



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

———— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 ————

Σχολή Επιστημών Υγείας  
Ιατρική Σχολή  
Παθολογικός Τομέας  
Α' Κλινική Εντατικής Θεραπείας  
ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός»

**Ο ρόλος του versican στο μεσοθηλίωμα υπεζωκότα**

Απόστολος Γ. Παππάς

Πνευμονολόγος-Φυματιολόγος

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

Αθήνα, 2020



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

Σχολή Επιστημών Υγείας  
Ιατρική Σχολή  
Παθολογικός Τομέας  
Α' Κλινική Εντατικής Θεραπείας  
ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός»

**Ο ρόλος του versican στο μεσοθηλίωμα υπεζωκότα**

Απόστολος Γ. Παππάς  
Πνευμονολόγος-Φυματιολόγος

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

Αθήνα, 2020

**Ημερομηνία αιτήσεως:**

21 Δεκεμβρίου 2012

**Ημερομηνία ορισμού 3/μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

26 Μαρτίου 2013

**Μέλη 3/μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Ιωάννης Καλομενίδης, Καθηγητής (Επιβλέπων),

Σπυρίδων Ζακυνθινός, Καθηγητής,

Γρηγόριος Στρατάκος, Ανπληρωτής Καθηγητής

**Ημερομηνία ορισμού του Θέματος:**

21 Ιουλίου 2014

**Ημερομηνία καταθέσεως της διδακτορικής διατριβής:**

20 Νοεμβρίου 2020

*Στην Ανθή*

*Στους γονείς,  
τη θεία  
και τις αδελφές μου*

### Ιπποκράτειος Όρκος:

1. Όμνυμι Απόλλωνα ιητρόν καί Ασκληπιόν καί Ύγείαν καί Πανάκειαν καί θεούς πάντας τε και πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσιν κατά δύναμιν καί κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καί ξυγγραφὴν τήνδε.
2. Ἠγήσασθαι μὲν τόν διδάξαντά με την τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καί βίου κοινώσασθαι, καί χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καί γένος τό ἐξ αὐτοῦ ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καί διδάξειν τήν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καί ξυγγραφῆς.
3. Παραγγελίης τε καί ἀκροήσιος καί τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσι καί τοῖσι τοῦ ἐμέ διδάξαντος καί μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καί ὠρκισμένοις νόμῳ ιητρικῷ, ἄλλῳ δέ οὐδενί.
4. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατά δύναμιν καί κρίσιν ἐμήν, ἐπί δηλήσει δέ καί ἀδικίῃ εἴρξω.
5. Οὐ δώσω δέ οὐδέ φάρμακον οὐδενί αἰτηθεῖς θανάσιμον, οὐδέ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε.
6. Ἄγνων δε καί ὁσίως διατηρήσω βίον τόν ἐμόν καί τέχνην τήν ἐμήν.
7. Οὐ τεμέω δε οὐδέν μιν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δε ἐργάτησιν ἀνδράσιν πρήξιος τῆσδε.
8. Ἐς οἰκίας δε ὀκόσας ἄν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτός ἐών πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καί φθορίης τῆς τε ἄλλης καί ἀφροδισίων ἔργων ἐπί τε γυναικείων σωμαίων καί ἀνδρείων, ἐλευθέρων τε καί δούλων.
9. Ἄ δ' ἄν ἐν θεραπείῃ ἦ ἴδω ἢ ἀκούσω, ἦ καί ἄνευ θεραπείης κατά βίον ἀνθρώπων, ἄ μή χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τά τοιαῦτα.
10. Όρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι καί μή ξυγγέοντι εἶη ἐπαύρασθαι καί βίου καί τέχνης, δοξαζομένῳ παρά πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τόν αἰεὶ χρόνον· παραβαίνοντι δέ καί ἐπιορκέοντι, τᾶναντία τουτέων.

## **Βιογραφικό Σημείωμα**

### **Α. Σπουδές:**

1. Πτυχίο: Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με βαθμό «λίαν καλώς».
2. Μεταπτυχιακές Σπουδές: Υποψήφιος Διδάκτωρ Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών από τις 26-3-2013.

### **Β. Επαγγελματική Εμπειρία:**

1. 1/7/2011 έως 31/7/2011: πρακτική άσκηση στο τμήμα Εσωτερικής Παθολογίας-Πνευμονολογίας στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Βελιγραδίου (Σερβία).
2. 3/9/2012 έως 27/9/2012: πρακτική άσκηση στο τμήμα Εσωτερικής Παθολογίας-Πνευμονολογίας στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο (RAKUS) Ρίγας (Λετονία).
3. 14/7/2014 έως 20/1/2016: απασχόληση στην 4<sup>η</sup> Πνευμονολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Νοσημάτων Θώρακος (ΓΝΝΘΑ) «Η Σωτηρία» στα πλαίσια απόκτησης ιατρικής ειδικότητας Πνευμονολογίας-Φυματιολογίας.
4. 29/2/2016 έως 29/4/2020: απασχόληση στην Α' Κλινική Εντατικής Θεραπείας/Πνευμονολογική Κλινική του ΓΝ «Ευαγγελισμός» στα πλαίσια απόκτησης ιατρικής ειδικότητας Πνευμονολογίας-Φυματιολογίας.
5. Από 30/4/2020: απασχόληση στην Α' Κλινική Εντατικής Θεραπείας/Πνευμονολογική Κλινική του ΓΝ «Ευαγγελισμός» ως Επικουρικός Επιμελητής Β'.

### **Γ. Συγγραφικό Έργο:**

1. Vazakidou ME, Magkouta S, Moschos C, Psallidas I, Pappas A, Psarra K, Kalomenidis I. Temsirolimus targets multiple hallmarks of cancer to impede mesothelioma growth in vivo. *Respirology*. 2015;20:1263-71.

2. Magkouta S, Pappas A, Moschos C, Vazakidou ME, Psarra K, Kalomenidis I. Icmt inhibition exerts anti-angiogenic and anti-hyperpermeability activities impeding malignant pleural effusion. *Oncotarget*. 2016;7:20249-59.
3. Magkouta S, Pappas A, Pateras IS, Kollintza A, Moschos C, Vazakidou ME, Karavana V, Gorgoulis VG, Kalomenidis I. Targeting Tie-2/angiopoietin axis in experimental mesothelioma confers differential responses and raises predictive implications. *Oncotarget*. 2018;9:21783-21796.
4. Pappas AG, Magkouta S, Pateras IS, Skianis I, Moschos C, Vazakidou ME, Psarra K, Gorgoulis VG, Kalomenidis I. Versican modulates tumor-associated macrophage properties to stimulate mesothelioma growth. *Oncoimmunology*. 2018;8(2):e1537427.
5. Magkouta S, Kollintza A, Moschos C, Spella M, Skianis I, Pappas A, Vazakidou ME, Stathopoulos G, Kalomenidis I. Role of angiopoietins in mesothelioma progression. *Cytokine*. 2019;118:99-106.
6. Magkouta SF, Pappas AG, Vaitsi PC, Agioutantis PC, Pateras IS, Moschos CA, Pliopoulou MP, Kosti CN, Loutrari HV, Gorgoulis VG, Kalomenidis IT. MTH1 favors mesothelioma progression and mediates paracrine rescue of bystander endothelium from oxidative damage. *JCI Insight*. 2020;5(12):e134885.

#### **Δ. Βραβεία/Επαινοι/Υποτροφίες:**

1. Βραβείο στο πλαίσιο προγράμματος χορηγιών του ομίλου EFG-Eurobank «η μεγάλη στιγμή για την Παιδεία» για τον ανώτερο γενικό βαθμό πρόσβασης στην τριτοβάθμια εκπαίδευση για τη σχολική περίοδο 2005-2006.
2. Έπαινος για την προφορική εργασία «Επίδραση της κακοήθους υπεζωκοτικής συλλογής στην παθοφυσιολογία των καρκινικών και αυτόχθονων κυττάρων της υπεζωκοτικής κοιλότητας» στα πλαίσια του 24<sup>ου</sup> Πανελλήνιου Συνεδρίου Νοσημάτων Θώρακος της Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρείας (ΕΠΕ).



3. Υποτροφία από την Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία για την ερευνητική εργασία με τίτλο « Ο ρόλος της αναστολής του MTH-1 στο μεσοθηλίωμα υπεζωκότα».

4. Υποτροφία από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) στα πλαίσια του προγράμματος χρηματοδότησης « Ερευνητικά Προγράμματα Αριστείας ΙΚΥ/Siemens» για την ερευνητική εργασία με τίτλο « Ο ρόλος του versican στο μεσοθηλίωμα υπεζωκότα».

#### **E. Συνέδρια/Σεμινάρια/Ημερίδες/Εκδηλώσεις:**

1. 2-3/2/2008: 4<sup>ο</sup> Διεθνές Συνέδριο Βιοτεχνολογίας.

2. 7-11/4/2008: Εφαρμοσμένη Φυσιολογία-Γενική Ιατρική.

3. 11/2/2009: «Αλκοολισμός» 3<sup>η</sup> Επιστημονική Συνάντηση.

4. 24-27/11/2011: 20<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος (ΕΠΕ).

5. 24-26/5/2013: Ερευνητική Συνάντηση Ομάδας Νοσημάτων Υπεζωκότα (συμμετοχή ως ομιλητής).

6. 5-7/12/2013: 22<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος (συμμετοχή ως ομιλητής) και συμμετοχή στο σεμινάριο διαθωρακικού υπερήχου υπό την αιγίδα της ΕΠΕ.

7. 26-29/11/2015: 24<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος (ΕΠΕ) - συμμετοχή ως ομιλητής.

8. 23-26/6/2016: 25<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος (ΕΠΕ) - συμμετοχή ως ομιλητής.

9. 3-7/9/2016: European Respiratory Society (ERS) Congress in London (συμμετοχή ως ομιλητής).

10. 13-16/12/2018: 27<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος (ΕΠΕ).

11. 12-15/12/2019: 28<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος (ΕΠΕ).

12. 6-9/9/2020: Virtual ERS Congress.

**ΣΤ. Ξένες Γλώσσες:**

1. Αγγλική: Άριστα, Proficiency – University of Michigan.

2. Γερμανική: Άριστα, Mittelstufe - Goethe Institut.

# Περιεχόμενα

<b>Περίληψη</b> .....	1
<b>Γενικό Μέρος</b> .....	3
Κακόηθες Μεσοθηλίωμα Υπεζωκότα.....	3
Versican.....	9
<b>Ειδικό Μέρος</b> .....	17
Υπόθεση/Σκοπός .....	17
Υλικά/Μέθοδοι.....	18
Αποτελέσματα .....	27
Συζήτηση/Συμπεράσματα.....	48
<b>Βιβλιογραφία</b> .....	53

## Περίληψη

Η πρωτεΐνη versican προάγει την καρκινική αύξηση σε πειραματικά μοντέλα μέσω αυτοκρινών και παρακρινών μηχανισμών. Ο ρόλος της στην πρόοδο του μεσοθηλιώματος δεν έχει μέχρι τώρα ερευνηθεί. Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε την επίδραση της -εκκρινόμενης από τον όγκο- πρωτεΐνης versican στην ανάπτυξη του μεσοθηλιώματος και τους υποκείμενους μηχανισμούς που οδηγούν στο αποτέλεσμα αυτό. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα ελέγχου ή -ενδεή ως προς το versican- AE17 και AB1 κύτταρα μεσοθηλιώματος μύς χορηγήθηκαν ενδοϋπεζωκοτικά σε συγγενικά στελέχη μύων, ώστε να δημιουργηθεί μεσοθηλίωμα υπεζωκότα και συνοδός κακοήθης υπεζωκοτική συλλογή (ΚΥΣ). Οι ανοσολογικοί υποπληθυσμοί της υπεζωκοτικής συλλογής και του κακοήθους ιστού χαρακτηρίστηκαν με κυτταρομετρία ροής. Κύτταρα μεσοθηλιώματος συγκαλλιεργήθηκαν με συγγενή μακροφάγα, με σκοπό να εξετάσουμε την επιρροή του versican στη μεταξύ τους αλληλεπίδραση, καθώς και με συγγενή ενδοθηλιακά κύτταρα, ώστε να μελετηθεί η επίδραση της πρωτεΐνης αυτής στην αγγειακή διαπερατότητα. Η έκφραση του versican μελετήθηκε σε δείγματα από ανθρώπινο μεσοθηλίωμα και συνοδό ΚΥΣ, καθώς και σε καλοήγη υπεζωκοτικό ιστό και πλευριτικό υγρό. Παρατηρήσαμε ότι, η αποσιώπηση του versican οδήγησε σε μειωμένη ποσότητα ιστού μεσοθηλιώματος και μειωμένο όγκο της συνοδού ΚΥΣ, επιδρώντας στον πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων *in vivo* (ενώ η καρκινική αύξηση δεν επηρεάστηκε σε πειράματα *in vitro*) περιορίζοντας παράλληλα την αγγειακή διαπερατότητα. Μύες που έπασχαν από -ενδεές ως προς το versican- μεσοθηλίωμα χαρακτηρίστηκαν από μικρότερο αριθμό ιστικών/υπεζωκοτικών μακροφάγων και ουδετεροφίλων, και μικρότερο αριθμό υπεζωκοτικών T-ρυθμιστικών CD4 (+) κυττάρων, συγκριτικά με τους μύες της ομάδας ελέγχου. Τα μακροφάγα που συγκαλλιεργήθηκαν με -ενδεή ως προς το versican- κύτταρα μεσοθηλιώματος παρουσίασαν στροφή προς τον M1 κυτταροτοξικό φαινότυπο και διέθεταν αυξημένες φαγοκυτταρικές ιδιότητες έναντι των καρκινικών κυττάρων, συγκριτικά με τα μακροφάγα ελέγχου. Σε συγκαλλιέργεια, τα -ενδεή ως προς το versican- μεσοθηλιακά κύτταρα δεν διέγειραν το ίδιο αποτελεσματικά την διαπερατότητα της ενδοθηλιακής μονοστιβάδας, σε σύγκριση με τα κύτταρα

ελέγχου. Διαπιστώσαμε επίσης, ότι η πρωτεΐνη versican υπερεκφράζεται στο ανθρώπινο μεσοθηλίωμα και τη συνδό ΚΥΣ. Συμπερασματικά, το versican, που εκκρίνεται από τον όγκο, προάγει την ανάπτυξη του μεσοθηλιώματος διαμορφώνοντας ένα -φιλικό προς τον όγκο- φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον, κυρίως ρυθμίζοντας τις λειτουργίες των μακροφάγων έναντι των καρκινικών κυττάρων.

## **Abstract**

Versican promotes experimental tumor growth through cell- and non cell-autonomous mechanisms. Its role in mesothelioma progression has not been investigated so far. In this study we investigated the impact of tumor-derived versican in mesothelioma progression and the underlying mechanism of its action. For this purpose, versican-silenced or control AE17 and AB1 murine mesothelioma cells were intrapleurally injected into syngeneic mice, in order to create pleural mesotheliomas and pleural effusions. Intratumoral and pleural immune subsets were assessed using flow cytometry. Mesothelioma cells were co-cultured with syngeneic macrophages to examine versican's impact on their interaction and endothelial cells to assess the effect of versican in endothelial permeability. Versican expression was assessed in human mesotheliomas and mesothelioma-related pleural effusions and benign pleural tissue and effusions. We observed that, versican silencing reduced mesothelioma mass and pleural fluid volume by affecting tumor cell proliferation and apoptosis *in vivo*, while tumor cell growth remained intact *in vitro*, and limited pleural vascular permeability. Mice harboring versican-deficient tumors presented fewer tumor/pleural macrophages and neutrophils, and fewer pleural T-regulatory cells, compared to the control animals. Macrophages co-cultured with versican-deficient mesothelioma cells were polarized towards M1 anti-tumor phenotype and demonstrated increased tumor cell phagocytic capacity, compared to macrophages co-cultured with control tumor cells. In co-culture, endothelial monolayer permeability was less effectively stimulated by versican-deficient cells than control cells. Versican was over-expressed in human mesothelioma tissue and mesothelioma-associated effusion. In conclusion, tumor cell-derived versican stimulates mesothelioma progression by shaping a tumor friendly inflammatory *milieu*, mainly by blunting macrophage anti-tumor activities.

## Γενικό Μέρος

### Κακόηθες Μεσοθηλίωμα Υπεζωκότα

Το Κακόηθες Μεσοθηλίωμα Υπεζωκότα (ΚΜΥ) είναι ένας επιθετικός τύπος καρκίνου της υπεζωκοτικής κοιλότητας, που προέρχεται από τα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα και συσχετίζεται κυρίως με την επαγγελματική (και πιο σπάνια με την περιβαλλοντική ή οικιακή) έκθεση στον αμιάντο [1]. Υπολογίζεται ότι ένα ποσοστό 8% έως 13% των απασχολούμενων στην εξόρυξη και επεξεργασία αμιάντου θα αναπτύξει τελικά μεσοθηλίωμα [2], ωστόσο δεν έχει πλήρως ξεκαθαριστεί αν υφίσταται δόσο-εξαρτώμενη ή/και χρονο-εξαρτώμενη σχέση μεταξύ της έκθεσης στον αμιάντο και της εμφάνισης μεσοθηλιώματος. Αν και η έκθεση στον αμιάντο παραμένει ο πιο μείζων παράγοντας κινδύνου, η μόλυνση με τον ιό simian virus (SV) 40 ίσως ενέχεται στην παθογένεση του ΚΜΥ [3]. Συνυπολογίζοντας την μακρά λανθάνουσα περίοδο της νόσου (30 έως 50 έτη), σε συνδυασμό με την απαγόρευση εξόρυξης και χρήσης του αμιάντου στις ανεπτυγμένες χώρες, η επίπτωση του ΚΜΥ στις περιοχές αυτές αναμένεται να εμφανίσει *plateau* μέχρι το 2020 [4]. Ωστόσο το γεγονός ότι το 80% του παγκοσμίου πληθυσμού διαβίει σε χώρες όπου ο αμιάντος δεν έχει απαγορευθεί και το 90% του αμιάντου που χρησιμοποιείται παγκοσμίως παράγεται σε χώρες όπως η Ρωσία, το Καζακστάν, η Κίνα και η Ινδία, καθιστά πιθανή την εμφάνιση μιας παγκόσμιας «επιδημίας» της νόσου στις επόμενες δεκαετίες [5]. Το ΚΜΥ παραμένει μια νόσος με δυσμενή πρόγνωση, η οποία εμφανίζει διάμεση επιβίωση περί τους 9-12 μήνες από τη στιγμή της διάγνωσης [6,7].

Παθοφυσιολογικά, αν και οι μηχανισμοί πρόκλησης ΚΜΥ δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί, φαίνεται ότι οι μακριές και λεπτές ίνες αμιάντου φθάνουν με την εισπνοή στις κυψελίδες, διαπερνούν το αναπνευστικό επιθήλιο και διαμέσου της λεμφικής οδού εισέρχονται στην υπεζωκοτική κοιλότητα, όπου έρχονται σε επαφή με την επιφάνεια των μεσοθηλιακών κυττάρων. Ακολούθως μπορούν άμεσα να επηρεάσουν το φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των μεσοθηλιακών κυττάρων διαπερνώντας τη μιτωτική άτρακτο και διαταράσσοντας έτσι τη μιτωτική διαδικασία, δημιουργώντας ανευπλοειδία ή άλλου τύπου χρωμοσωμική ανωμαλία [3]. Σε πειραματικά μοντέλα μεσοθηλιώματος αρουραίων παρατηρήθηκε ότι οι ίνες αμιάντου επάγουν τα πρωτο-ογκογονίδια *c-fos* και

*c-jun* με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο [8]. Ο συνεχής ερεθισμός των μεσοθηλιακών κυττάρων οδηγεί σε παρατεταμένη φλεγμονή, με αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species - ROS) και επακόλουθο χρόνιο οξειδωτικό stress σε πληθώρα κυτταρικών πληθυσμών. Οι συνθήκες αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή συγκεκριμένων νουκλεϊνικών προϊόντων, όπως η 8-υδροξύ-γουανοσίνη [8-hydroxy-guanosine (8-OHdG)], που προκαλούν θραύσεις στην διπλή έλικα του DNA των μεσοθηλιακών κυττάρων [8]. Οι ίδιες αυτές 8-OHd βάσεις έχουν παρατηρηθεί σε λεμφοκύτταρα απομονωμένα από το πλάσμα ατόμων αρκετές δεκαετίες μετά την τεκμηριωμένη έκθεσή τους στον αμιάντο, υποδεικνύοντας μια συνεχή διαδικασία οξειδωτικού stress [9]. Η χρόνια φλεγμονή οδηγεί σε ενεργοποίηση ενδοκυττάρων οδών, όπως το μονοπάτι Wnt (Wingless-related integration site) [10,11] με αποτέλεσμα την υπερέκφραση διαφόρων προφλεγμονωδών κυτταροκινών [8], όπως ο Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) και η High-mobility Group Protein B1 (*HMGB1*) [12], γεγονός που οδηγεί στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο Nuclear Factor Kappa-B (NF- $\kappa$ B), προωθώντας έτσι την επιβίωση και αύξηση μεσοθηλιακών κυττάρων, που έχουν συσσωρεύσει μεταλλάξεις κάτω από την επίδραση των ινών αμιάντου. Σε μοριακό επίπεδο, είναι πλέον έκδηλο ότι υπάρχει μια γενετική επιρρέπεια στην ανάπτυξη ΚΜΥ [13,14]. Η πιο συχνή χρωμοσωμική ανωμαλία είναι η απώλεια ετεροζυγωτίας στο χρωμόσωμα 22, ωστόσο δομικές επαναδιατάξεις των 1p, 3p, 9p 6q έχουν συχνά περιγραφεί [15]. Η απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων φαίνεται πως είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ανάπτυξη του ΚΜΥ [16], με τα πιο συχνά να είναι τα εξής: α) cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*CDKN2A*) το οποίο εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου [17,18], β) BRCA1-associated protein 1 (*BAP1*) [19,20] το οποίο εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA εκφράζοντας την πυρηνική ντεουμπικουιτινάση BAP-1 [21], γ) neurofibromin 2 (*NF2*) [22,23] το οποίο ελέγχει το ενδοκυττάριο μονοπάτι Hippo-YAP1 [24,25], υπεύθυνο για τη ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την έκφραση αυξητικών παραγόντων (όπως ο VEGF-vascular endothelial growth factor) και την αντοχή στην απόπτωση και δ) Wilms tumor 1 (*WT1*), το οποίο αναστέλλει τη δράση του p53. Άλλες σημαντικές γονιδιακές μεταλλάξεις [απώλεια του PTEN (phosphatase and tensin homolog), PIK3CA μετάλλαξη] αφορούν την ενεργοποίηση της ενδοκυττάριας οδού PI3K/AKT/mTOR

(phosphatidylinositol 3-kinase/alpha serine-threonine-protein kinase/mammalian target of rapamycin) [16,26], η οποία οδηγεί σε αντοχή στην απόπτωση και σε αύξηση της αγγειογένεσης [27]. Συνολικά η ενεργοποίηση των ανωτέρω οδών προκαλεί την έκφραση διάφορων προφλεγμονωδών κυτταροκινών, (TNF-α, HMBG1), αυξητικών παραγόντων (VEGF [28], PDGF - platelet-derived growth factor A και B, IGF - insulin growth factor 1 και 2, bFGF - basic fibroblast growth factor, HGF- hepatocyte growth factor και TGF- transforming growth factor [8]), αλλά και διαμεμβρανικών μορίων όπως ο programmed-death ligand 1 (PDL-1) [29], που επηρεάζουν αυτοκρινώς ή παρακρινώς τη λειτουργία μιας σειράς κυτταρικών πληθυσμών, όπως τα μεσοθηλιακά, τα δενδριτικά και ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, οι ινοβλάστες, τα CD4 λεμφοκύτταρα κ.ο.κ [16] προκαλώντας κυτταρική αύξηση, αγγειογένεση, τοπική ανοσοκαταστολή και αποφυγή των κυτταροτοξικών επιδράσεων του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή [30,31]. Μελέτες γονιδιακού πολυμορφισμού ανέδειξαν ότι συγκεκριμένοι πληθυσμοί ανθρώπων εμφανίζουν γενετική προδιάθεση στην ανάπτυξη ΚΜΥ [8]. Πιο συγκεκριμένα, άτομα στη Φινλανδία που έφεραν τον τύπο του «βραδέως-ακετυλιωτή» του NAT-2 (N-acetyltransferase) γονιδίου και στερούνταν το γονίδιο GSTM1 (glutathione-S-transferase M1), εμφάνισαν αυξημένη συχνότητα κακοήθους μεσοθηλιώματος υπεζωκότα μετά την έκθεση στον αμιάντο. Το GSTM1 εμφανίζει ισχυρές αντιοξειδωτικές δράσεις, μέσω ρύθμισης του συστήματος γλουταθειόνης, ενώ το NAT-2 γονίδιο εμπλέκεται στον μετασχηματισμό των αρωματικών αμινών [32]. Επίσης, σε ανθρώπους που διαβιούν στην Καπαδοκία και φέρουν την αντίστοιχη μετάλλαξη, έχει περιγραφεί το λεγόμενο «BAP-1 σύνδρομο» [33], που συνίσταται σε αυξημένη συχνότητα αυτόματης εμφάνισης ΚΜΥ και μελανώματος σε μέλη της ίδιας οικογένειας ή ακόμα και στο ίδιο άτομο ύστερα από την έκθεση στον εριονίτη [20]. Εκτός από την έκθεση στις ίνες αμιάντου, άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με πρόκληση ΚΜΥ αποτελούν η χρόνια φλεγμονή και ίνωση της υπεζωκοτικής κοιλότητας, ανεξαρτήτως αιτιολογίας [8] και η ακτινοβολία του ημιθωρακίου, ιδίως σε περιπτώσεις που απαιτείται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα μεταξύ των συνεδριών, ανεξάρτητα από τη συνολική δόση της ακτινοβολίας [34].

Ιστολογικά, σύμφωνα με την ταξινόμηση της WHO (2015) [35], το ΚΜΥ διακρίνεται σε α) διάχυτο κακόηθες μεσοθηλιώμα, που είναι και ο πιο συχνός τύπος και περαιτέρω



ταξινομείται σε επιθηλιοειδές, σαρκωματώδες, δεσμοπλαστικό και διφασικό, β) εντοπισμένο κακόηθες μεσοθηλίωμα, που περαιτέρω ταξινομείται ως επιθηλιοειδές, σαρκωματώδες και διφασικό και γ) καλώς διαφοροποιημένο θηλωματώδες μεσοθηλίωμα. Η εντοπισμένη νόσος, το επιθηλιοειδές και το καλώς διαφοροποιημένο θηλωματώδες KMY εμφανίζουν την καλύτερη πρόγνωση, ενώ το σαρκωματώδες και διφασικό KMY συνδυάζονται συνήθως με μικρότερη επιβίωση [36,37]. Αθροίσεις πλειομορφικών αναπλαστικών, πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων σε αδενωμάτωση, θηλωματώδη ή συμπαγή πρότυπα είναι χαρακτηριστικά του επιθηλιακού KMY [35]. Ατρακτοειδή κύτταρα, που ομοιάζουν με ινοβλάστες και είναι οργανωμένα σε συνεστραμμένη διάταξη (storiform pattern), παραπέμπουν σε σαρκωματώδες MY, ενώ η παρουσία άτυπων κυττάρων εντός πυκνού συνδετικού ιστού, είναι χαρακτηριστική του δεσμοπλαστικού KMY [8]. Ωστόσο η διάκριση μεταξύ άλλων κακοήθων (αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα/μαστού) ή καλοήθων (ινοποιός πλευρίτιδα) αιτιών μπορεί να είναι δυσχερής [8]. Για το λόγο αυτό η ανοσοϊστοχημική χρώση με τους δείκτες calretinin, cytokeratins 5/6, Wilms Tumor-1 (WT-1) και D2-40 είναι συχνά απαραίτητη [35].

