

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ

ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ

ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μελέτη της επίδρασης της δοξορουβικίνης στην τοπολογία της RAS ογκοπρωτεΐνης και στη ρύθμιση της κυτταρικής γήρανσης και της αυτοφαγίας σε καρκινικά μεσεγχυματικά κύτταρα»

“Investigation of the impact of doxorubicin on RAS oncoprotein topology and its role in the regulation of cellular senescence and autophagy in mesenchymal cancer cells”

Ροζή Χριστίνα του Βασιλείου

ΛΑΡΙΣΑ 2025

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δαμαλάς Αλέξανδρος (επιβλέπον): Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ψαρρά Άννα-Μαρία (συνεπιβλέπουσα): Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τραχανά Βαρβάρα (μέλος): Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Προτού ξεκινήσει η περιγραφή της διπλωματικής εργασίας μου θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου σε ορισμένα πρόσωπα.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή αυτής της εργασίας, τον κύριο Δαμαλά Αλέξανδρο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα και για όσα μου έμαθε στο εργαστήριο βιολογίας.

Την ίδια στιγμή, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την διδακτορική φοιτήτρια Ουτσούνη Ζωζώ για την ανεκτίμητη βοήθεια και όλες τις πολύτιμες συμβουλές καθ' όλη την διάρκεια του εργαστηριακού τμήματος της εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την συμβολή τους και το ευχάριστο περιβάλλον συνεργασίας.

Ευχαριστώ ακόμη την συνεπιβλέπουσα μου, κύρια Ψαρρά Άννα-Μαρία για όλες τις σημαντικές γνώσεις που με βοήθησε να αποκτήσω κατά την διάρκεια της φοίτησης μου στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, όπως και για την άψογη συνεργασία που είχαμε κατά την διεκπεραίωση της διπλωματικής εργασίας μου. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Τραχανά Βαρβάρα που δέχτηκε να είναι μέρος της τριμελούς επιτροπής μου.

Τέλος, τα πιο θερμά ευχαριστώ θα ήθελα να τα αποδώσω στην οικογένεια και τους φίλους μου που ήταν πάντα δίπλα μου και με στήριζαν με κάθε τρόπο όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι RAS πρωτεΐνες είναι μικρές GTPάσες οι οποίες εμπλέκονται σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την κυτταρική μετανάστευση. Η λειτουργία τους είναι στενά συνδεδεμένη με τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους. Μεταλλάξεις στα γονίδια RAS συνδέονται με την ανάπτυξη πολλών τύπων καρκίνου, καθώς οδηγούν σε μόνιμη ενεργοποίησή των πρωτεϊνών και ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η κυτταρική σειρά MDA-MB 231 είναι μια καρκινική μεσεγχυματική σειρά η οποία φέρει μετάλλαξη στο K-RAS γονίδιο και για αυτό, επιλέχθηκε ώστε να μελετηθεί η τοπολογία της RAS έπειτα από επίδραση της δοξορουβικίνης. Η δοξορουβικίνη είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντικαρκινικό φάρμακο με σημαντικό θεραπευτικό δυναμικό λόγω των μηχανισμών δράσης της που είναι η πρόκληση βλαβών στο DNA, η δημιουργία ελεύθερων ριζών και η επαγωγή απόπτωσης. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο συγκεντρώσεις δοξορουβικίνης (12,5 nM και 100 nM) και έπειτα από καλλιέργεια των κυττάρων μαζί με το αντικαρκινικό φάρμακο παρατηρήθηκε η τοπολογία του λιπιδικού άκρου της ισομορφής H-RAS με την βοήθεια συνεστιακού μικροσκοπίου ζωντανής κυτταρικής απεικόνισης. Το γονίδιο για το tH-RAS εισάχθηκε στα καρκινικά κύτταρα με πλασμίδιο που έφερε το γονίδιο αναφοράς GFP. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το tH-RAS στα καρκινικά μεσεγχυματικά κύτταρα, χωρίς επίδραση του φαρμάκου, εντοπιζόταν στην πλασματική μεμβράνη. Από την άλλη, στα κύτταρα μετά την επίδραση δοξορουβικίνης, το tH-RAS εντοπιζόταν στο κυτταρόπλασμα ανεξαρτήτως συγκέντρωσης. Για πιο σαφή εικόνα των αποτελεσμάτων μελετήθηκαν και τα επίπεδα της πρωτεΐνης καβεολίνης-1, μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης που σχηματίζει τις δομές caveolae της μεμβράνης. Η RAS πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με την καβεολίνη-1, η οποία της επιτρέπει να αγκυροβολήσει στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η αποστροφή του tH-RAS από την μεμβράνη του κυττάρου μετά την επίδραση δοξορουβικίνης, διαπιστώσαμε πως ακολουθείται από μειωμένα επίπεδα καβεολίνης-1 στα κύτταρα. Παράλληλα, η δοξορουβικίνη προκάλεσε και μορφολογικές αλλαγές στα μεσεγχυματικά καρκινικά κύτταρα, που τα έκανε να χάσουν το χαρακτηριστικό επίμηκες σχήμα τους. Μέτρηση των επιπέδων του επιθηλιακού δείκτη E-καδερίνης, φανέρωσε αύξηση μετά την επίδραση του φαρμάκου, γεγονός που σηματοδοτεί μεσεγχυματική προς επιθηλιακή μετάβαση (MET). Ακόμη μέρος της εργασίας ασχολήθηκε με την επαγόμενη κυτταρική γήρανση στα MDA-MB 231 κύτταρα, έπειτα από επίδραση της δοξορουβικίνης. Τα αποτελέσματα της μεθόδου προσδιορισμού δραστηριότητας SA-β-gal καθώς και της μέτρησης των επιπέδων του δείκτη κυτταρικής γήρανσης p21, έδειξαν πως η δοξορουβικίνη είναι ικανή να προκαλέσει κυτταρική γήρανση στα καρκινικά κύτταρα με δωσοεξαρτώμενο τρόπο. Τέλος, διερευνήθηκε η σχέση της δοξορουβικίνης με την αυτοφαγία. Για τον σκοπό αυτό, έγινε μέτρηση των αυτοφαγικών πρωτεϊνών PI3K-CIII, ATG5, P62 και LC3I/II. Τα αποτελέσματα οδήγησαν στο συμπέρασμα πως τα 12,5 nM δοξορουβικίνης μπλοκάρουν την αυτοφαγική ροή, ενώ στα 100 nM παρατηρείται επανέναρξη της αυτοφαγικής διαδικασίας.

ABSTRACT

RAS proteins are small GTPases that participate in signal transduction pathways regulating cell proliferation, differentiation, and migration. Their activity is closely linked to their subcellular localization. Mutations in RAS genes are associated with the development of many cancer types, as they result in constitutive activation of the proteins and uncontrolled cell proliferation. The MDA-MB-231 cell line is a mesenchymal cancer cell line carrying a mutation in the KRAS gene, and for this reason, it was selected to study the topology of RAS following treatment with doxorubicin. Doxorubicin is a widely used chemotherapeutic drug with significant therapeutic potential due to its mechanisms of action, which include induction of DNA damage, generation of reactive oxygen species, and triggering of apoptosis. In this study, two concentrations of doxorubicin (12.5 nM and 100 nM) were used. After culturing the cells in the presence of the drug, the localization of the lipid-modified terminus of the H-RAS isoform was examined using live-cell confocal microscopy. The tH-RAS gene was introduced into cancer cells through a plasmid carrying the GFP reporter gene. The results showed that in untreated mesenchymal cancer cells, tH-RAS was localized at the plasma membrane. In contrast, after doxorubicin treatment, tH-RAS was found in the cytoplasm regardless of concentration. To obtain a clearer view, the levels of caveolin-1, a membrane protein forming caveolae structures, were also examined. RAS proteins interact with caveolin-1, which enables their anchoring to the plasma membrane. The detachment of tH-RAS from the plasma membrane following doxorubicin treatment was accompanied by reduced caveolin-1 levels. At the same time, doxorubicin induced morphological alterations in the mesenchymal cancer cells, causing them to lose their characteristic elongated shape. Measurement of the epithelial marker E-cadherin revealed an increase after treatment, indicating a mesenchymal-to-epithelial transition (MET). Another part of the study focused on doxorubicin-induced senescence in MDA-MB-231 cells. SA- β -gal activity assays, along with measurements of the senescence marker p21, demonstrated that doxorubicin induces cellular senescence in a dose-dependent manner. Finally, the relationship between doxorubicin and autophagy was investigated by measuring the autophagic proteins PI3K-CIII, ATG5, P62, and LC3I/II. The results indicated that 12.5 nM doxorubicin blocked autophagic flux, whereas at 100 nM, autophagy was reactivated.

