Opticon Monitor 3.

Copy number calculation. For the calculation of the number of copies that were inserted into the genome of each founder and his ancestors we isolated genomic tail DNA using phenol:chlorophorm extraction. All the samples were diluted to a final concentration of 12, 5 ng/μl and 2 μl from each sample were used in each reaction. For the multiplication of the transgene we used primers that detect the exon 3 of the hTNFR1 while MAP3K8 was used as a reference gene for normalization. Finally, the human p55 knock-in mouse was used as a control that contains 2 copies of the human p55⁵⁴. The primer sequences were: hTNFR1 exon3F: 5'-TAC AAT GAC TGT CCA GGC CCG-3', hTNFR1 exon3R: 5'-GCA TTT GGA GCA GCT GAG GC-3', MAP3K8F: 5'-TCC AGG CCT GTT TCC GGC-3', MAP3K8R: 5'-CCT CCC TCG CCG GCT TCC-3'. The Q-PCR conditions were: annealing at 59 °C for 30 sec, elongation at 72 °C for 30 sec. The reactions were performed using the Quantitect Real-time PCR kit from Qiagen (Cato No. 204143).

hTNFR1, hGH and mGh expression levels. After the mice were sacrificed, the tissues of interest (heart, lung, kidney, spleen, liver, muscle, brain, ileum, colon, abdominal white adipose tissue, interscapular brown adipose tissue, testis, pituitary and hypothalamus) were snap-frozen in liquid nitrogen. The total RNA was isolated and DNase treated using the Absolutely RNA Miniprep Kit from Agilent Technologies (Cat. No. 400800). Reverse transcription was performed using the M-MLV Reverse Transcriptase from Promega (Cat. No. M1705). Samples were normalized to B2M (B2M F: 5'-TTC TGG TGC TTG TCT CAC TGA-3'; B2M R: 5'-CAG TAT GTT CGG CTT CCC ATT C-3'). The primers for hTNFR1 were purchased from Qiagen (QT00216993). The primers for hGH have been described by Browsers *et al.*¹², the primers for mGh have been described by Martari *et al.*⁵⁵. All reactions were performed using the Quantitect Real-time PCR kit from Qiagen (Cat. No. 204143). The reaction conditions were: hTNFR1: annealing at 55 °C for 30 sec and elongation at 72 °C for 30 sec; hGH: annealing at 58 °C for 30 sec and elongation at 72 °C for 40 sec.

Phenotypic characterization. *Body weight curve.* For the body weight curves the mice were weighed once per week starting at 4 weeks. Additionally, regarding the TgC6hp55 versus their wt siblings, we also compared their body weights at 1 week, 11 days, 2 weeks and 3 weeks of age.

microCT. The scanning was performed in a Skyscan 1172 microCT (Brucker). The bone specimens (right femur) were wrapped with gauze soaked in PBS and stored in a freezer at -20 °C. Before the scanning, they were left to defrost at RT. The scanning parameters were set at 49 kV and 100 μA, the resolution was 1332 × 960 and the filter used was Al 0.5 mm. The image reconstitution was performed using the NRecon program (SkyScan, Brucker).

German Mouse Clinic phenotypic pipeline. *ipGTT.* Mice were used for the glucose tolerance test after a 16–18 hours-lasting overnight food-withdrawal. In the beginning of the test, the body weight of mice was determined. For the determination of the fasting blood glucose level, the tip of the tail was scored using a sterilized scalpel blade and a small drop of blood was analyzed with the Accu-Chek Aviva glucose analyzer (Roche/Mannheim). Thereafter mice were injected intraperitoneally with 2 g of glucose/kg body weight using a 20% glucose solution, a 25-gauge needle and a 1-ml syringe. 15, 30, 60 and 120 minutes after glucose injection, additional blood samples (one drop each) were collected and used to determine blood glucose levels and insulin levels (30, 60 min) as described before. Repeated bleeding was induced by removing the clot from the first incision and massaging the tail of the mouse. After the experiment was finished, mice were placed in a cage with plentiful supply of water and food⁵⁶.

Insulin levels were determined by ELISA (Mercodia, Sweden).

Insulin tolerance test. The insulin tolerance test was conducted in the early afternoon after 6 hours food deprivation that began in the early morning. Insulin (0.7 U per kg body mass) was injected intraperitoneally after measurement of baseline blood glucose from blood samples taken from the tail vein. Further blood samples were taken 15, 30, 60, 90 and 120 minutes after injection. Glucose levels were determined using a handheld glucometer (ACCU CHECK Aviva, Roche Diagnostics/Mannheim, Germany).

Hyperinsulinemic-euglycemic clamp. As a preparatory step, a permanent jugular vein catheter was implanted in anesthetized experimental mice 6–7 days before the clamp study. For the hyperinsulinemic-euglycemic clamp, mice were food deprived for 6 hours beginning in the early morning. Mice were unrestrained and conscious during the procedure but placed in oversized rat restrainers and warmed by

warming pads. To administer solutions catheters were connected to syringes in CMA402 pumps (Axel Semrau, Sprockhoevel, Germany). After 110 minutes of primed-continuous [$3\text{-}^3\text{H}$] glucose infusion (1.85 kBq/min), a blood sample was collected to determine plasma insulin, glucose and [$3\text{-}^3\text{H}$] glucose concentrations to calculate basal endogenous glucose production. Thereafter, a [$3\text{-}^3\text{H}$] glucose infusion (3.7 kBq/min) containing insulin (15 pmol·kg $^{-1}$ ·min $^{-1}$; HumulinR, Lilly, Indianapolis, IN) begun. Blood glucose concentrations were monitored in intervals of 10 minutes. Target glycemia was achieved by adjusting glucose infusion rates. 120 minutes after beginning of the experiment, 2-[^{14}C] deoxyglucose (370 kBq) was injected intravenously to assess rates of tissue specific glucose uptake. After conclusion of the experiment, mice were euthanized by intravenously injected overdose of ketamine/xylazine. Mice were dissected, tissues were collected, immediately snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C . Blood was also collected at culling and plasma ^3H and ^{14}C radioactivity was determined in deproteinized plasma before and after $^3\text{H}_2\text{O}$ evaporation to estimate glycolysis rates. In hepatic lysates 2-[^{14}C] deoxyglucose-6-phosphate was separated from 2-[^{14}C] deoxyglucose via ion-exchange columns (Poly-Prep AG1-X8, Bio-Rad, Germany). Glucose uptake rates were calculated by multiplying mean plasma glucose between 120 and 140 min (mmol/ml) by 2-[^{14}C] deoxyglucose tissue content (dpm/100 g tissue), divided by 2-[^{14}C] deoxyglucose plasma AUC in the same period of time. Source of radioisotopes: Perkin Elmer; samples were measured in Ultima-Gold scintillation cocktail (Tri-Carb2910TR, Perkin-Elmer, Weissenstein, Germany). Whole body glucose disposal (M value) was calculated from the tracer infusion rate, specific activity of [$3\text{-}^3\text{H}$] glucose and body weight.