Η συνήθης κλινική εικόνα του ασθενούς με KMY συνίσταται στην παρουσία έντονου θωρακικού άλγους και συμπτωμάτων συμβατών με την ύπαρξη υπεζωκοτικής συλλογής (αίσθημα βάρους στο θώρακα και προοδευτικά επιδεινούμενη δύσπνοια) [38]. Συχνά η υπεζωκοτική συλλογή ανευρίσκεται σε τυχαίο ακτινολογικό έλεγχο για άλλη αιτία, ενώ όταν το KMY απαντάται ως εντοπισμένη εξεργασία στον υπεζωκότα ο ασθενής μπορεί να είναι ασυμπτωματικός. Η ύπαρξη συνοδού κακοήθους υπεζωκοτικής συλλογής (KYΣ), όπως και η εμφάνιση γενικευμένων συμπτωμάτων (απώλεια βάρους και κακουχία), που εμφανίζονται πολύ αργότερα κατά την πορεία της νόσου, αποτελούν δυσμενή προγνωστικά στοιχεία [3].

Θεμελιώδη ρόλο στην προσέγγιση του ασθενούς με μεσοθηλίωμα κατέχει η αξονική τομογραφία θώρακος με ενδοφλέβια σκιαγραφική ουσία (CT με iv contrast-ivc). Χαρακτηριστικά το KMY εμφανίζεται σαν πεπαχυσμένη, ακανόνιστων ορίων ή οζώδης διήθηση του υπεζωκότα, που συχνά περιβάλλει κυκλοτερώς τον σύστοιχο πνεύμονα, προκαλώντας παγίδευση αυτού [39,40]. Συνοδά ευρήματα αποτελούν η λεμφαδενοπάθεια μεσοθωρακίου, η υπεζωκοτική συλλογή, καθώς και οι πνευμονικοί

όζοι, ευρήματα που είναι παρόντα σε ποσοστό 60% των περιπτώσεων [41]. Η πάχυνση του υπεζωκότα με συμμετοχή της σύστοιχης μεσολοβίου σχισμής περιγράφεται στο 90% των περιπτώσεων, υπεζωκοτική συλλογή με απώλεια όγκου του σύστοιχου πνεύμονα ανευρίσκεται στο 70% των περιπτώσεων, ενώ πιο σπάνια το KMY μπορεί να εκδηλωθεί ως εντοπισμένη υπεζωκοτική εξεργασία [40]. Ωστόσο κανένα από τα ανωτέρω ακτινολογικά σημεία δεν είναι παθολογιομονικό του KMY, καθώς οποιαδήποτε κακοήθεια που προσβάλλει τον υπεζωκότα προσομοιάζει την εικόνα του KMY [42].

Η διάγνωση τελικά τίθεται με κυτταρολογική εξέταση δείγματος υπεζωκοτικής συλλογής (αν υφίσταται), ή με ιστολογική τεκμηρίωση σε τμήμα ιστού που έχει ληφθεί με ανοικτή θωρακοτομή ή video-assisted thoracic surgery (VATS) χειρουργική παρέμβαση, είτε με διαδερμική βιοψία υπεζωκότα υπό υπερηχογραφική ή ακτινολογική καθοδήγηση [3]. Σημαντική προσπάθεια έχει καταβληθεί ώστε να ανακαλυφθεί ο βιοδείκτης που θα θέσει μη επεμβατικά τη διάγνωση του KMY. Για το σκοπό αυτό ένας μεγάλος αριθμός βιολογικών μορίων έχει μελετηθεί εκτεταμένα στον ορό, στο πλευριτικό υγρό, τον εκπνεόμενο αέρα και το πλάσμα ασθενών με KMY [43]. Από τις ουσίες αυτές, η γλυκοπρωτεΐνη μεσοθηλίνη (που βρίσκεται στην επιφάνεια των φυσιολογικών μεσοθηλιακών κυττάρων) [44], η οστεοποντίνη (πρωτεΐνη του εξωκυττάρου χώρου) [45,46] και η φιμπουλίνη-3 (πρωτεΐνη του εξωκυττάρου χώρου) [47], παρουσιάζουν αυξημένες συγκεντρώσεις στο υπεζωκοτικό υγρό ή/και στον ορό ασθενών με μεσοθηλιώμα και έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση ασθενών με KMY σε σχέση με υγιείς ενήλικες ή ασθενείς που πάσχουν από καλοήγη νόσο του υπεζωκότα. Ωστόσο το γεγονός ότι κανένας από αυτούς τους δείκτες δεν εμφανίζει ευαισθησία και ειδικότητα πάνω από 90%, τους καθιστά ακατάλληλους για τη διάγνωση του μεσοθηλιώματος και η κλινική τους αξία παραμένει άγνωστη [43].

Για τη σταδιοποίηση της νόσου ακολουθούνται οι οδηγίες της όγδοης αναθεώρησης του συστήματος TNM (Tumor-Nodule-Metastasis), που εκδίδεται από την κοινή επιτροπή “American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control”. Στις αξιολογούμενες μεταβολές της τελευταίας αναθεώρησης περιλαμβάνονται τα εξής: α) η διήθηση του σύστοιχου ημιδιαφράγματος, του θωρακικού τοιχώματος ή του περικαρδίου ορίζεται ως T4 (στάδιο III), β) ανεξάρτητα από το κλινικό στάδιο N0, N1 ή N2 η πρόγνωση παραμένει η ίδια και γ) οι ασθενείς με τη χειρότερη πρόγνωση είναι αυτοί που

εμφανίζουν απομακρυσμένες μεταστάσεις (στάδιο IV) [48]. Εκτός από το σύστημα TNM, ανεξάρτητος προβλεπτικός παράγοντας, όσον αφορά την επιβίωση, αποτελεί η συνολική πάχυνση του υπεζωκότα (μετρούμενη στην αξονική τομογραφία θώρακος [49]. Οπότε για τη βασική σταδιοποίηση των ασθενών με ΚΜΥ αρκεί ο ακτινολογικός έλεγχος με αξονική τομογραφία θώρακος και κοιλίας. Ωστόσο, στην περίπτωση που επιλεγμένοι ασθενείς πρόκειται να υποβληθούν σε χειρουργική αντιμετώπιση του όγκου, ενδείκνυται η ολοκλήρωση του ελέγχου με αξονική τομογραφία εγκεφάλου και διενέργεια FDG-PET/CT (Fluodeoxyglucose-Positron Emission Tomography/Computed Tomography) τομογραφίας. Εξαιτίας της χαμηλής ευαισθησίας της PET/CT (γεγονός που αποδίδεται στην άμεση γεινίαση των λεμφαδένων του μεσοθωρακίου με τον πάσχοντα υπεζωκοτικό ιστό ή/και στην προηγούμενη διενέργεια πλευρόδεσης), η σταδιοποίηση, σε αυτές τις επιλεγμένες περιπτώσεις, οφείλει να ολοκληρωθεί επεμβατικά με μεσοθωρακοσκοπηση ή διαβρογχική αναρρόφηση δια βελόνης καθοδηγούμενη με ενδοβρογχικό υπέρηχο [Endobronchial Ultra-sound Transbronchial Needle Aspiration (EBUS-TBNA)] [50].

Ένα μικρό ποσοστό προσεκτικά επιλεγμένων ασθενών μπορεί να υποβληθεί σε χειρουργική αντιμετώπιση του ΚΜΥ σε κέντρα αναφοράς, στα πλαίσια πολυδύναμης αντιμετώπισης και ογκολογικού συμβουλίου. Η εκτεταμένη πλευρεκτομή με αποφλοιώση (Extended Pleurectomy/Decortication-EP/D) είναι η προτιμώμενη μέθοδος έναντι της εξωπλευρικής πνευμονεκτομής (Extra-Pleural Pneumonectomy-EPP), εξαιτίας της μειωμένης μετεγχειρητικής θνησιμότητας από επιπλοκές στο αναπνευστικό σύστημα και της καλύτερης ποιότητας ζωής. Ασθενείς με σαρκωματώδες ΚΜΥ (ή μεσοθηλίωμα με επικρατή τον σαρκωματώδη ιστολογικό τύπο), N2 νόσο ή νόσο σταδίου IV κρίνονται ως μη χειρουργικά επιλέξιμοι [50]. Με δεδομένο, λοιπόν, το μικρό αριθμό ασθενών που θα οδηγηθούν τελικά στο χειρουργείο, η θεραπεία του ΚΜΥ, ως επί το πλείστον, είναι παρηγορητική και συνίσταται στην χορήγηση συνδυασμού χημειοθεραπείας με πλατινούχο σκεύασμα (cisplatin/carboplatin) και πεμετρεξέδης (pemetrexed), με τη διάμεση επιβίωση να μην ξεπερνά τους 13-16 μήνες [51]. Η προσθήκη στο παραπάνω σχήμα αντι-αγγειογενετικού (anti-VEGF) παράγοντα (bevacizumab) προσδίδει οριακή αύξηση στην επιβίωση ασθενών με ΚΜΥ [52]. Ακόμη, ενθαρρυντικά αποτελέσματα έχουν ανακύψει από κλινικές μελέτες φάσης II [53], που αφορούν τη χορήγηση

ανοσοθεραπευτικών παραγόντων έναντι του PD/PDL-1, ιδίως σε ασθενείς με ΚΜΥ και ιστολογική έκφραση του PDL-1 σε ποσοστό >1%, ενός υποπληθυσμού που εμφανίζει χειρότερη επιβίωση [28]. Παράλληλα ένας αριθμός από πιθανούς νέους θεραπευτικούς στόχους βρίσκεται αυτή τη στιγμή υπό κλινική αξιολόγηση, χωρίς ωστόσο να έχει προκύψει η θεραπευτική οντότητα που θα επιμηκύνει σημαντικά την επιβίωση των ασθενών με ΚΜΥ, διατηρώντας ταυτόχρονα ένα ασφαλές προφίλ όσον αφορά την τοξικότητα [28]. Για το λόγο αυτό είναι αναγκαία η διενέργεια μελετών που θα ξεδιαλύνουν ακόμα περισσότερο την παθοφυσιολογία του μεσοθηλιώματος και θα αποκαλύψουν πιθανούς νέους θεραπευτικούς στόχους.

## **Versican**

Το versican (vcan) είναι μια πρωτεογλυκάνη που προσδένεται στο υαλουρονικό, ανήκει στην οικογένεια των υαλεκτινών [54] και απαντάται σε πληθώρα ιστών, από τον οφθαλμό έως την καρδιά και από τον αρθρικό θύλακο έως το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) [55]. Το όνομά του προέρχεται από την σύνθεση των λέξεων versatile (ευέλικτος) και aggrecan (αγγκρικάνη). Εδράζεται κυρίως στον εξωκυττάριο χώρο [extra-cellular matrix (ECM)] και κωδικοποιείται από το γονίδιο *CSPG2* (chondroitin-sulfate proteoglycan 2) [56], που εντοπίζεται σε ένα μονήρη γενετικό τόπο στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 5q14.3 [57]. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία και η δομή του μορίου έχουν καθοριστεί πλήρως αναλύοντας cDNA αλληλουχίες από δείγματα που προέρχονται από ανθρώπινους ιστούς και πειραματόζωα. Ο πρωτεϊνικός πυρήνας εμφανίζει περιοχές με συγκεκριμένη βιολογική λειτουργία (περιοχικό πρότυπο – domain pattern). Το G1 (globular domain 1) αμινοτελικό άκρο προσδένεται στη γλυκοζαμινογλυκάνη (glycosaminoglycan-GAG) υαλουρονικό και το G3 (globular domain 3) καρβοξυτελικό άκρο μοιάζει με την οικογένεια των σελεκτινών και εμπεριέχει ένα ανάλογο C-τύπου λεκτίνης, το οποίο γειτνιάζει με δύο ομόλογες περιοχές του αυξητικού παράγοντα EGF και μια ρυθμιστική περιοχή του συμπληρώματος [55]. Το G3 άκρο μπορεί να αλληλεπιδρά με άλλα μόρια του εξωκυττάριου χώρου, όπως οι β-ιντεγκρίνες (β-integrines) [58]. Το ενδιάμεσο τμήμα του πρωτεϊνικού πυρήνα κωδικοποιείται από δύο ευμεγέθη εξόνια (εξόνια 7 και 8) και αποτελεί θέση πρόσδεσης μορίων θειικής χονδροϊτίνης [(chondroitin sulfate (CS)] [55].

Μέσω εναλλακτικού ματίσματος του πρόδρομου μορίου mRNA, προκύπτουν έξι ισομορφές της πρωτεογλυκάνης (V0-V5), οι οποίες διαφέρουν στην εντόπιση και τη λειτουργία. Το γεγονός αυτό αποδίδεται εν μέρει στο διαφορετικό αριθμό των αλύσεων θειικής χονδροϊτίνης που προσδένονται στο κάθε μόριο και εξαρτάται από τον τύπο κυττάρου που συνθέτει την πρωτεΐνη [59]. Η V0 αποτελεί το μεταγράφομα ολόκληρου του πρόδρομου μορίου mRNA και περιέχει όλες τις αλληλουχίες των εξονίων. Η V1 περιέχει μόνο την περιοχή β-GAG (κωδικοποιείται από το εξόνιο 8), η V2 περιέχει μόνο το τμήμα α-GAG (κωδικοποιείται από το εξόνιο 7) και η V3 αποτελεί απευθείας σύνδεση του αμινοτελικού G1 άκρου με το καρβοξυτελικό G3 άκρο, με αποτέλεσμα να μην προσδένεται σε αλύσους CS [60,61]. Η V4 εμπεριέχει ένα τμήμα του εξονίου 8, ενώ πρόσφατα περιγράφηκε μια νέα ισομορφή V5, που φέρει ένα μικρό τμήμα πρόσδεσης της CS μεταξύ του G1 και G3 άκρου. Η αλληλουχία αυτή κωδικοποιείται από μια περιοχή περιφερικότερα του εξονίου 8 (προς το 3' άκρο), η οποία μέχρι πρότινος θεωρούνταν μη κωδικοποιούμενη [62]. Το μοριακό βάρος του versican κυμαίνεται από 72 (V3) έως 370 kDa (V0), όπως υπολογίζεται από την cDNA αλληλουχία. Ωστόσο κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western, το μοριακό βάρος είναι σημαντικά μεγαλύτερο (ενδεικτικά το μοριακό βάρος του V0 υπολογίζεται περί τα 500 kDa), γεγονός που αποδίδεται στις CS πολυσακχαριδικές αλύσους [63]. Οι V0, V1 αποτελούν τις πιο άφθονες ισομορφές στον ανθρώπινο οργανισμό, προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και εμποδίζουν την απόπτωση [59]. Η V2 περιορίζεται εντός του ΚΝΣ [64] και διαθέτει ιδιότητες αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [65] και καθοδήγησης των νευρικών αξόνων εντός της νευρογλοίας [64]. Αντιστοίχως η V3 ισομορφή εμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση [66]. Η V4 ισομορφή ομοιάζει δομικά με τη V1, ωστόσο η ακριβής βιολογική της λειτουργία δεν έχει σαφώς καθοριστεί [67], ενώ η V5 φαίνεται πως συμμετέχει στην παθοφυσιολογία του τραύματος των νωτιαίων νεύρων, όπως έχει δειχθεί σε πειραματικά μοντέλα νευροπαθητικού πόνου σε αρουραίους [62].

Το versican εκφράζεται φυσιολογικά από πολλούς διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς, όπως οι ινοβλάστες, τα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λευκοκύτταρα. Η έκφραση του versican ελέγχεται από πληθώρα προφλεγμονωδών κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων [68] αλλά και micro-RNAs [69,70,71] και

ρυθμίζεται από το μονοπάτι Wnt/ $\beta$ -catenin/T-cell factor (TCF), όπως έχει παρατηρηθεί σε λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών [72,73]. Το μονοπάτι αυτό ρυθμίζει πρωταρχικά τη διαδικασία της επιθηλιακής-προς-μεσεγχυματικής μετάβασης [epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)] και ελέγχεται κυρίως από τον αυξητικό παράγοντα TGF- $\beta$  [74,75]. Στον αντίποδα, εργασίες σε πειραματόζωα που μελέτησαν την έκφραση του versican από μακροφάγα περιγράφουν ότι η διαδικασία αυτή ρυθμίζεται από μονοπάτια που ελέγχονται από την επίδραση των ιντερφερονών (interferons-IFN) [76].

Η πρωτεογλυκάνη versican μπορεί να εκκρίνεται αυτούσια στον εξωκυττάριο χώρο, ή να υφίσταται κατάλυση από διάφορα ένζυμα και να αποκολλάται από αυτόν [59]. Η αντίδραση αυτή δεν είναι ειδική και μπορεί να πραγματοποιηθεί από μεταλλοπρωτεϊνάσες του ECM (matrix-metalloproteinases), τις MMPs 1, 2, 3, 7, 9 [77,78], από την πρωτεάση σερίνης πλασμίνη [79] και από ένζυμα της οικογένειας ADAMTs (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) [80]. Ειδικότερα η κατάλυση από τις ADAMTs 1, 4, 5, 9, 15, 20 πρωτεάσες πραγματοποιείται στον δεσμό μεταξύ των αμινοξέων Glu<sup>441</sup>-Ala<sup>442</sup> (γλουταμικό οξύ<sup>441</sup>-αλανίνη<sup>442</sup>), που βρίσκεται εντός της αλληλουχίας DPEAAE<sup>441</sup>-A<sup>442</sup>RRGQ, οπότε προκύπτει το DPEAAE θραύσμα, που είναι γνωστό ως versikine [81]. Η αλληλουχία DPEAAE βρίσκεται εντός της περιοχής  $\beta$ -GAG, οπότε η versikine είναι παράγωγο μόνο των ισομορφών V0, V1 της πρωτεογλυκάνης [82]. Αντίστοιχη πρωτεόλυση της V2 ισομορφής (και κατά συνέπεια της V0) από τα ένζυμα ADAMTs πραγματοποιείται στο δεσμό Glu<sup>405</sup>-Gln<sup>406</sup> (γλουταμικό οξύ<sup>405</sup>-γλουταμίνη<sup>406</sup>), ο οποίος βρίσκεται εντός της  $\alpha$ -GAG περιοχής. Αποτέλεσμα της καταλυτικής αυτής διαδικασίας είναι η παραγωγή του πρωτεϊνικού μορίου GHAP (Glial Hyaluronic Acid Binding Protein-πρωτεΐνη της νευρογλοίας συνδεόμενη με το υαλουρονικό) [67,83]. Καταλυτικά προϊόντα όπως η versikine και η GHAP, μπορούν να λειτουργήσουν ως «ματρικίνες» ή πρότυπα σχετιζόμενα με ιστική βλάβη [damage-associated molecular patterns (DAMPs)]. Με τον τρόπο αυτό αλληλεπιδρούν με κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (αλλά και με άλλους τύπους κυττάρων), με αποτέλεσμα να επηρεάζουν την έκφραση προ- ή αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών [84,85].

Φυσιολογικά, το versican διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την εμβρυογένεση [59], όπου καθοδηγεί τη νευραξονική αύξηση [64] και τον σχηματισμό των καρδιακών

κοιλοτήτων [86]. Πιο πρόσφατες αναφορές [87] περιγράφουν την ύπαρξη ενός γλυκοκάλυκα πλούσιου σε versican, υαλουρονικό, TSG-6 (TNF-stimulated gene 6 protein) και αναστολέα inter-alpha (IaI). Η δομή αυτή προστατεύει τα αρχέγονα κύτταρα (stem cells) του ομφάλιου λώρου από την κυτταροτοξική δράση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, επιδρώντας στον φαινότυπο των T-λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων. Εκτός από τις λειτουργίες που επιτελεί κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ανθρώπινου οργανισμού, το versican προάγει την ωρίμανση των ινοβλαστών και των μυοϊνοβλαστών, κυτταρικών τύπων που συμμετέχουν στη διαδικασία επούλωσης (wound healing) [88,89]. Το versican αλληλεπιδρά με άλλα μόρια του εξωκυττάρου χώρου, όπως το υαλουρονικό [90], η φιβριλλίνη-1 (fibrillin-1), η τενασίνη-R (tenascin-R), η φιβουλίνη 1 και 2 (fibullin 1 and 2) [91,92,93,94] και η TSG-6 [95]. Προσδένεται επίσης σε μια σειρά από υποδοχείς, όπως το CD44 (cluster differentiation 44), ο PSGL-1 (p selectin glycoprotein ligand-1), οι υποδοχείς σκουπιδοφάγου [toll-like receptors (TLRs)] και οι P-, L- σελεκτίνες [96,97,98,99]. Οι περισσότεροι από αυτούς τους υποδοχείς υπερεκφράζονται από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος [59], με αποτέλεσμα το versican να συμμετέχει στη διαδικασία της φλεγμονώδους αντίδρασης.

Πράγματι, στους ιστούς που φλεγμαίνουν, η προσκόλληση και η συσσώρευση των λευκοκυττάρων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αλληλεπίδρασή τους με τα μόρια του ECM, μεταξύ αυτών και το versican [100]. Όπως έχει παρατηρηθεί σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα φλεγμονώδους νόσου του εντέρου [101,102], τα υποστηρικτικά κύτταρα (stromal cells) παράγουν πλούσιο σε υαλουρονικό και versican ECM, ο οποίος οργανώνεται σε διάταξη που μοιάζει με καλώδιο, με αποτέλεσμα την αυξημένη προσκόλληση και συσσώρευση των λευκών αιμοσφαιρίων. Αντίθετα, η αδρανοποίηση του versican με ειδικό αντίσωμα (neutralizing antibody) οδήγησε σε αναστολή της προσκόλλησης των λευκοκυττάρων στον ECM σε *in vitro* συγκαλλιέργεια με ανθρώπινους ινοβλάστες [103]. Σε μια σειρά από παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι η αθηροσκλήρωση [104], το versican δρα ως χημειοτακτικός παράγοντας των κυττάρων της μυελώδους σειράς. Αντίστοιχα, σε πειραματική προσομοίωση ιικής λοίμωξης με χρήση

του ανοσοδιεγερτικού παράγοντα Poly I:C (πολυϊονοσινικό:πολυκυτιδικό οξύ) σε R26R<sup>ert2</sup>Cre<sup>+</sup>/Vcan<sup>-/-</sup> γενετικά τροποποιημένους ποντικούς, η παραγωγή του versican από τα υποστηρικτικά κύτταρα ενίσχυσε τη συσσώρευση των μακροφάγων ύστερα από τη χορήγηση Poly I:C [105]. Τα R26R<sup>ert2</sup>Cre<sup>+</sup>/Vcan<sup>-/-</sup> πειραματόζωα παύουν να εκφράζουν την πρωτεογλυκάνη σε όλους τους ιστούς μετά από χορήγηση ταμοξιφαίνης. Εκτός από την απευθείας χημειοτακτική δράση, το versican αναστέλλει την αποδόμηση της CCL2 (C-C ligand motif 2), μιας χυμοκίνης, που προάγει τη μετανάστευση των μονοπύρηνων [106]. Ειδικότερα, σε μοντέλα μεταστατικού αδενοκραινώματος πνεύμονα και μελανώματος ποντικού, η πρωτεογλυκάνη αλληλεπιδρά με τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα μέσω του υποδοχέα TLR-2, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της ενδοκυττάριας οδού Myd88 (myeloid differentiation primary response 88 – πρωταρχική απάντηση διαφοροποίησης της μυελώδους σειράς 88) [97,98]. Η ενεργοποίηση της οδού Myd88 στα κύτταρα της μυελώδους σειράς επάγει τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB, διάφορες κινάσες ενεργοποιούμενες από μιτογόνα [mitogen-activated protein (MAP) kinases] και την πρωτεΐνη-ενεργοποιητή 1 [activator-protein 1 (AP-1)], προωθώντας την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως οι ιντερλευκίνες (interleukins) 6, 10 (IL-6, IL-10) [97,107]. Ομοίως, σε μελέτες με χρήση Poly I:C σε LysM/Vcan<sup>-/-</sup> γενετικά τροποποιημένους ποντικούς [76], διαπιστώθηκε ότι το versican επηρεάζει σημαντικά την έκφραση IFNs και IL-10 από τα μακροφάγα. Στα LysM/Vcan<sup>-/-</sup> πειραματόζωα η πρωτεογλυκάνη παύει να εκφράζεται μόνο στα μακροφάγα, δεδομένου ότι η έκφραση της Cre ρεκομπινάσης (causes recombination-προκαλεί ανασυνδυασμό) ρυθμίζεται από τον υποκινητή της λυσοζύμης, με αποτέλεσμα ο LoxP (locus of X over P 1) ανασυνδυασμός να πραγματοποιείται μόνο στα μακροφάγα. Ο τρόπος που επιδρά το versican στη λειτουργία των μακροφάγων δεν είναι πλήρως ξεκάθαρος, ωστόσο φαίνεται ότι οι CS αλυσοί είναι απαραίτητες, καθώς είναι επαρκώς τεκμηριωμένος ο ρόλος τους στην αντιγονοπαρουσίαση, στην παραγωγή κυτταροκινών από τα φλεγμονώδη κύτταρα, την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και στην ρύθμιση του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας II [Major Histocompatibility Complex (MHC) II] [59,108]. Η παρατήρηση αυτή ενισχύεται περαιτέρω από το γεγονός ότι η V3 ισομορφή (που δεν προσδέεται σε αλύσους χονδροϊτίνης) εμφανίζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες [66,109].



Ένας ακόμη κυτταρικός πληθυσμός που αλληλεπιδρά με τον ECM κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής απάντησης είναι τα λεμφοκύτταρα και το versican επηρεάζει σημαντικά τη δυνατότητα τους να προσκολλώνται σε αυτόν [110]. Ορισμένες μελέτες περιγράφουν ότι αναστέλλει την πρόσδεσή τους στο υαλουρονικό και την παραγωγή IL-10 [110]. Υπάρχουν, ωστόσο, αναφορές ότι το versican διευκολύνει τη μετανάστευση και την προσκόλληση των λεμφοκυττάρων, που έχουν απομονωθεί από ασθενείς με σύνδρομο Sezary (μια παραλλαγή δερματικού T-κυτταρικού λεμφώματος) [111] και ότι αλληλεπιδρά με τη χυμοκίνη CCL5, προωθώντας τη μετανάστευση των CD8 T-λεμφοκυττάρων [112]. Σε πιο πρόσφατες μελέτες, που αφορούσαν ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα, διαπιστώθηκε ότι η versikine επάγει την ενεργοποίηση των CD8+ T-λεμφοκυττάρων και είναι σημαντικός ρυθμιστής της μετακίνησής τους στις περιοχές της φλεγμονής [85]. Πέρα από την άμεση επίδρασή της στα T-λεμφοκύτταρα, η versikine αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της διαφοροποίησης των BATF-3 (Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like -3) δενδριτικών κυττάρων [113]. Τα BATF-3 δενδριτικά κύτταρα εμφανίζουν ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα BATF-3 και αποτελούν έναν υποπληθυσμό αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, που ρυθμίζει τη μετανάστευση και διείσδυση των λεμφοκυττάρων εντός διαφόρων όγκων [113,114,115]. Λαμβάνοντας υπόψη την επιρροή του versican σε διάφορες εκφάνσεις της ανοσολογικής απάντησης, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι αποτελεί κομβικό μόριο για την καρκινική αύξηση, επάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την τροποποίηση της φλεγμονώδους απάντησης και την αποφυγή των κυτταροτοξικών δράσεων του ξενιστή [59,116]. Υπερεκφράζεται σε ένα σημαντικό αριθμό κακοηθειών [117,118], όπως το αδενοκαρκίνωμα μαστού [119], το γλοίωμα [120], το μελάνωμα [121] και το μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα [98]. Μπορεί να δρα το ίδιο αυτοκρινώς ή παρακρινώς ως μιτογόνο, όπως έχει παρατηρηθεί σε πειραματικά μοντέλα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, ενεργοποιώντας το μονοπάτι EGFR-PI3K-AKT [122], ή να διευκολύνει τη μετανάστευση και την προσκόλληση καρκινικών κυττάρων λειομυοσαρκώματος δημιουργώντας ένα συμπαγές περίβλημα γύρω από αυτά [123]. Σε πειραματικά μοντέλα αδενοκαρκινώματος πνεύμονα [98] και μαστού [119] παρατηρήθηκε ότι η υπερπαραγωγή του versican από τα καρκινικά κύτταρα οδήγησε στη μετανάστευση και ενεργοποίηση των σχετιζόμενων-με-τον-όγκο μακροφάγων [tumor-

associated macrophages (TAMs)]. Αυτό φαίνεται πως επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπίδρασης του versican με τον υποδοχέα TLR-2 και τους συνυποδοχείς TLR-6 και CD-14 [98]. Τα ενεργοποιημένα TAMs παρουσιάζουν ιδιότητες συμβατές με τον M2 φαινότυπο, με συνέπεια να υπερεκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως ο TNF- $\alpha$  και η IL-6, προωθώντας κατ' αυτόν τον τρόπο την καρκινική αύξηση [97,98,124]. Ανάλογη επίδραση φαίνεται ότι ασκείται και στα T-λεμφοκύτταρα που σχετίζονται με τον όγκο. Η υπερέκφραση του versican στο μικροπεριβάλλον κακοηθειών του τραχήλου της μήτρας οδηγεί σε μειωμένη συσσώρευση CD8+ T-λεμφοκυττάρων [125]. Αντίστοιχα σε μια σειρά πειραματικών μελετών παρατηρήθηκε ότι το versican που παράγεται από τα καρκινικά κύτταρα προώθησε την έκφραση του PDL-1 από τα μονοπύρρηνα/μακροφάγα, μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα TLR-2 [126]. Η αύξηση των επιπέδων του PDL-1 (και κατά συνέπεια η ενεργοποίηση της οδού PD/PDL-1) οδηγεί στην απώλεια των κυτταροτοξικών ιδιοτήτων των T-λεμφοκυττάρων και προκαλεί την κυτταρική «εξουθένωσή» τους (T-cell exhaustion) [127,128].