Λέξεις-κλειδιά: Ras πρωτεΐνη, καβεολίνη-1, δοξορουβικίνη, μεσεγχυματική-επιθηλιακή μετάβαση, κυτταρική γήρανση, αυτοφαγία

Keyword: Ras protein, caveolin-1, doxorubicin, mesenchymal-to-epithelial transition, cellular senescence, autophagy

Πίνακας Περιεχομένων

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1. RAS πρωτεΐνη	8
1.1. Ισομορφές της RAS πρωτεΐνης	8
1.2. Δομή της πρωτεΐνης.....	8
1.3. RAS ενεργοποίηση-απενεργοποίηση	9
1.4. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις	10
1.5. Υποκυτταρικός εντοπισμός.....	11
1.6. Μονοπάτι RAS – MAPK	12
1.7. Μονοπάτι RAS-PI3K	12
1.8. RAS και καρκίνος	13
1.9. Σηματοδότηση RAS και EMT	15
2. Καβεολίνη-1 (CAV-1)	15
2.1. Δομή της πρωτεΐνης.....	16
2.2. Βιολογικοί ρόλοι της καβεολίνης-1.....	17
2.2.1. Δημιουργία Caveolae.....	17
2.2.2. Ρύθμιση ομοιόστασης χοληστερόλης	17
2.2.3. Ρύθμιση μιτοχονδριακής λειτουργίας.....	18
2.2.4. Συμμετοχή σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος.....	18
2.3. Καβεολίνη-1 στα καρκινικά κύτταρα MDA-MB 231	19
2.4. Συσχέτιση της καβεολίνης-1 με την RAS πρωτεΐνη	19
3. Δοξορουβικίνη	20
3.1. Μηχανισμοί δράσης δοξορουβικίνης	20
3.1.1. Πρόκληση βλαβών στο DNA	20
3.1.2. Παραγωγή ελευθέρων ριζών - ROS	21
4. Κυτταρική γήρανση.....	22
4.1. Αναδιπλασιαστική γήρανση	22
4.2. Επαγόμενη από το στρες πρόωρη κυτταρική γήρανση-SIPS	23
4.3. Μονοπάτια p53/p21 ^{WAF1/CIP1} και p16 ^{INK4a} /pRB	23

4.4.	Φαινότυπος γηρασμένων κυττάρων	25
4.5.	Αναστολή κυτταρικής γήρανσης στα καρκινικά κύτταρα.....	25
4.6.	DOX και επαγωγή γήρανσης σε καρκινικά κύτταρα	26
5.	Αυτοφαγία	26
5.1.	Πρωτεΐνες της αυτοφαγίας.....	28
5.2.	Δημιουργία του αυτοφαγοσώματος	28
5.3.	Δημιουργία αυτολυσσοσώματος.....	29
5.4.	DOX και αυτοφαγία στα καρκινικά κύτταρα.....	30
6.	Αυτοφαγία και κυτταρική γήρανση	31
7.	Καρκινική σειρά MDA-MB 231	33
ΣΚΟΠΟΣ		34
ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ.....		35
8.	Καλλιέργεια καρκινικών μεσεγχυματικών κυττάρων MDA-MB 231	35
8.1.	Διαχείριση και Ανακαλλιέργεια καρκινικών κυττάρων	35
8.2.	Απόψυξη καρκινικών κυττάρων	36
8.3.	Κατάψυξη καρκινικών κυττάρων	37
8.4.	Στρώσιμο κυττάρων σε plate - Plating.....	37
8.5.	Εισαγωγή πλασμιδίου στα καρκινικά κύτταρα – Transfection	38
8.6.	Επίδραση με doxorubicin.....	39
8.7.	Παρατήρηση κυττάρων με συνεστιακό μικροσκόπιο	39
8.8.	Μέθοδος προσδιορισμού δραστηριότητας SA-β-gal.....	40
8.9.	Λύσης κυττάρων και απομόνωση πρωτεϊνών	41
8.10.	Προσδιορισμός απόλυτης συγκέντρωσης πρωτεϊνών	42
8.11.	Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE)	43
8.11.1.	Παρασκευή δειγμάτων πριν την φόρτωση.....	43
8.11.2.	Διαχωρισμός Πρωτεϊνών – SDS PAGE	44
8.11.3.	Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη – Transfer	45
8.11.4.	Blocking	46
8.11.5.	Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Western (Western Blot)	46

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	48
9.1. Αλλαγή στην μορφολογία των κυττάρων έπειτα από επίδραση με δοξορουβικίνη	48
9.2. Εντοπισμός της tH-RAS στο εσωτερικό των κυττάρων.....	49
9.3. Αποτελέσματα της μεθόδου προσδιορισμού δραστικότητας SA-β-gal	50
9.4. Αποτελέσματα της ποσοτικής ποσοτικοποίησης του επιθηλιακού δείκτη E-cadherin 51	
9.5. Αποτελέσματα της ποσοτικής ποσοτικοποίησης της caveolin-1	52
9.6. Αποτελέσματα της ποσοτικής ποσοτικοποίησης του δείκτη κυτταρικής γήρανσης p21 53	
9.7. Αποτελέσματα της ποσοτικής ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών που της αυτοφαγίας	54
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	58
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	64

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. RAS πρωτεΐνη

Οι RAS πρωτεΐνες είναι μικρές GTPάσες με μοριακό βάρος 21-25 kDa, δυαδικοί μοριακοί διακόπτες που εναλλάσσονται μεταξύ ενεργής και ανενεργής κατάστασης και εμπλέκονται σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος στο κύτταρο. Τα κυριότερα μονοπάτια σηματοδότησης που ελέγχουν οι RAS πρωτεΐνες αφορούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την κυτταρική μετανάστευση. Αν και η ρύθμιση αυτών των πρωτεϊνών είναι αρκετά αυστηρή, υπάρχουν περιπτώσεις μεταλλάξεων των γονιδίων RAS ή άλλων ρυθμιστών, που τις καθιστούν διαρκώς ενεργές με αποτέλεσμα διάφορες ασθένειες όπως RASopathies, καρκίνος, ακόμα και ψυχιατρικές διαταραχές.

1.1. Ισομορφές της RAS πρωτεΐνης

Υπάρχουν τρία γονίδια για τις RAS πρωτεΐνες τα οποία μετά την έκφραση τους δίνουν τέσσερα είδη ανθρώπινων RAS πρωτεϊνών, την HRAS, την NRAS και τις ισομορφές KRASa και KRASb, οι οποίες προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα του mRNA του ίδιου γονιδίου. Όλες οι ισομορφές της RAS πρωτεΐνης εμφανίζουν σημαντική ομοιότητα στην αμινοξική τους αλληλουχία (82-90%), ενώ παράλληλα είναι παρόμοιες ως προς την δομή και τις βιοχημικές τους ιδιότητες. Η κύρια διαφοροποίηση των διαφορετικών Ras πρωτεϊνών βρίσκεται στο C-τελικό άκρο της αλληλουχίας (Hobbs et al., 2016).

1.2. Δομή της πρωτεΐνης

Όλες οι RAS πρωτεΐνες έχουν μια κοινή δομή τύπου Rossmann που περιλαμβάνει έναν κεντρικό κλώνο με 6 β-πτυχωτές επιφάνειες που πλαισιώνεται από 5 α-έλικες (Vetter Ingrid R., 2014). Ειδικότερα, έχουν μία περιοχή υπεύθυνη για την ρύθμιση ενεργοποίησης και απενεργοποίησης τους, η οποία ονομάζεται G domain. Η περιοχή αυτή αποτελείται από περίπου 166 αμινοξέα και σχετίζεται με την δέσμευση και την υδρόλυση των νουκλεοτιδίων GTP και GDP. Η G domain διακρίνεται σε 2 λειτουργικές περιοχές, τον λοβό τελεστή (Effector lobe) (αμινοξέα 1–86), ο οποίος εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες-στόχους και τον αλλοστερικό λοβό (Allosteric lobe) (αμινοξέα 87–166) που αφορά την ρύθμιση και την διαμόρφωση της πρωτεΐνης (Buhrman et al., 2011). Μεταξύ των ισομορφών της RAS πρωτεΐνης διαφορές εντοπίζονται στον αλλοστερικό λοβό και όχι στον λοβό τελεστή. Πιο συγκεκριμένα, οι διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης διαφέρουν στην ισορροπία ανάμεσα σε ενεργή και ανενεργή διαμόρφωση κάτι που συνεπάγεται διαφορές στην σύνδεση της πρωτεΐνης με την μεμβράνη, την ταχύτητα υδρόλυσης GTP και την συγγένεια δέσμευσης με άλλους παράγοντες. Αυτές οι μικρές αλλά σημαντικές αλλαγές μεταξύ H-RAS, K-RAS και N-RAS καθιστούν αναγκαία την μελέτη κάθε ισομορφής ξεχωριστά. Επίσης, οι RAS πρωτεΐνες περιέχουν και πολλά συντηρημένα μοτίβα που προσδίδουν σημαντικές λειτουργίες. Αυτά είναι η P-loop, οι switch I και switch II περιοχές και NKxD και ExSAK.