Indirect calorimetry. A 48-hours indirect calorimetry trial was conducted in single caged mice having free access to food and water (32-cages PhenoMaster with activity & drinking/feeding monitoring, TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Germany). Four data points were collected per hour (oxygen consumption, carbon dioxide production, respiratory exchange ratio, metabolic rate) resulting in a total of 192 data points. From gas exchange data we calculated oxidation rates of carbohydrates and lipids⁴⁶. In parallel to energy expenditure, food consumption was carefully monitored. Food consumption was converted into metabolizable energy uptake using a factor of 13.047 kJ per gram food (Altromin 1324, Altromin, Lage, Germany) that was determined before the indirect calorimetry trial based on bomb calorimetric combustion of diet and feces samples.

qNMR. The body composition was analyzed by non-invasive qNMR (Bruker MiniSpec LF50, Bruker, Ettlingen, Germany).

Clinical Chemistry. Blood samples for clinical chemistry analyses were collected in Li-heparin coated tubes after overnight food withdrawal and from *ad libitum* fed mice. Plasma samples were analyzed using an AU480 autoanalyzer (Olympus, Germany) and adapted reagent kits provided by Beckman-Coulter, Wako Chemicals GmbH or Randox according to GMC standard procedures⁵⁷. A small EDTA-blood sample was used by the Immunology screen for FACS analysis.

FACS Analysis of Peripheral blood leukocytes (PBL). PBLs were isolated from the cell pellet of 500 μl whole blood samples after centrifugation. The cell pellet is dissolved in 600 μl NH $_4\text{Cl}$ -based, Tris-buffered erythrocyte lysis solution, and 150 μl transferred into 96-well micro titer plates. After subsequent washing steps with FACS staining buffer (PBS, 0.5% BSA, 0.02% sodium azide, pH 7.45), PBLs were incubated for 20 min with Fc block (clone 2.4G2, PharMingen, San Diego, USA). Cells were then stained with fluorescence-conjugated monoclonal antibodies (PharMingen). After the antibody incubation, propidium iodide was added for the identification of dying/dead cells⁴⁵, which might bind antibodies unspecifically, and/or loose specific antigens upon apoptosis⁴⁴. Samples were acquired from 96 well plates and measured in one of our two threelaser 10-color flow cytometers (LSRII, Becton Dickinson, USA; Gallios, Beckman Coulter, USA). A total number of 10.000–30.000 living CD45+ per sample is reached. For analysis, intact cells are first identified by their FSC/SSC profile. These cells were gated on the basis of their propidium iodide/PE signal (compensated parameters), allowing the dead cells to be gated out. Living cells were then gated using their SSC/CD45 signal, gating out remaining erythrocytes, thrombocytes and debris⁵⁸. CD45+ cells are subsequently analyzed by software based analysis (Flowjo, TreeStar Inc, USA; SPICE⁵⁹. In former experiments, FMO (Fluorescence minus one) controls from wild-type mice have been used to define 'positive' and 'negative' regions⁶⁰.

Immunohistochemical analysis. The IHC was performed using the streptavidin-peroxidase method with an automated immunostainer (DiscoveryXT; Roche, Penzberg, Germany) in paraffin-embedded tissue. After heat-induced antigen retrieval with EDTA (pH 8), we used the primary antibody anti-serotonin (5-HT) ABIN617893 from <https://www.antibodies-online.com/antibody/617893/anti-5-Hydroxytryptamine> in a dilution 1:100. We repeated the procedure two times with an appropriate positive control (neuroendocrine cells in murine gut) and a negative control (without the primary antibody) to confirm the specificity of the staining. Secondary antibody and blocking against nonspecific binding was performed according to antibody information. DAB and hematoxylin as contrast were used for visualization of the reaction peptide-hormone-antibody. Cytoplasmic staining was considered a positive reaction. Images for illustration were made by the slide-scanning system, NanoZoomer 2.0 HT (Hamamatsu Photonics K.K.; Hamamatsu City, Japan).

DEXA. After anesthesia, the weight and length of the mouse were recorded, and the mouse was placed in the analyzer (pDEXA Sabre X-ray Bone Densitometer, Norland Medical Systems Inc., Basingstoke, Hampshire, UK). Whole body analysis excluding the skull was performed (Scan speed 20 mm/s, Resolution 0.5 mm $\times$ 1.0 mm, HAW 0.020).

Histopathological analysis. The tissues were isolated from the animals, washed in PBS and fixed in formalin at 4 °C overnight. After that they were embedded into paraffin, cut with a microtome and stained with either Hematoxylin/Eosin (H/E) or Periodic acid-Schiff (PAS). Photos were taken with a Nikon Eclipse E800 microscope equipped with a Q Imaging ExiAqua camera using the Bioquant Q-capture Pro7 program. Adipocyte size was calculated using the Adiposoft program.

Transcriptome analyses. Transcriptome analyses from liver samples of four transgenic and four wild-type male mice at the age of 21 weeks were performed following total RNA extraction (RNAeasy Midi kit, Qiagen). Illumina Mouse Ref-8 v2.0 Expression BeadChips were employed as previously described⁶¹. Illumina GenomeStudio 2011.1 was used for data normalization (cubic spline) and statistical analysis for the identification of differential gene expression was performed with SAM (Significance Analysis of Microarrays, fold change >1.7, FDR < 1%)⁶². Over-represented functional annotations were obtained using Qiagen's Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen Redwood City). The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus⁶³ and are accessible through GEO Series accession number GSE95345.

Identification of the insertion site. The identification of the insertion site was performed by the Cergentis company (Utrecht, Netherlands) using a TLA (Targeted Locus Amplification) sequencing technique³⁶.

Human Growth Hormone and mouse IGF-1 detection. Human Growth Hormone (hGH) was detected and quantified in the serum of TgC6hp55 mice using a Growth Hormone (GH) Human SimpleStep ELISA Kit from Abcam (ab190811). Serum from wt mice did not give any signal. Mouse IGF-1 was detected and quantified in the serum of wt and TgC6hp55 mice using an IGF-1 (mouse/rat) ELISA from ALPCO (Cat. No. 22-IG1MS-E01).

Treatment with Pegvisomant. Pegvisomant was kindly provided by Pfizer (New York, USA).

Starting at 20 days of age, the mice were first weighed and then injected intraperitoneally every Monday-Wednesday-Friday morning with either 250 mg/kg Pegvisomant (experimental groups) or saline (control groups) according to Liao *et al.*⁶⁴ for 4 weeks. After the end of this period the mice were sacrificed, their organs were weighed and liver and abdominal white adipose tissue were collected for histopathological examination. Additionally, blood serum was collected in order to measure mouse IGF-1 as an indicator of the effectiveness of the treatment.