Εκτός από τις μεταβολές που προκαλεί στη λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, το versican προάγει την καρκινική αύξηση, ρυθμίζοντας την αγγειογένεση. Σε κακοήθειες των γεννητικών οργάνων, η συσσώρευση της πρωτεογλυκάνης στον ECM συσχετίστηκε με την αύξηση του αριθμού των νεοαγγείων [129,130]. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν από πειραματικές μελέτες μεταστατικού αδενοκαρκινώματος πνεύμονα, όπου η υπερέκφραση του versican οδήγησε σε σημαντική αύξηση της αγγειογένεσης [131]. Ωστόσο η διαδικασία αυτή φαίνεται ότι ρυθμίζεται στενά από την παραγωγή της versikine (μέσω κάθαρσης της πρωτεογλυκάνης από τα ένζυμα της οικογένειας ADAMTs), καθώς παρατηρήθηκε ισχυρή συσχέτιση των επιπέδων της versikine με την εντόπιση των ενδοθηλιακών κυττάρων [131,132] στα αρχικά στάδια της επαγόμενης από τον VEGF αγγειογένεσης.

Αν και η βασική πηγή του versican είναι τα καρκινικά κύτταρα, είναι προφανές ότι και τα υποστηρικτικά κύτταρα παράγουν ένα σημαντικό ποσοστό αυτού [59]. Σε κακοήθειες του μαστού και των ωοθηκών, ο TGF- $\beta$  οδηγεί σε υπερέκφραση του versican στον υποστηρικτικό ιστό, προκαλώντας αύξηση των επιπέδων mRNA της πρωτεογλυκάνης στους ινοβλάστες [133,134]. Αντίστοιχα, σε κακοήθειες της μήτρας και του τραχήλου

παρατηρείται υπερπαραγωγή του versican από τα καρκινικά και υποστηρικτικά κύτταρα [135,136]. Ωστόσο, σε πειραματικά μοντέλα ινοσαρκώματος ποντικού, η αναστολή της έκφρασης του versican είχε ως αποτέλεσμα την παρουσία σημαντικά μικρότερου αριθμού ινοβλαστών σχετιζόμενων με τον όγκο [cancer-associated fibroblasts (CAFs)] [137]. Τέτοιες μεταβολές στη σύσταση του ECM οδηγούν στη δημιουργία μεγαλύτερων και λιγότερο διαφοροποιημένων όγκων, όπως έχει παρατηρηθεί σε πειραματικό μοντέλο αδενοκαρκινώματος παγκρέατος [138]. Στις περιοχές της φλεγμονής που γειτνιάζουν με τον κακοήγη ιστό, μεγάλες ποσότητες της πρωτεογλυκάνης παράγονται από κύτταρα της μυελώδους σειράς. Πιο συγκεκριμένα, σε πειραματικά μοντέλα μυών παρατηρήθηκε ότι το versican που εκκρίνεται (μέσω της επίδρασης του TGF- $\beta$ ) από τα CD11b+Ly6C<sup>high</sup> κύτταρα προώθησε τη δημιουργία πνευμονικών μεταστάσεων [139]. Αντίστοιχα, *in vitro* μελέτες ανέδειξαν αύξηση της παραγωγής του versican από μακροφάγα, τα οποία συγκαλλιεργήθηκαν με καρκινικά κύτταρα [140], οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα ότι και οι δύο κυτταρικοί πληθυσμοί αποτελούν σημαντική πηγή της πρωτεογλυκάνης κατά την ανάπτυξη των κακοηθειών [141]. Συνολικά οι ανωτέρω παρατηρήσεις θέτουν την υπόνοια ύπαρξης μιας πολύπλοκης διάδρασης διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών εντός του όγκου, η οποία καθορίζει τη συσσώρευση και κατανομή του versican εντός του ECM, επιδρώντας σε σημαντικούς σταθμούς της καρκινικής αύξησης και της δημιουργίας απομακρυσμένων μεταστάσεων [59].

Όλο και περισσότερες μελέτες αναδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο του versican στη φλεγμονή και την ανοσολογική απάντηση. Ενίοτε ασκεί αντιφλεγμονώδεις δράσεις, ενώ σε διαφορετικές περιπτώσεις φαίνεται ότι κατέχει προφλεγμονώδεις ιδιότητες. Το γεγονός αυτό εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως ο τύπος των κυττάρων που παράγουν το versican, το είδος της ισομορφής που εκκρίνεται, η σύσταση του ECM και τα υπόλοιπα συστατικά του που αλληλεπιδρούν με το versican, το αν υφίσταται αυτούσιο ή σε μορφή ματρικίνης κ.ο.κ. Σε κάθε περίπτωση αποτελεί ένα πολυδύναμο βιολογικό μόριο, το οποίο ρυθμίζει σημαντικές πτυχές της φλεγμονής, της επούλωσης, της ογκογένεσης και της δημιουργίας μεταστάσεων. Η πλήρης κατανόηση της σύνθετης λειτουργίας του κατά τη διάρκεια της καρκινικής αύξησης μπορεί να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων, ώστε να καταστεί δυνατή η καλύτερη αντιμετώπιση κακοηθειών με δυσμενή πρόγνωση, όπως το μεσοθηλίωμα υπεζωκότα.

## **Ειδικό Μέρος**

### **Υπόθεση/Σκοπός**

Το παρόν ερευνητικό έργο αποσκοπεί στην μελέτη του ρόλου της πρωτεογλυκάνης versican στην ανάπτυξη του κακοήθους μεσοθηλιώματος υπεζωκότα και στη διερεύνηση των υποκείμενων μηχανισμών. Υποθέτουμε ότι το versican προάγει την αύξηση του ΚΜΥ μέσω της ενίσχυσης του ρυθμού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, αλλά και της ρύθμισης προωθητικών για τον όγκο διαδικασιών, που εξαρτώνται από την αλληλεπίδραση όγκου-ξενιστή, όπως είναι η αγγειογένεση και η ανοσολογική απάντηση.

## Υλικά/Μέθοδοι

### *Κύτταρα και πειραματόζωα*

Οι κυτταρικές σειρές μεσοθηλιώματος ποντικού AE17 [142] και AB1 [143] ήταν ευγενική προσφορά του καθηγητή Dr YCG Lee (Περθ, Αυστραλία). AE17 και AB1 κύτταρα-μάρτυρες ή κύτταρα ενδεή ως προς την παραγωγή του versican, που εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα χρωστική [Green Fluorescent Protein (GFP)] και παρουσιάζουν αντοχή στο αντιβιοτικό πουρομυκίνη, δημιουργήθηκαν με μετασχηματισμό, χρησιμοποιώντας πλασμιδιακούς φορείς. Τα πλασμίδια αυτά εξέφραζαν μικρές RNA αλληλουχίες τύπου «φουρκέτα» (short-hairpin RNAs), στοχεύοντας το αγγελιαφόρο RNA (mRNA) της πρωτεογλυκάνης versican (shvcan), ή τυχαίες RNA αλληλουχίες, που δεν είχαν καμία επίδραση στην πρωτεϊνική έκφραση (κενοί φορείς-empty vector). Τα πλασμίδια αποκτήθηκαν από την εταιρεία Origine (Rockville, ΗΠΑ) και μεταφέρθηκαν εντός των ευκαρυωτικών κυττάρων με το αντιδραστήριο Xfect [144]. Ειδικότερα, το πλασμιδιακό DNA μεταφέρθηκε εντός ενός περιβλήματος από υδρόφοβα λιποσωμακά νανοσωματίδια, το οποίο έχει την ικανότητα να συντήκεται με την πλασματική μεμβράνη. Με τον τρόπο αυτό τα πλασμίδια εισήλθαν εντός των ευκαρυωτικών κυττάρων και ακολούθως μεταφέρθηκαν στον πυρήνα τους. Τέσσερις διαφορετικές shRNA αλληλουχίες επιστρατεύτηκαν για το μετασχηματισμό των κυττάρων του ΚΜΥ: 5'-TCCTCGGCTCTGACGGTACAGTGATATAA-3' (sh770), 5'-CAGAATCAAATGGTCTAAGATGGAAGTGG-3' (sh771), 5'-AGTTCTACTGCAGTTATGGCCAAGGAGAC-3' (sh772), 5'-CTAATAAGGAAGTGGAGGAGGAAGGTATG-3' (sh773). Παρόλα αυτά μόνο τα κακοήθη κύτταρα τα οποία μετασχηματίστηκαν με πλασμίδια που εξέφραζαν την sh771 αλληλουχία παρουσίασαν σημαντική (>90%) μείωση στην έκφραση του versican. Για το λόγο αυτό ήταν τα μόνα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για τα *in vivo* πειράματα.

Τα μακροφάγα που προέρχονται από τον μυελό των οστών [Bone Marrow-Derived Macrophages (BMDMs)] απομονώθηκαν από το μυελό των οστών C57/Bl6 ή Tomato C57/Bl6 μυών [145]. Πιο συγκεκριμένα, ενήλικοι μύες υπέστησαν ευθανασία με υπερδοσολογία σεβοφλουρανίου. Χρησιμοποιώντας λαβίδα και νυστέρι εμποτισμένα σε διάλυμα αιθανόλης περιεκτικότητας 70% v/v αφαιρέθηκε το δέρμα και ο υποδόριος ιστός

από τα κάτω άκρα των πειραματόζωων. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε τομή στο σημείο της ισχιακής άρθρωσης και της άρθρωσης του γόνατος, με αποτέλεσμα την *en block* αφαίρεση των μηριαίων οστών και των υπερκείμενων μυϊκών ομάδων. Διατηρώντας στείρες συνθήκες παρασκευάστηκε ανατομικά το μηριαίο οστό. Με τη χρήση σύριγγας 25-G/10 ml το σύνολο του μυελού εντός του μηριαίου οστού ξεπλύθηκε με χορήγηση εντός του οστού 2-5 ml καλλιεργητικού μέσου. Το σύνολο των κυττάρων επώαστηκε σε τρυβλίο *petri* παρουσία αυξητικού παράγοντα M-CSF [παράγοντας που προωθεί τη δημιουργία αποικιών των μακροφάγων (macrophage-colony stimulating factor)]. Ύστερα από 7 ημέρες το τρυβλίο περιείχε μόνο BMDMs.

Με ανάλογη διαδικασία απομονώθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα από τον πνεύμονα C57/Bl6 μυών [Murine-lung endothelial cells (MLECs)] [146]. Ειδικότερα, ύστερα από ευθανασία των πειραματόζωων, πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του δέρματος, του υποδορίου ιστού και των μυϊκών ομάδων στο πρόσθιο θωρακικό τοίχωμα, με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Ακολούθως έγινε κάθετη διατομή του στέρνου και διάνοιξη του θωρακικού κλωβού. Μετά από απολίνωση και διατομή της τραχείας στο επίπεδο του κρικοειδούς χόνδρου αφαιρέθηκε *en block* το μεσοθωράκιο, η καρδιά και οι πνεύμονες, οι οποίοι διαχωρίστηκαν ακολούθως στο επίπεδο των πνευμονικών πυλών. Αφού υπολογίστηκε το βάρος των πνευμόνων σε ζυγό ακριβείας, τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 9 ml κολλαγενάσης και 1 ml ντισπάσης ανά γραμμάριο ιστού για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 37° C. Ύστερα από την επώαση με τις πρωτεάσες, τα ιστικά υπολείμματα ξεδιαλύθηκαν περαιτέρω με χρήση ειδικού φίλτρου και τα νεκρά κύτταρα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα κοκκιοκύτταρα και τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνθηκαν με το διάλυμα διαχωρισμού Ficolī. Τελικά τα ενδοθηλιακά κύτταρα απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση εντός μαγνητικού πεδίου και χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης CD-31, τα οποία είχαν επαλειφθεί με παραμαγνητικά μικροσωματίδια (dynabeads).

Όλοι οι κυτταρικοί πληθυσμοί αναπτύχθηκαν σε καλλιεργητικό μέσο DMEM [Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco)] με προσθήκη ορού από έμβryo μόσχου σε συγκέντρωση 10% v/v [10% Fetal Calf Serum (FCS)], 100 µg/ml πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και L-γλουταμίνη. Ο ορός είχε προθερμανθεί ώστε να

απενεργοποιηθεί το συμπλήρωμα. Για την ανάπτυξη σταθερών κλώνων με τη χρήση πλασμιδίων προστέθηκε στο καλλιεργητικό μέσο πουρομυκίνη. Όλοι οι κυτταρικοί πληθυσμοί ελέγχθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης [real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)] για την προσβολή από *mycoplasma spp.*, όπως έχει προηγουμένως περιγραφεί [144].

Οι C57/Bl6 και Balb/c μύες αποκτήθηκαν από το ίδρυμα «Αλ. Φλέμινγκ» (BSRC Al. Fleming) και το Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ (Hellenic Pasteur Institute). Οι Tomato C57/Bl6 μύες ήταν ευγενική προσφορά του καθηγητή Dr. Γ.Τ. Σταθόπουλου (Πάτρα, Ελλάδα). Όλα τα πειραματόζωα διαβιούσαν στην Ερευνητική Μονάδα Ζωικών Προτύπων του ΓΝ «Ευαγγελισμός» (EL25BIO015, Αθήνα, Ελλάδα) και ελάμβαναν τροφή και νερό *ad libitum*. Ο συνολικός αριθμός πειραματόζωων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη υπολογίστηκε με στατιστική ανάλυση ισχύος (power analysis) με χρήση του λογισμικού προγράμματος Gpower. Πιο συγκεκριμένα, για κάθε στέλεχος ποντικού υπολογίστηκε ότι χρειάστηκαν 20 πειραματόζωα ( $\alpha = 0,8$ , 20% μείωση στο βάρος του όγκου,  $p=0,05$ ) σύμφωνα με δεδομένα από τη βιβλιογραφία. Ακόμα 10 C57/Bl6 και 5 Tomato C57/Bl6 μύες χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των BMDMs και των MLECs.

### ***In vivo μελέτες***

Η χρήση μυών για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης έλαβε έγκριση από την Κτηνιατρική Υπηρεσία της Περιφέρειας Αττικής και ακολούθησε τη διεθνή νομοθεσία και τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τη διαχείριση και θανάτωση των πειραματόζωων (αριθμός πρωτοκόλλου: K/7890/2010). Για τη δημιουργία πειραματικού KMY [27] χρησιμοποιήθηκαν ενήλικοι μύες (ηλικίας 8-12 εβδομάδων). Υποβλήθηκαν σε αναισθησία και μυοχάλαση με συνδυασμό κεταμίνης/ξυλαζίνης, διάλυμα το οποίο χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά με σύριγγα μεγέθους 27 g/1ml. Ακολούθως τα πειραματόζωα ακινητοποιήθηκαν και αφαιρέθηκε το δέρμα και ο υποδόριος ιστός στο 4°-5° μεσοπλευρίο διάστημα του αριστερού ημιθωρακίου. Στην πρόσθια μασχαλιαία γραμμή, μεταξύ της έσω μαστικής και μασχαλιαίας αρτηρίας, πραγματοποιήθηκε τομή 1-2 mm και παρασκευάστηκε ανατομικά ο τοιχωματικός υπεζωκότας. Στη συνέχεια χορηγήθηκε (με χρήση σύριγγας μεγέθους 27 g/1 ml) εναιώρημα  $5 \times 10^5$  AE17 ή AB1

κυττάρων μεσοθηλιώματος, που ήταν ενδεή-ως-προς το versican (shvcan) ή εξέφραζαν κανονικά την πρωτεογλυκάνη (vector), στην υπεζωκοτική κοιλότητα C57/Bl6 ή Balb/c μυών αντίστοιχα. Τα πειραματόζωα είχαν την ίδια ηλικία, ίδιο βάρος και φύλο. Παρακολούθηθηκαν καθημερινά και όταν εμφάνισαν διαταραχή της ευζωίας τους (περίπου την 14<sup>η</sup> ημέρα), υπέστησαν ευθανασία με υπερδοσολογία εισπνεόμενου σεβοφλουρανίου. Αφαιρέθηκε με επιμήκη τομή το δέρμα και ο υποδόριος ιστός από τον τράχηλο μέχρι την πύελο και παρασκευάστηκε ανατομικά το περιτόναιο. Ακολούθησε επιμήκης διατομή αυτού με αποκάλυψη των ενδοκοιλιακών σπλάγγων. Με τη χρήση σύριγγας 21 g/2.5 ml αναρροφήθηκε το σύνολο του πλευριτικού υγρού διαμέσου των ημιδιαφραγμάτων. Ο ακριβής όγκος της ΚΥΣ υπολογίστηκε με μικροπιπέτα. Ένα τμήμα του πλευριτικού υγρού χρησιμοποιήθηκε για υπολογισμό της συγκέντρωσης με αιμοκυτταρόμετρο των λευκοκυττάρων στην υπεζωκοτική κοιλότητα κάθε πειραματόζωου. Το υπόλοιπο της ΚΥΣ χρησιμοποιήθηκε σε μελέτες καθορισμού του ανοσοφαινοτύπου των λευκοκυττάρων με κυτταρομετρία ροής [144]. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εγκάρσια διατομή των ημιδιαφραγμάτων και επιμήκης διατομή του στέρνου, με αποτέλεσμα τη διάνοιξη του θωρακικού κλωβού. Με χρήση λαβίδας αφαιρέθηκε προσεκτικά το σύνολο του κακοήθους ιστού, συμπεριλαμβανομένων των εμφυτεύσεων του υπεζωκότα, των ημιδιαφραγμάτων και του μεσοθωρακίου. Το βάρος του όγκου κάθε πειραματόζωου υπολογίστηκε με ζυγό ακριβείας. Τμήμα των όγκων τοποθετήθηκε σε διάλυμα φορμαλίνης για ανοσοϊστοχημική ανάλυση (μονιμοποίηση και εγκλεισμός σε κύβους παραφίνης). Διαφορετικό τμήμα των όγκων καταψύχθηκε (για μελέτες ανοσοφθορισμού) και ένα τρίτο τμήμα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ανοσολογικών πληθυσμών με κυτταρομετρία ροής.

Για τη μελέτη της αγγειακής διαπερατότητας σε πειραματόζωα με ΚΥΣ, χορηγήθηκε ενδοφθαλμίως διάλυμα σεσημασμένης αλβουμίνης με τη χρωστική Evans Blue [147], σε συγκέντρωση 4 mg/ml, 60 λεπτά πριν την ευθανασία των μυών (περί την 14<sup>η</sup> ημέρα). Η χρωστική απορροφήθηκε διαμέσου του χοριοειδή χιτώνα του οφθαλμού και μεταφέρθηκε στην κυκλοφορία. Μετά την ευθανασία των πειραματόζωων αναρροφήθηκε το σύνολο της ΚΥΣ από την υπεζωκοτική κοιλότητα κάθε ποντικού. Παράλληλα ελήφθη δείγμα φλεβικού αίματος (με βελόνα 27 g/1 ml) παρακεντώντας την κάτω κοίλη φλέβα. Η συγκέντρωση της αλβουμίνης στην υπεζωκοτική κοιλότητα



υπολογίστηκε με φωτομέτρηση (απορρόφηση στα 630 nm) και η συνολική ποσότητα αυτής προέκυψε πολλαπλασιάζοντας τη συγκέντρωση της αλβουμίνης με τον όγκο της ΚΥΣ. Προκειμένου να ελεγχθεί ότι κάθε πειραματόζωο έλαβε την ίδια ποσότητα αλβουμίνης κατά την έγχυση στον οφθαλμό, υπολογίστηκε η συγκέντρωση της αλβουμίνης στο φλεβικό αίμα.

### ***Ανοσοϊστοχημεία, Ανοσοφθορισμός, Ανοσοαποτύπωση και Κυτταρομετρία Ροής***

Ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση των καρκινικών κυττάρων *in vivo* μελετήθηκαν με τη μέθοδο του πυρηνικού αντιγόνου των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων [Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)] και με την τεχνική της σήμανσης με τριφωσφορική δεοξουρακίλη μέσω τελικής δεοξυνουκλεοτιδικής τρανσφεράσης [Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL)] αντίστοιχα σε ιστοτεμάχια όγκου ποντικού που είχαν μονιμοποιηθεί σε φορμαλίνη και είχαν εμβαπτιστεί σε παραφίνη [148,149].

Η αγγειογένεση μελετήθηκε με ανοσοφθορισμό. Για το σκοπό αυτό, κρυτομές όγκου από C57/B16 και Balb/c μύες μονιμοποιήθηκαν με τη χρήση της ουσίας για τομή σε βέλτιστη θερμοκρασία [optical cutting temperature (OCT) compound]. Ακολούθως οι κρυτομές επώαστηκαν με φθορίζον αντίσωμα έναντι του ειδικού δείκτη των ενδοθηλιακών κυττάρων CD-31 (BD Biosciences). Η πυκνότητα των νεοαγγείων (αριθμός των CD-31 θετικών ενδοθηλιακών αθροίσεων κατά οπτικό πεδίο) [150] και ο λόγος της αγγειακής επιφάνειας: συνολική επιφάνεια όγκου [144] υπολογίστηκε με χρήση μικροσκοπίου φθορισμού και λογισμικού ImageJ (National Institutes of Health).

Η έκφραση του versican σε όγκους C57/B16 και Balb/c μύων καθώς και σε κυτταροκαλλιέργειες AE17 και AB1 κυττάρων καθορίστηκε με την ανοσοαποτύπωση κατά western [27]. Για το σκοπό αυτό δείγματα από ΚΜΥ μύων και κυτταροκαλλιέργειες κυττάρων μεσοθηλιώματος υπέστησαν λύση με διάλυμα λύσης: 25 mM HEPES [(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid)], pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Igepal CA-630 [octylphenoxy poly(ethyleneoxy)ethanol], 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 10% γλυκερόλη, 10 μg/ml λευπεπτίνη, 10 μg/ml απροτινίνη, 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 1 mM

ορθοβαναδικό νάτριο και φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 14000 g. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και αναλύθηκε ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 10% υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Για την έκφραση του versican τα δείγματα επώαστηκαν με το αντίσωμα 8D8.1 (Millipore) [151], το οποίο ανιχνεύει το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεογλυκάνης. Για τον καθορισμό των επιπέδων της versikine χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα ab19345 (Abcam), το οποίο ανιχνεύει το νεοεπίτοπο DPEAEE [98]. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την ακτίνη ή την Ι-τουμπουλίνη.

Εμπύρηννα κύτταρα από όγκους και συνοδές ΚΥΣ C57/B16 μυών μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα παραφορμαδεύδης 4%, ενώ η μεμβράνη τους κατέστη διαπερατή με διάλυμα 0,25% Triton-X 100 [144]. Στη συνέχεια επώαστηκαν με τα εξής φθορίζοντα αντισώματα: αντι-CD45-APC-Cy-7 (δείκτης λευκοκυττάρων), αντι-CD3-PE-Cy7 (δείκτης λεμφοκυττάρων), αντι-CD4-APC-Cy7 (δείκτης Τ-βοηθητικών λεμφοκυττάρων), αντι-Foxp3-APC [δείκτης Τ-ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (T-Regulatory lymphocytes)] [152], anti-CD8-PerCP (δείκτης CD8 Τ-λεμφοκυττάρων), αντι-CD137-PE (δείκτης ενεργοποιημένων CD8 Τ-λεμφοκυττάρων), αντι-CD11b-FITC (δείκτης μυελοκυττάρων), αντι-GR1-PE (δείκτης ουδετερόφιλων σχετιζόμενων με τον όγκο), αντι-F4/80-PerCP (δείκτης μακροφάγων σχετιζόμενων με τον όγκο), αντι-IL10-PE (πρότυπη κυτταροκίνη του ογκογόνου M2 φαινοτύπου) και αντι-IL12-APC (πρότυπη κυτταροκίνη του κυτταροτοξικού M1 φαινοτύπου). Ο λόγος IL-12/IL-10 χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης της πόλωσης των μακροφάγων [153]. Τα φλεγμονώδη κύτταρα επιλέχθηκαν σύμφωνα με το προφίλ της οριζόντιας και πλάγιας σκέδασής τους και της θετικής χρώσης ως προς το CD-45. Η μελέτη του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης των κυττάρων μεσοθηλιώματος και των BMDMs έγινε με τη χρήση των δεικτών rompidium iodide-PI (Applichem) και Annexin V-APC (Biolegend) αντίστοιχα. Όλοι οι κυτταρικοί πληθυσμοί αναλύθηκαν με κυτταρομετρητή πολλαπλών χρωμάτων BD FACS Canto II (BD Bioscience) [27,144].

### ***In vitro* μελέτες**

Η ζωτικότητα των κυττάρων μεσοθηλιώματος μελετήθηκε με τη μέθοδο του MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] [27]. Η *in vitro* διαπερατότητα της μονοστοιβάδας ενδοθηλιακών κυττάρων

αξιολογήθηκε με τη χρήση ενός συστήματος transwell (Corning, διαμέτρου 65 mm, μέγεθος πόρων: 0.4  $\mu\text{m}$ ) [144]. Πιο συγκεκριμένα, ενδοθηλιακά κύτταρα πνεύμονα ποντικού (MLECs) [146] απομονώθηκαν με τη διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως και καλλιεργήθηκαν (σε συγκέντρωση  $2 \times 10^4$  κύτταρα/βοθρίο) στον ανώτερο θάλαμο του συστήματος transwell, που είχε προηγουμένως επαλειφθεί με τζελατίνη. Στον κατώτερο θάλαμο τοποθετήθηκαν vector ή shvcan AE17 κύτταρα (σε συγκέντρωση  $5 \times 10^4$  κύτταρα/βοθρίο). 48 ώρες αργότερα, φθορίζουσα βόειος αλβουμίνη (FITC-BSA) σε συγκέντρωση 250  $\mu\text{g/ml}$  προστέθηκε στον ανώτερο θάλαμο του συστήματος transwell και αφέθηκε να εισχωρήσει διαμέσου της ενδοθηλιακής μονοστοιβάδας στον κατώτερο θάλαμο για 45 λεπτά. Η συγκέντρωση της FITC-BSA στον κατώτερο θάλαμο υπολογίστηκε με μέτρηση της απορρόφησης στα 485/535 nm. Καλλιεργητικοί θάλαμοι χωρίς ενδοθηλιακά ή καρκινικά κύτταρα συμπεριελήφθησαν στα πειράματα ως μάρτυρες. Η ακεραιότητα της ενδοθηλιακής μονοστοιβάδας εκτιμήθηκε με μικροσκόπιο φθορισμού, αφού προηγήθηκε χρώση των ενδοθηλιακών κυττάρων με το αντίσωμα anti-CD-31.