Η P-loop (phosphate-binding loop) παρέχει το κατάλληλο περιβάλλον φορτίου και διαλύτη για την δέσμευση του φωσφορικού τμήματος του GTP/GDP (Wittinghofer & Vetter, 2011). Οι switch I (αμινοξέα 30-40) και switch II (αμινοξέα 60-76) επικράτειες λειτουργούν ως διακόπτες που δυναμικά αλλάζουν διαμόρφωση ανάλογα με το αν η πρωτεΐνη βρίσκεται σε ενεργή ή ανενεργή κατάσταση. Παράλληλα, είναι σημαντικές για την αλληλεπίδραση της RAS με άλλες πρωτεΐνες (Ostrem et al., 2013). Τέλος, τα μοτίβα NKxD και ExSAK διευκολύνουν την αναγνώριση του νουκλεοτιδίου GTP/GDP και την τοποθέτηση του εντός της ενεργούς θέσης. Τέλος, υπάρχει στο C-τελικό άκρο των πρωτεϊνών, η καρβοξυτελική υπερμεταβλητή περιοχή (HVR), η οποία διαφέρει ανάμεσα στις ισομορφές HRAS, KRAS, NRAS. Η HVR περιέχει τα σήματα για τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (π.χ. φαρνεσυλίωση, παλμιτοϋλίωση), που καθορίζουν την πρόσδεση στη μεμβράνη. Επομένως, η ίδια ορίζει τον εντοπισμό της πρωτεΐνης (κυτταρόπλασμα, μεμβράνη, Golgi, ενδομεμβρανικά διαμερίσματα) (Parker & Mattos, 2018).

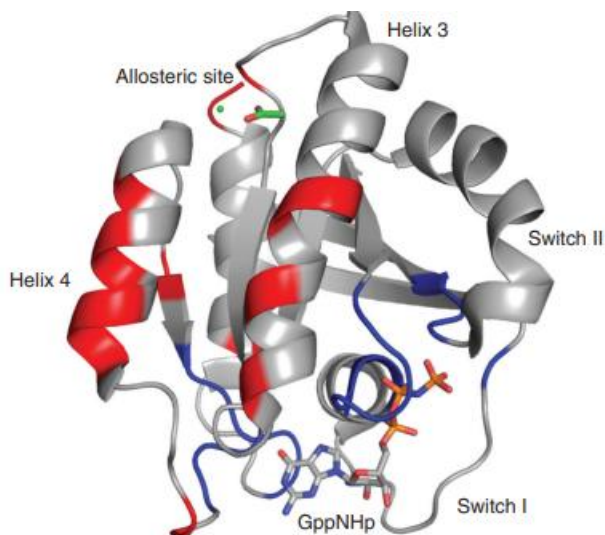


Figure 1: Τρισδιάστατη δομή της H-RAS

1.3. RAS ενεργοποίηση-απενεργοποίηση

Οι RAS είναι πρωτεΐνες μεταγωγής που είναι ενεργές όταν συνδέονται με τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP) και ανενεργές όταν συνδέονται με διφωσφορική γουανοσίνη (GDP). Αυτός ο κύκλος ενεργοποίησης/απενεργοποίησης ελέγχεται αυστηρά από ρυθμιστικές πρωτεΐνες γνωστές ως παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEF) και πρωτεΐνες ενεργοποίησης GTPάσης (GAP). Οι GEF και οι GAP είναι μεγάλες, με πολλές επικράτειες πρωτεΐνες, ικανές για ποικιλία αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες, λιπίδια και ρυθμιστικά μόρια που ελέγχουν τα επίπεδα ενεργού και ανενεργού RAS. Πιο συγκεκριμένα, ο ρυθμός αποσύνδεσης του GDP είναι τόσο αργός ($t_{1/2} = 6 \text{ min}$) που επιτρέπει στις Ras πρωτεΐνες να παραμένουν σε ανενεργή κατάσταση μέχρι να υπάρξει σήμα για ανταλλαγή GDP/GTP (Hunter et al., 2015). Εδώ, έρχεται ο ρόλος του GEF που επιταχύνει σημαντικά τον ρυθμό ανταλλαγής

νουκλεοτιδίων. Αντίστοιχα, και ο ρυθμός υδρόλυσης του GTP είναι αρκετά αργός ($t_{1/2} = 16 \text{ min}$), καθιστώντας την αλληλεπίδραση με GAP απαραίτητη για την επιτάχυνση της αντίδρασης (Hunter et al., 2015). Σε αυτό το σημείο, είναι σημαντικό να αναφέρουμε πως η συγγένεια και των δύο νουκλεοτιδίων με την πρωτεΐνη RAS είναι παρόμοια. Επομένως, η εμφάνιση αυξημένων επιπέδων RAS πρωτεΐνης συνδεδεμένη με GTP εξαρτάται αποκλειστικά από την συγκέντρωση των δυο νουκλεοτιδίων στο εσωτερικό των κυττάρων, η οποία είναι συνήθως δέκα φορές υψηλότερη για το GTP σε σύγκριση με το GDP (Simanshu et al., 2017).

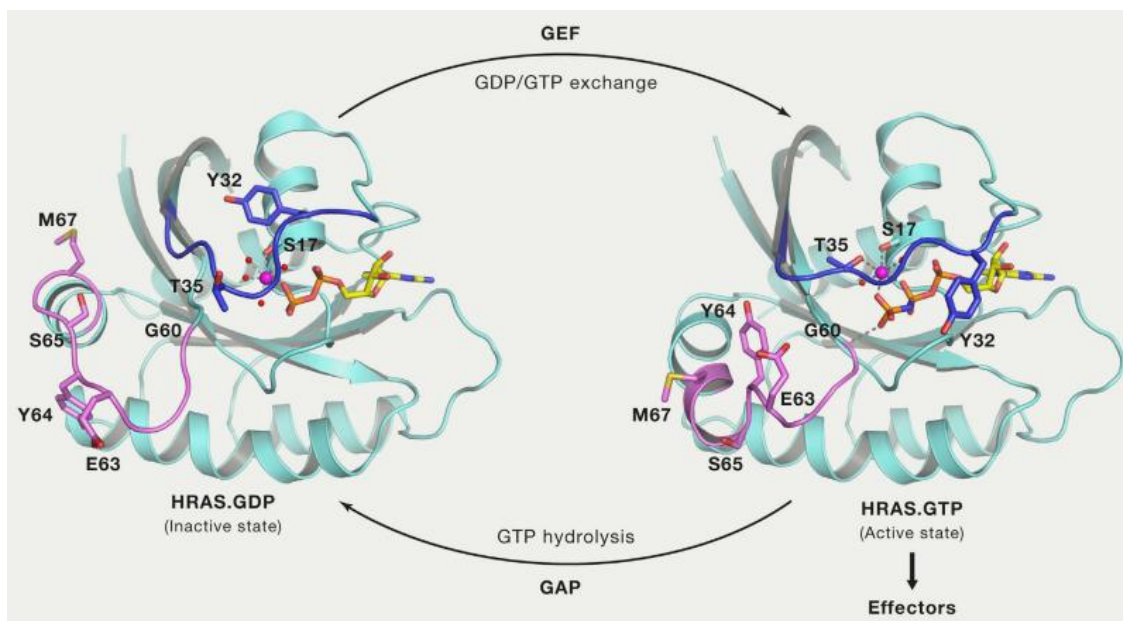


Figure 2: Απεικονίζει τις αλλαγές διαμόρφωσης της RAS όταν μεταβαίνει από ανενεργή κατάσταση (σύνδεσης GDP) σε ενεργή κατάσταση (σύνδεσης GTP). Οι περιοχές διακόπτη I και διακόπτη II είναι χρωματισμένες μπλε και μωβ αντίστοιχα, και τα άτομα πλευρικής αλυσίδας (Simanshu et al., 2017).