Statistical analysis. In every comparison we made, we first examined if the data in each group follow a Gaussian distribution using D'Agostino-Pearson Omnibus normality test, Shapiro-Wilk test and Kolmogorov-Smirnov test with Dallal-Wilkison-Lilliefors P value. If the data indeed followed a Gaussian distribution, we compared them using unpaired t-test or unpaired t-test with Welch's correction if the variances of the different groups compared were significantly different according to the F-test. On the contrary, if the data were not normally distributed, we compared them using the Mann-Whitney test. Finally, for multiple statistical comparisons on a single data set we used the ANOVA test. Significance is shown in graphs as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

References

- Brinster, R. L., Allen, J. M., Behringer, R. R., Gelinas, R. E. & Palmiter, R. D. Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 836–840, doi:10.1073/pnas.85.3.836 (1988).
- Palmiter, R. D., Sandgren, E. P., Avarbock, M. R., Allen, D. D. & Brinster, R. L. Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 478–482, doi:10.1073/pnas.88.2.478 (1991).
- Chaffin, K. E. *et al.* Dissection of thymocyte signaling pathways by *in vivo* expression of pertussis toxin ADP-ribosyltransferase. *The EMBO journal* **9**, 3821–3829 (1990).
- Orban, P. C., Chui, D. & Marth, J. D. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 6861–6865, doi:10.1073/pnas.89.15.6861 (1992).
- Hara, M. *et al.* Transgenic mice with green fluorescent protein-labeled pancreatic beta -cells. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **284**, E177–183, doi:10.1152/ajpendo.00321.2002 (2003).
- Herrera, P. L. Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development* **127**, 2317–2322 (2000).
- Kellendonk, C., Opherk, C., Anlag, K., Schutz, G. & Tronche, F. Hepatocyte-specific expression of Cre recombinase. *Genesis* **26**, 151–153, doi:10.1002/(ISSN)1526-968X (2000).
- Postic, C. *et al.* Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *The Journal of biological chemistry* **274**, 305–315, doi:10.1074/jbc.274.1.305 (1999).
- Vassar, R. & Fuchs, E. Transgenic mice provide new insights into the role of TGF- α during epidermal development and differentiation. *Genes & development* **5**, 714–727 (1991).
- Zimmerman, L. *et al.* Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* **12**, 11–24, doi:10.1016/0896-6273(94)90148-1 (1994).
- Brouwers, B. & Creemers, J. W. Human Growth Hormone in Transgenesis: A Growing Problem? *Diabetes* **64**, 3648–3650, doi:10.2337/dbi15-0007 (2015).
- Brouwers, B. *et al.* Impaired islet function in commonly used transgenic mouse lines due to human growth hormone minigene expression. *Cell metabolism* **20**, 979–990, doi:10.1016/j.cmet.2014.11.004 (2014).
- Baan, M. *et al.* Transgenic expression of the human growth hormone minigene promotes pancreatic beta-cell proliferation. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **309**, R788–794, doi:10.1152/ajpregu.00244.2015 (2015).
- Chen, H. W., Hamer, D. H., Heiniger, H. J. & Meier, H. Stimulation of hepatic RNA synthesis in dwarf mice by ovine prolactin. *Biochimica et biophysica acta* **287**, 90–97, doi:10.1016/0005-2787(72)90332-2 (1972).
- Declercq, J. *et al.* Metabolic and Behavioural Phenotypes in Nestin-Cre Mice Are Caused by Hypothalamic Expression of Human Growth Hormone. *PLoS one* **10**, e0135502, doi:10.1371/journal.pone.0135502 (2015).
- Nuytens, K. *et al.* The dwarf phenotype in GH240B mice, haploinsufficient for the autism candidate gene Neurobeachin, is caused by ectopic expression of recombinant human growth hormone. *PLoS one* **9**, e109598, doi:10.1371/journal.pone.0109598 (2014).