Για την *in vitro* μελέτη του φαινοτύπου των μακροφάγων, BMDMs και AE17 κύτταρα τοποθετήθηκαν (σε συγκέντρωση  $12 \times 10^4$  κύτταρα/βοθρίο, σε αναλογία 1:1) στα δύο διαφορετικά διαμερίσματα ενός συστήματος transwell (μέγεθος πόρων: 0.4  $\mu\text{m}$ , Corning), χωρίς προηγουμένως να έχουν υποστεί στέρηση βόειου ορού (FBS). 24 ώρες αργότερα, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και η έκφραση των CD11b, F4/80, IL-10 και IL-12 καθορίστηκε με κυτταρομετρία ροής. Η βασική έκφραση των ιντερλευκινών IL-10 και IL-12 καθορίστηκε σε κυτταροκαλλιέργειες BMDMs χωρίς την παρουσία κυττάρων μεσοθηλιώματος.

Για τα *in vitro* πειράματα αξιολόγησης της μετανάστευσης των μακροφάγων  $3 \times 10^4$  AE17 κύτταρα μεσοθηλιώματος τοποθετήθηκαν στον κατώτερο θάλαμο ενός συστήματος transwell [μέγεθος πόρων μεμβράνης: 8  $\mu\text{m}$  (Corning)]. Στον ανώτερο θάλαμο καλλιεργήθηκαν  $15 \times 10^4$  BMDMs μακροφάγα, τα οποία προηγουμένως είχαν υποστεί στέρηση ορού για 12 ώρες. Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκε διαμέσου της μεμβράνης transwell ένα πρηνές συγκέντρωσης χημειοτακτικών ερεθισμάτων (αποκλειστική πηγή των οποίων ήταν τα καρκινικά κύτταρα) και τα μακροφάγα

αφέθηκαν να μεταναστεύσουν προς τη μεμβράνη για 24 ώρες. Όλα τα διαμερίσματα περιείχαν καλλιεργητικό μέσο χωρίς FBS. Τα μακροφάγα που μετανάστευσαν μονιμοποιήθηκαν, συλλέχθηκαν, βάφθηκαν με χρώση Giemsa και παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο [144].

Η επίδραση του versican, που εκκρίνεται από τον όγκο, στην κυτταροτοξική δράση των μακροφάγων έναντι των καρκινικών κυττάρων *in vitro* διερευνήθηκε ως εξής: Μακροφάγα BMDMs σε συγκέντρωση  $2 \times 10^5$  κύτταρα/βοθρίο καλλιεργήθηκαν για 12 ώρες με λιποπολυσακχαρίδη [lipopolysaccharide (LPS) σε συγκέντρωση 1  $\mu\text{g/ml}$ ], ένα συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηρίων, το οποίο ωθεί τα μακροφάγα να εμφανίζουν λειτουργίες συμβατές με τον M1 κυτταροτοξικό φαινότυπο] [154,155]. Μαζί με τα μακροφάγα τοποθετήθηκαν σε καλλιεργητικό τρυβλίο 6 βοθρίων AE17 κύτταρα σε αναλογία 1:2. 24 ώρες αργότερα τα κύτταρα μεσοθηλιώματος και τα BMDMs συλλέχθηκαν και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού και απόπτωσης αξιολογήθηκε με κυτταρομετρία ροής (όπως περιγράφηκε παραπάνω). Επιπλέον tomato BMDMs ( $2 \times 10^5$  κύτταρα/βοθρίο) και AE17 (vector ή shvcan) κύτταρα συγκαλλιεργήθηκαν σε τρυβλίο 6 βοθρίων (σε αναλογία 2:1). Ακολούθως συλλέχθηκαν, μονιμοποιήθηκαν και παρατηρήθηκαν σε φθορίζον μικροσκόπιο. Ο αριθμός, κατά οπτικό πεδίο, των tomato BMDMs (κύτταρα με κόκκινη απόχρωση) που περιείχαν στο κυτταρόπλασμά τους θραύσματα μετασχηματισμένων AE17 κυττάρων (κύτταρα με πράσινη απόχρωση, που εκφράζουν την πρωτεΐνη GFP), χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης φαγοκυττάρωσης. Όλα τα *in vitro* πειράματα διεξήχθησαν δύο φορές και κάθε τιμή αναφέρεται σε τριπλέτα.

### ***Μελέτες σε ανθρώπινα δείγματα***

Οι κύβοι παραφίνης ανθρώπινων δειγμάτων παραχωρήθηκαν από το Αρχείο του τμήματος Παθολογοανατομίας, ύστερα από σχετική έγκριση της Επιτροπής Βιοηθικής και Δεοντολογίας του Γενικού Νοσοκομείου «Ο Ευαγγελισμός» (Αθήνα, Ελλάδα), με αριθμό πρωτοκόλλου: 322/12-4-2012, ώστε να υποβληθούν σε ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις. Δεδομένης της αναδρομικής φύσης των μελετών, δεν απαιτήθηκε έγγραφη συγκατάθεση από τους ασθενείς. Η έκφραση του versican στο μεσοθηλίωμα υπεζωκότα ή σε τμήματα υγιούς τοιχωματικού υπεζωκότα (τα οποία ελήφθησαν από ασθενείς που

χειρουργήθηκαν για πρωτοπαθή αυτόματο πνευμοθώρακα) αξιολογήθηκε σε ιστοτεμάχια, τα οποία μονιμοποιήθηκαν σε φορμαλίνη και εμβαπτίστηκαν σε παραφίνη. Οι ιστολογικές τομές επώαστηκαν με το αντίσωμα 8D8.1 (Millipore) έναντι του versican σε συγκέντρωση 1:50. Με τον τρόπο αυτό ανιχνεύθηκε το καρβοξυτελικό άκρο του πρωτεϊνικού πυρήνα της πρωτεογλυκάνης [151]. Στην ομάδα του KMY συμπεριελήφθησαν 16 ασθενείς με μεσοθηλίωμα (λόγος θήλυ: άρρεν = 5/16, μέση ηλικία =  $69,25 \pm 1,41$  έτη, επιθηλιοειδές KMY=12, αδιευκρίνιστο=2, δεσμοπλαστικό=1, σαρκοματοειδές=1), ενώ η ομάδα του πνευμοθώρακα περιελάμβανε 9 ασθενείς (λόγος θήλυ: άρρεν=4/9, μέση ηλικία=  $33,11 \pm 4,82$  έτη). Η έκφραση του versican ενδοκυτταρίως ή στον εξωκυττάριο χώρο βαθμονομήθηκε από έναν έμπειρο παθολογοανατόμο σύμφωνα με τις εργασίες του Sluiter και συνεργατών [156].

Τα επίπεδα του versican μετρήθηκαν επίσης στο πλευριτικό υγρό και το πλάσμα ασθενών με KMY (n=10) ή καρδιακή ανεπάρκεια (n=10) με την ενζυμική ανοσοπροσοφορική μέθοδο [Enzyme-linked Immusorbent Assay (ELISA)], χρησιμοποιώντας το versican/Pg-M/Pg-350 ELISA kit (Cusabio, MD, USA). Τα δείγματα ανασύρθηκαν από μια βιο-τράπεζα, η οποία διατηρείται στο εργαστήριό μας [157]. Η δημιουργία και διαχείριση της βιο-τράπεζας έλαβε έγκριση από την Επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας του Γενικού Νοσοκομείου «Ο Ευαγγελισμός» (Αθήνα, Ελλάδα), με αριθμό πρωτοκόλλου: 379/12-7-2006. Όλοι οι ασθενείς υπέγραψαν έντυπη φόρμα συγκατάθεσης. Τα δεδομένα που αφορούσαν τα επίπεδα του versican mRNA και τη συνολική επιβίωση 87 ασθενών με KMY ελήφθησαν από την ελεύθερης πρόσβασης βάση δεδομένων “The Cancer Genome Atlas” (TCGA) (gdc.cancer.gov) [158].

### ***Στατιστική ανάλυση***

Οι ποσοτικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέση τιμή  $\pm$  συστηματικό σφάλμα [mean  $\pm$  standard error of mean (SEM)] και η ανάλυσή τους πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία Student’s t-test ή one-way ANOVA (analysis of variance). Οι ποιοτικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως διάγραμμα κατανομής συχνοτήτων (πίνακας 2X2) και εξετάστηκαν με τη δοκιμασία  $\chi^2$ , διορθωμένη κατά Yates. Τα στοιχεία από τη βάση δεδομένων “The Cancer Genome Atlas” (TCGA) αναλύθηκαν με N-Way tabulation. Το mRNA της πρωτεογλυκάνης versican θεωρήθηκε ως ανεξάρτητη μεταβλητή, ενώ η συνολική

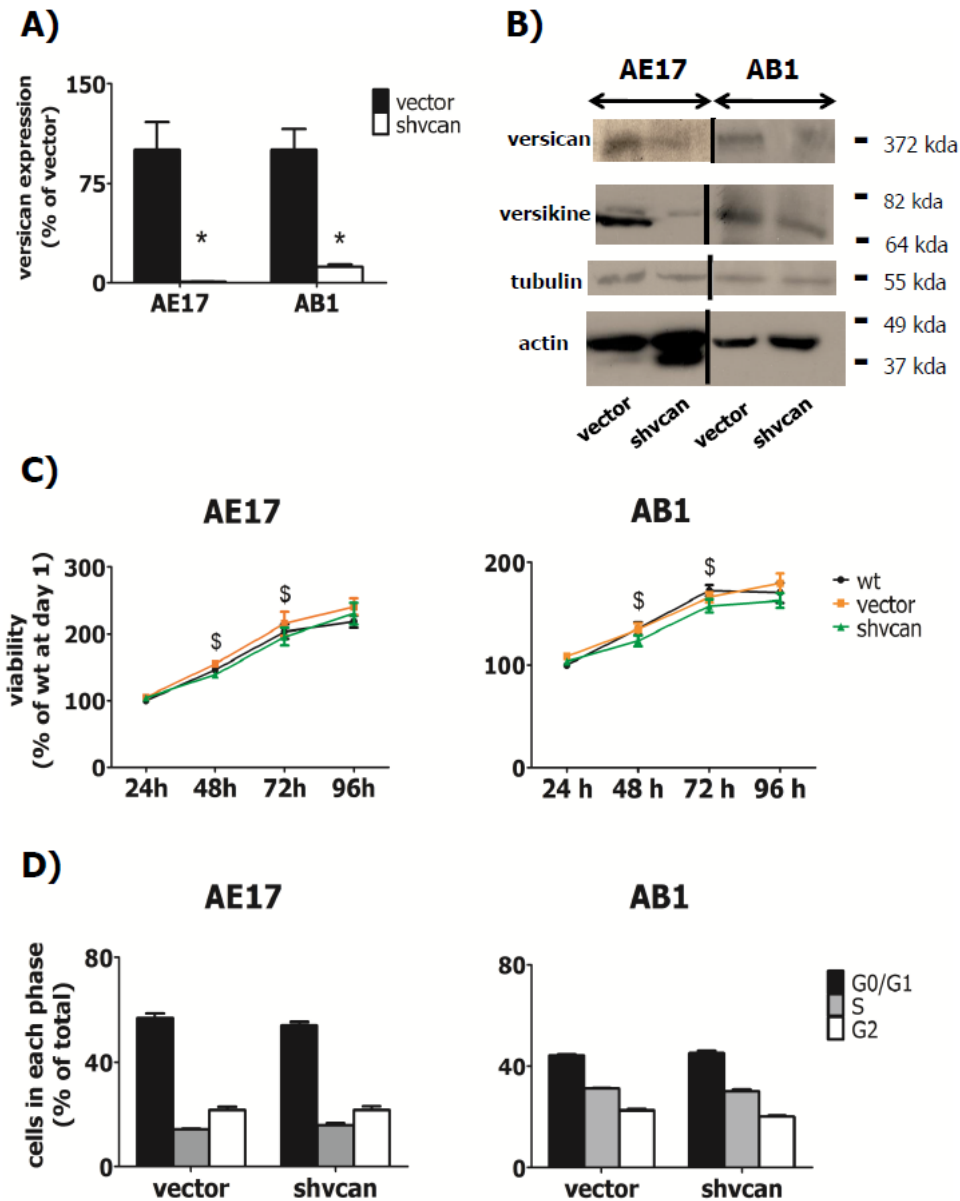
επιβίωση ήταν η εξαρτημένη μεταβλητή. Η ηλικία, το φύλο, ο ιστολογικός τύπος (επιθηλιοειδές ΚΜΥ έναντι μη-επιθηλιοειδούς ΚΜΥ) και η χημειοθεραπεία (θεραπεία με σταθερό συνδυασμό σισπλατίνης και πεμετρεξέδης έναντι σταθερού συνδυασμού με προσθήκη και άλλων χημειοθεραπευτικών παραγόντων) εξετάστηκαν ως συγχυτικοί παράγοντες. Οι τιμές  $P < 0,05$  θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τα λογισμικά πακέτα «Statistical Package for the Social Sciences v.13.0.0 (IBM)» και «IHS EViews (Irvine)». Η πολυπαραγοντική μελέτη επικυρώθηκε με τη χρήση του λογισμικού R (R software).

## **Αποτελέσματα**

### ***Το versican προωθεί την αύξηση του ΚΜΥ και τη δημιουργία κακοήθους υπεζωκοτικής συλλογής in vivo.***

Ενδεείς ως προς το versican AE17 και AB1 (shvcan) κυτταρικοί κλώνοι (οι οποίοι εξέφραζαν τον πρωτεϊνικό πυρήνα του versican και τη versikine σε ποσοστό μικρότερο του 10% συγκριτικά με τα κύτταρα vector) (Εικ. 1A,B) εξετάστηκαν με τη μέθοδο MTS και με κυτταρομετρία ροής. Παρατηρήθηκε ότι η ζωτικότητα (Εικ. 1C) και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τους (Εικ. 1D) δεν διέφερε σε σύγκριση με κύτταρα μεσοθηλιώματος, τα οποία είχαν μετασχηματιστεί με πλασμίδια vector (κύτταρα vector). AE17 και AB1 shvcan ή vector κύτταρα χορηγήθηκαν απευθείας στην υπεζωκοτική κοιλότητα συγγενών C57Bl/6 και Balb/c μυών αντίστοιχα, προκειμένου να δημιουργηθούν μεσοθηλιώματα υπεζωκότα. Πειραματόζωα που έφεραν όγκους, οι οποίοι στερούνταν το versican, εμφάνισαν μειωμένο κακόηθες φορτίο (Εικ. 2A) και μειωμένη συνολική ποσότητα ΚΥΣ (Εικ. 2B), συγκριτικά με τα πειραματόζωα ελέγχου. Οι shvcan όγκοι εξέφραζαν σημαντικά μικρότερη ποσότητα της versikine (Εικ. 3A,B) και του πρωτεϊνικού πυρήνα του versican (Εικ. 3C,D), συγκριτικά με τις κακοήθειες ελέγχου, αντανakλώντας κατ' αυτόν τον τρόπο το *in vitro* πρότυπο της έκφρασης του versican από τα κύτταρα του μεσοθηλιώματος. Μάλιστα, το εύρημα αυτό αποδεικνύει ότι η αποσιώπηση του versican στα καρκινικά κύτταρα διατηρήθηκε στις *in vivo* συνθήκες και υπονοεί ότι η μεγαλύτερη ποσότητα της πρωτεογλυκάνης στον ιστό του ΚΜΥ προέρχεται από τα κακοήθη κύτταρα.

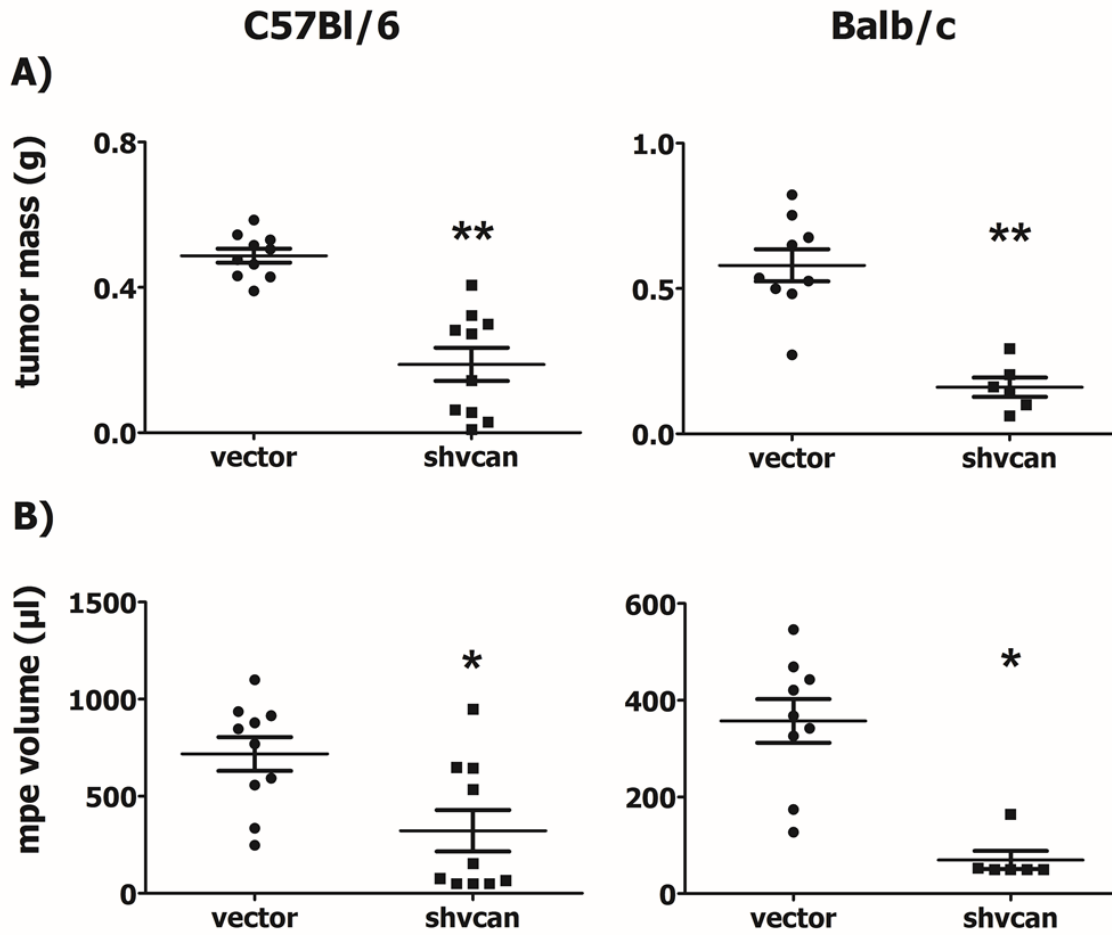
## Εικόνα 1



**Εικ. 1:** Τα –ενδεί ως προς το versican- κύτταρα μεσοθηλιώματος μύος (shvcan) εμφανίζουν παρόμοιο ρυθμό αύξησης συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου (vector).

Οι σταθεροί κλώνοι shvcan κυττάρων μεσοθηλιώματος εκφράζουν λιγότερο από 10% της πρωτεΐνης versican, η οποία εκφράζεται από κύτταρα τα οποία έχουν μετασχηματιστεί με πλασμίδια vector, όπως καθορίστηκε με τη μέθοδο western blot (A). Αντιπροσωπευτικές εικόνες παρουσιάζουν μια παράλληλη μείωση της πρωτεΐνης versican και -του DPEAEE τμήματός της- versikine στα AE17 και AB1 shvcan κύτταρα μεσοθηλιώματος μύος (B). Επιβίωση των wild-type (αμετασχημάτιστων), vector και shvcan AE17 και AB1 κυττάρων (όπως καθορίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο MTS) στις 24, 48, 72, 96 ώρες αντίστοιχα (C) και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής του κυτταρικού κύκλου των κλώνων μεσοθηλιώματος (χρησιμοποιώντας propidium iodide) (D), \* $p < 0.05$  συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου vector, \$  $p < 0.05$  συγκριτικά με τον πληθυσμό της προηγούμενης ημέρας, wt:wild type (αμετασχημάτιστα) κύτταρα, shvcan: κύτταρα μετασχηματισμένα με πλασμίδια που περιείχαν short-hairpin RNA αλληλουχίες στοχεύοντας το mRNA της πρωτεΐνης versican, vector: κύτταρα μετασχηματισμένα με πλασμίδια που περιείχαν τυχαίες RNA αλληλουχίες (άδειοι φορείς). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή  $\pm$  σταθερό σφάλμα.

## Εικόνα 2

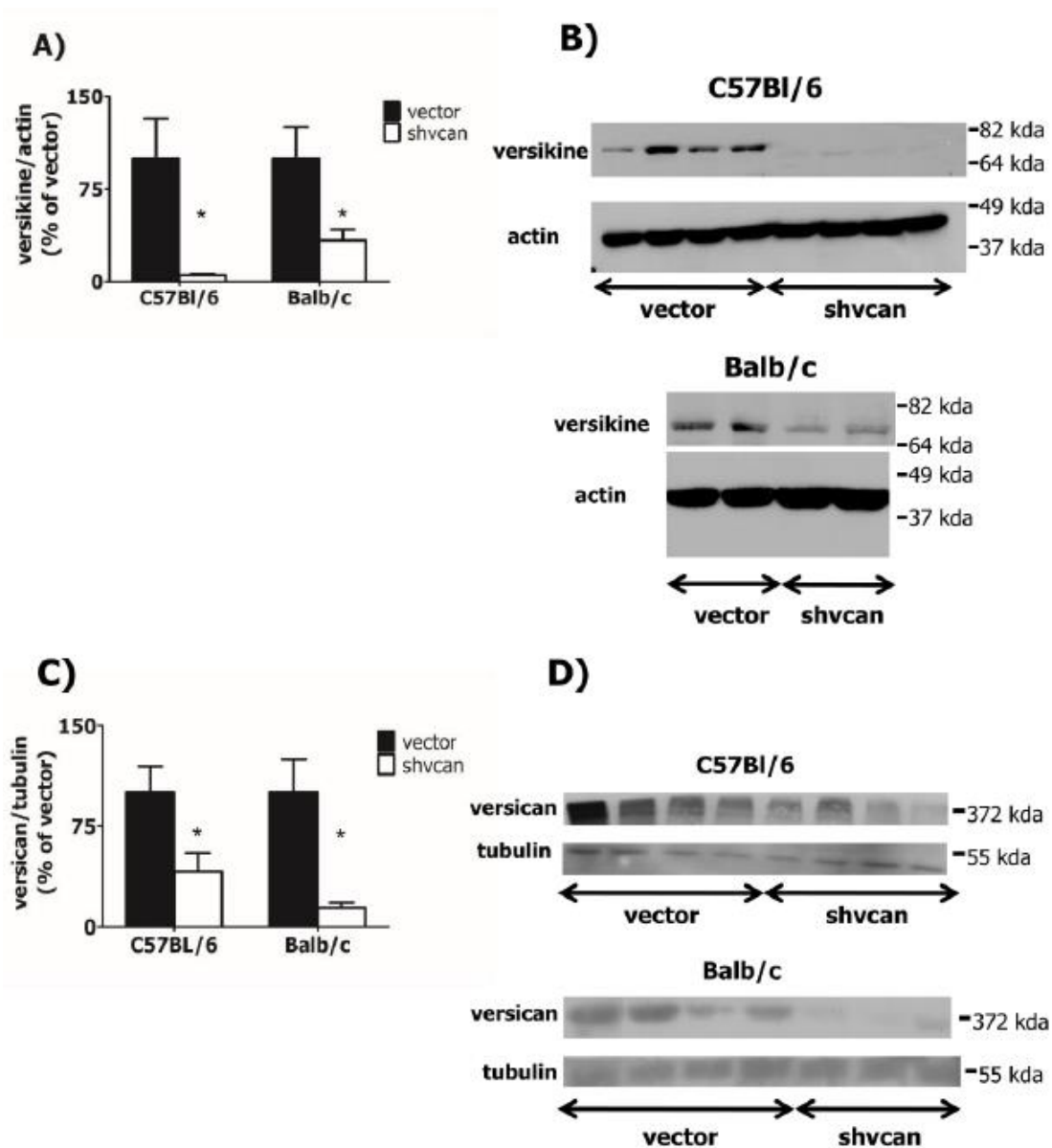


**Εικ. 2:** Η πρωτεΐνη versican που προέρχεται από τον όγκο ενισχύει την ανάπτυξη του μεσοθηλιώματος σε πειραματικά μοντέλα μύων.

C57Bl/6 και Balb/c μύες υπέστησαν ευθανασία 14 ημέρες μετά την ενδοϋπεζωκοτική έγχυση AE17 και AB1 συγγενών κυττάρων μεσοθηλιώματος αντίστοιχα. Το σύνολο του κακοήθους ιστού (tumor mass) (A) και η κακοήθης υπεζωκοτική συλλογή (mpe volume) (B) συλλέχθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.001$  σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (vector). Vector: κύτταρα μεσοθηλιώματος που εκφράζουν την πρωτεΐνη versican, Shvcan: κύτταρα μεσοθηλιώματος ενδεί ως προς την έκφραση της πρωτεΐνης versican. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή  $\pm$  σταθερό σφάλμα.



### Εικόνα 3



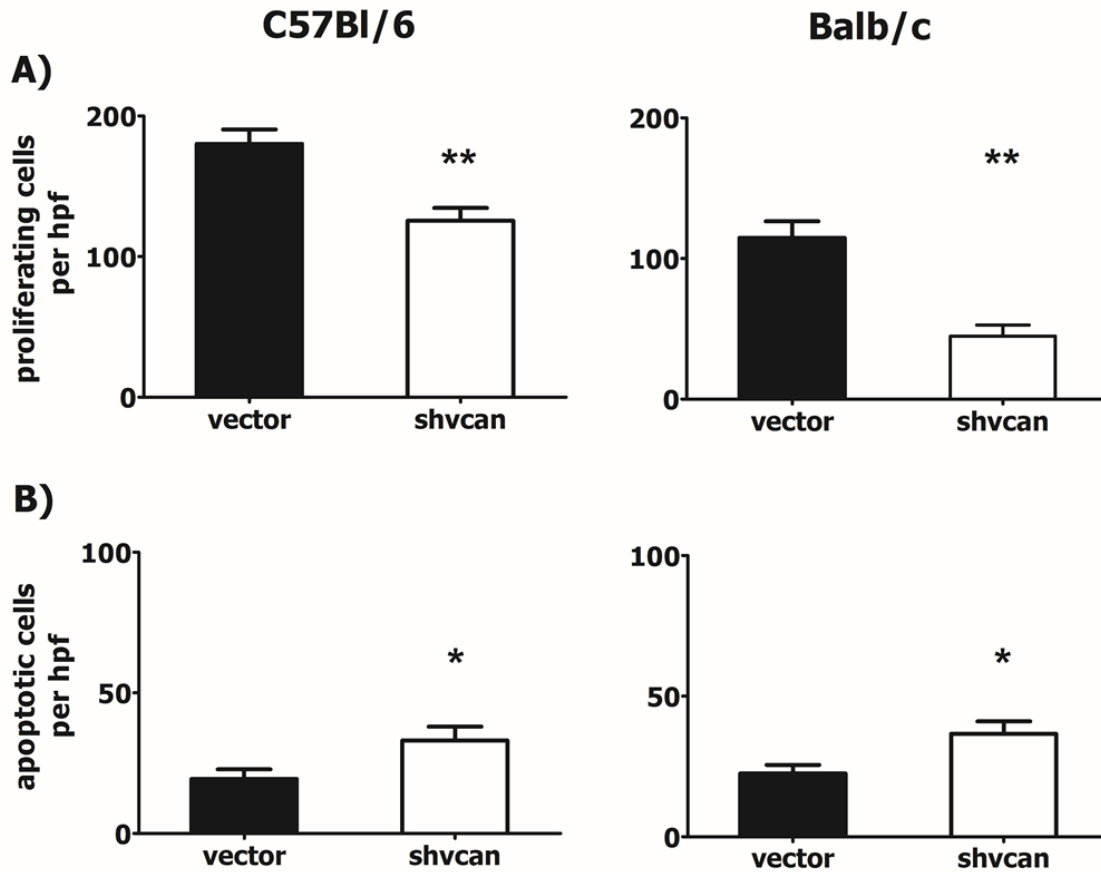
**Εικ. 3:** Η αποσίωψη της πρωτεΐνης versican διατηρείται *in vivo*.