1.4. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Απαραίτητο για την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται οι RAS πρωτεΐνες είναι η σύνδεση τους με την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Οι RAS πρωτεΐνες συνδέονται στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης μέσω των C-τελικών άκρων τους και συγκεκριμένα της HRV περιοχής τους αφού πρώτα δεχτούν λιπιδιακές τροποποιήσεις. Οι βασικές λιπιδιακές τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα και επιτρέπουν με αυτόν τον τρόπο την αγκυροβόληση των πρωτεϊνών στην μεμβράνη είναι η φαρνεσυλίωση (prenylation) και η παλμιτοϋλίωση (palmitoylation). Η φαρνεσυλίωση πρόκειται για την προσθήκη φαρνεσυλομάδας στο τελικό κατάλοιπο κυστεΐνης στο μοτίβο CaaX (όπου το a είναι ένα αλειφατικό αμινοξύ ενώ το X μπορεί να είναι οποιοδήποτε αμινοξύ) (Hancock et al., 1989). Μετά από αυτή την διαδικασία ακολουθεί πρωτεολυτική αποκοπή - διάσπαση των υπολειμμάτων -aaX από το RCE1 (Boyartchuk et al., 1997) και μεθυλίωση της κυστεΐνης από το ICMT (ισοπρενυλοκυστεΐνη καρβοξυμεθυλοτρανσφεράση) (Dai et al., 1998). Παλμιτοϋλίωση

υφίστανται οι HRAS και NRAS, αλλά όχι η KRASb η οποία ωστόσο έχει μια περιοχή πλούσια σε λυσίνη που έλκεται από τα αρνητικά φορτισμένα λιπίδια της μεμβράνης (Zhou & Hancock, 2018). Η παλμιτοϋλίωση των RAS πρωτεϊνών συμβαίνει στο σύμπλεγμα Golgi, το οποίο σημαίνει πως οι HRAS και NRAS ισομορφές μεταφέρονται στην μεμβράνη από το Golgi μέσω κυστιδίων (Swarthout et al., 2005), ενώ αντίθετα η KRASb μεταφέρεται απευθείας στην πλασματική μεμβράνη χωρίς να περνά από το Golgi (Hancock et al., 1991).

1.5. Υποκυτταρικός εντοπισμός

Όπως αναφέρεται παραπάνω (ενότητα 1.2), η κάθε ισομορφή RAS πρωτεΐνης φέρει δική της μοναδική HRV περιοχή. Επομένως, είναι αναμενόμενο η κάθε μια να κατανέμεται σε διαφορετικές περιοχές της μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα, οι HRAS και NRAS προτιμούν λιπιδιακά μικροπεριβάλλοντα (lipid microdomains) πλούσια σε χοληστερόλη (Vogel et al., 2009). Από την άλλη, η KRASb προτιμά liquid-disordered περιοχές (Weise et al., 2011). Οι διαφορές αυτές στην θέση σύνδεσης της μεμβράνης είναι υπεύθυνες για την σηματοδοτική εξειδίκευση της κάθε ισομορφής.

Σχετικά με την ρύθμιση της σύνδεσης έχει βρεθεί πως η φωσφορυλίωση της KRASb στη σερίνη 181 από την PKC μειώνει την συγγένεια της πρωτεΐνης με την πλασματική μεμβράνη και προκαλεί συσσώρευση στις ενδομεμβράνες (Ballester et al., 1987). Επίσης, η Ca^{+2} /calmodulin είναι ικανή να απελευθερώνει την KRASb από την μεμβράνη και να την καθοδηγεί στις ενδομεμβράνες μέσω του μεταφορέα PDEd, ο οποίος είναι ικανός να μεταφέρει πρωτεΐνες της οικογένειας RAS από την μεμβράνη στο εσωτερικό του κυττάρου και αντίστροφα (Fivaz & Meyer, 2005; Schmick et al., 2014). Η εξάντληση του PDEd οδηγεί σε εσφαλμένο εντοπισμό της RAS και κατά συνέπεια σε εξασθενημένη σηματοδότηση. Επιπλέον, μελέτες NMR έχουν δείξει πως και ο G-domain των RAS πρωτεϊνών μπορεί να έρθει σε επαφή με την πλασματική μεμβράνη. Μάλιστα, η θέση και ο προσανατολισμός του εξαρτάται από το ποιο νουκλεοτίδιο είναι συνδεδεμένο με την πρωτεΐνη. Έτσι, διαμορφώνονται δύο μοντέλα GTP-bound για την KRAS4b. Στο πρώτο μοντέλο, η περιοχή σύνδεσης με effectors της πρωτεΐνης είναι αποκρυμμένη και δεν επιτρέπει την αλληλεπίδραση με effectors, ενώ στο δεύτερο μοντέλο η περιοχή αυτή είναι εκτεθειμένη και ικανή να αλληλοεπιδράσει με effectors (Jang et al., 2016; Mazhab-Jafari et al., 2015; Prakash et al., 2016).

Από όλα τα παραπάνω, συμπεραίνουμε πως οι RAS πρωτεΐνες δεν είναι στατικές στην μεμβράνη, αλλά η τοπολογία τους υποδηλώνει την κατάσταση τους. Ειδικότερα, όταν οι RAS πρωτεΐνες βρίσκονται σε λειτουργική κατάσταση εντοπίζονται στην εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης, ώστε να αλληλοεπιδρούν με υποδοχείς και σηματοδοτικά μόρια. Αντίθετα, όταν βρίσκονται σε ανενεργή ή ενδιάμεση κατάσταση εντοπίζονται σε εσωτερικά διαμεμβρανικά διαμερίσματα ή ακόμα και στο κυτταρόπλασμα. Τέτοιες περιπτώσεις παρατηρούνται πριν την λιπιδιακή τροποποίηση ή μετά την φωσφορυλίωση. Εντοπισμός των RAS πρωτεϊνών εκτός της

μεμβράνης μπορεί να είναι μηχανισμός αρνητικής ρύθμισης, που δηλώνει τερματισμό σήματος ή σε ορισμένες περιπτώσεις να συνδέεται με παθολογικές καταστάσεις.

1.6. Μονοπάτι RAS – MAPK

Μία από τις βασικές οδούς σηματοδότησης που συμμετέχει η RAS πρωτεΐνη είναι η RAS – MAPK. Το μονοπάτι ξεκινά όταν υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (RTKs), υποδοχείς GPCRs, υποδοχείς κυτοκινών ή υποδοχείς εξωκυτταρικής μήτρας διεγείρονται από αυξητικούς παράγοντες (Rauen, 2013). Η σύνδεση ενός αυξητικού παράγοντα (π.χ. EGF, PDGF) πυροδοτεί την αυτοφωσφορυλίωση RTK και την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη προσαρμογέα GRB2. Στη συνέχεια, η GRB2 συνδέεται με πρωτεΐνες SOS, οι οποίες προσκολλώνται στην πλασματική μεμβράνη. Η SOS, είναι πρωτεΐνη GEF και ενεργοποιεί την RAS, προάγοντας την ανταλλαγή GDP με GTP. Η Ras-GTP στρατολογεί στην πλασματική μεμβράνη και ενεργοποιεί την Raf (MAPKKK), μια κινάση σερίνης/θρεονίνης (Leevers et al., 1994; Stokoe et al., 1994). Στη συνέχεια, η Raf φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις MEKs (MEK1 και/ή MEK2) της κινάσης MAPK (MAPKK), οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις ERKs (ERK1 και/ή ERK2). Τέλος, οι ERKs μετακινούνται στον πυρήνα. Τα υποστρώματα ERK είναι μεταγραφικοί παράγοντες, όπως FOS, ELK1, JUN, ETS1 και πρωτεϊνικές κινάσες (κινάσες S6, MAPKAPKs), οι οποίες ελέγχουν την έκφραση γονιδίων για ζωτικές κυτταρικές λειτουργίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση. Το μονοπάτι RAS-MAPK είναι ιδιαίτερα μελετημένο διότι μεταλλάξεις που μπορούν να το επηρεάσουν, οδηγούν σε συνεχή, ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του, κάτι που παρατηρείται σε πολλούς τύπους καρκίνου και συμβάλλει στην προώθηση όγκων.