17. Oropeza, D. *et al.* Phenotypic Characterization of MIP-CreERT1Lphi Mice With Transgene-Driven Islet Expression of Human Growth Hormone. *Diabetes* **64**, 3798–3807, doi:[10.2337/db15-0272](https://doi.org/10.2337/db15-0272) (2015).
18. Pruniau, V. P., Louagie, E., Brouwers, B., Declercq, J. & Creemers, J. W. The AlfpCre mouse revisited: evidence for liver steatosis related to growth hormone deficiency. *Hepatology* **58**, 2209–2210, doi:[10.1002/hep.26483](https://doi.org/10.1002/hep.26483) (2013).
19. Goffin, V., Shiverick, K. T., Kelly, P. A. & Martial, J. A. Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals. *Endocrine reviews* **17**, 385–410, doi:[10.1210/edrv-17-4-385](https://doi.org/10.1210/edrv-17-4-385) (1996).
20. Klee, P. *et al.* Connexin implication in the control of the murine beta-cell mass. *Pediatric research* **70**, 142–147, doi:[10.1038/pr.2011.367](https://doi.org/10.1038/pr.2011.367) [10.1203/PDR.0b013e318220f106](https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318220f106) (2011).
21. Miyazaki, S. *et al.* Nuclear hormone retinoid X receptor (RXR) negatively regulates the glucose-stimulated insulin secretion of pancreatic β -cells. *Diabetes* **59**, 2854–2861, doi:[10.2337/db09-1897](https://doi.org/10.2337/db09-1897) (2010).
22. Sanvito, F. *et al.* TGF- β 1 overexpression in murine pancreas induces chronic pancreatitis and, together with TNF- α , triggers insulin-dependent diabetes. *Biochemical and biophysical research communications* **217**, 1279–1286, doi:[10.1006/bbrc.1995.2906](https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2906) (1995).
23. Armaka, M. *et al.* Mesenchymal cell targeting by TNF as a common pathogenic principle in chronic inflammatory joint and intestinal diseases. *The Journal of experimental medicine* **205**, 331–337, doi:[10.1084/jem.20070906](https://doi.org/10.1084/jem.20070906) (2008).
24. Bossen, C. *et al.* Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. *The Journal of biological chemistry* **281**, 13964–13971, doi:[10.1074/jbc.M601553200](https://doi.org/10.1074/jbc.M601553200) (2006).
25. Braghetta, P. *et al.* Distinct regions control transcriptional activation of the α 1(VI) collagen promoter in different tissues of transgenic mice. *The Journal of cell biology* **135**, 1163–1177, doi:[10.1083/jcb.135.4.1163](https://doi.org/10.1083/jcb.135.4.1163) (1996).
26. Buckley, A. R., Putnam, C. W. & Russell, D. H. Prolactin is a tumor promoter in rat liver. *Life sciences* **37**, 2569–2575, doi:[10.1016/0024-3205\(85\)90616-2](https://doi.org/10.1016/0024-3205(85)90616-2) (1985).
27. Jones, B. K., Monks, B. R., Liehaber, S. A. & Cooke, N. E. The human growth hormone gene is regulated by a multicomponent locus control region. *Molecular and cellular biology* **15**, 7010–7021, doi:[10.1128/MCB.15.12.7010](https://doi.org/10.1128/MCB.15.12.7010) (1995).
28. Chen, H. W., Meier, H., Heiniger, H. J. & Huebner, R. J. Tumorigenesis in strain DW-J mice and induction by prolactin of the group-specific antigen of endogenous C-type RNA tumor virus. *Journal of the National Cancer Institute* **49**, 1145–1154 (1972).
29. Ueki, I. *et al.* Inactivation of the acid labile subunit gene in mice results in mild retardation of postnatal growth despite profound disruptions in the circulating insulin-like growth factor system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 6868–6873, doi:[10.1073/pnas.120172697](https://doi.org/10.1073/pnas.120172697) (2000).
30. Shibli-Rahhal, A. & Schlechte, J. The effects of hyperprolactinemia on bone and fat. *Pituitary* **12**, 96–104, doi:[10.1007/s11102-008-0097-3](https://doi.org/10.1007/s11102-008-0097-3) (2009).
31. Dazzi, F., Ramasamy, R., Glennie, S., Jones, S. P. & Roberts, I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood reviews* **20**, 161–171, doi:[10.1016/j.blre.2005.11.002](https://doi.org/10.1016/j.blre.2005.11.002) (2006).
32. Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Episkopou, V. & Kollias, G. Immune and inflammatory responses in TNF α -deficient mice: a critical requirement for TNF α in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *The Journal of experimental medicine* **184**, 1397–1411, doi:[10.1084/jem.184.4.1397](https://doi.org/10.1084/jem.184.4.1397) (1996).
33. Ermolaeva, M. A. *et al.* Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. *Nature immunology* **9**, 1037–1046, doi:[10.1038/ni.1638](https://doi.org/10.1038/ni.1638) (2008).
34. Campagnoli, C. *et al.* Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* **98**, 2396–2402, doi:[10.1182/blood.V98.8.2396](https://doi.org/10.1182/blood.V98.8.2396) (2001).
35. Wilson, C., Bellen, H. J. & Gehring, W. J. Position effects on eukaryotic gene expression. *Annual review of cell biology* **6**, 679–714, doi:[10.1146/annurev.cb.06.110190.003335](https://doi.org/10.1146/annurev.cb.06.110190.003335) (1990).
36. de Vree, P. J. *et al.* Targeted sequencing by proximity ligation for comprehensive variant detection and local haplotyping. *Nature biotechnology* **32**, 1019–1025, doi:[10.1038/nbt.2959](https://doi.org/10.1038/nbt.2959) (2014).
37. Chabrod, P., Tavian, M., Humeau, L. & Peault, B. Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment. *Blood* **87**, 4109–4119 (1996).
38. Baker, A. R. *et al.* Osteoblast-specific expression of growth hormone stimulates bone growth in transgenic mice. *Molecular and cellular biology* **12**, 5541–5547, doi:[10.1128/MCB.12.12.5541](https://doi.org/10.1128/MCB.12.12.5541) (1992).
39. Palmiter, R. D., Norstedt, G., Gelinas, R. E., Hammer, R. E. & Brinster, R. L. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science* **222**, 809–814, doi:[10.1126/science.6356363](https://doi.org/10.1126/science.6356363) (1983).
40. Stewart, T. A. *et al.* An evaluation of the functions of the 22-kilodalton (kDa), the 20-kDa, and the N-terminal polypeptide forms of human growth hormone using transgenic mice. *Endocrinology* **130**, 405–414, doi:[10.1210/endo.130.1.1727714](https://doi.org/10.1210/endo.130.1.1727714) (1992).
41. Daughaday, W. H. *et al.* Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* **235**, 107–107, doi:[10.1038/235107a0](https://doi.org/10.1038/235107a0) (1972).
42. Woychik, R. P. & Alagramam, K. Insertional mutagenesis in transgenic mice generated by the pronuclear microinjection procedure. *The International journal of developmental biology* **42**, 1009–1017 (1998).
43. Parsons, J. A., Bartke, A. & Sorenson, R. L. Number and size of islets of Langerhans in pregnant, human growth hormone-expressing transgenic, and pituitary dwarf mice: effect of lactogenic hormones. *Endocrinology* **136**, 2013–2021, doi:[10.1210/endo.136.5.7720649](https://doi.org/10.1210/endo.136.5.7720649) (1995).
44. Goyvaerts, L., Schraenen, A. & Schuit, F. Serotonin competence of mouse beta cells during pregnancy. *Diabetologia* **59**, 1356–1363, doi:[10.1007/s00125-016-3951-2](https://doi.org/10.1007/s00125-016-3951-2) (2016).
45. Schraenen, A. *et al.* Placental lactogens induce serotonin biosynthesis in a subset of mouse beta cells during pregnancy. *Diabetologia* **53**, 2589–2599, doi:[10.1007/s00125-010-1913-7](https://doi.org/10.1007/s00125-010-1913-7) (2010).
46. Ling, C. *et al.* Prolactin (PRL) receptor gene expression in mouse adipose tissue: increases during lactation and in PRL-transgenic mice. *Endocrinology* **141**, 3564–3572, doi:[10.1210/endo.141.10.7691](https://doi.org/10.1210/endo.141.10.7691) (2000).
47. Yakar, S. *et al.* Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 7324–7329, doi:[10.1073/pnas.96.13.7324](https://doi.org/10.1073/pnas.96.13.7324) (1999).
48. Boren, J., Taskinen, M. R., Olofsson, S. O. & Levin, M. Ectopic lipid storage and insulin resistance: a harmful relationship. *Journal of internal medicine* **274**, 25–40, doi:[10.1111/joim.12071](https://doi.org/10.1111/joim.12071) (2013).
49. Wilcox, G. Insulin and insulin resistance. *The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists* **26**, 19–39 (2005).
50. Bohlooly, Y. M. *et al.* Growth hormone overexpression in the central nervous system results in hyperphagia-induced obesity associated with insulin resistance and dyslipidemia. *Diabetes* **54**, 51–62, doi:[10.2337/diabetes.54.1.51](https://doi.org/10.2337/diabetes.54.1.51) (2005).
51. Berryman, D. E. *et al.* Comparing adiposity profiles in three mouse models with altered GH signaling. *Growth hormone & IGF research: official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* **14**, 309–318, doi:[10.1016/j.gthr.2004.02.005](https://doi.org/10.1016/j.gthr.2004.02.005) (2004).
52. Fleenor, D., Arumugam, R. & Freemark, M. Growth hormone and prolactin receptors in adipogenesis: STAT-5 activation, suppressors of cytokine signaling, and regulation of insulin-like growth factor I. *Hormone research* **66**, 101–110, doi:[10.1159/000093667](https://doi.org/10.1159/000093667) (2006).