Ποσότητα του πρωτεϊνικού θραύσματος versikine (A) και του πρωτεϊνικού πυρήνα του versican (C) σε ιστούς AE17 και AB1 μεσοθηλιώματος (όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο western blot) και αντιπροσωπευτικές εικόνες από τη western blot ανάλυση (B,D), \* $p < 0.05$  συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου vector. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή  $\pm$  σταθερό σφάλμα. Actin: ακτίνη, tubulin: τουμπολίνη.

***Το versican ενισχύει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, περιορίζει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων και επάγει την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας.***

Σε μια προσπάθεια να αποσαφηνίσουμε τους υποκείμενους μηχανισμούς, με τους οποίους το versican προωθεί την ανάπτυξη του μεσοθηλιώματος, εστίασαμε στην επίδραση της αποσιώπησης του versican στο ρυθμό πολλαπλασιασμού και στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, καθώς και στην αγγειογένεση εντός του όγκου. Ενδεή ως προς την πρωτεογλυκάνη ΚΜΥ παρουσίασαν μειωμένο ρυθμό πολλαπλασιασμού (Εικ. 4Α, Εικ. 5Α) και αυξημένη απόπτωση (Εικ. 4Β, Εικ. 5Β) των καρκινικών κυττάρων, όπως παρατηρήθηκε σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες. Χρησιμοποιώντας φθορίζον αντίσωμα έναντι του CD-31 σε κρυοτομές πειραματικών μεσοθηλιωμάτων, διαπιστώσαμε ότι η αγγειογένεση εντός του όγκου [όπως τεκμηριώθηκε με μέτρηση της μικροαγγειακής πυκνότητας (Εικ. 6) και του λόγου της αγγειακής/καρκινικής επιφάνειας] δεν επηρεάστηκε.

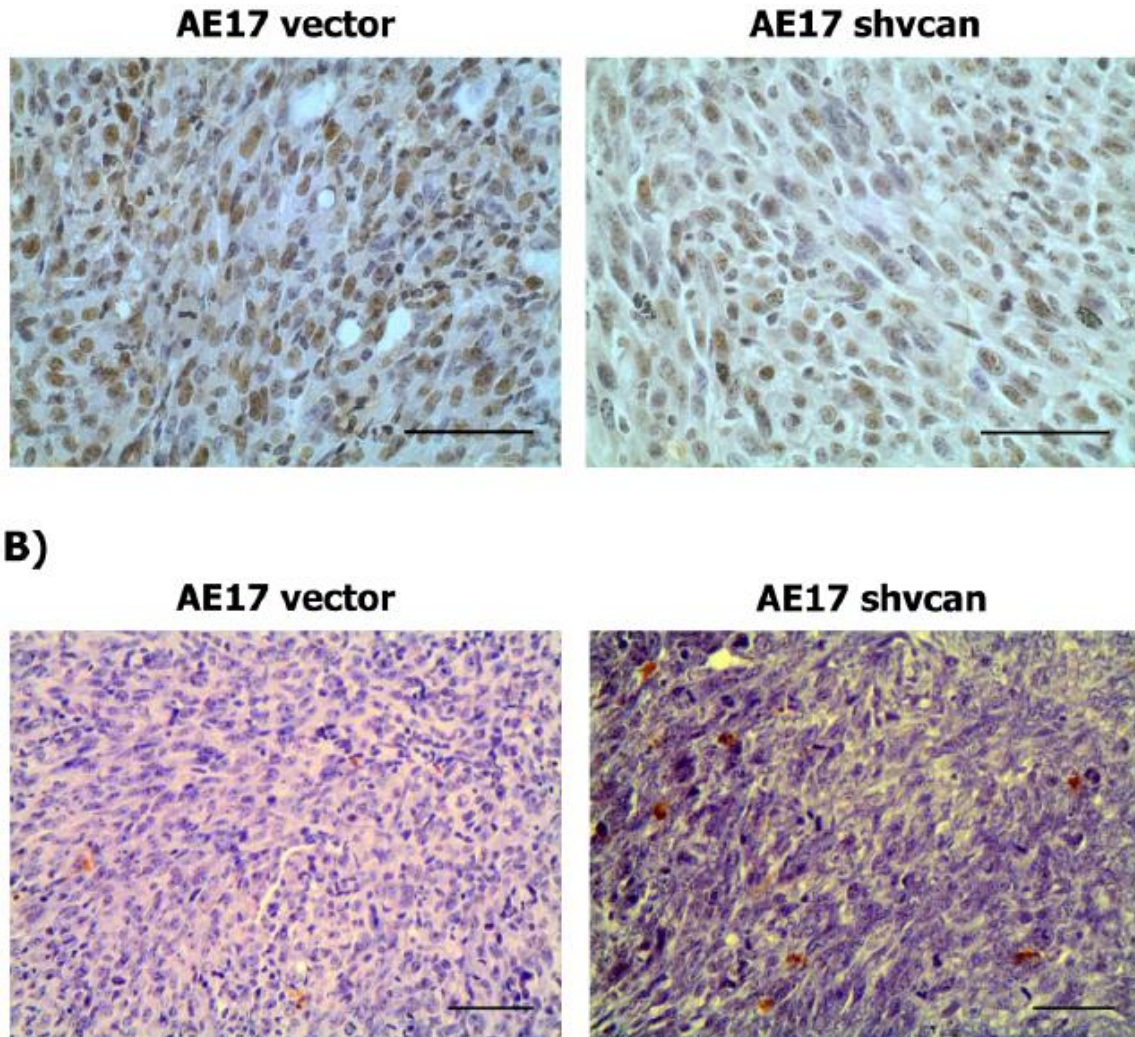
## Εικόνα 4



**Εικ. 4:** Η πρωτεΐνη versican που προέρχεται από τον όγκο επάγει τον πολλαπλασιασμό και εμποδίζει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων *in vivo*.

Ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση των καρκινικών κυττάρων αξιολογήθηκαν σε τομές παραφίνης από κακόηθες μεσοθηλίωμα υπεζωκότα με ανοσοϊστοχημεία έναντι του πυρηνικού αντιγόνου των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων [proliferating cell nuclear antigen antibody (anti-PCNA) immunostaining] και με τη μέθοδο TUNEL [deoxynucleotidyl nick end-labeling] αντίστοιχα. Αριθμός των PCNA (+) πολλαπλασιαζόμενων καρκινικών κυττάρων κατά οπτικό πεδίο (proliferating cells per hpf) (A) και αριθμός των TUNEL (+) καρκινικών κυττάρων κατά οπτικό πεδίο (apoptotic cells per hpf) (B) C57Bl/6 και Balb/c μών αντίστοιχα, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου vector. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή  $\pm$  σταθερό σφάλμα.

## Εικόνα 5

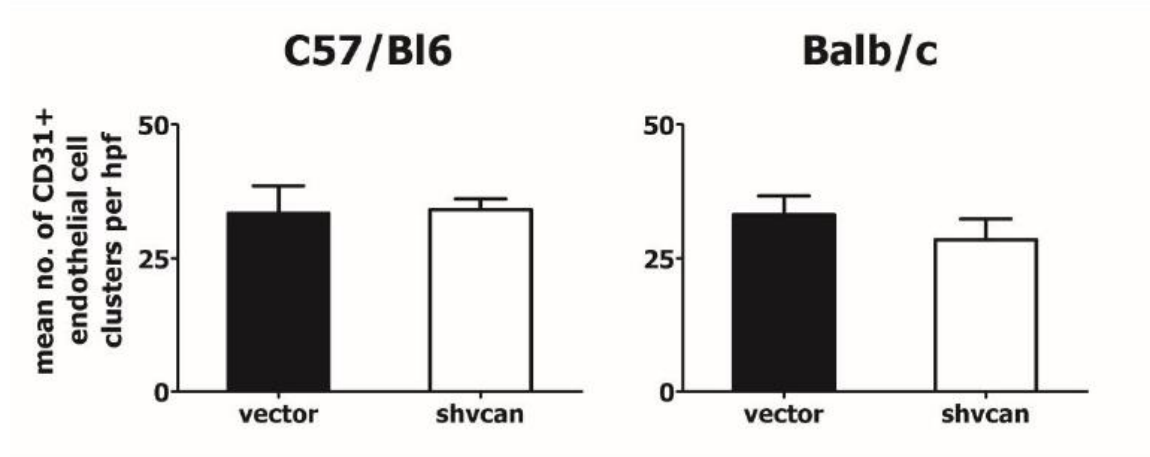


**Εικ. 5:** Το μεσοθηλίωμα που στερείται την πρωτεΐνη versican χαρακτηρίζεται από χαμηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού και αυξημένο ρυθμό απόπτωσης *in vivo*, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.

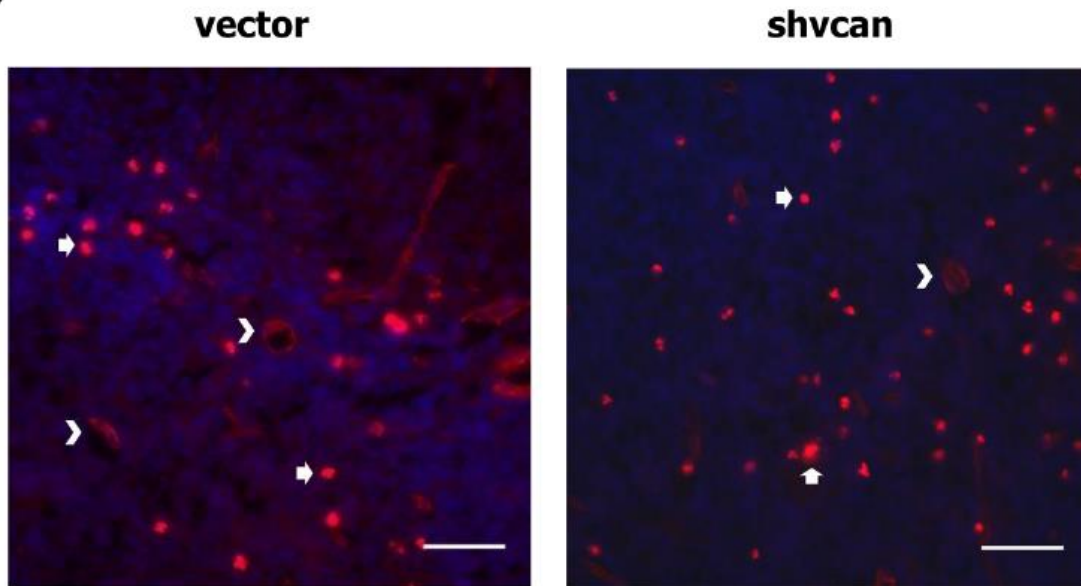
Τομές παραφίνης από μεσοθηλίωμα μυός προερχόμενο από AE17 κύτταρα (το οποίο αναπτύχθηκε σε C57Bl/6 μύες) επωάστηκαν με αντίσωμα έναντι του αντιγόνου PCNA προκειμένου να καθοριστεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός (A), ή αναλύθηκαν με τη μέθοδο TUNEL προκειμένου να αξιολογηθεί η κυτταρική απόπτωση (B). Κλίμακα: 20 μm.

## Εικόνα 6

**A)**



**B)**

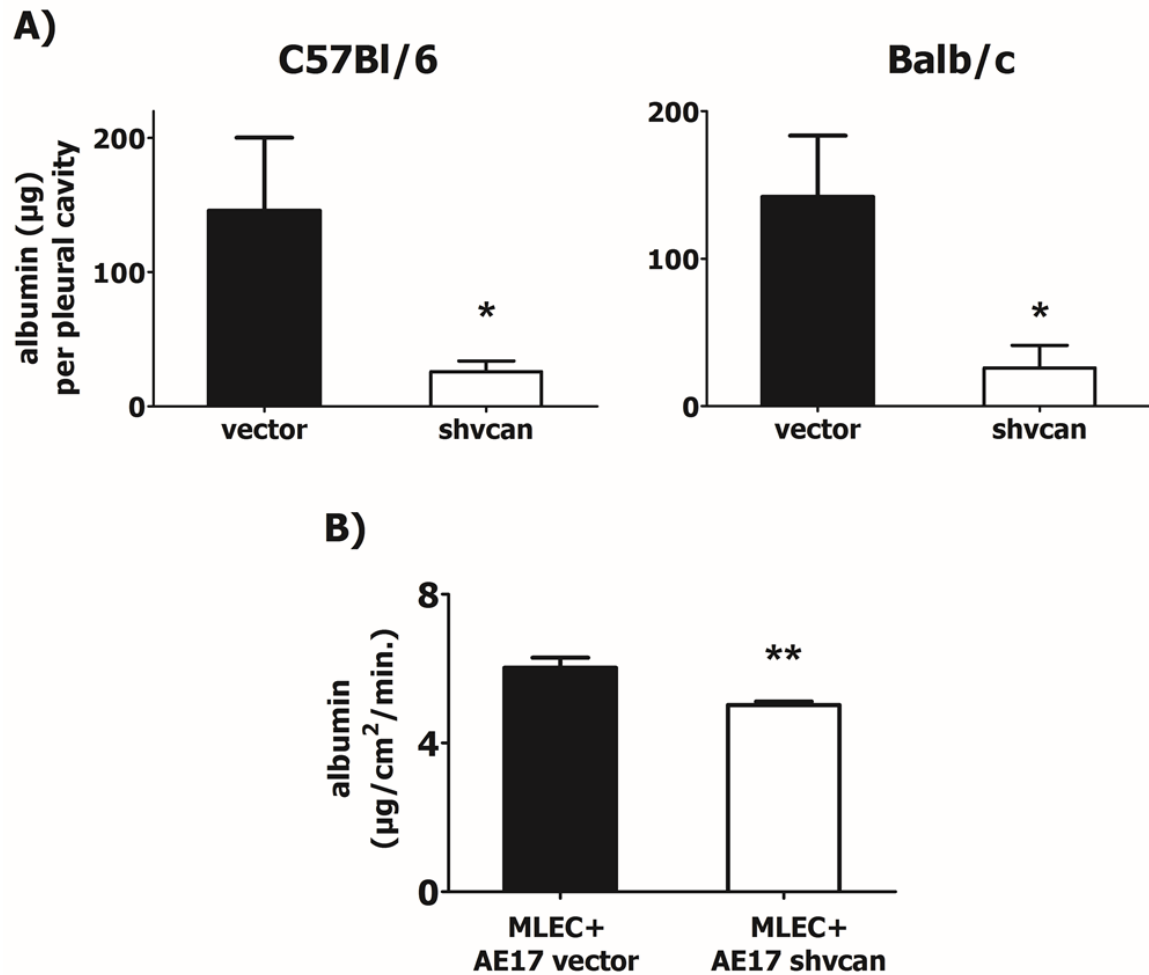


**Εικ. 6:** Η αγγειογένεση δεν επηρεάζεται στο μεσοθηλίωμα που στερείται την πρωτεΐνη versican συγκριτικά με το μεσοθηλίωμα ελέγχου.

Μέσος αριθμός των αθροίσεων CD31+ ενδοθηλιακών κυττάρων σε κρυστομές που ελήφθησαν από C57/Bl6 και Balb/c μύες με μεσοθηλίωμα, όπως προσδιορίστηκε με ανοσοφθορισμό. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων (A). Αντιπροσωπευτικές εικόνες από επώαση με anti-CD31 φθορίζον αντίσωμα σε κρυστομές που ελήφθησαν από C57/Bl6 μύες με μεσοθηλίωμα (B). Οι αθροίσεις των CD31+ ενδοθηλιακών κυττάρων (λευκά βέλη) και τα νέο-αγγεία (λευκές αιχμές) φανερώνουν την αγγειογένεση. Κλίμακα: 20 μm.

Προκειμένου να αποσαφηνιστεί εάν η αποσιώπηση του versican επηρεάζει τη διαπερατότητα των αγγείων της υπεζωκοτικής κοιλότητας, ενός καθοριστικού μηχανισμού στη δημιουργία της ΚΥΣ [159], χορηγήθηκε ενδοφλεβίως σε πειραματόζωα η χρωστική Evans Blue (η οποία προσδένεται στην αλβουμίνη του πλάσματος) και τα επίπεδά της στον ορό και το υπεζωκοτικό υγρό των πειραματόζωων υπολογίστηκαν *ante mortem*. Μετά την έγχυση παρατηρήσαμε ότι οι μύες που έπασχαν από ενδεή ως προς το versican ΚΜΥ εμφάνισαν σημαντικά μειωμένη αγγειακή διαπερατότητα στα αγγεία του υπεζωκότα (Εικ. 7Α), χωρίς τα επίπεδα της χρωστικής στο πλάσμα να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των ομάδων. Για να επαληθεύσουμε περαιτέρω την παρατήρηση αυτή, πραγματοποιήσαμε *in vitro* πειράματα συγκαλλιέργειας, χρησιμοποιώντας ΑΕ17 κύτταρα και συγγενή ενδοθηλιακά κύτταρα από τους πνεύμονες C57/B16 μών (MLECs), ώστε να διερευνήσουμε αν το versican που προέρχεται από το μεσοθηλίωμα ενισχύει τη διαπερατότητα της μονοστοιβάδας ενδοθηλιακών κυττάρων. Διαπιστώσαμε ότι ο ρυθμός της αλβουμίνης που διαπερνά τα κενά της ενδοθηλιακής μονοστοιβάδας στη μονάδα του χρόνου ήταν σημαντικά μειωμένος όταν τα ενδοθηλιακά κύτταρα συγκαλλιεργήθηκαν με ενδεή ως προς το versican ΑΕ17 κύτταρα, συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου (Εικ. 7Β).

## Εικόνα 7



**Εικ. 7:** Η πρωτεΐνη versican που προέρχεται από τον όγκο προάγει την αγγειακή διαπερατότητα.

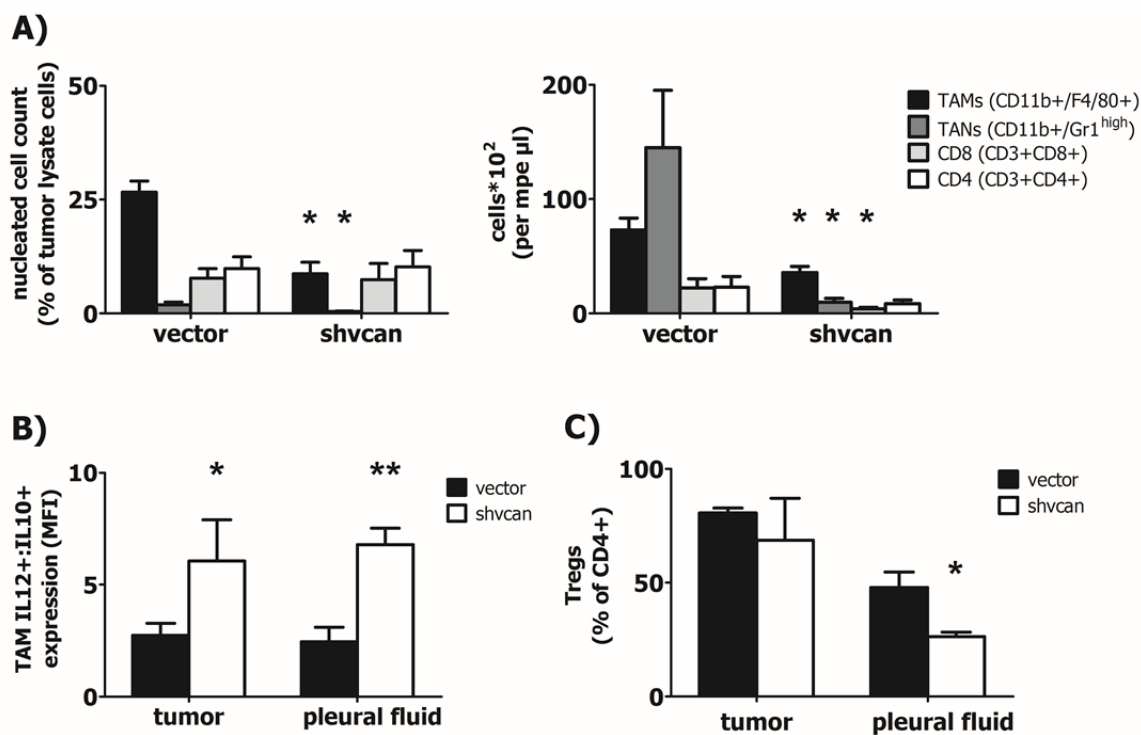
Η αγγειακή διαπερατότητα μελετήθηκε *in vivo* μετρώντας την ποσότητα (μg) της -συνδεδεμένης με Evans Blue-αλβουμίνης, η οποία είχε συγκεντρωθεί στην υπεζωκοτική κοιλότητα C57Bl/6 και Balb/c μύων με μεσοθηλίωμα, ύστερα από ενδοφλέβια έγχυση της χρωστικής (A). Ενδοθηλιακά κύτταρα συγκαλλιεργήθηκαν με AE17 κύτταρα μεσοθηλιώματος *in vitro* και η διαπερατότητα της ενδοθηλιακής μονοστιβάδας αξιολογήθηκε προσδιορίζοντας την ποσότητα της FITC-αλβουμίνης που διαπέρασε δεδομένη περιοχή της μονοστιβάδας ανά μονάδα χρόνου (B), \* $p < 0.05$  συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (vector), \*\* $p < 0.01$ . Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή  $\pm$  σταθερό σφάλμα. MLEC: murine lung endothelial cells (ενδοθηλιακά κύτταρα απομονωμένα από πνεύμονα C57Bl/6 μύος). FITC-αλβουμίνη: αλβουμίνη συνδεδεμένη με fluorescein isothiocyanate.

***To versican επηρεάζει καθοριστικά στην ανοσολογική αντίδραση που σχετίζεται με το ΚΜΥ.***

Δείγματα από κακοήθη ιστό μεσοθηλιώματος και συνοδού ΚΥΣ ελήφθησαν από C57/Bl6 μύες και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Με τον τρόπο αυτό εξετάστηκε η επίδραση του versican στην καθοδηγούμενη από τον όγκο ανοσολογική απάντηση. Μεσοθηλιώματα που στερούνταν το versican περιείχαν λιγότερα CD11b+F4/80+ μακροφάγα [Tumor-associated macrophages (TAMs)], CD11b+GR1<sup>high</sup> ουδετερόφιλα [Tumor-associated neutrophils (TANs)], ενώ οι συνοδοί ΚΥΣ περιείχαν σημαντικά μικρότερες ποσότητες TAMs, TANs και CD8+ T-λεμφοκυττάρων, συγκριτικά με τους όγκους και τις πλευριτικές συλλογές ελέγχου (Εικ. 8A). Επιπλέον, η αποσιώπηση του versican ώθησε τα μακροφάγα προς τον M1-κυτταροτοξικό φαινότυπο, όπως αναδεικνύεται από τον σημαντικά αυξημένο λόγο έκφρασης των κυτταροκινών IL-12 και IL-10 (IL12:IL10) στα μεσοθηλιώματα και συνοδούς ΚΥΣ που στερούνταν το versican, σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου (Εικ. 8B). Επιπρόσθετα, εντός του πλευριτικού υγρού μυών με μεσοθηλιώμα που εξέφραζε το versican, η πλειοψηφία των CD4+ T-λεμφοκυττάρων εμφάνιζε τον T-ρυθμιστικό [T-regulatory (Treg)] φαινότυπο (CD4+ Foxp3+) [160], ο οποίος καθορίζεται από την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Foxp3 (forkhead box protein 3). Στον αντίποδα, η αποσιώπηση της πρωτεογλυκάνης στα καρκινικά κύτταρα, οδήγησε σε μερική αντιστροφή αυτού του φαινομένου (Εικ. 8C). Σε αντίθεση με τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα, η αποσιώπηση του versican στα καρκινικά κύτταρα δεν επιδρά στην ενεργοποίηση των CD8+ T-λεμφοκυττάρων, όπως παρατηρήθηκε από τη μελέτη της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης CD137 στον κυτταρικό αυτό πληθυσμό. Ωστόσο, συνολικά το versican φαίνεται πως αναστέλλει τις κυτταροτοξικές επιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος στο μικροπεριβάλλον του ΚΜΥ.



## Εικόνα 8



**Εικ. 8:** Η πρωτεΐνη versican που προέρχεται από τον όγκο διαμορφώνει ένα -φιλικό προς τον όγκο- μικροπεριβάλλον.

Το λύμα του κακοήθους ιστού και η κακοήθης υπεζωκοτική συλλογή (ΚΥΣ), που συλλέχθηκαν από C57Bl/6 μύες με κακοήθες μεσοθηλίωμα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. TAMs, TANs, CD8 (+) και CD4 (+) κύτταρα στο μεσοθηλίωμα (αριθμός εμπύρηνων κυττάρων % του αριθμού των εμπύρηνων κυττάρων του ιστικού λύματος) και την συνοδό ΚΥΣ (αριθμός εμπύρηνων κυττάρων/μl ΚΥΣ) (Α), λόγος της έκφρασης IL12/IL10 από τα TAMs (δείκτης της πόλωσης των μακροφάγων) (Β) και % ποσοστό των Tregs στο σύνολο των CD4 (+) κυττάρων (C), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου vector. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα. TAMs: μακροφάγα σχετιζόμενα με τον όγκο, TANs: ουδετερόφιλα σχετιζόμενα με τον όγκο, CD8: CD8 (+) T-λεμφοκύτταρα, CD4: CD4 (+) T-λεμφοκύτταρα, Tregs: T-ρυθμιστικά CD4 (+) λεμφοκύτταρα, MFI: μέση ένταση φθορισμού.

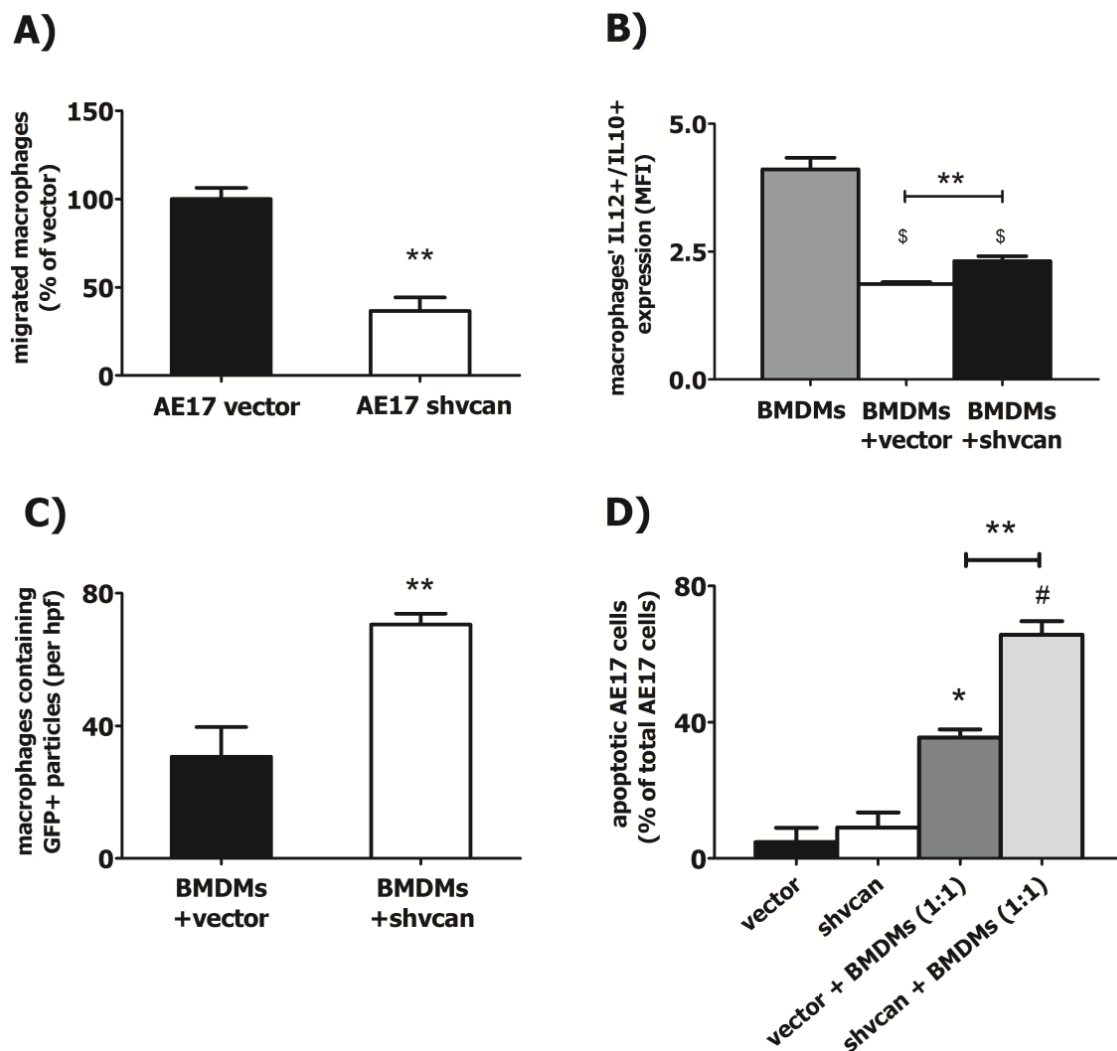
***Το versican ευοδώνει τη μετανάστευση των μακροφάγων, προάγει την απόκτηση του M2 φαινοτύπου και προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα από (την επαγόμενη από τα μακροφάγα) απόπτωση και φαγοκυττάρωση.***

Βασιζόμενοι στην παρατηρηθείσα μείωση των TAMs μακροφάγων στα ενδεή ως προς το versican πειραματικά ΚΜΥ, υποθέσαμε ότι η πρωτεογλυκάνη διευκολύνει τη μετανάστευση των μακροφάγων προς τον όγκο. Για το σκοπό αυτό τοποθετήσαμε AE17 shvcan ή vector κύτταρα μεσοθηλιώματος και BMDMs μακροφάγα στα δύο διαφορετικά διαμερίσματα ενός συστήματος transwell και παρατηρήσαμε ότι σημαντικά λιγότερα μακροφάγα μετανάστευσαν προς τα AE17 shvcan κύτταρα σε σχέση με τα κύτταρα vector (Εικ. 9Α). Στη συνέχεια, διερωτώμενοι αν το versican που παράγεται από τον όγκο επηρεάζει τη λειτουργία των μακροφάγων, ώστε να παρουσιάζουν ιδιότητες του M1 ή του M2 φαινοτύπου, αναλύσαμε με κυτταρομετρία ροής BMDMs, τα οποία είχαν συγκαλλιεργηθεί με AE17 κύτταρα. Από τα πειράματα αυτά προέκυψε ότι τα AE17 κύτταρα ελέγχου ωθούν τα μακροφάγα προς τον M2 φαινότυπο, ενώ η αποσιώπηση του versican απέτρεψε εν μέρει αυτό το φαινόμενο (Εικ. 9Β).