1.7. Μονοπάτι RAS-PI3K

Η οδός φωσφατιδυλνισιτόλης 3 κινάσης (PI3K) είναι ο δεύτερος καλύτερα μελετημένος τελεστής Ras και συμμετέχει στη ρύθμιση ενός ευρέος φάσματος κυτταρικών δραστηριοτήτων, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της μετανάστευσης και της απόπτωσης. Και σε αυτή την περίπτωση προηγείται η ίδια διαδικασία μέχρι την ενεργοποίηση της Ras πρωτεΐνης (ενότητα 1.6). Η ενεργή Ras-GTP αλληλεπιδρά με και ενεργοποιεί την λιπιδιακή κινάση PI3K. Η PI3K, με την σειρά της, φωσφορυλιώνει το μεμβρανικό λιπίδιο PIP2 και το μετατρέπει σε PIP3. Το PIP3 δίνει σήμα και στρατολογεί στην μεμβράνη την Akt (Πρωτεϊνική κινάση B, PKB) και την PDK1 (Κινάση 1 εξαρτώμενη από φωσφατιδυλνισιτόλη) (Singh, 2015). Η PDK1 και η mTORC2 φωσφορυλιώνουν την Akt σε δύο θέσεις προκαλώντας την πλήρη ενεργοποίηση της. Η Akt έχει πολλούς στόχους που ρυθμίζουν διαδικασίες όπως η επιβίωση, η ανάπτυξη και ο αναβολικός μεταβολισμός. Πιο συγκεκριμένα, η Akt αναστέλλει την απόπτωση καθώς φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την Bad, μια προ-αποπτωτική πρωτεΐνη της οικογένειας Bcl-2 ενώ ταυτόχρονα ενισχύει την έκφραση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών. Επίσης, η Akt ενεργοποιεί την mTORC1 μέσω καταστολής της TSC1/2, η οποία προάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών και την κυτταρική ανάπτυξη.

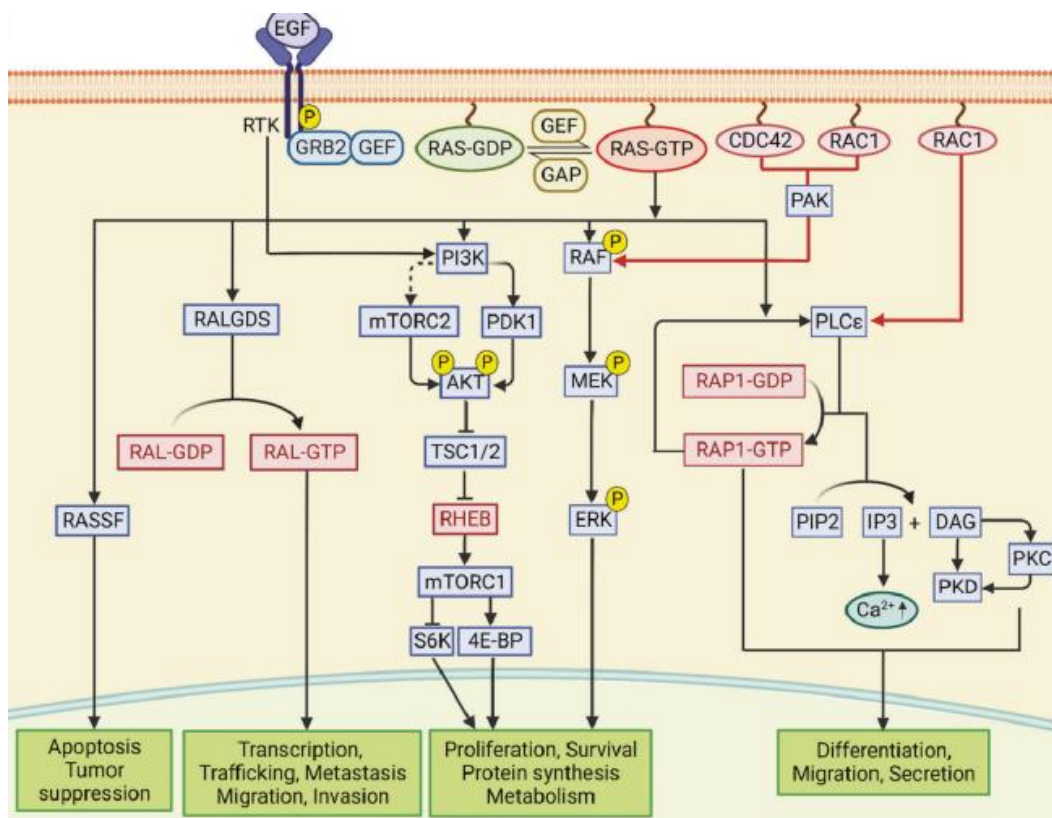


Figure 3 Απεικονίζονται όλα τα σηματοδοτικά μονοπάτια που συμμετέχει η υποοικογένεια Ras. Συγκεκριμένα φαίνονται οι οδοί σηματοδότησης RAS-RAF-MEK-ERK, RAS-PI3K-AKT, RAS-RALGDS-RAL, RAS-PLC, RAS-RASSF, η διασταύρωση μεταξύ Ras και άλλων μικρών GTPασών, συμπεριλαμβανομένων των CDC42, RAC1 και RAP1, οι RHEB και RAL επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα (Yin et al., 2023).

1.8. RAS και καρκίνος

Μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν RAS πρωτεΐνες συνδέονται άμεσα με την ανάπτυξη πολλών τύπων καρκίνου, καθώς οδηγούν σε μόνιμη ενεργοποίησή τους και ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Πιο συγκεκριμένα, τέτοιες μεταλλάξεις εμφανίζονται περίπου σε 30% των ανθρώπινων καρκίνων, και σε ακόμη υψηλότερες συχνότητες σε καρκίνους του παγκρέατος (90%), του πνεύμονα (35%), του θυρεοειδούς αδένος (55%), του παχέος εντέρου (45%) και του ήπατος (30%). Συχνότερα, οι μεταλλάξεις αφορούν την ισομορφή KRAS (85%) και πολύ λιγότερο την NRAS (12%) και την HRAS (3%). Οι περισσότερες μεταλλάξεις RAS εμφανίζονται στα κωδικόνια Gly12 (G12), Gly13 (G13) ή Gln61 (Q61). Η αντικατάσταση της γλυκίνης στα κωδικόνια 12 ή 13 από οποιοδήποτε αμινοξύ εκτός της προλίνης θεωρείται ότι παρουσιάζει ένα στερεοχημικό μπλοκάρισμα που εμποδίζει τον δάκτυλο αργινίνης της GAP να εισέλθει στη θέση GTPάσης και να προωθήσει την υδρόλυση (Scheffzek et al., 1997). Επίσης, η γλουταμίνη 61 είναι μέρος του μηχανισμού υδρόλυσης GTP, επομένως οι μεταλλάξεις σε αυτό το κατάλοιπο καταστρέφουν τόσο την εγγενή, όσο και την GAP-μεσολαβούμενη υδρόλυση GTP. Την ίδια στιγμή, εμφανίζονται μεταλλάξεις που μειώνουν τη συγγένεια για τα νουκλεοτίδια, όπως οι μεταλλάξεις στα κωδικόνια 146 (A146) (Edkins & O'Meara, 2006). Τα μεταλλαγμένα

στελέχη A146 και άλλα (π.χ. T158A, R164Q και K176Q) επιτρέπουν στο GDP να αποσυνδεθεί γρήγορα, με αποτέλεσμα την ανώμαλη συσσώρευση RAS στη μορφή GTP. Το τελικό αποτέλεσμα αυτών των μεταλλάξεων είναι η αυξημένη σύνδεση της πρωτεΐνης με GTP και άρα η συνεχής δραστικότητα και ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών όπως το MAPK και PI3K-AKT.

Όπως αναφέρθηκε, στον καρκίνο εμφανίζονται μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12, 13 και 61 που καθιστούν τις πρωτεΐνες RAS ανθεκτικές στα GAPs. Με την ίδια λογική, απώλεια των GAPs λόγω μετάλλαξης ή διαγραφής μπορεί, να οδηγήσει στην ενεργοποίηση του RAS. Αυτό μπορεί να φαίνεται απίθανο, καθώς υπάρχουν τουλάχιστον 14 διαφορετικές μορφές GAPs σε ανθρώπινα κύτταρα (Bernards, 2003). Η απώλεια όμως οποιασδήποτε από αυτές μπορεί να συμβάλει στον καρκινικό φαινότυπο. Η πιο γνωστή μετάλλαξη σε GAP πρωτεΐνη είναι μετάλλαξη απενεργοποίησης (loss-of-function) στο γονίδιο NF1 (Neurofibromin 1) που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη νευροϊνωματίνης. Μάλιστα, στο δεσμοπλαστικό μελάνωμα, η συχνότητα των μεταλλάξεων του NF1 είναι πάνω από 50% (Shain et al., 2015). Η απώλεια νευροϊνωματίνης είναι μία από τις πιο συχνές επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις στο μυξοϊνοσάρκωμα και το πλειομορφικό λιποσάρκωμα (Barretina et al., 2010).