53. Kawai, M. *et al.* Growth hormone stimulates adipogenesis of 3T3-L1 cells through activation of the Stat5A/5B-PPARgamma pathway. *Journal of molecular endocrinology* **38**, 19–34, doi:10.1677/jme.1.02154 (2007).
54. Van Hauwermeiren, F. *et al.* Safe TNF-based antitumor therapy following p55TNFR reduction in intestinal epithelium. *The Journal of clinical investigation* **123**, 2590–2603, doi:10.1172/JCI65624 (2013).
55. Martari, M. *et al.* Partial rescue of growth failure in growth hormone (GH)-deficient mice by a single injection of a double-stranded adeno-associated viral vector expressing the GH gene driven by a muscle-specific regulatory cassette. *Human gene therapy* **20**, 759–766, doi:10.1089/hum.2008.197 (2009).
56. Yakar, S. *et al.* Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *The Journal of clinical investigation* **110**, 771–781, doi:10.1172/JCI15463 (2002).
57. Kahn, D. *et al.* Does hyperprolactinemia affect hepatic regeneration independent of sex steroids? *The Journal of laboratory and clinical medicine* **112**, 644–651 (1988).
58. Weaver, J. L., Broud, D. D., McKinnon, K. & Germolec, D. R. Serial phenotypic analysis of mouse peripheral blood leukocytes. *Toxicology mechanisms and methods* **12**, 95–118, doi:10.1080/10517230290075341 (2002).
59. Roederer, M., Nozzi, J. L. & Nason, M. C. SPICE: exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology* **79**, 167–174, doi:10.1002/cyto.a.21015 (2011).
60. Baumgarth, N. & Roederer, M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *Journal of immunological methods* **243**, 77–97, doi:10.1016/S0022-1759(00)00229-5 (2000).
61. Kugler, J. E. *et al.* High mobility group N proteins modulate the fidelity of the cellular transcriptional profile in a tissue- and variant-specific manner. *J Biol Chem* **288**, 16690–16703, doi:10.1074/jbc.M113.463315 (2013).
62. Tusher, V. G., Tibshirani, R. & Chu, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 5116–5121, doi:10.1073/pnas.091062498 (2001).
63. Barrett, T. *et al.* NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Res* **41**, D991–995, doi:10.1093/nar/gks1193 (2013).
64. Liao, L. *et al.* Liver-specific overexpression of the insulin-like growth factor-I enhances somatic growth and partially prevents the effects of growth hormone deficiency. *Endocrinology* **147**, 3877–3888, doi:10.1210/en.2005-1537 (2006).

Acknowledgements

We thank Spiros Lalos, Anna Katevaina and Dimitra Papadopoulou for technical assistance in histopathology. This work has been supported by IMI-funded project BeTheCure (BTCure, 115142–2) and Advanced ERC grant MCs-inTEST (340217) to G.K., by the Helmholtz Portfolio Theme “Metabolic Dysfunction and Common Disease” to J.B., by the Helmholtz Alliance “Imaging and Curing Environmental Metabolic Disease “ICEMED” to J.B., by the German Federal Ministry of Education and Research (Infrafrontier grant 01KX1012) to M.H.d.A. and to the German Center for Diabetes Research. The authors thank the InfrafrontierGR Research Infrastructure for excellent mouse hosting and phenotyping facilities.

Author Contributions

A.K., M.R. and G.K. designed the study, N.K. generated the transgenic mouse TgC6hp55, A.K. performed experiments, J.R., M.W., L.B., B.R., J.C.-W., M.H., J.B., F.N. and T.A. performed and analyzed mouse experiments and E.W., H.F., V.G.-D. and M.H.d.A. participated in the conception of the phenotypic tests at the GMC, M.A. performed the microCT experiments and analyzed the results, A.K. and M.R. analyzed the data and wrote the manuscript, G.K. critically revised the manuscript, all authors reviewed and approved the final manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-02581-8

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Accession codes: The liver transcriptome data are accessible through GEO series accession number GSE95345.

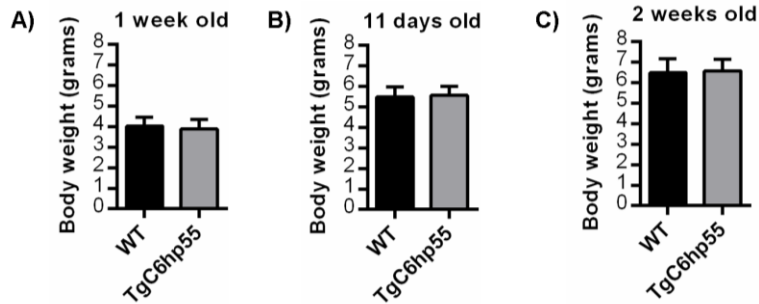
Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

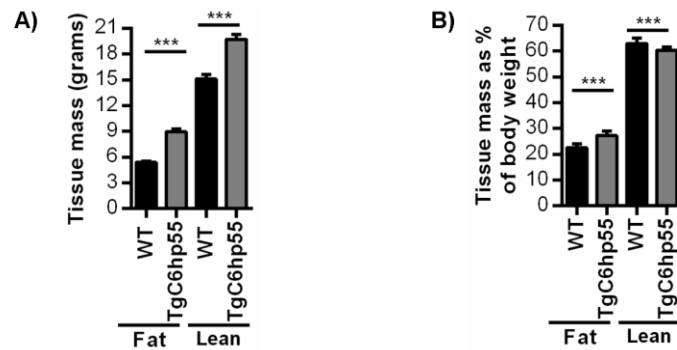
© The Author(s) 2017

Supplementary Figures

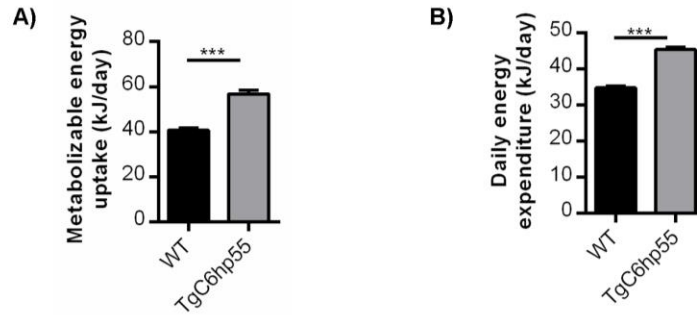


Supplementary Figure S1. TgC6hp55 mice do not show increased body weight at the first 2 weeks of age.