Προσπαθώντας να αποσαφηνίσουμε τις επιδράσεις του versican στην αναστολή της καρκινικής αύξησης, ένα φαινόμενο το οποίο παρατηρήθηκε μόνο σε *in vivo* συνθήκες και έχοντας δείξει ότι η αποσιώπηση του versican στα καρκινικά κύτταρα επαναφέρει τον κυτταροτοξικό φαινότυπο στα TAMs, υποθέσαμε ότι τα κύτταρα ΜΥ, που δεν εκφράζουν την πρωτεογλυκάνη, είναι ευάλωτα στις κυτταροτοξικές επιδράσεις των μακροφάγων. Για το σκοπό αυτό, Tomato BMDMs συγκαλλιεργήθηκαν με AE17 vector ή shvcan κύτταρα (τα οποία εξέφραζαν τη χρωστική GFP) και παρατηρήθηκαν με μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού. Διαπιστώσαμε ότι μακροφάγα που είχαν συγκαλλιεργηθεί με ενδεή ως προς το versican AE17 κύτταρα, περιείχαν στο κυτταρόπλασμά τους περισσότερα GFP (+) θραύσματα κυττάρων μεσοθηλιώματος, συγκριτικά με μακροφάγα που καλλιεργήθηκαν παρουσία AE17 κυττάρων ελέγχου. Με αυτόν τον τρόπο φάνηκε ότι τα μακροφάγα επιδεικνύουν αυξημένη ικανότητα φαγοκυττάρωσης απέναντι σε κακοήθη κύτταρα, τα οποία δεν εκφράζουν το versican (Εικ. 9C, Εικ. 10). Σε ένα παρόμοιο σύνολο πειραμάτων τα ενδεή ως προς το versican κακοήθη κύτταρα εμφάνισαν αυξημένη απόπτωση, συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου,

κατά τη συγκαλλιέργειά τους με συγγενή μακροφάγα (Εικ. 9D), αν και ο βασικός ρυθμός απόπτωσης δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των AE17 shncan και AE17 vector κυττάρων, όπως αποκαλύφθηκε με κυτταρομετρία ροής. Αντίθετα, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού και απόπτωσης των μακροφάγων ήταν παρόμοιος, ανεξάρτητα αν καλλιεργήθηκαν παρουσία κυττάρων μεσοθηλιώματος που εξέφραζαν ή όχι την πρωτεογλυκάνη.

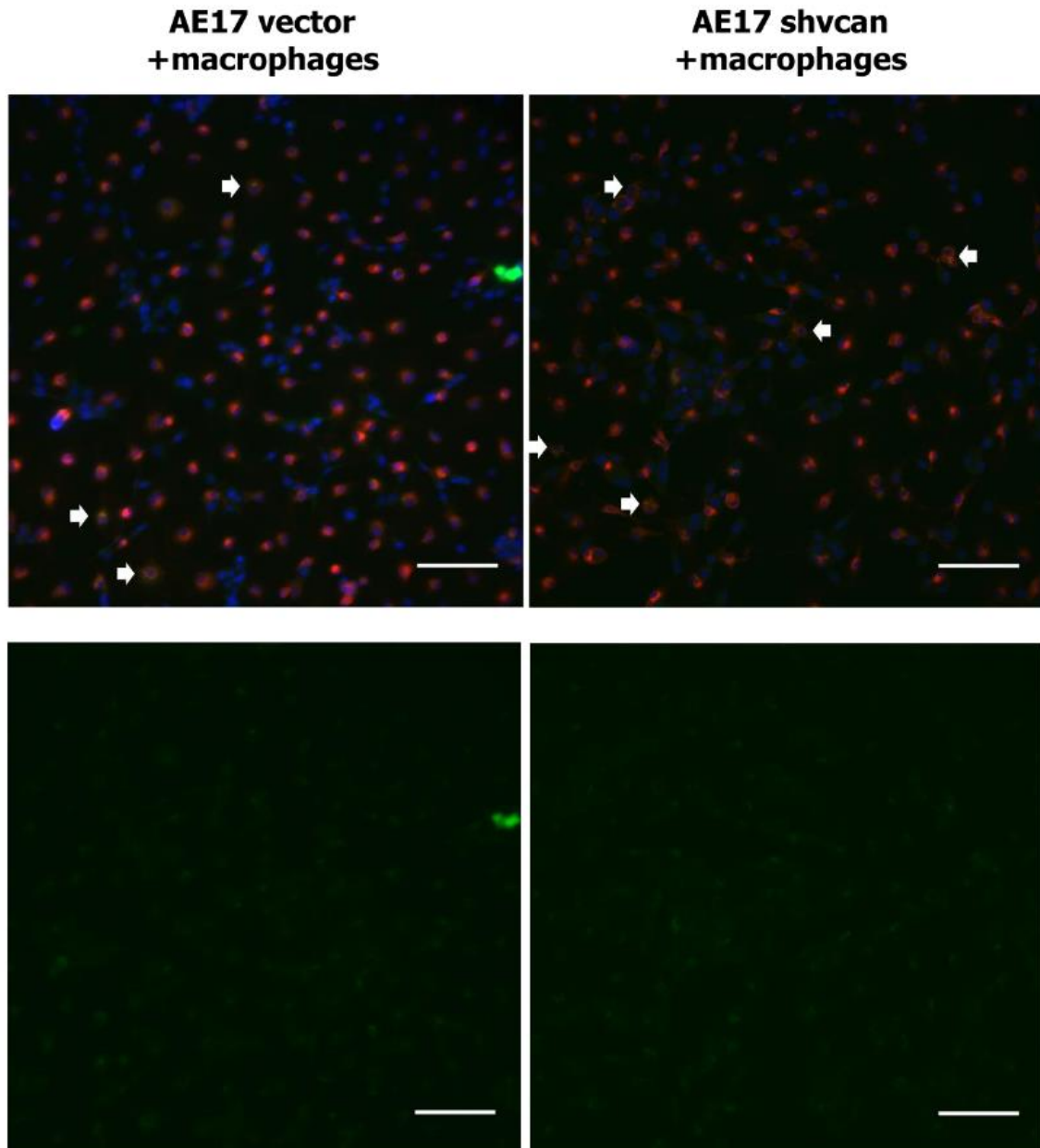
## Εικόνα 9



**Εικ. 9:** Η προερχόμενη από τον όγκο πρωτεΐνη versican τροποποιεί καθοριστικά τις επιδράσεις των μακροφάγων στα κύτταρα του μεσοθελιώματος *in vitro*.

Μακροφάγα, τα οποία συγκαλλιεργήθηκαν με –ενδεί ως προς το versican- AE17 κύτταρα μεσοθελιώματος μύος, εμφάνισαν μειωμένη μετανάστευση προς τα κακοήθη κύτταρα (A), αυξημένη πόλωση προς τον M1 φαινότυπο (B) και αυξημένη φαγοκυττάρωση των καρκινικών κυττάρων (C) συγκριτικά με μακροφάγα που συγκαλλιεργήθηκαν με AE17 κύτταρα ελέγχου. Τα –ενδεί ως προς το versican- AE17 κύτταρα εμφάνισαν υψηλότερο ρυθμό απόπτωσης συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου σε συγκαλλιέργεια με μακροφάγα (D). Αριθμός των BMDMs κ.ο.π. που μετανάστευσαν προς AE17-vector ή AE17-shvcan κύτταρα (% των μακροφάγων που μετανάστευσαν προς κύτταρα ελέγχου vector – μεγέθυνση 400X) (A), λόγος της IL-12/IL-10 έκφρασης από μακροφάγα τα οποία καλλιεργήθηκαν μόνα ή παρουσία AE17-vector ή AE17-shvcan κυττάρων (B), αριθμός των tomato μακροφάγων, που περιείχαν θραύσματα AE17 GFP (+) κυττάρων, τα οποία συγκαλλιεργήθηκαν με AE17-vector ή AE17-shvcan κύτταρα κ.ο.π. (μεγέθυνση 400X) (C) και ποσοστό των αποπτωτικών AE17-vector ή AE17-shvcan κυττάρων τα οποία καλλιεργήθηκαν μόνα ή παρουσία μακροφάγων (D), \* $p < 0.05$  συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου vector, # $p < 0.05$  συγκριτικά με την ομάδα shvcan, \$ $p < 0.05$  συγκριτικά με τα μακροφάγα, \*\* $p < 0.01$ . Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή  $\pm$  σταθερό σφάλμα. BMDMs: Bone Marrow Derived Macrophages (μακροφάγα προερχόμενα από τον μυελό των οστών C57Bl/6 μνών), MFI: Μέση ένταση φθορισμού. GFP: πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη.

## Εικόνα 10



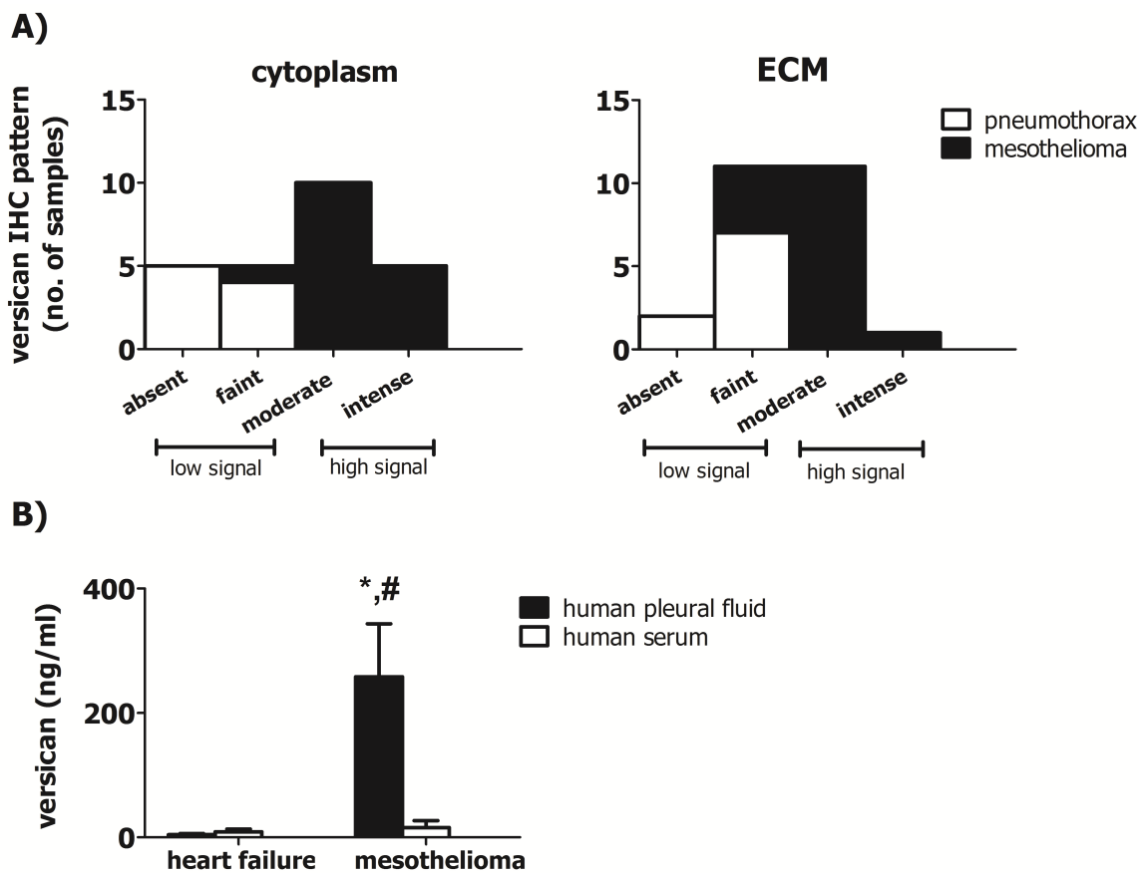
**Εικ. 10:** Τα -ενδεή ως προς το versican- AE17 κύτταρα (shvcan) είναι πιο ευαίσθητα στην φαγοκυττάρωση από μακροφάγα, σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου (vector) *in vitro*.

Εικόνες ανοσοφθορισμού από *in vitro* συγκαλλιέργεια tomato μακροφάγων και AE17-GFP (+) κυττάρων. Τα μακροφάγα με GFP (+) κυτταρόπλασμα (βέλη) έχουν εγκολπώσει και αποδομήσει τα κύτταρα μεσοθηλιώματος (άνω ήμισυ). Η λήψη σε μήκος κύματος της πράσινης φθορίζουσας χρωστικής αναδεικνύει την κατανομή της GFP (κάτω ήμισυ). Κλίμακα: 10  $\mu\text{m}$ . GFP: πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη.

*Το versican υπερεκφράζεται στο ανθρώπινο μεσοθηλίωμα και στη συνοδό ΚΥΣ και υψηλότερα επίπεδα mRNA της πρωτεογλυκάνης σχετίζονται με τον επιθηλιοειδή ιστολογικό υπότυπο.*

Σε μια προσπάθεια καθορισμού της κλινικής σημασίας του versican στο ΚΜΥ, διερευνήσαμε την έκφραση της πρωτεογλυκάνης σε ιστολογικά δείγματα ασθενών με μεσοθηλίωμα (mesothelioma group), ή καλοήγη νόσο του υπεζωκότα [ασθενείς που υπεβλήθησαν σε χειρουργική εκτομή εμφυσηματικών κύστεων για θεραπεία πρωτοπαθούς πνευμοθώρακα (pneumothorax group)]. Όπως καθορίστηκε με ανοσοϊστοχημεία, υψηλότερη έκφραση του versican παρατηρήθηκε στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων, όσο και στον εξωκυττάριο χώρο του ΚΜΥ, συγκριτικά με τον καλοήγη υπεζωκοτικό ιστό (Εικ. 11Α, Εικ. 12). Παρόμοια, τα επίπεδα του versican στην κακοήγη υπεζωκοτική συλλογή ασθενών με μεσοθηλίωμα ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με τον ομόλογο ορό, αλλά και συγκριτικά με το πλευριτικό υγρό και το πλάσμα ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια (Εικ. 11Β). Διερευνώντας περαιτέρω την κλινική σημασία της πρωτεογλυκάνης στο ΚΜΥ, πραγματοποιήσαμε πολυπαραγοντική ανάλυση δεδομένων που ανασύρθηκαν από τη βάση δεδομένων «The Cancer Genome Atlas» (TCGA) και αφορούσαν 87 ασθενείς με ΚΜΥ. Διαπιστώσαμε ότι η έκφραση του versican δεν αποτελούσε ανεξάρτητο προβλεπτικό παράγοντα της συνολικής επιβίωσης (Πίνακας 1Α). Από τους τέσσερις συγχυτικούς παράγοντες που εξετάστηκαν (ηλικία, φύλο, είδος χημειοθεραπείας και ιστολογικός τύπος), ο επιθηλιοειδής τύπος συσχετίστηκε οριακά με καλύτερη συνολική επιβίωση (Πίνακας 1C), μια παρατήρηση που είναι σύμφωνη με προηγούμενες αναφορές στη βιβλιογραφία [161]. Ωστόσο, αυτή η ροπή δεν επιβεβαιώθηκε κατά τη διενέργεια της πολυπαραγοντικής ανάλυσης των δεδομένων. Επιπρόσθετα αποκαλύφθηκε μια ισχυρή συσχέτιση των χαμηλών επιπέδων mRNA του versican με τον επιθηλιοειδή ιστολογικό τύπο (Πίνακας 1B,D, Εικ. 13).

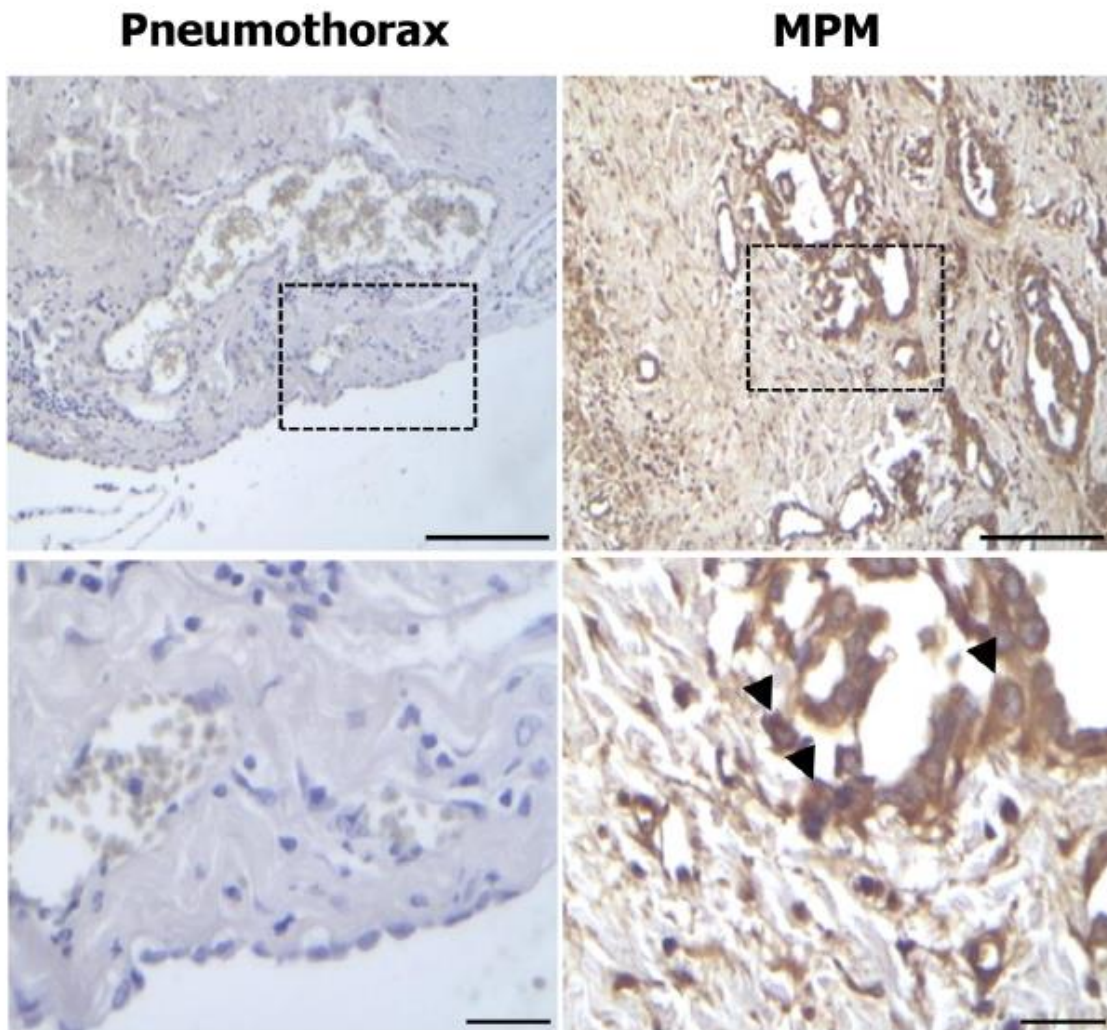
## Εικόνα 11



**Εικ. 11:** Υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης versican ανιχνεύονται στον ιστό του ανθρώπινου κακοήθους μεσοθηλώματος και στη συνοδό ΚΥΣ.

Ποιοτική ανάλυση της έκφρασης του versican σε τομές παραφίνης από ασθενείς με πνευμοθώρακα ( $n = 9$ ) ή μεσοθηλίωμα (MPM) ( $n = 16$ ),  $p < 0.001$  και  $p < 0.01$  συγκριτικά με την ομάδα ασθενών με πνευμοθώρακα [κυτταροπλασματική (cytoplasm) χρώση και χρώση του εξωκυττάριου χώρου (ECM), αντίστοιχα] (A) και επίπεδα του versican σε υπεζωκοτική συλλογή (pleural fluid) και ομόλογο ορό (serum) από ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια (hf,  $n = 10$ ) ή κακόηθες μεσοθηλίωμα ( $n = 10$ ) (B),  $*p < 0.05$  συγκριτικά με την καρδιακή ανεπάρκεια,  $\# p < 0.05$  συγκριτικά με τον ορό. IHC: ανοσοϊστοχημεία (immunohistochemistry). (A): Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάγραμμα κατανομής συχνότητων. (B): Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή  $\pm$  σταθερό σφάλμα.

## Εικόνα 12



**Εικ. 12:** Η πρωτεΐνη versican υπερεκφράζεται στο κυτταρόπλασμα και τον εξωκυττάριο χώρο (ECM) του ανθρώπινου κακοήθους μεσοθηλιώματος (MPM).

Τομές παραφίνης από ασθενείς με πνευμοθώρακα ή μεσοθηλίωμα. Οι αιχμές των βελών αναδεικνύουν την θετική ανοσοϊστοχημική χρώση του versican στα κακοήθη κύτταρα. Κλίμακα: 200μm (άνω ήμισυ), 50μm (κάτω ήμισυ).



## Πίνακας 1

A)

Independent variable	Dependent variable: survival	
Age	$t = -1.348$	$p = 0.1816$
Gender	$t = 0.564$	$p = 0.5746$
Chemotherapy	$t = 1.886$	$p = 0.1631$
Histological type	$t = 0.515$	$p = 0.6078$
Versican mRNA	$t = -1.412$	$p = 0.1619$

B)

Independent variable	Dependent variable: Versican mRNA	
Age	$t = 0.6$	$p = 0.5502$
Gender	$t = 0.654$	$p = 0.5148$
Chemotherapy	$t = 1.25$	$p = 0.2148$
Histological type	$t = -2.722$	$p = 0.0079$

C)

Dependent Variable: **survival**  
 Method: Least Squares  
 Date: Time:  
 Sample: 1 87  
 Included observations: 87

Variable	Coefficient	Std. Error	t-Statistic	Prob.
<b>epithelioid type</b>	215.3667	113.1159	1.903946	0.0603
C	432.6333	91.55912	4.725180	0.0000

R-squared	0.040903	Mean dependent var	573.7356
Adjusted R-squared	0.029619	S.D. dependent var	509.0860
S.E. of regression	501.4900	Akaike info criterion	15.29576
Sum squared resid	21376837	Schwarz criterion	15.35245
Log likelihood	-663.3658	Hannan-Quinn criter.	15.31859
F-statistic	3.625011	Durbin-Watson stat	1.75768
Prob(F-statistic)	0.060301		

D)

Dependent Variable: **epithelioid type**  
 Method: Least Squares  
 Date: Time:  
 Sample: 1 87  
 Included observations: 87

Variable	Coefficient	Std. Error	t-Statistic	Prob.
<b>versican</b>	-1.29E-05	4.24E-06	-3.043790	0.0031
C	0.773493	0.062512	12.37348	0.0000

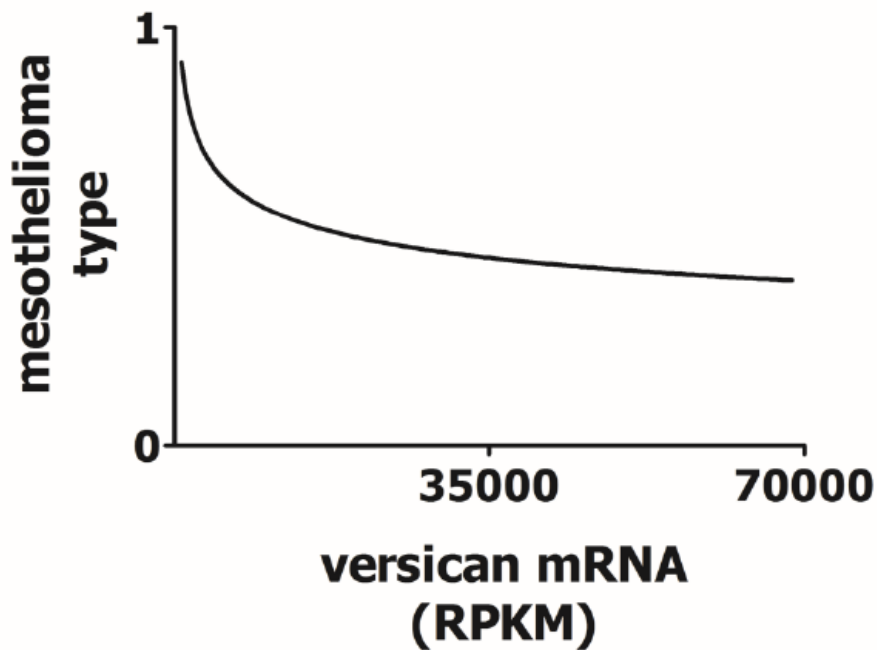
  

R-squared	0.098283	Mean dependent var	0.655172
Adjusted R-squared	0.087675	S.D. dependent var	0.478067
S.E. of regression	0.456630	Akaike info criterion	1.292831
Sum squared resid	17.72339	Schwarz criterion	1.349519
Log likelihood	-54.23817	Hannan-Quinn criter.	1.315658
F-statistic	9.264660	Durbin-Watson stat	1.979722
Prob(F-statistic)	0.003109		

**Πιν. 1:** Χαμηλότερα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης versican συσχετίζονται με επιθηλιοειδές μεσοθηλίωμα, έναν ιστολογικό τύπο με καλύτερη πρόγνωση.

Πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων που αφορούσαν 87 ασθενείς με μεσοθηλίωμα και ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων “The Cancer Genome Atlas” (TCGA) (A,B). Η ηλικία, το φύλο, η χημειοθεραπεία και ο ιστολογικός τύπος εξετάστηκαν ως συγχυτικοί παράγοντες. Ασθενείς οι οποίοι έπασχαν από επιθηλιοειδές μεσοθηλίωμα παρουσίασαν μεγαλύτερη επιβίωση συγκριτικά με ασθενείς που εμφάνισαν τον μη επιθηλιοειδή τύπο της νόσου (μέση διαφορά=215 ημέρες,  $p=0.06$ ) (C). Τα χαμηλότερα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης versican συσχετίζονται ισχυρά με το επιθηλιοειδές μεσοθηλίωμα ( $p=0.003$ ) (D).