Παράλληλα, το γονίδιο RASA1 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p120 RasGAP, η οποία συνδέεται με ενεργοποιημένες RTKs, όπως η PDGFR, μέσω των SH2 περιοχών της και πιθανώς απενεργοποιεί τις πρωτεΐνες RAS που σχετίζονται με αυτούς τους υποδοχείς. Η πρωτεΐνη p120 RasGAP σχηματίζει επίσης ένα σύμπλεγμα με την πρωτεΐνη RhoGAP p190 (Settleman et al., 1992), η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο ARHGAP5, γεγονός που εγείρει την πιθανότητα η απώλεια της πρωτεΐνης RASA1 να οδηγεί στην ενεργοποίηση τόσο των πρωτεϊνών Rho όσο και των πρωτεϊνών RAS. Αυτό το γονίδιο μεταλλάσσεται αρκετά συχνά σε ανθρώπινους καρκίνους. (Campbell et al., 2016). Ενώ οι σωματικές μεταλλάξεις και οι διαγραφές σε NF1, SPRED1, RASA1 και RASA2 των RasGAP αποκαλύπτουν σημαντικούς ρόλους στον καρκίνο, η απώλεια έκφρασης μέσω επιγενετικής σίγησης των RasGAPs DAB2IP και RASAL2 (McLaughlin et al., 2013) συμβάλλει άμεσα στον μεταστατικό καρκίνο του μαστού και στον καρκίνο του προστάτη. Αυτές οι ασθένειες είναι αξιοσημείωτες για την απουσία συχνών μεταλλάξεων στα ίδια τα γονίδια RAS. Στον καρκίνο του προστάτη, η απώλεια της έκφρασης DAB2IP οδηγεί σε συντονισμένη ενεργοποίηση του RAS και του πυρηνικού παράγοντα κB (NF-κB) (Min et al., 2010), ενώ στους καρκίνους του μαστού, η ταυτόχρονη απώλεια των DAB2IP και RASAL2 οδηγεί σε εισβολή, EMT και μετάσταση (Olsen et al., 2016).

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της Ras πρωτεΐνης στα καρκινικά κύτταρα, εξαρτάται από το είδος της καρκινικής κυτταρικής σειράς. Συχνά, η ίδια εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη, καθώς οι περισσότερες μεταλλάξεις την καθιστούν διαρκώς ενεργή (Nandan & Sivaraman, 2025). Ωστόσο, σε άλλες περιπτώσεις η RAS μπλοκάρεται στο κυτταρόπλασμα και απαιτείται η χρήση αυξητικού παράγοντα για να μεταβεί στην μεμβράνη (Damalas et al., 2022).

1.9. Σηματοδότηση RAS και EMT

Η EMT (Epithelial–Mesenchymal Transition) είναι μια βιολογική διαδικασία κατά την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν τις ιδιότητες τους και αποκτούν μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά. Οι βασικές φαινοτυπικές αλλαγές που επέρχονται με την EMT είναι απώλεια συνδέσεων κυττάρου-κυττάρου, αναδιοργάνωση κυτταροσκελετού, απώλεια πολικότητας, έκκριση πρωτεϊνών (π.χ. fibronectin), απόκτηση αυξημένης κινητικότητας, διεισδυτικότητας και ανθεκτικότητας στην απόπτωση, αύξηση έκφρασης μεσεγχυματικών δεικτών όπως βιμεντίνη και N-καδερίνη και μείωση έκφρασης επιθηλιακών δεικτών όπως E-καδερίνη. Η EMT παίζει σημαντικό ρόλο στην μετάσταση του καρκίνου και φαίνεται να είναι στενά συνδεδεμένη με την RAS σηματοδότηση. Όπως αναλύεται παραπάνω, η Ras ενεργοποιείται μέσω υποδοχέων τυροσινικής κινάσης (RTKs), οι οποίοι διεγείρονται από αυξητικούς παράγοντες. Μετά την ενεργοποίησή της, η Ras κινητοποιεί κυρίως τις οδούς RAF–MEK–ERK και PI3K–AKT, οι οποίες επάγουν την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων όπως Snail, Slug, Twist και ZEB1/2 που ενεργοποιούν την EMT. Κεντρικό ρόλο παίζει επίσης ο μεταγραφικός παράγοντας FRA1, που ενεργοποιείται από την οδό ERK. Ο FRA1 συνεργάζεται με τους μεταγραφικούς παράγοντες ZEB και TWIST για να ενισχύσει την κυτταρική κινητικότητα, την εισβολή και την αντοχή στην απόπτωση (Diesch et al., 2014). Παράλληλα, η Ras συνεργάζεται με το μονοπάτι TGF-β/Smad, ενισχύοντας περαιτέρω την επαγωγή της EMT μέσω πρωτεϊνών όπως ο Snail (Shields et al., 2013) και μέσω ενεργοποίησης GTPασών (Rho, Rac) (Lu et al., 2016). Η διαδικασία αυτή ρυθμίζεται επιπλέον από microRNAs, τα οποία λειτουργούν ως “διακόπτες” της EMT σε πολλούς καρκίνους που αφορούν Ras μεταλλάξεις. Για παράδειγμα, η απώλεια του let-7 οδηγεί σε υπερέκφραση του K-Ras (Saridaki et al., 2014), ενώ η καταστολή του miR-134 ή του miR-630 έχει βρεθεί ότι προάγει την EMT μέσω της οδού Ras/PI3K/AKT (Feng et al., 2017; Liu et al., 2015). Συμπερασματικά, η ενεργοποίηση της Ras καθιστά τα καρκινικά κύτταρα πιο πλαστικά, επιτρέποντάς τους να προσαρμόζονται στο μικροπεριβάλλον, να διαφεύγουν του ανοσοποιητικού συστήματος, να αποκτούν μεταστατική ικανότητα και να αντιστέκονται στις θεραπείες. Έτσι, η EMT αποτελεί ένα κρίσιμο στάδιο στην καρκινογένεση, το οποίο ενισχύεται άμεσα από την οδό Ras και τους πολλαπλούς μηχανισμούς ρύθμισής της.

Ένας πρωτεϊνικός παράγοντας που σχετίζεται με την ρύθμιση της σηματοδότησης Ras είναι η καβεολίνη-1.

2. Καβεολίνη-1 (CAV-1)

Η καβεολίνη-1 είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 21-24 kDa, με χαρακτηριστική δομή φουρκέτας η οποία ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών καβεολίνες (Kaya et al., 2021). Η οικογένεια των καβεολινών περιλαμβάνει την καβεολίνη-1, την καβεολίνη-2 και την καβεολίνη-3. Με εξαίρεση την καβεολίνη-3 η οποία εκφράζεται κυρίως στα μυϊκά κύτταρα, τα υπόλοιπα δυο μέλη εκφράζονται σε πολλούς άλλους τύπους κυττάρων (de Almeida, 2017). Η καβεολίνη-1

αποτελεί την κύρια δομική πρωτεΐνη των λεγόμενων caveolae, τα οποία είναι εγκολπώσεις της πλασματικής μεμβράνης, πλούσιες σε σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη που φτάνουν σε μέγεθος τα 50-100 nm (Volonte & Galbiati, 2020). Παράλληλα, η καβεολίνη-1 εντοπίζεται και ενδοκυτταρικά στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο, στο σύστημα Golgi, στα εκκρινόμενα από το Golgi κυστίδια και στα μιτοχόνδρια, ενώ υπάρχει και ελεύθερη στο κυτταρόπλασμα αλλά και σε εκκρινόμενη μορφή (Filippini & D'alessio, 2020).