(A) Body weight comparison at 1 week (n=29 wt and n=22 TgC6hp55 mice). (B) Body weight comparison at 11 days (n=41 wt and n=33 TgC6hp55 mice). (C) Body weight comparison at 2 weeks (n=41 wt and n=32 TgC6hp55 mice). Data represent mean $\pm$ SEM

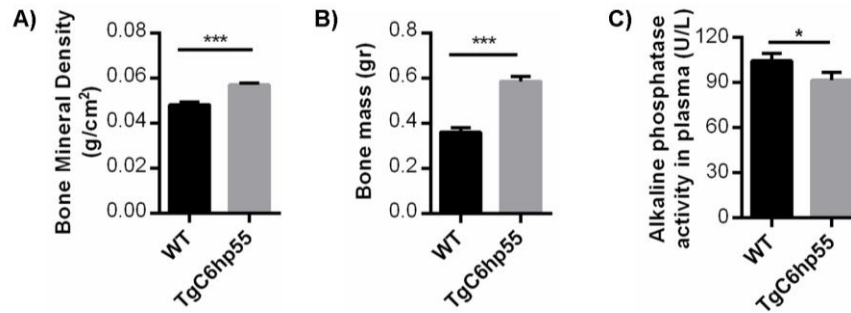


Supplementary Figure S2. (A) Whole body composition analysis using Nuclear magnetic Resonance (NMR). Measurement of whole body lean and fat mass in wt (n=30) and TgC6hp55 (n=29) mice at the age of 13 weeks. (B) Normalization of the NMR values presented in (S2A Fig.) according to body weight. Data represent mean $\pm$ SEM



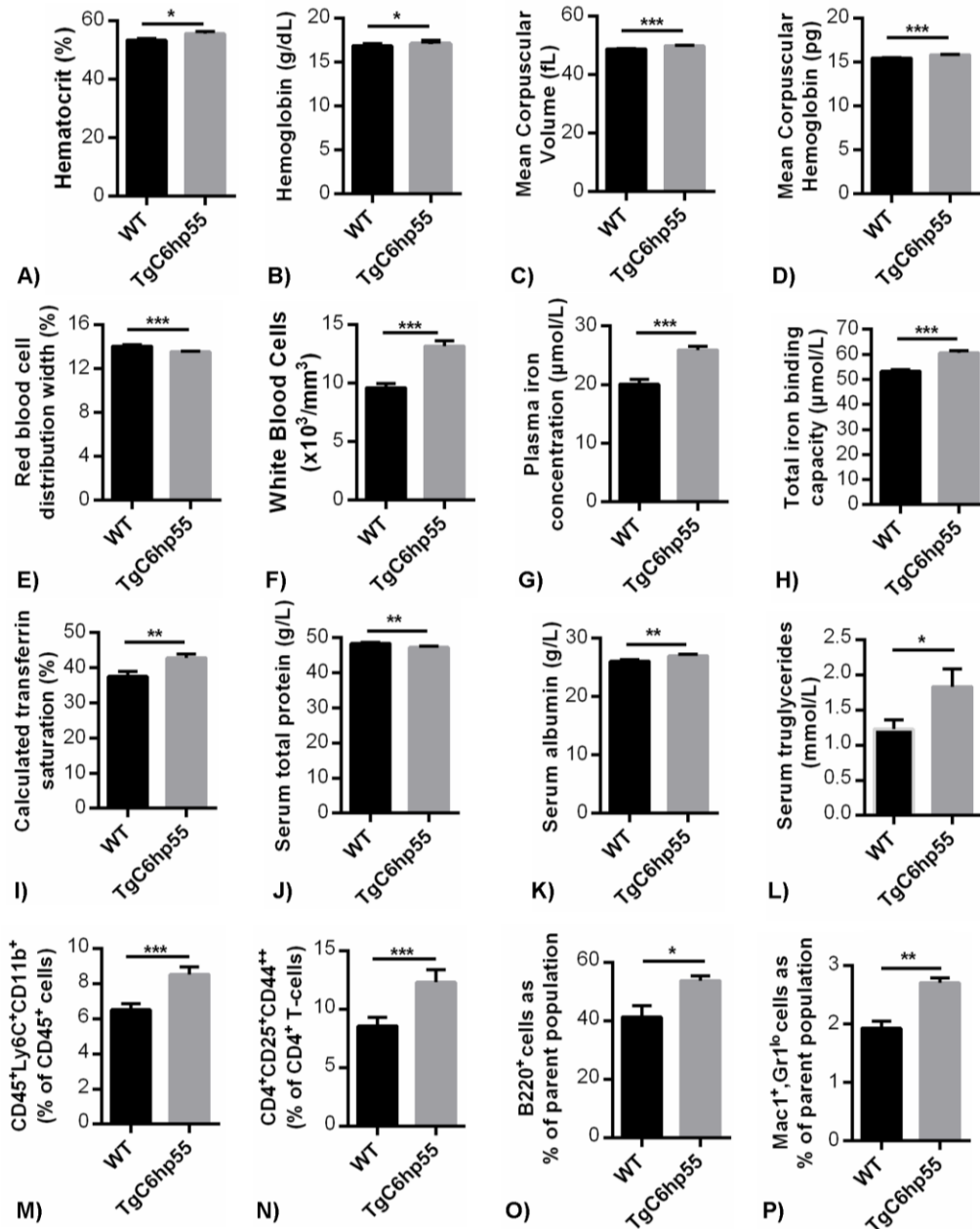
Supplementary Figure S3. TgC6hp55 mice show increased energy consumption as well as increased metabolism.

(A) Daily metabolizable energy uptake (N= 15 WT and 11 TgC6hp55 mice). **(B)** Daily energy expenditure (N= 15 WT and 11 TgC6hp55 mice). Data represent mean±SEM



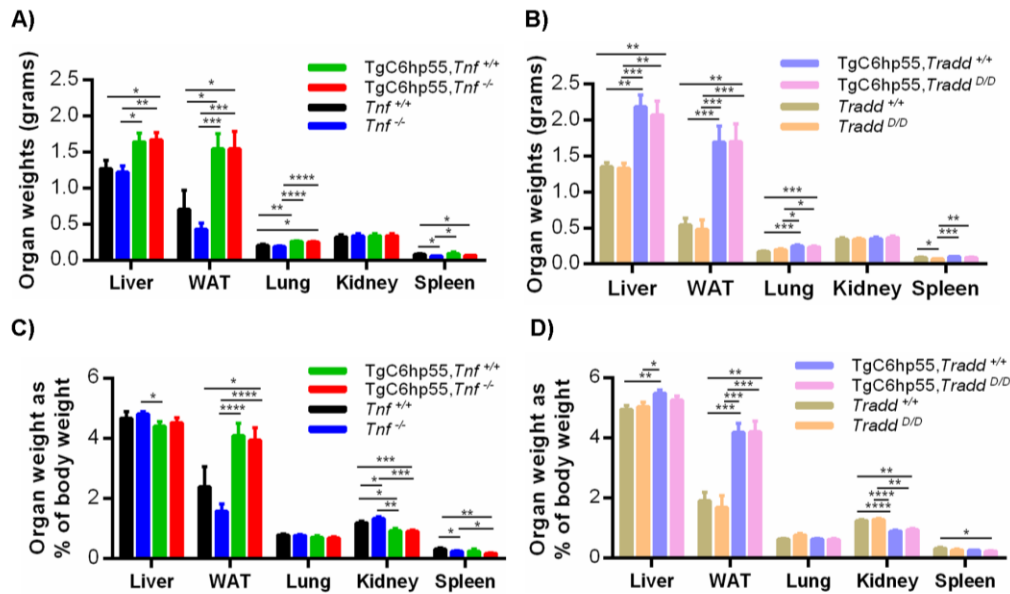
Supplementary Figure S4. TgC6hp55 mice show alterations in bone parameters and metabolism.