**Εικόνα 13**



**Εικ. 13:** Χαμηλότερα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης versican συσχετίζονται με επιθηλιοειδές μεσοθηλίωμα, έναν ιστολογικό τύπο με καλύτερη πρόγνωση.

Μη γραμμική παλινδρόμηση ( $\log_x - \log_y$ ) του versican mRNA (RPKM) και του επιθηλιοειδούς μεσοθηλώματος ( $r_s = -0.313$ ,  $r^2 = 0.0982$ ,  $p < 0.01$ ). Τα δεδομένα, που αφορούσαν 87 ασθενείς με μεσοθηλίωμα, ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων “The Cancer Genome Atlas” (TCGA). 0: μη-επιθηλιοειδές μεσοθηλίωμα, 1: επιθηλιοειδές μεσοθηλίωμα,  $r_s$ : μη παραμετρικός συντελεστής Spearman, RPKM: Αναγνώσεις ανά 1000 βάσεις μεταγραφώματος/εκατομμύριο (Reads Per Kilobase of transcript per Million).

## Συζήτηση/Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε την επίδραση της πρωτεογλυκάνης versican στην πρόοδο του μεσοθηλιώματος υπεζωκότα. Χρησιμοποιώντας συγγενή μοντέλα μυών και τεχνικές γονιδιακής αποσιώπησης, που περιελάμβαναν χρήση μικρών αλληλουχιών RNA τύπου «φουρκέτα» (shRNAs), διαπιστώσαμε ότι η αναστολή της έκφρασης του versican στα καρκινικά κύτταρα: α) δεν είχε καμιά επίδραση στην κυτταρική αύξηση των κυττάρων μεσοθηλιώματος *in vitro*, αλλά επηρέασε σημαντικά το ρυθμό πολλαπλασιασμού και τη ζωτικότητα των καρκινικών κυττάρων *in vivo*, β) ανέστειλε τη συσσώρευση (στο μικροπεριβάλλον του όγκου) ανοσολογικών πληθυσμών που ευοδώνουν την ανάπτυξη του μεσοθηλιώματος και ταυτόχρονα ενίσχυσε τις κυτταροτοξικές δράσεις των μακροφάγων σε πειράματα συγκαλλιέργειας με κακοήθη κύτταρα και γ) περιόρισε την αγγειακή διαπερατότητα του προσβεβλημένου από μεσοθηλίωμα υπεζωκότα, τη διαπερατότητα της ενδοθηλιακής μονοστοιβάδας κατά τη συγκαλλιέργεια με κύτταρα μεσοθηλιώματος καθώς και το μέγεθος της κακοήθους υπεζωκοτικής συλλογής, που δημιουργείται κατά την ανάπτυξη του μεσοθηλιώματος. Επιπρόσθετα, παρατηρήσαμε ότι το versican υπερεκφράζεται στον ιστό του ανθρώπινου ΚΜΥ και αυξημένα επίπεδά του ανευρίσκονται στο πλευριτικό υγρό ασθενών με μεσοθηλίωμα.

Στην παρούσα μελέτη παραθέτουμε για πρώτη φορά στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η πρωτεογλυκάνη versican ενισχύει σημαντικά την ανάπτυξη του μεσοθηλιώματος. Τα ευρήματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, οι οποίες περιγράφουν ότι το versican προάγει την καρκινική αύξηση σε πειραματικά μοντέλα αδενοκαρκινώματος μαστού [119], γλιώματος [120], κακοήθους μελανώματος [121] και αδενοκαρκινώματος πνεύμονα [98]. Αυτό επιτυγχάνεται με διττό τρόπο: είτε μέσω επίδρασης στις ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων, είτε μέσω τροποποίησης του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Η αποσιώπηση του versican δεν μετέβαλλε το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων μεσοθηλιώματος *in vitro*, αλλά η ικανότητά του να ενισχύει την ανάπτυξη του όγκου σε *in vivo* συνθήκες υποδηλώνει ότι η πρωτεογλυκάνη αυτή εμπλέκεται στη σύνθετη αλληλεπίδραση του κακοήθους ιστού με τον ξενιστή και

απομακρύνει την πιθανότητα ρύθμισης της αύξησης των καρκινικών κυττάρων με απευθείας επίδραση σε αυτά.

Από τη στιγμή που αποκλείσαμε μια ενδεχόμενη αυτοκρινή ή παρακρινή δράση του (προερχόμενου από τα καρκινικά κύτταρα) versican, ώστε να ευνοείται η ανάπτυξη του μεσοθηλιώματος, εστίασαμε στη συμμετοχή της πρωτεογλυκάνης στη διάδραση μεταξύ όγκου και ξενιστή. Το φαινόμενο αυτό περιλαμβάνει την αγγειογένεση και την απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι των καρκινικών κυττάρων, διεργασίες σημαντικές για την ανάπτυξη του καρκίνου [116]. Η αποσιώπηση του versican στα κύτταρα του μεσοθηλιώματος δεν επηρέασε την αγγειογένεση εντός του όγκου. Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με πρόσφατα δημοσιευμένες παρατηρήσεις [131] ότι το versican που εκκρίνεται από τα κύτταρα του ξενιστή και όχι από τα κακοήθη ρυθμίζει την σχετιζόμενη με τον όγκο αγγειογενετική δραστηριότητα. Όσον αφορά την επιρροή του versican στο μικροπεριβάλλον του μεσοθηλιώματος, δείξαμε ότι οι ενδεείς ως προς το versican όγκοι και κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές περιείχαν μικρότερο αριθμό μακροφάγων, ουδετερόφιλων και T-λεμφοκυττάρων. Με δεδομένο τον κεντρικό ρόλο που κατέχουν τα μακροφάγα στην πρόοδο των κακοηθειών [162], στη συνέχεια εστίασαμε στην παρατηρηθείσα μείωση των TAMs στο μικροπεριβάλλον του μεσοθηλιώματος και αναρωτηθήκαμε αν επρόκειτο περί μειωμένης ζωτικότητας των μακροφάγων ή μειωμένης επιστράτευσης από την περιφέρεια. Μελέτες *in vitro* αποκάλυψαν ότι, ενώ η ζωτικότητα των μακροφάγων δεν εξαρτάται από την έκφραση του versican από τα καρκινικά κύτταρα, η προερχόμενη από τα κύτταρα πρωτεογλυκάνη προήγαγε τη μετανάστευση των μακροφάγων προς τον καρκινικό ιστό. Η παρατήρηση αυτή είναι σύμφωνη με προηγούμενες παρατηρήσεις σε προ-νεοπλασματικές και φλεγμονώδεις αλλοιώσεις, οι οποίες ανέδειξαν τις ισχυρές χημειοτακτικές ιδιότητες του versican [121,163,164].

Επιπρόσθετα, η αποσιώπηση του versican στον κακοήθη ιστό του μεσοθηλιώματος ώθησε τα μακροφάγα προς τον κυτταροτοξικό M1 φαινότυπο και ενίσχυσε τις ογκοκατασταλτικές ιδιότητές τους. Ενδεικτική της κυτταροτοξικής ικανότητας των μακροφάγων ήταν η αυξημένη απόπτωση και φαγοκυττάρωση των ενδεών ως προς το versican καρκινικών κυττάρων, που παρατηρήθηκαν σε *in vitro* συστήματα

συγκαλλιέργειας μακροφάγων και κυττάρων μεσοθηλιώματος. Τα ευρήματα αυτά διευρύνουν ακόμα περισσότερο προηγούμενες παρατηρήσεις, οι οποίες αφορούσαν την επίδραση της εκκρινόμενης από τον όγκο πρωτεογλυκάνης στο φαινότυπο των TAMs [98], αποκαλύπτοντας τη σύνθετη δράση του versican στη, διαμεσολαβούμενη από τα TAMs, εξουδετέρωση των καρκινικών κυττάρων. Συνολικά θεωρούμε ότι η αναστολή της καρκινικής αύξησης, που παρατηρήθηκε στα ενδεί ως προς το versican KMY, ήταν πιθανώς αποτέλεσμα αυξημένης φαγοκυττάρωσης και αποπτωτικών ερεθισμάτων από M1 μακροφάγα εναντίον των καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο θα πρέπει να σημειωθεί ότι η κεκαθαυμένη μορφή της πρωτεογλυκάνης, η versikine, ασκεί τις ογκοκατασταλτικές της δράσεις, κυρίως με την ενεργοποίηση των CD8+ κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων [85]. Εφόσον η παραγωγή της versikine από τα κύτταρα KMY μειώνεται ύστερα από τον μετασχηματισμό τους με πλασμίδια που περιέχουν shRNAs, ακολουθώντας τη μείωση του πρωτεϊνικού πυρήνα του versican, δεν κατέστη δυνατό να αποσαφηνίσουμε αν η versikine ασκεί αυξητικές ή κυτταροτοξικές δράσεις στο πειραματικό μοντέλο KMY που περιγράφεται στην παρούσα μελέτη.

Οι κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές εμφανίζονται στην πλειοψηφία των ασθενών με μεσοθηλιώμα υπεζωκότα και αποτελούν μείζονα αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας [3]. Το προερχόμενο από τον όγκο versican αποδείχτηκε ότι προάγει τη διαφυγή υγρού και πρωτεϊνών από τα τοιχώματα των αγγείων του υπεζωκότα με αποτέλεσμα τη δημιουργία και συσσώρευση πλευριτικού υγρού σε μύες που έπασχαν από KMY. Επιπλέον, τα κύτταρα μεσοθηλιώματος που εκφράζουν την πρωτεογλυκάνη ενίσχυσαν πιο αποτελεσματικά την αγγειακή διαπερατότητα της ενδοθηλιακής μονοστοιβάδας σε σύγκριση με τα κύτταρα μεσοθηλιώματος που στερούνταν το versican, όπως φάνηκε σε *in vitro* μελέτες συγκαλλιέργειας. Από όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη αναφορά που δηλώνει ότι το προερχόμενο από τον όγκο versican διαθέτει άμεσες ιδιότητες πρόκλησης αυξημένης αγγειακής διαπερατότητας. Ωστόσο, το αποτέλεσμα της αποσιώπησης του versican σε *in vivo* συνθήκες ήταν πιο εμφανές σε σύγκριση με τις *in vitro* μελέτες, υπονοώντας ότι, τουλάχιστον στο AE17-C57Bl/6 μοντέλο, και άλλοι διαμεσολαβητές, οι οποίοι σχετίζονται λειτουργικά με το versican, συνεισφέρουν ευρέως στην αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα του ενδοθηλίου και τη δημιουργία της κακοήθους υπεζωκοτικής συλλογής *in vivo*. Πηγή των παραγόντων αυτών είναι πιθανώς διαφορετικοί

υποπληθυσμοί του ανοσοποιητικού συστήματος [159,165], οι οποίοι στρατεύονται στην υπεζωκοτική κοιλότητα ύστερα από τη χημειοτακτική επίδραση του versican.

Από κλινική άποψη, η *in vivo* παρατηρούμενη επίδραση της αποσιώπησης του versican στην πρόοδο του μεσοθηλιώματος σε συνδυασμό με το εύρημα ότι το versican υπερεκφράζεται στο ανθρώπινο μεσοθηλίωμα, υποδεικνύουν ότι η πρωτεογλυκάνη αυτή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά στην αντιμετώπιση του ΚΜΥ. Ειδικότερα, ένας αναστολέας του versican θα μπορούσε να στοχεύσει όχι μόνο την προερχόμενη από τα καρκινικά κύτταρα πρωτεογλυκάνη (και με αυτόν τον τρόπο να τροποποιήσει την διαμορφούμενη από τον όγκο ανοσολογική απάντηση και αγγειακή διαπερατότητα), αλλά και το versican που παράγεται από τα κύτταρα του ξενιστή, με πιθανότερο επιπρόσθετο αποτέλεσμα την αναστολή της αγγειογένεσης εντός του όγκου [131]. Με τον τρόπο αυτό θα μπορούσε να επιτευχθεί μια ακόμα μεγαλύτερη αναστολή της καρκινικής αύξησης, συγκριτικά με αυτή που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη. Η παρατήρηση ότι η αποσιώπηση του versican στα κύτταρα του όγκου ενισχύει την κυτταροτοξική δράση των μακροφάγων, αναστέλλοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την πρόοδο του κακοήθους μεσοθηλιώματος, τοποθετεί μια πιθανή στοχευμένη θεραπεία έναντι του versican μεταξύ μιας ανερχόμενης τάξης αντινεοπλασματικών ανοσοθεραπειών, οι οποίες επιδρούν στην εγγενή ανοσία (innate immunity). Πιο συγκεκριμένα, η ανάδειξη του versican ως μια πρωτεογλυκάνη που επάγει ένα ανοσοκατασταλτικό μικροπεριβάλλον του όγκου, μια ιδιότητα σημαντική για την πρόοδο του ΚΜΥ [16], υποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο μόριο πιθανώς συνεισφέρει στην άμβλυνση του θεραπευτικού αποτελέσματος νέων ανοσοθεραπευτικών σκευασμάτων, τα οποία στοχεύουν στη διέγερση της προσαρμοστικής ανοσίας (adaptive immunity) εναντίον των καρκινικών κυττάρων και βρίσκονται αυτή τη στιγμή υπό κλινική δοκιμή σε ασθενείς με τη συγκεκριμένη κακοήθεια [166]. Για το σκοπό αυτό η φαρμακευτική στόχευση εναντίον του versican, η οποία θα αντιστρέφει τις ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες της εγγενούς ανοσίας, θα μπορούσε να δρα συνεργικά με παράγοντες που ενεργοποιούν τα λεμφοκύτταρα (π.χ. anti-PD-1/PDL-1), ώστε να διαμορφώσουν ένα πιο επιτυχημένο θεραπευτικό αποτέλεσμα σε ασθενείς με κακοήθες μεσοθηλίωμα. Σε κάθε περίπτωση απαιτούνται περισσότερες μελέτες, σε κλινικό και προ-κλινικό επίπεδο, ώστε να αποδειχθεί η παραπάνω υπόθεση.

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι το versican υπερεκφράζεται στο ανθρώπινο μεσοθελίωμα και τη συνοδό κακοήθη υπεζωκοτική συλλογή. Ειδικότερα, η αναστολή της έκφρασης της πρωτεογλυκάνης από τα καρκινικά κύτταρα οδηγεί στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του πειραματικού ΚΜΥ, ρυθμίζοντας κυρίως τη μετανάστευση και τη λειτουργία των μακροφάγων (TAMs) εντός του όγκου. Επιπρόσθετα το προερχόμενο από τον όγκο versican ενισχύει την διαπερατότητα των αγγείων του υπεζωκότα και προάγει τη συσσώρευση της κακοήθους υπεζωκοτικής συλλογής. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν ότι η πρωτεογλυκάνη versican μπορεί να στοχευθεί θεραπευτικά, ώστε να αποτελέσει κομμάτι νέων, αποτελεσματικότερων θεραπευτικών σχημάτων έναντι του μεσοθελιώματος.

## **Βιβλιογραφία**

- 1) Stermán DH, Albelda SM. Advances in the diagnosis, evaluation, and management of malignant pleural mesothelioma. *Respirology*. 2005;10:266–283.
- 2) Selikoff, IJ, Hammond EC, Seidman H. Latency of asbestos disease among insulation workers in the United States and Canada. *Cancer*. 46: 2736-2740
- 3) Robinson BW, Musk AW, Lake RA. Malignant mesothelioma. *Lancet*. 2005;366:397-408.
- 4) Hodgson JT, McElvenny DM, Darnton AJ, Price MJ, Peto J. The expected burden of mesothelioma mortality in Great Britain from 2002 to 2050. *Br J Cancer*. 2005;92:587–593.
- 5) Kameda T, Takahashi K, Kim R, Jiang Y, Movahed M, Park EK, Rantanen J. Asbestos: use, bans and disease burden in Europe. *Bull World Health Organ*. 2014;92:790-797.
- 6) Leigh J, Robinson BWS. The history of mesothelioma in Australia 1945–2001. In: Robinson BWS, Chahinian AP, eds. *Mesothelioma*. London: Martin Dunitz, 2002: 55–110.
- 7) de Klerk NH, Olsen N, Threlfall T, Shilkin K, Lee E, Musk AW. Mesothelioma survival in Western Australia. Perth: 1st Perth Mesothelioma Centre Symposium, 2004.
- 8) Moon EK, Litzky LA, Stermán DH. In: Grippi MA, Elias JA, Fishman JA, Kotloff RM, Pack AI, Senior RM, editors. *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders 5<sup>th</sup> Edition*. NY, USA: McGraw-Hill Education; 2015. pp. 1216-1235.
- 9) Schurkes C, Brock W, Abel J, Unfried K. Induction of 8-hydroxydeoxyguanosine by manmade vitreous fibres and crocidolite asbestos administered intraperitoneally in rats. *Mutat Res*. 2004;553:59-65.
- 10) Jean D, Daubriac J, Le Primpec-Barthes F, Galateau-Salle F, Jaurand MC. Molecular changes in mesothelioma with an impact on prognosis and treatment. *Arch Pathol Lab Med*. 2012;136:277-293.
- 11) Rascoe PA, Jupiter D, Cao X, Littlejohn JE, Smythe WR. Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma. *Expert Rev Mol Med*. 2012;14:e12.
- 12) Qi F, Okimoto G, Jube S, Napolitano A, Pass HI, Laczko R, Demay RM, Khan G, Tiirikainen M, Rinaudo C, Croce A, Yang H, Gaudino G, Carbone M. Continuous exposure to chrysotile asbestos can cause transformation of human mesothelial cells via HMGB1 and TNF- $\alpha$  signaling. *Am J Pathol*. 2013;183:1654-1666.



- 13) Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med.* 2000;343:78-85.
- 14) Huncharek M, Kelsey K, Muscat J, Christiani D. Parental cancer and genetic predisposition in malignant pleural mesothelioma: a case-control study. *Cancer Lett.* 1996;102:205–08.
- 15) Pylkkänen L, Sainio M, Ollikainen T, Mattson K, Nordling S, Carpén O, Linnainmaa K, Husgafvel-Pursiainen K. Concurrent LOH at multiple loci in human malignant mesothelioma with preferential loss of NF2 gene region. *Oncol Rep.* 2002;9:955-959.
- 16) Yap TA, Aerts JG, Popat S, Fennell DA. Novel insights into mesothelioma biology and implications for therapy. *Nat Rev Cancer.* 2017;17:475-488.
- 17) Wong L, Zhou J, Anderson D, Kratzke RA. Inactivation of p16<sup>INK4a</sup> expression in malignant mesothelioma by methylation. *Lung Cancer.* 2002;38:131-136.
- 18) Cheng JQ, Jhanwar SC, Klein WM, Bell DW, Lee WC, Altomare DA, Nobori T, Olopade OI, Buckler AJ, Testa JR. p16 alterations and deletion mapping of 9p21-p22 in malignant mesothelioma. *Cancer Res.* 1994;54:5547-5551.
- 19) Kadariya Y, Cheung M, Xu J, Pei J, Sementino E, Menges CW, Cai KQ, Rauscher FJ, Klein-Szanto AJ, Testa JR. Bap1 Is a Bona Fide Tumor Suppressor: Genetic Evidence from Mouse Models Carrying Heterozygous Germline Bap1 Mutations. *Cancer Res.* 2016;76:2836-2844.
- 20) Testa JR, Cheung M, Pei J, Below JE, Tan Y, Sementino E, Cox NJ, Dogan AU, Pass HI, Trusa S, Hesdorffer M, Nasu M, Powers A, Rivera Z, Comertpay S, Tanji M, Gaudino G, Yang H, Carbone M. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet.* 2011;43(10):1022-1025.
- 21) Bott M, Brevet M, Taylor BS, Shimizu S, Ito T, Wang L, Creaney J, Lake RA, Zakowski MF, Reva B, Sander C, Delsite R, Powell S, Zhou Q, Shen R, Olshen A, Rusch V, Ladanyi M. The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21.1 losses in malignant pleural mesothelioma. *Nat Genet.* 2011;43:668-672.
- 22) Guo G, Chmielecki J, Goparaju C, Heguy A, Dolgalev I, Carbone M, Seepo S, Meyerson M, Pass HI. Whole-exome sequencing reveals frequent genetic alterations in BAP1, NF2, CDKN2A, and CUL1 in malignant pleural mesothelioma. *Cancer Res.* 2015;75:264-269.
- 23) Singhi AD, Krasinskas AM, Choudry HA, Bartlett DL, Pingpank JF, Zeh HJ, Luvison A, Fuhrer K, Bahary N, Seethala RR, Dacic S. The prognostic significance of

BAP1, NF2, and CDKN2A in malignant peritoneal mesothelioma. *Mod Pathol.* 2016;29:14-24.

24) Li W, You L, Cooper J, Schiavon G, Pepe-Caprio A, Zhou L, Ishii R, Giovannini M, Hanemann CO, Long SB, Erdjument-Bromage H, Zhou P, Tempst P, Giacotti FG. Merlin/NF2 suppresses tumorigenesis by inhibiting the E3 ubiquitin ligase CRL4 (DCAF1) in the nucleus. *Cell.* 2010;140:477-490.

25) Mizuno T, Murakami H, Fujii M, Ishiguro F, Tanaka I, Kondo Y, Akatsuka S, Toyokuni S, Yokoi K, Osada H, Sekido Y. *Oncogene.* 2012;31:5117-5122.

26) Zhou S, Liu L, Li H, Eilers G, Kuang Y, Shi S, Yan Z, Li X, Corson JM, Meng F, Zhou H, Sheng Q, Fletcher JA, Ou WB. Multipoint targeting of the PI3K/mTOR pathway in mesothelioma. *Br J Cancer.* 2014;110:2479-2488.

27) Vazakidou ME, Magkouta S, Moschos C, Psallidas I, Pappas A, Psarra K, Kalomenidis I. Temsirolimus targets multiple hallmarks of cancer to impede mesothelioma growth in vivo. *Respirology.* 2015;20:1263-1271.

28) Scherpereel A, Wallyn F, Albelda SM, Munck C. Novel therapies for malignant pleural mesothelioma. *Lancet Oncol.* 2018;19:e161-e172.

29) Lievens LA, Bezemer K, Cornelissen R, Kaijen-Lambers ME, Hegmans JP, Aerts JG. Precision immunotherapy; dynamics in the cellular profile of pleural effusions in malignant mesothelioma patients. *Lung Cancer.* 2017;107:36-40.

30) Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science.* 2008;320:674-677.

31) Sekido Y. Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma. *Carcinogenesis.* 2013;34:1413-1419.

32) Hirvonen A, Saarikoski ST, Linnainmaa K, Koskinen K, Husgafvel-Pursiainen K, Mattson K, Vainio H. Glutathione S-transferase and N-acetyltransferase genotypes and asbestos-associated pulmonary disorders. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:1853-1856.

33) Emri SA. The Cappadocia mesothelioma epidemic: its influence in Turkey and abroad. *Ann Transl Med.* 2017;5:239.

34) Farioli A, Ottone M, Morganti AG, Compagnone G, Romani F, Cammelli S, Mattioli S, Violante FS. Radiation-induced mesothelioma among long-term solid cancer survivors: a longitudinal analysis of SEER database. *Cancer Med.* 2016;5:950-959.

35) Galateau-Salle F, Churg A, Roggli V, Travis WD; World Health Organization Committee for Tumors of the Pleura. The 2015 World Health Organization Classification

of Tumors of the Pleura: Advances since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol.* 2016;11:142-154.

36) Meyerhoff RR, Yang CJ, Speicher PJ, Gulack BC, Hartwig MG, D'Amico TA, Harpole DH, Berry MF. Impact of mesothelioma histologic subtype on outcomes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *J Surg Res.* 2015;196:23-32.

37) Rusch VW, Giroux D, Kennedy C, Ruffini E, Cangir AK, Rice D, Pass H, Asamura H, Waller D, Edwards J, Weder W, Hoffmann H, van Meerbeeck JP, IASLC Staging Committee. Initial analysis of the international association for the study of lung cancer mesothelioma database. *J Thorac Oncol.* 2012;7:1631-1639.

38) Scott B, Mukherjee S, Lake R, Robinson BWS. Malignant mesothelioma. In: Hanson H, ed. *Textbook of lung cancer.* London: Martin Dunitz, 2000: 273–93.

39) Kawashima A, Libshitz HI. Malignant pleural mesothelioma: CT manifestations in 50 cases. *AJR Am J Roentgenol.* 1990;155:965-969.

40) Sahin AA, Cöplü L, Selçuk ZT, Eryilmaz M, Emri S, Akhan O, Bariş YI. Malignant pleural mesothelioma caused by environmental exposure to asbestos or erionite in rural Turkey: CT findings in 84 patients. *AJR Am J Roentgenol.* 1993;161:533-537.

41) Gamsu G, Aberle DR, Lynch D. Computed tomography in the diagnosis of asbestos-related thoracic disease. *J Thorac Imaging.* 1989;4:61-67.

42) Taylor DR, Page W, Hughes D, Varghese G. Metastatic renal cell carcinoma mimicking pleural mesothelioma. *Thorax.* 1987;42:901-902.

43) Woolhouse I, Bishop L, Darlison L, De Fonseka D, Edey A, Edwards J, Faivre-Finn C, Fennell DA, Holmes S, Kerr KM, Nakas A, Peel T, Rahman NM, Slade M, Steele J, Tsim S, Maskell NA. British Thoracic Society Guideline for the investigation and management of malignant pleural mesothelioma. *Thorax.* 2018;73:i1-i30.

44) Creaney J, Francis RJ, Dick IM, Musk AW, Robinson BWS, Byrne MJ, Nowak AK. Serum soluble mesothelin concentrations in malignant pleural mesothelioma: relationship to tumor volume, clinical stage and changes in tumor burden. *Clin Cancer Res.* 2011;17:1181-1189.

45) Hollevoet K, Nackaerts K, Gosselin R, De Wever W, Bosquée L, De Vuyst P, Germonpré P, Kellen E, Legrand C, Kishi Y, Delanghe JR, van Meerbeeck JP. Soluble mesothelin, megakaryocyte potentiating factor, and osteopontin as markers of patient response and outcome in mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2011;6:1930-1937.

46) Lin H, Shen YC, Long HY, Wang H, Luo ZY, Wei ZX, Hu SQ, Wen FQ. Performance of osteopontin in the diagnosis of malignant pleural mesothelioma: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7:1289-1296.

- 47) Pass HI, Levin SM, Harbut MR, Melamed J, Chiriboga L, Donington J, Huflejt M, Carbone M, Chia D, Goodglick L, Goodman GE, Thornquist MD, Liu G, de Perrot M, Tsao MS, Goparaju C. Fibulin-3 as a blood and effusion biomarker for pleural mesothelioma. *N Engl J Med*. 2012;367:1417-1427.
- 48) Berzenji L, Van Schil PE, Carp L. The eighth TNM classification for malignant pleural mesothelioma. *Transl Lung Cancer Res*. 2018;7:543-549.
- 49) Nowak AK, Chansky K, Rice DC, Pass HI, Kindler HL, Shemanski L, Billé A, Rintoul RC, Batirel HF, Thomas CF, Friedberg J, Cedres S, de Perrot M, Rusch VW, Staging and Prognostic Factors Committee, Advisory Boards and Participating Institutions. The IASLC Mesothelioma Staging Project: Proposals for Revisions of the T Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification for Pleural Mesothelioma. *J Thorac Oncol*. 2016;11:2089-2099.
- 50) Scherpereel A, Opitz I, Berghmans T, Psallidas I, Glatzer M, Rigau D, Astoul P, Bölükbas S, Boyd J, Coolen J, De Bondt C, De Ruyscher D, Durieux V, Faivre-Finn C, Fennell D, Galateau-Salle F, Greillier L, Hoda MA, Klepetko W, Lacourt A, McElnay P, Maskell NA, Mutti L, Paireon JC, Van Schil P, van Meerbeeck JP, Waller D, Weder W, Cardillo G, Putora PM. ERS/ESTS/EACTS/ESTRO guidelines for the management of malignant pleural mesothelioma. *Eur Respir J*. 2020;55:1900953.
- 51) Baas P, Fennell D, Kerr KM, Van Schil PE, Haas RL, Peters S. ESMO guidelines committee. Malignant pleural mesothelioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015;26 Suppl 5:v31-v39.
- 52) Zalcman G, Mazieres J, Margery J, Greillier L, Audigier-Valette C, Moro-Sibilot D, Molinier O, Corre R, Monnet I, Gounant V, Rivière F, Janicot H, Gervais R, Locher C, Milleron B, Tran Q, Lebitasy MP, Morin F, Creveuil C, Parienti JJ, Scherpereel A; French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). Bevacizumab for newly diagnosed pleural mesothelioma in the Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2016;387:1405-1414.
- 53) Scherpereel A, Mazieres J, Greillier L, Lantuejoul S, Dô P, Bylicki O, Monnet I, Corre R, Audigier-Valette C, Locatelli-Sanchez M, Molinier O, Guisier F, Urban T, Ligeza-Poisson C, Planchard D, Amour E, Morin F, Moro-Sibilot D, Zalcman G; French Cooperative Thoracic Intergroup. Nivolumab or nivolumab plus ipilimumab in patients with relapsed malignant pleural mesothelioma (IFCT-1501 MAPS2): a multicentre, open-label, randomised, non-comparative, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20:239-253.
- 54) Zimmermann D: Versican. In *Proteoglycans-Structure, Biology and Molecular Interactions*. Edited by Iozzo R. New York: Marcel Dekker, Inc; 2000:327-341.
- 55) Wight TN. Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14:617-623.