2.1. Δομή της πρωτεΐνης

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την καβεολίνη-1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7 στην θέση 7q31.2 και μετά την έκφραση του δίνει μία πρωτεΐνη με τέσσερις επικράτειες: το N-τελικό άκρο, το Scaffolding domain, το Membrane-spanning domain και το C-τελικό άκρο. Το N-τελικό άκρο (αμινοξέα 1-60) βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και περιέχει θέσεις για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και σήματα για μεταφορά στο Ενδοπλασματικό δίκτυο (Volonte & Galbiati, 2020). Η περιοχή Scaffolding domain (αμινοξέα 61-101) είναι υπεύθυνη για αλληλεπιδράσεις με σηματοδοτικές πρωτεΐνες, όπως η RAS. Ειδικότερα, αναγνωρίζει το αμινοξικό μοτίβο ΦΧΧΦΧΧΧΦ (Χ= οποιοδήποτε αμινοξύ, Φ= αρωματικό αμινοξύ) σε άλλες πρωτεΐνες και αλληλοεπιδρά με αυτές (Couet et al., 1997). Η περιοχή Membrane-spanning domain (αμινοξέα 102-134) δημιουργεί μια υδρόφοβη θηλιά που εισχωρεί στη μεμβράνη χωρίς να τη διαπερνά πλήρως. Ουσιαστικά, αγκυροβολεί τμήμα της πρωτεΐνης στην πλασματική μεμβράνη με τα δύο άκρα της (N-άκρο και C-άκρο) να βρίσκονται στραμμένα στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 4). Τέλος, το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης περιέχει θέσεις παλμιτοϋλίωσης και θέσεις που βοηθούν την πρόσδεση στην μεμβράνη (Schlegel & Lisanti, 2000).

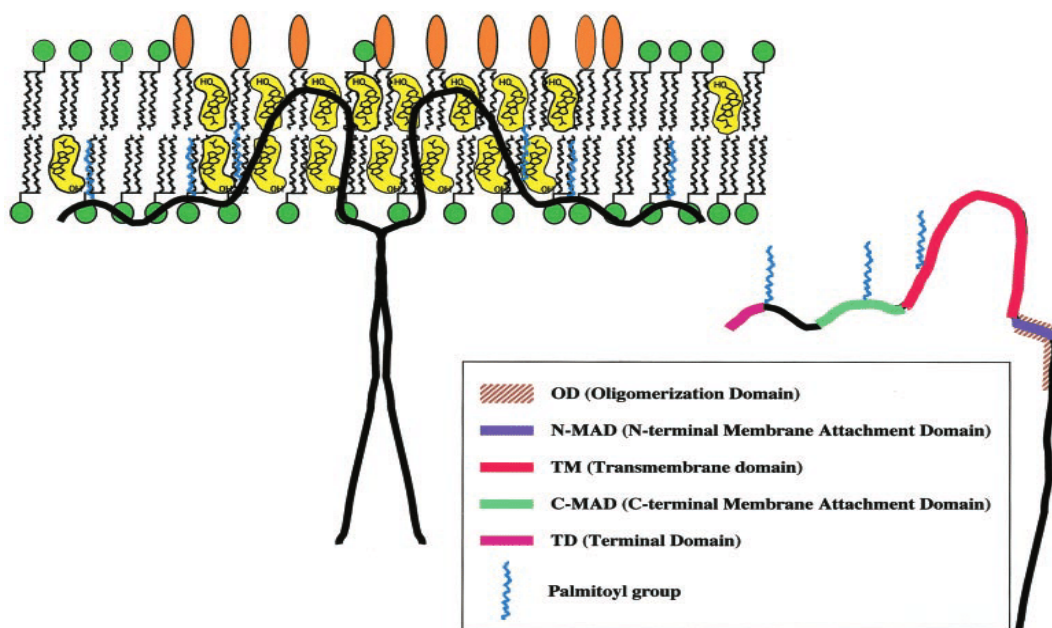


Figure 4: Απεικονίζει την δομή της καβεολίνης-1 στην πλασματική μεμβράνη (Woodman et al., 2002).

2.2. Βιολογικοί ρόλοι της καβεολίνης-1

Η καβεολίνη-1 είναι κυρίως γνωστή ως η βασική πρωτεΐνη των caveolae στην πλασματική μεμβράνη. Ωστόσο, η ίδια έχει διάφορους βιολογικούς ρόλους μέσα στο κύτταρο και εμπλέκεται σε πολλές διεργασίες. Οι ρόλοι της καβεολίνης-1 είναι άμεσα συνδεδεμένοι με την υποκυτταρική της θέση καθώς πέρα από την πλασματική μεμβράνη η ίδια εντοπίζεται και σε άλλες μεμβράνες όπως του Ενδοπλασματικού Δικτύου, του Συμπλέγματος Golgi, των μιτοχονδρίων, των λυσοσωμάτων και των εξοκυτταρικών και ενδοκυτταρικών κυστιδίων.

2.2.1. Δημιουργία Caveolae

Όπως αναφέρθηκε συνοπτικά παραπάνω, βασικός ρόλος της καβεολίνης-1 είναι η δημιουργία των caveolae που αποτελούν εσοχές της πλασματικής μεμβράνης, έχουν χαρακτηριστικό σχήμα που μοιάζει με το γράμμα ω και έχουν μέγεθος 50-100 nm (Volonte & Galbiati, 2020). Η ανάπτυξη της τεχνολογίας του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου βοήθησε σημαντικά στην ανακάλυψή τους, πρώτα σε ενδοθηλιακά κύτταρα της καρδιάς και στη συνέχεια σε μια πληθώρα κυττάρων (Peters et al., 1985). Επιπλέον, τα caveolae αποτελούνται από σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη (Lajoie & Nabi, 2010). Για την δημιουργία των caveolae η καβεολίνη-1 αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες όπως οι cavin (cavin1-PRTF, cavin2-SDPR, cavin3-SRBC, cavin4-MURC), και με λιπίδια της μεμβράνης, προάγοντας την καμπυλότητα και τον σχηματισμό των χαρακτηριστικών εγκολπώσεων. Η δημιουργία των caveolae ολοκληρώνεται με τη βοήθεια κάποιων πρωτεϊνών συνεργών όπως η PACSIN2 (Syndapin II), η ATPase Eps-15 homology domain 2 (EHD2) και ο ορφανός υποδοχέας με δράση κινάσης τυροσίνης 1 (Lamaze et al., 2017). Ο ρόλος των caveolae είναι να λειτουργούν σαν «πλατφόρμες» σηματοδότησης καθώς η καβεολίνη-1 συνδέεται με μόρια σηματοδότησης όπως G-πρωτεΐνες, υποδοχείς τυροσινικής κινάσης, eNOS (ένζυμο της νιτρικής οξειδίου συνθετάσης), μέσω ειδικών αλληλεπιδράσεων με το scaffolding domain της (Couet et al., 1997).

2.2.2. Ρύθμιση ομοιόστασης χοληστερόλης

Ένας ακόμη σημαντικός ρόλος της καβεολίνης-1 φαίνεται να είναι αυτός στην ομοιόσταση της χοληστερόλης. Φαίνεται πως η καβεολίνη-1 δρα ως αισθητήρας των επιπέδων χοληστερόλης του κυττάρου, αλλά με τη σειρά της και η ίδια η χοληστερόλη ρυθμίζει τα επίπεδα της καβεολίνης-1. Αρχικά, η καβεολίνη-1, μέσω μιας αμινοξικής αλληλουχίας που φέρει στην επικράτεια CSD, έχει την ικανότητα να δεσμεύει την νεοσυντιθέμενη χοληστερόλη (Murata et al., 1995) από το Ενδοπλασματικό Δίκτυο και να την μεταφέρει στην πλασματική μεμβράνη, όπου θα αξιοποιηθεί για την δημιουργία των εγκολπώσεων (Smart et al., 1994). Σε in vivo μελέτες που έγιναν σε νεφρικά κύτταρα ποντικών μετά από σίγηση της καβεολίνης-1 παρατηρήθηκε μειωμένη χοληστερόλη σε λιπιδιακά σωμάτια (Le Lay et al., 2006) επιβεβαιώνοντας τον ρόλο της καβεολίνης-1 στην ενδοκυτταρική μεταφορά της χοληστερόλης. Εκτός όμως από την