(A) Comparison of Bone Mineral Density in wt (n=20) and TgC6hp55 (n=18) mice. **(B)** Comparison of the total bone mass (without calculating the skull) in wt (n=20) and TgC6hp55 (n=18) mice. **(C)** Comparison of the serum Alkaline Phosphatase activity in wt (n=29) and TgC6hp55 (n=30) mice. Data represent mean±SEM



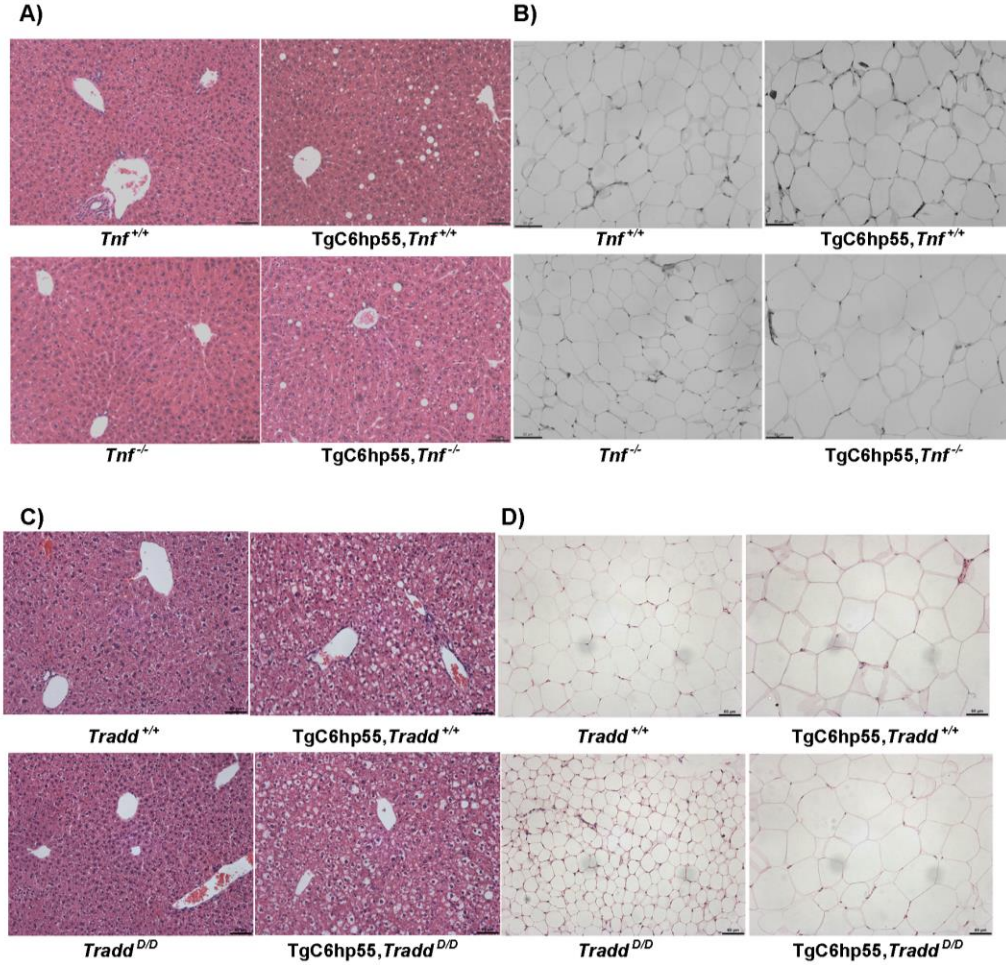
Supplementary Figure S5. TgC6hp55 mice show alterations in a plethora of parameters of their physiology.

(A-F) Hematological analysis of the serum of wt (n=28) and TgC6hp55 (n=28) mice: (A) Comparison of Hematocrit. (B) Comparison of Hemoglobin. (C) Comparison of Mean Corpuscular Volume (MCV). (D) Comparison of Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH). (E) Comparison of Red Blood Cell Distribution Width (RDW). (F) Comparison of White Blood Cell numbers. (G-L) Biochemical analysis of the serum of wt (n=29) and TgC6hp55 (n=30) mice: (G) Comparison of Iron concentration in the plasma. (H) Comparison of the Total Iron Binding Capacity (TIBC). (I) Comparison of the calculated transferrin saturation. (J) Comparison of the total serum protein. (K) Comparison of the serum Albumin levels. (L) Comparison of serum triglycerides in ad libitum fed mice. (M-N) Immunological analysis in the peripheral blood of wt and TgC6hp55 mice: (M) Comparison of LyC6⁺ monocytes from wt (n=22) and TgC6hp55 (n=23) mice. (N) Comparison of CD4⁺CD45⁺CD44⁺ T cells from wt (n=29) and TgC6hp55 (n=30) mice. (O-P) Immunological analysis in the spleen of wt (n=4) and TgC6hp55 (n=4) mice: (O) Comparison of B220⁺ cells. (P) Comparison of Mac1⁺Gr1^{lo} cells. Data represent mean $\pm$ SEM



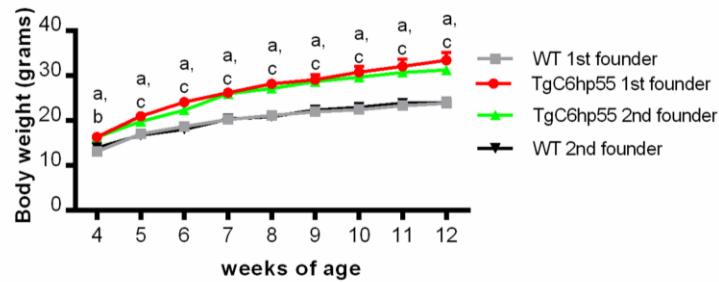
Supplementary Figure S6. TgC6hp55*Tnf*^{-/-} and TgC6hp55*Tradd*^{D/D} mice show increased organ weights similar to the TgC6hp55 mice.