- 56) Margolis RU, Margolis RK. Aggrecan-versican-neurocan family proteoglycans. *Methods Enzymol.* 1994;245:105-126.
- 57) Iozzo RV, Naso MF, Cannizzaro LA, Wasmuth JJ, McPherson JD. Mapping of the versican proteoglycan gene (CSPG2) to the long arm of human chromosome 5 (5q12-5q14). *Genomics.* 1992;14:845-851.
- 58) Wu Y, Chen L, Zheng PS, Yang BB. beta 1-Integrin-mediated glioma cell adhesion and free radical-induced apoptosis are regulated by binding to a C-terminal domain of PG-M/versican. *J Biol Chem.* 2002;277:12294-12301.
- 59) Wight TN, Kang I, Evanko SP, Harten IA, Chang MY, Pearce OMT, Allen CE, Frevert CW. Versican-A Critical Extracellular Matrix Regulator of Immunity and Inflammation. *Front Immunol.* 2020;11:512.
- 60) Ito K, Shinomura T, Zako M, Ujita M, Kimata K. Multiple forms of mouse PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan generated by alternative splicing. *J Biol Chem.* 1995;270:958-965.
- 61) Kischel P, Waltregny D, Dumont B, Turtoi A, Greffe Y, Kirsch S, De Pauw E, Castronovo V. Versican overexpression in human breast cancer lesions: known and new isoforms for stromal tumor targeting. *Int J Cancer.* 2010;126:640-650.
- 62) Bogen O, Bender O, Alvarez P, Kern M, Tomiuk S, Hucho F, Levine JD. Expression of a novel versican variant in dorsal root ganglia from spared nerve injury rats. *Mol Pain.* 2019;15:1744806919874557.
- 63) Evanko SP, Chan CK, Johnson PY, Frevert CW, Wight TN. The biochemistry and immunohistochemistry of versican. In: Mecham RP, editor. *Methods in Extracellular Matrix Biology.* Cambridge, MA: Academic Press (Elsevier Inc.) (2018). p. 261–79.
- 64) Dours-Zimmermann MT, Maurer K, Rauch U, Stoffel W, Fässler R, Zimmermann DR. Versican V2 assembles the extracellular matrix surrounding the nodes of ranvier in the CNS. *J Neurosci.* 2009;29:7731-7742.
- 65) Sheng W, Wang G, Wang Y, Liang J, Wen J, Zheng PS, Wu Y, Lee V, Slingerland J, Dumont D, Yang BB. The roles of versican V1 and V2 isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Mol Biol Cell.* 2005;16:1330-1340.
- 66) Kang I, Barth JL, Sproul EP, Yoon DW, Workman GA, Braun KR, Argraves WS, Wight TN. Expression of V3 Versican by Rat Arterial Smooth Muscle Cells Promotes Differentiated and Anti-inflammatory Phenotypes. *J Biol Chem.* 2015;290:21629-21641.
- 67) Foulcer SJ, Day AJ, Apte SS. Isolation and purification of versican and analysis of versican proteolysis. *Methods Mol Biol.* 2015;1229:587-604.

- 68) Kinsella MG, Bressler SL, Wight TN. The regulated synthesis of versican, decorin, and biglycan: extracellular matrix proteoglycans that influence cellular phenotype. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2004;14:203-234.
- 69) Rutnam ZJ, Wight TN, Yang BB. miRNAs regulate expression and function of extracellular matrix molecules. *Matrix Biol.* 2013;32:74-85.
- 70) Wang X, Hu G, Zhou J. Repression of versican expression by microRNA-143. *J Biol Chem.* 2010;285:23241-23250.
- 71) Yan Y, Qin D, Hu B, Zhang C, Liu S, Wu D, Huang W, Huang X, Wang L, Chen X, Zhang L. Deletion of miR-126a Promotes Hepatic Aging and Inflammation in a Mouse Model of Cholestasis. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2019;16:494-504.
- 72) Rahmani M, Carthy JM, McManus BM. Mapping of the Wnt/ $\beta$ -catenin/TCF response elements in the human versican promoter. *Methods Mol Biol.* 2012;836:35-52.
- 73) Rahmani M, Read JT, Carthy JM, McDonald PC, Wong BW, Esfandiarei M, Si X, Luo Z, Luo H, Rennie PS, McManus BM. Regulation of the versican promoter by the beta-catenin-T-cell factor complex in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2005;280:13019-13028.
- 74) Floor S, van Staveren WC, Larsimont D, Dumont JE, Maenhaut C. Cancer cells in epithelial-to-mesenchymal transition and tumor-propagating-cancer stem cells: distinct, overlapping or same populations. *Oncogene.* 2011;30:4609-4621.
- 75) Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene.* 2010;29:4741-4751.
- 76) Chang MY, Kang I, Gale M Jr, Manicone AM, Kinsella MG, Braun KR, Wigmosta T, Parks WC, Altemeier WA, Wight TN, Frevert CW. Versican is produced by Trif- and type I interferon-dependent signaling in macrophages and contributes to fine control of innate immunity in lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2017;313:L1069-L1086.
- 77) Passi A, Negrini D, Albertini R, Miserocchi G, De Luca G. The sensitivity of versican from rabbit lung to gelatinase A (MMP-2) and B (MMP-9) and its involvement in the development of hydraulic lung edema. *FEBS Lett.* 1999;456:93-96.
- 78) Perides G, Asher RA, Lark MW, Lane WS, Robinson RA, Bignami A. Glial hyaluronate-binding protein: a product of metalloproteinase digestion of versican? *Biochem J.* (1995) 312:377-84.
- 79) Kenagy RD, Fischer JW, Davies MG, Berceci SA, Hawkins SM, Wight TN, Clowes AW. Increased plasmin and serine proteinase activity during flow-induced intimal atrophy in baboon PTFE grafts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:400-404.

- 80) Nandadasa S, Foulcer S, Apte SS. The multiple, complex roles of versican and its proteolytic turnover by ADAMTS proteases during embryogenesis. *Matrix Biol.* 2014;35:34-41.
- 81) Sandy JD, Westling J, Kenagy RD, Iruela-Arispe ML, Verscharen C, Rodriguez-Mazaneque JC, Zimmermann DR, Lemire JM, Fischer JW, Wight TN, Clowes AW. Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *J Biol Chem.* 2001;276:13372-13378.
- 82) Shinomura T, Nishida Y, Ito K, Kimata K. cDNA cloning of PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan expressed during chondrogenesis in chick limb buds. Alternative spliced multiforms of PG-M and their relationships to versican. *J Biol Chem.* 1993;268:14461-14469.
- 83) Westling J, Gottschall PE, Thompson VP, Cockburn A, Perides G, Zimmermann DR, Sandy JD. ADAMTS4 (aggrecanase-1) cleaves human brain versican V2 at Glu405-Gln406 to generate glial hyaluronate binding protein. *Biochem J.* 2004;377:787-795.
- 84) Schmitt M. Versican vs versikine: tolerance vs attack. *Blood.* 2016;128:612-613.
- 85) Hope C, Foulcer S, Jagodinsky J, Chen SX, Jensen JL, Patel S, Leith C, Maroulakou I, Callander N, Miyamoto S, Hematti P, Apte SS, Asimakopoulos F. Immunoregulatory roles of versican proteolysis in the myeloma microenvironment. *Blood.* 2016;128:680-685.
- 86) Mjaatvedt CH, Yamamura H, Capelhart AA, Turner D, Markwald RR. The *Cspg2* gene, disrupted in the *hdf* mutant, is required for right cardiac chamber and endocardial cushion formation. *Dev Biol.* 1998;202:56-66.
- 87) Coulson-Thomas VJ, Gesteira TF, Hascall V, Kao W. Umbilical cord mesenchymal stem cells suppress host rejection: the role of the glycocalyx. *J Biol Chem.* 2014;289:23465-23481.
- 88) Hattori N, Carrino DA, Lauer ME, Vasanthi A, Wylie JD, Nelson CM, Apte SS. Pericellular versican regulates the fibroblast-myofibroblast transition: a role for ADAMTS 5 protease-mediated proteolysis. *J Biol Chem.* 2011;286:34298-34310.
- 89) Islam S, Chuensirikulchai K, Khummuang S, Keratibumrunpong T, Kongtawelert P, Kasinrerak W, Hatano S, Nagamachi A, Honda H, Watanabe H. Accumulation of versican facilitates wound healing: Implication of its initial ADAMTS-cleavage site. *Matrix Biol.* 2020;87:77-93.
- 90) LeBaron RG, Zimmermann DR, Ruoslahti E. Hyaluronate binding properties of versican. *J Biol Chem.* 1992;267:10003-10010.

- 91) Isogai Z, Aspberg A, Keene DR, Ono RN, Reinhardt DP, Sakai LY. Versican interacts with fibrillin-1 and links extracellular microfibrils to other connective tissue networks. *J Biol Chem.* 2002;277:4565-4572.
- 92) Aspberg A, Binkert C, Ruoslahti E. The versican C-type lectin domain recognizes the adhesion protein tenascin-R. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:10590-10594.
- 93) Aspberg A, Adam S, Kostka G, Timpl R, Heinegård D. Fibulin-1 is a ligand for the C-type lectin domains of aggrecan and versican. *J Biol Chem.* 1999;274:20444-20449.
- 94) Olin AI, Mörgelin M, Sasaki T, Timpl R, Heinegård D, Aspberg A. The proteoglycans aggrecan and Versican form networks with fibulin-2 through their lectin domain binding. *J Biol Chem.* 2001;276:1253-1261.
- 95) Day AJ, Milner CM. TSG-6: A multifunctional protein with anti-inflammatory and tissue-protective properties. *Matrix Biol.* 2019;78-79:60-83.
- 96) Wu YJ, La Pierre DP, Wu J, Yee AJ, Yang BB. The interaction of versican with its binding partners. *Cell Res.* 2005;15:483-494.
- 97) Tang M, Diao J, Gu H, Khatri I, Zhao J, Catral MS. Toll-like Receptor 2 Activation Promotes Tumor Dendritic Cell Dysfunction by Regulating IL-6 and IL-10 Receptor Signaling. *Cell Rep.* 2015;13:2851-2864.
- 98) Kim S, Takahashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, Luo JL, Karin M. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature.* 2009;457:102-106.
- 99) Kawashima H, Hirose M, Hirose J, Nagakubo D, Plaas AH, Miyasaka M. Binding of a large chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan, versican, to L-selectin, P-selectin, and CD44. *J Biol Chem.* 2000;275:35448-35456.
- 100) Gill S, Wight TN, Frevert CW. Proteoglycans: key regulators of pulmonary inflammation and the innate immune response to lung infection. *Anat Rec (Hoboken).* 2010;293:968-981.
- 101) de la Motte CA, Hascall VC, Drazba J, Bandyopadhyay SK, Strong SA. Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid:polycytidylic acid: inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function. *Am J Pathol.* 2003;163:121-133.
- 102) Petrey AC, de la Motte CA. Hyaluronan in inflammatory bowel disease: Cross-linking inflammation and coagulation. *Matrix Biol.* 2019;78-79:314-323.



- 103) Potter-Perigo S, Johnson PY, Evanko SP, Chan CK, Braun KR, Wilkinson TS, Altman LC, Wight TN. Polyinosine-polycytidylic acid stimulates versican accumulation in the extracellular matrix promoting monocyte adhesion. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;43:109-120.
- 104) Wight TN, Merrilees MJ. Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circ. Res.* 2004;94:1158–1167.
- 105) Kang I, Harten IA, Chang MY, Braun KR, Sheih A, Nivison MP, Johnson PY, Workman G, Kaber G, Evanko SP, Chan CK, Merrilees MJ, Ziegler SF, Kinsella MG, Frevert CW, Wight TN. Versican Deficiency Significantly Reduces Lung Inflammatory Response Induced by Polyinosine-Polycytidylic Acid Stimulation. *J Biol Chem.* 2017;292:51-63.
- 106) Masuda A, Yasuoka H, Satoh T, Okazaki Y, Yamaguchi Y, Kuwana M. Versican is upregulated in circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and amplifies a CCL2-mediated pathogenic loop. *Arthritis Res Ther.* 2013;15:R74.
- 107) Deguine J, Barton GM. MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000Prime Rep.* 2014;6:97.
- 108) Stephenson EL, Mishra MK, Moussienko D, Laflamme N, Rivest S, Ling CC, Yong VW. Chondroitin sulfate proteoglycans as novel drivers of leucocyte infiltration in multiple sclerosis. *Brain.* 2018;141:1094-1110.
- 109) Merrilees MJ, Beaumont BW, Braun KR, Thomas AC, Kang I, Hinek A, Passi A, Wight TN. Neointima formed by arterial smooth muscle cells expressing versican variant V3 is resistant to lipid and macrophage accumulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:1309-1316.
- 110) Evanko SP, Potter-Perigo S, Bollyky PL, Nepom GT, Wight TN. Hyaluronan and versican in the control of human T-lymphocyte adhesion and migration. *Matrix Biol.* 2012;31:90-100.
- 111) Fujii K, Karpova MB, Asagoe K, Georgiev O, Dummer R, Urosevic-Maiwald M. Versican upregulation in Sézary cells alters growth, motility and resistance to chemotherapy. *Leukemia.* 2015;29:2024-2032.
- 112) Hirose J, Kawashima H, Yoshie O, Tashiro K, Miyasaka M. Versican interacts with chemokines and modulates cellular responses. *J Biol Chem.* 2001;276:5228-5234.
- 113) Hope C, Emmerich PB, Papadas A, Pagenkopf A, Matkowskyj KA, Van De Hey DR, Payne SN, Clipson L, Callander NS, Hematti P, Miyamoto S, Johnson MG, Deming DA, Asimakopoulos F. Versican-Derived Matrikines Regulate Batf3-Dendritic Cell Differentiation and Promote T Cell Infiltration in Colorectal Cancer. *J Immunol.* 2017;199:1933-1941.

- 114) Lavin Y, Kobayashi S, Leader A, Amir ED, Elefant N, Bigenwald C, Remark R, Sweeney R, Becker CD, Levine JH, Meinhof K, Chow A, Kim-Shulze S, Wolf A, Medaglia C, Li H, Rytlewski JA, Emerson RO, Solovyov A, Greenbaum BD, Sanders C, Vignali M, Mary Beasley B, Flores R, Gnjjatic S, Pe'er D, Rahman A, Amit I, Merad M. Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses. *Cell*. 2017;169:750-765.e17.
- 115) Laoui D, Keirsse J, Morias Y, Van Overmeire E, Geeraerts X, Elkrim Y, Kiss M, Bolli E, Lahmar Q, Sichien D, Serneels J, Scott CL, Boon L, De Baetselier P, Mazzone M, Guilliams M, Van Ginderachter JA. The tumour microenvironment harbours ontogenically distinct dendritic cell populations with opposing effects on tumour immunity. *Nat Commun*. 2016 Dec 23;7:13720.
- 116) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144:646-74.
- 117) Theocharis AD, Karamanos NK. Proteoglycans remodeling in cancer: Underlying molecular mechanisms. *Matrix Biol*. 2019;75-76:220-259.
- 118) Ricciardelli C, Sakko AJ, Ween MP, Russell DL, Horsfall DJ. The biological role and regulation of versican levels in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28:233-45.
- 119) Du WW, Fang L, Yang X, Sheng W, Yang BL, Seth A, Zhang Y, Yang BB, Yee AJ. The role of versican in modulating breast cancer cell self-renewal. *Mol Cancer Res*. 2013;11:443-455.
- 120) Hu F, Dzaye OD, Hahn A, Yu Y, Scavetta RJ, Dittmar G, Kaczmarek AK, Dunning KR, Ricciardelli C, Rinnenthal JL, Heppner FL, Lehnardt S, Synowitz M, Wolf SA, Kettenmann H. Glioma-derived versican promotes tumor expansion via glioma-associated microglial/macrophages Toll-like receptor 2 signaling. *Neuro Oncol*. 2015;17:200-10.
- 121) Kunisada M, Yogianti F, Sakumi K, Ono R, Nakabeppu Y, Nishigori C. Increased expression of versican in the inflammatory response to UVB- and reactive oxygen species-induced skin tumorigenesis. *Am J Pathol*. 2011;179:3056-65.
- 122) Zhangyuan G, Wang F, Zhang H, Jiang R, Tao X, Yu D, Jin K, Yu W, Liu Y, Yin Y, Shen J, Xu Q, Zhang W, Sun B. Versican V1 promotes proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma through the activation of EGFR-PI3K-AKT pathway. *Oncogene*. 2020;39:1213-1230.
- 123) Keire PA, Bressler SL, Lemire JM, Edris B, Rubin BP, Rahmani M, McManus BM, van de Rijn M, Wight TN. A role for versican in the development of leiomyosarcoma. *J Biol Chem*. 2014;289:34089-103.

- 124) Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140:883-99.
- 125) Gorter A, Zijlmans HJ, van Gent H, Trimbos JB, Fleuren GJ, Jordanova ES. Versican expression is associated with tumor-infiltrating CD8-positive T cells and infiltration depth in cervical cancer. *Mod Pathol*. 2010;23:1605-15.
- 126) Hartley G, Regan D, Guth A, Dow S. Regulation of PD-L1 expression on murine tumor-associated monocytes and macrophages by locally produced TNF- $\alpha$ . *Cancer Immunol Immunother*. 2017;66:523-535.
- 127) Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016;39:98-106.
- 128) Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011;12:492-9.
- 129) Ghosh S, Albitar L, LeBaron R, Welch WR, Samimi G, Birrer MJ, Berkowitz RS, Mok SC. Up-regulation of stromal versican expression in advanced stage serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2010;119:114-20.
- 130) Labropoulou VT, Theocharis AD, Ravazoula P, Perimenis P, Hjerpe A, Karamanos NK, Kalofonos HP. Versican but not decorin accumulation is related to metastatic potential and neovascularization in testicular germ cell tumours. *Histopathology*. 2006;49:582-93.
- 131) Asano K, Nelson CM, Nandadasa S, Aramaki-Hattori N, Lindner DJ, Alban T, Inagaki J, Ohtsuki T, Oohashi T, Apte SS, Hirohata S. Stromal Versican regulates tumor growth by promoting angiogenesis. *Sci Rep*. 2017;7:17225.
- 132) Fu Y, Nagy JA, Brown LF, Shih SC, Johnson PY, Chan CK, Dvorak HF, Wight TN. Proteolytic cleavage of versican and involvement of ADAMTS-1 in VEGF-A/VPF-induced pathological angiogenesis. *J Histochem Cytochem*. 2011;59:463-73.
- 133) Derynck R, Goeddel DV, Ullrich A, Gutterman JU, Williams RD, Bringman TS, Berger WH. Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res*. 1987;47:707-12.
- 134) Van Bockstal M, Lambein K, Van Gele M, De Vlieghere E, Limame R, Braems G, Van den Broecke R, Cocquyt V, Denys H, Bracke M, Libbrecht L, De Wever O. Differential regulation of extracellular matrix protein expression in carcinoma-associated fibroblasts by TGF- $\beta$ 1 regulates cancer cell spreading but not adhesion. *Oncoscience*. 2014;1:634-48.

- 135) Kodama J, Hasengaowa, Kusumoto T, Seki N, Matsuo T, Nakamura K, Hongo A, Hiramatsu Y. Versican expression in human cervical cancer. *Eur J Cancer*. 2007;43:1460-6.
- 136) Kodama J, Hasengaowa, Kusumoto T, Seki N, Matsuo T, Ojima Y, Nakamura K, Hongo A, Hiramatsu Y. Prognostic significance of stromal versican expression in human endometrial cancer. *Ann Oncol*. 2007;18:269-74.
- 137) Fanhchaksai K, Okada F, Nagai N, Pothacharoen P, Kongtawelert P, Hatano S, Makino S, Nakamura T, Watanabe H. Host stromal versican is essential for cancer-associated fibroblast function to inhibit cancer growth. *Int J Cancer*. 2016;138:630-41.
- 138) Özdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, Zheng X, Wu CC, Simpson TR, Laklai H, Sugimoto H, Kahlert C, Novitskiy SV, De Jesus-Acosta A, Sharma P, Heidari P, Mahmood U, Chin L, Moses HL, Weaver VM, Maitra A, Allison JP, LeBleu VS, Kalluri R. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell*. 2014;25:719-34.
- 139) Gao D, Joshi N, Choi H, Ryu S, Hahn M, Catena R, Sadik H, Argani P, Wagner P, Vahdat LT, Port JL, Stiles B, Sukumar S, Altorki NK, Rafii S, Mittal V. Myeloid progenitor cells in the premetastatic lung promote metastases by inducing mesenchymal to epithelial transition. *Cancer Res*. 2012;72:1384-94.
- 140) Said N, Sanchez-Carbayo M, Smith SC, Theodorescu D. RhoGDI2 suppresses lung metastasis in mice by reducing tumor versican expression and macrophage infiltration. *J Clin Invest*. 2012;122:1503-18.
- 141) Senda M, Fukuyama R, Nagasaka T. Kinetics of versican-expressing macrophages in bone marrow after cord blood stem cell transplantation for treatment of acute myelogenous leukaemia. *J Clin Pathol*. 2016;69:906-11.
- 142) Jackaman C, Bundell CS, Kinnear BF, Smith AM, Filion P, van Hagen D, Robinson BW, Nelson DJ. IL-2 intratumoral immunotherapy enhances CD8+ T cells that mediate destruction of tumor cells and tumor-associated vasculature: a novel mechanism for IL-2. *J Immunol*. 2003;171:5051-63.
- 143) Bielefeldt-Ohmann H, Marzo AL, Himbeck RP, Jarnicki AG, Robinson BW, Fitzpatrick DR. Interleukin-6 involvement in mesothelioma pathobiology: inhibition by interferon alpha immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 1995;40:241-50.
- 144) Magkouta S, Pappas A, Moschos C, Vazakidou ME, Psarra K, Kalomenidis I. Icmt inhibition exerts anti-angiogenic and anti-hyperpermeability activities impeding malignant pleural effusion. *Oncotarget*. 2016;7:20249-59.

- 145) Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol.* 2008;83:14.
- 146) Van Beijnum JR, Rousch M, Castermans K, van der Linden E, Griffioen AW. Isolation of endothelial cells from fresh tissues. *Nat Protoc.* 2008;3:1085–1091.
- 147) Stathopoulos GT, Psallidas I, Moustaki A, Moschos C, Kollintza A, Karabela S, Porfyridis I, Vassiliou S, Karatza M, Zhou Z, Joo M, Blackwell TS, Roussos C, Graf D, Kalomenidis I. A central role for tumor-derived monocyte chemoattractant protein-1 in malignant pleural effusion. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100:1464-76.
- 148) Stathopoulos GT, Moschos C, Loutrari H, Kollintza A, Psallidas I, Karabela S, Magkouta S, Zhou Z, Papiris SA, Roussos C, Kalomenidis I. Zoledronic acid is effective against experimental malignant pleural effusion. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178:50-9.
- 149) Psallidas I, Stathopoulos GT, Maniatis NA, Magkouta S, Moschos C, Karabela SP, Kollintza A, Simoes DC, Kardara M, Vassiliou S, Papiris SA, Roussos C, Kalomenidis I. Secreted phosphoprotein-1 directly provokes vascular leakage to foster malignant pleural effusion. *Oncogene.* 2013;32:528-35.
- 150) Meng J, Liu Y, Han J, Tan Q, Chen S, Qiao K, Zhou H, Sun T, Yang C. Hsp90 $\beta$  promoted endothelial cell-dependent tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer.* 2017;16:72.
- 151) Carthy JM, Boroomand S, McManus BM. Versican and CD44 in in vitro valvular interstitial cell injury and repair. *Cardiovasc Pathol.* 2012;21:74-82.
- 152) Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:490-500.
- 153) Mills CD, Lenz LL, Harris RA. A Breakthrough: Macrophage-Directed Cancer Immunotherapy. *Cancer Res.* 2016;76:513-6.
- 154) Liang MD, Bagchi A, Warren HS, Tehan MM, Trigilio JA, Beasley-Topliffe LK, Tesini BL, Lazzaroni JC, Fenton MJ, Hellman J. Bacterial peptidoglycan-associated lipoprotein: a naturally occurring toll-like receptor 2 agonist that is shed into serum and has synergy with lipopolysaccharide. *J Infect Dis.* 2005;191:939-48.
- 155) Zheng XF, Hong YX, Feng GJ, Zhang GF, Rogers H, Lewis MA, Williams DW, Xia ZF, Song B, Wei XQ. Lipopolysaccharide-induced M2 to M1 macrophage transformation for IL-12p70 production is blocked by *Candida albicans* mediated up-regulation of EBI3 expression. *PLoS One.* 2013;8:e63967.
- 156) Sluiter NR, de Cuba EM, Kwakman R, Meijerink WJ, Delis-van Diemen PM, Coupé VM, Beliën JA, Meijer GA, de Hingh IH, te Velde EA. Versican and vascular

endothelial growth factor expression levels in peritoneal metastases from colorectal cancer are associated with survival after cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Clin Exp Metastasis*. 2016;33:297-307.

157) Kollintza A, Magkouta S, Psallidas I, Moschos C, Stratiki M, Esquerda A, Porcel JM, Kalomenidis I. Interleukin-17A is involved in bacteria-related acute pleural inflammation. *Respirology*. 2013;18:488-94.

158) Grossman RL, Heath AP, Ferretti V, Varmus HE, Lowy DR, Kibbe WA, Staudt LM. Toward a Shared Vision for Cancer Genomic Data. *N Engl J Med*. 2016 ;375:1109-12.

159) Stathopoulos GT, Kalomenidis I. Malignant pleural effusion: tumor-host interactions unleashed. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186:487-92.

160) Li MO, Rudensky AY. T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function. *Nat Rev Immunol*. 2016;16:220-33.

161) Van Schil PE, Opitz I, Weder W, De Laet C, Domen A, Lauwers P, Hendriks JM, Van Meerbeeck JP. Multimodal management of malignant pleural mesothelioma: where are we today? *Eur Respir J*. 2014;44:754-64.

162) Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 2014;41:49-61.

163) Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124:783-801.

164) Wight TN, Kang I, Merrilees MJ. Versican and the control of inflammation. *Matrix Biol*. 2014;35:152-61.

165) Giannou AD, Marazioti A, Spella M, Kanellakis NI, Apostolopoulou H, Psallidas I, Prijovich ZM, Vreka M, Zazara DE, Lilis I, Papaleonidopoulos V, Kairi CA, Patmanidi AL, Giopanou I, Spiropoulou N, Harokopos V, Aidinis V, Spyratos D, Teliousi S, Papadaki H, Taraviras S, Snyder LA, Eickelberg O, Kardamakis D, Iwakura Y, Feyerabend TB, Rodewald HR, Kalomenidis I, Blackwell TS, Agalioti T, Stathopoulos GT. Mast cells mediate malignant pleural effusion formation. *J Clin Invest*. 2015;125:2317-34.

166) Alley EW, Lopez J, Santoro A, Morosky A, Saraf S, Piperdi B, van Brummelen E. Clinical safety and activity of pembrolizumab in patients with malignant pleural mesothelioma (KEYNOTE-028): preliminary results from a non-randomised, open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol*. 2017;18:623-630.