(A) Comparison of liver, abdominal white adipose tissue (WAT), lung (both lungs), kidney (both kidneys) and spleen weight among *Tnf*^{+/+} (n=6), *Tnf*^{-/-} (n=11), TgC6hp55*Tnf*^{+/+} (n=6) and TgC6hp55*Tnf*^{-/-} (n=9) mice. **(B)** Comparison of liver, abdominal white adipose tissue (WAT), lung (both lungs), kidney (both kidneys) and spleen weight among *Tradd*^{+/+} (n=8), *Tradd*^{D/D} (n=7), TgC6hp55*Tradd*^{+/+} (n=7) and TgC6hp55*Tradd*^{D/D} (n=7) mice. **(C)** Comparison of the normalized organ weights from (S6A Fig) expressed as % of the mouse body weight. **(D)** Comparison of the normalized organ weights from (S6B Fig) expressed as % of the mouse body weight. Data represent mean±SEM



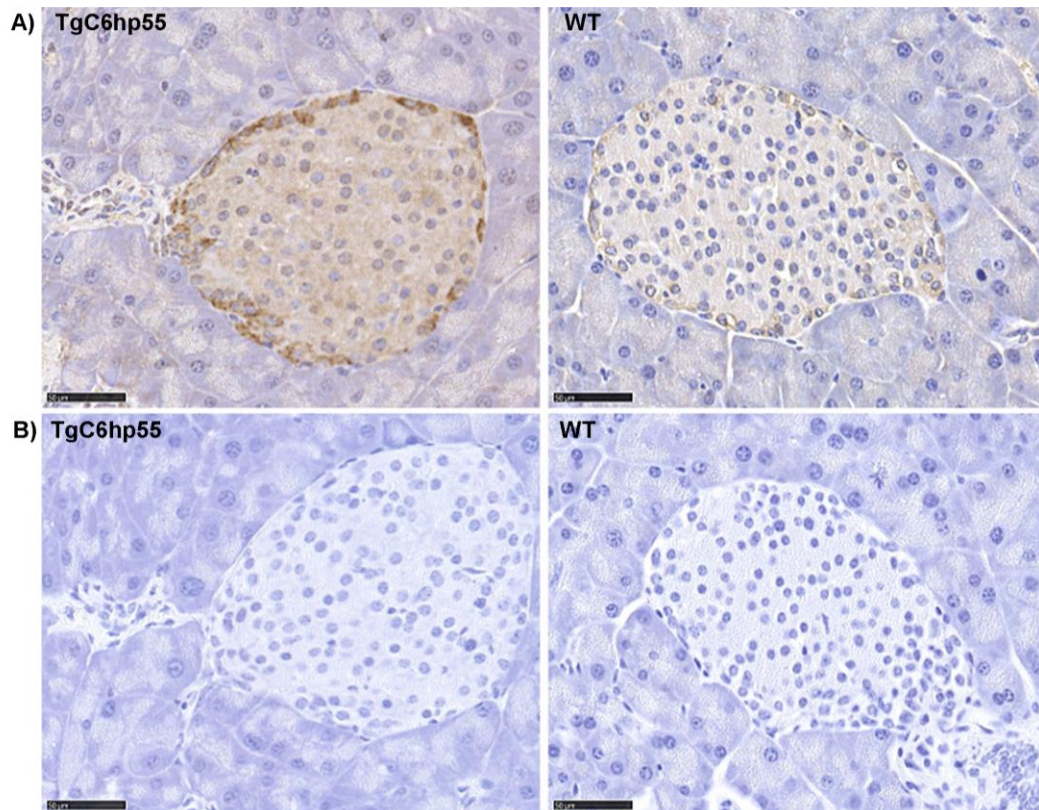
Supplementary Figure S7. TgC6hp55*Tnf*^{-/-} and TgC6hp55*Tradd*^{D/D} mice show histopathological alterations in their liver and white adipose tissue similar to the TgC6hp55 mice.

(A) Histopathological assessment of lipid accumulation in the livers of *Tnf*^{+/+}, *Tnf*^{-/-}, TgC6hp55*Tnf*^{+/+} and TgC6hp55*Tnf*^{-/-} mice (H/E staining). **(B)** Histopathological comparison of the adipocyte size from the abdominal white adipose tissue of *Tnf*^{+/+}, *Tnf*^{-/-}, TgC6hp55*Tnf*^{+/+} and TgC6hp55*Tnf*^{-/-} mice (H/E staining). **(C)** Histopathological assessment of lipid accumulation in the livers of *Tradd*^{+/+}, *Tradd*^{D/D}, TgC6hp55*Tradd*^{+/+} and TgC6hp55*Tradd*^{D/D} mice (H/E staining). **(D)** Histopathological comparison of the adipocyte size from the abdominal white adipose tissue of *Tradd*^{+/+}, *Tradd*^{D/D}, TgC6hp55*Tradd*^{+/+} and TgC6hp55*Tradd*^{D/D} mice (H/E staining). *Tnf*^{+/+} (n=6), *Tnf*^{-/-} (n=11), TgC6hp55*Tnf*^{+/+} (n=6) and TgC6hp55*Tnf*^{-/-} (n=9), *Tradd*^{+/+} (n=8), *Tradd*^{D/D} (n=7), TgC6hp55*Tradd*^{+/+} (n=7) and TgC6hp55*Tradd*^{D/D} (n=7) mice. All figures are in 200x magnification / scale=60μm.



Supplementary Figure S8. TgC6hp55 mice coming from Founder 2 keep showing enhanced somatic growth identical to that observed in the mice coming from Founder 1. Body weight curve in wt mice coming from Founder 1 (n=10), transgenic mice coming from Founder 1 (n=10), wt mice coming from Founder 2 (n=11) and transgenic mice coming from Founder 2 (n=15). At all time points, wt mice from both Founders do not show any difference in their body weight. Simultaneously, the transgenic mice coming from both Founders also show no difference in their body weight at all time points.

a represents *** statistical difference between the body weight of TgC6hp55 mice coming from Founder 1 and the body weight of the wt mice coming from Founder 1. **b** represents ** statistical difference between the body weight of the transgenic mice coming from Founder 2 and the body weight of the wt mice coming from Founder 2. **c** represents *** statistical difference between the body weight of the transgenic mice coming from Founder 2 and the body weight of the wt mice coming from Founder 2. Data represent mean±SEM



Supplementary Figure S9. TgC6hp55 mice show enhanced production of serotonin in their pancreatic islets.

A) Representative serotonin immunostaining (brown) of neuroendocrine pancreas (islets) of a TgC6hp55 mouse and a wildtype mouse. B) The negative controls of the immunostaining in the respective tissue (without the primary antibody). n=3 male and 3 female wild type mice and n=3 male and 3 female TgC6hp55 mice. All figures are in 400x magnification / scale = 50µm.