ενδοκυτταρική μεταφορά της χοληστερόλης, η καβεολίνη-1 ρυθμίζει και την εκκροή χοληστερόλης από το κύτταρο μέσω αλληλεπίδρασης με ApoA1 και ABCA1 (P. E. Fielding & Fielding, 1995). Με την σειρά της η χοληστερόλη ρυθμίζει τα επίπεδα καβεολίνης-1 στα κύτταρα. Αυτό συμβαίνει καθώς η διαθέσιμη χοληστερόλη είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό των caveolae. Έτσι, χωρίς επαρκή χοληστερόλη, η καβεολίνη-1 δεν μπορεί να σταθεροποιηθεί στη μεμβράνη και είτε αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα είτε παραμένει εγκλωβισμένη στο Ενδοπλασματικό δίκτυο χωρίς να ωριμάσει σωστά (Pol et al., 2005). Παράλληλα, η χοληστερόλη μπορεί να ρυθμίσει τα επίπεδα καβεολίνης-1 στο κύτταρο σε μεταγραφικό στάδιο. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες έδειξαν πως τα επίπεδα mRNA της καβεολίνης-1 αυξήθηκαν μετά από χορήγηση Low Density Lipoprotein (LDL), ενώ στον υποκινητή της βρέθηκαν δύο αλληλουχίες που μοιάζουν με στοιχεία ρυθμιζόμενα από στερόλες (Bist et al., 1997). Αντίστοιχα, μετά από μείωση των επιπέδων ελεύθερης χοληστερόλης μέσω οξείδωσής, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων mRNA της καβεολίνης-1 (C. J. Fielding et al., 1997). Αυτό δείχνει ότι αλλαγές στα επίπεδα της ελεύθερης χοληστερόλης επηρεάζουν τα επίπεδα καβεολίνης-1 στο κύτταρο.

2.2.3. Ρύθμιση μιτοχονδριακής λειτουργίας

Ταυτόχρονα, η καβεολίνη-1 εμπλέκεται στην ρύθμιση της σωστής λειτουργίας των μιτοχονδρίων. Ένας τρόπος με τον οποίο γίνεται αυτό είναι η ρύθμιση των επιπέδων χοληστερόλης, τα οποία είναι σημαντικά για την ρύθμιση της δράσης και της ευαισθησίας των μιτοχονδρίων σε απόπτωση. Έρευνες έδειξαν πως η απώλεια της καβεολίνης-1 αυξάνει τη μιτοχονδριακή ευπάθεια στην απόπτωση, λόγω συσσώρευσης της χοληστερόλης και άρα διαταραχές στη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Marí et al., 2006). Την ίδια στιγμή, η απώλεια της καβεολίνης-1 έχει συνδεθεί με αυξημένη παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια, που μπορεί να οδηγήσει σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και κυτταρική γήρανση (Bosch et al., 2011).

2.2.4. Συμμετοχή σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η καβεολίνη-1 δεν αποτελεί απλώς μία δομική πρωτεΐνη της πλασματικής μεμβράνης, αλλά λειτουργεί ως καίριος ρυθμιστής σηματοδότησης, δρώντας είτε ενισχυτικά είτε ανασταλτικά, ανάλογα με το εκάστοτε μόριο-στόχο. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ενδοθηλιακή συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS). Έχει αποδειχθεί πως η καβεολίνη-1 δρα ως ενδογενής αναστολέας της eNOS, σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα τόσο *in vitro* (Ju et al., 1997), όσο και *in vivo*, όπου ποντίκια χωρίς έκφραση καβεολίνης-1 εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα eNOS (Razani et al., 2001). Επιπλέον, η καβεολίνη-1 αναστέλλει τη δράση της κινάσης τυροσίνης c-SRC, δεσμεύοντάς την σε ανενεργή μορφή (Li et al., 1996). Παράλληλα, επηρεάζει και υποδοχείς με δράση κινάσης, όπως ο υποδοχέας του επιδερμικού παράγοντα αύξησης (EGFR), με τον οποίο αλληλεπιδρά μέσω της επικράτειας CSD, εμποδίζοντας τη δραστηριότητα της κινάσης τυροσίνης που διαθέτει

(Kornbluth et al., 1987). Η καβεολίνη-1 έχει επίσης ρόλο στην αναστολή των ετεροτριμερών GPCRs, δεσμεύοντας την α -υπομονάδα τους και σταθεροποιώντας τους σε ανενεργή κατάσταση (Jones et al., 2001). Παρόλα αυτά, η λειτουργία της δεν είναι μόνο ανασταλτική. Σε ορισμένες περιπτώσεις δρα θετικά, όπως στον υποδοχέα ινσουλίνης (IR) και στον υποδοχέα οιστρογόνων (ER). Συγκεκριμένα, έχει φανεί ότι μέσω της επικράτειας CSD ενισχύει τη δραστικότητα κινάσης του IR (Yamamoto et al., 1998), ενώ στην περίπτωση του υποδοχέα οιστρογόνων α (ER α) διευκολύνει τη μεταφορά του στον πυρήνα ανεξάρτητα από προσδέτη, προάγοντας τη σηματοδοτική του λειτουργία (Schlegel et al., 1999).

2.3. Καβεολίνη-1 στα καρκινικά κύτταρα MDA-MB 231

Η καβεολίνη-1 στα καρκινικά κύτταρα έχει διττό ρόλο καθώς έχει αναφερθεί ότι επηρεάζει τόσο θετικά όσο και αρνητικά διάφορες πτυχές της εξέλιξης του όγκου. Ο διττός της ρόλος εξαρτάται από το στάδιο του όγκου, τον ιστό προέλευσης και το μικροπεριβάλλον. Στα καρκινικά κύτταρα MDA-MB 231, στα οποία εστιάζει το ενδιαφέρον της αυτή η εργασία φαίνεται να υπάρχει υψηλότερη έκφραση καβεολίνης-1 σε σχέση με άλλες κυτταρικές σειρές (Xiao et al., 2022). Τα αυξημένα επίπεδα καβεολίνης-1 προσδίδουν στα κύτταρα αντίσταση στην απόπτωση απενεργοποιώντας την κασπάση-8, με ταυτόχρονη ενεργοποίηση οδών επιβίωσης κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των PI3K/Akt και MEK/ERK. Αυτό εξηγεί την χημειοανθεκτικότητα που εμφανίζουν τα κύτταρα. Μελέτες έδειξαν πως σε MDA-MB 231 κύτταρα με σίγηση της καβεολίνης-1 απαιτήθηκε μικρότερη δόση ακτινοβολίας για την θεραπεία από ότι σε κύτταρα με ενεργή καβεολίνη-1 (Fiucci et al., 2002). Η καβεολίνη-1 επίσης, φαίνεται να λειτουργεί ως ρυθμιστής της μετάστασης, καθώς ενεργοποιεί τον Rab5 έναν παράγοντα ενδοσωμικής μεταφοράς, αυξάνοντας τη μετάσταση των κυττάρων (Díaz et al., 2014). Την ίδια στιγμή, τα MDA-MB-231 εκκρίνουν κυστίδια πλούσια σε καβεολίνη-1, που περιέχουν μόρια όπως tenascin-C (πρωτεΐνη του εξωκυττάριου χώρου ECM) και Cyr61, τα οποία ενισχύουν την εισβολή άλλων κυττάρων (Campos et al., 2019). Τα εξωσώματα με καβεολίνη-1 ενισχύουν την προσκόλληση καρκινικών κυττάρων σε απομακρυσμένους ιστούς όπως τον πνεύμονα, μέσω αλλαγής του προμεταστατικού μικροπεριβάλλοντος (PMN) (Y. Wang et al., 2023). Συμπερασματικά, η καβεολίνη-1 στα MDA-MB 231 δρα κυρίως ως προαγωγικός παράγοντας επιθετικότητας και μετάστασης, ενώ συμμετέχει στη ρύθμιση μονοπατιών επιβίωσης και στην αντίσταση σε θεραπείες. Ο ακριβής ρόλος της μπορεί να εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες και από το μικροπεριβάλλον του όγκου.

2.4. Συσχέτιση της καβεολίνης-1 με την RAS πρωτεΐνη

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω (ενότητα 2.1), η καβεολίνη-1 μέσω της επικράτειας CSD που έχει, μπορεί να αλληλεπιδράσει και να δεσμεύσει την ενεργή μορφή της RAS πρωτεΐνης (RAS-GTP) στην εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης (Couet et al., 1997). Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να ενεργοποιήσει προσωρινά μονοπάτια που προάγει η RAS όπως τα MAPK/ERK

και PI3K/Akt. Παράλληλα, η ενεργοποίηση της οδού MAPK/ERK από την RAS μειώνει μεταγραφικά τη δραστικότητα του υποκινητή της καβεολίνης-1 (Engelman et al., 1997), κάτι που οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα καβεολίνης-1 και απουσία caveolae (Koleske et al., 1995). Σχετικά με την καβεολίνη-1 και τον υποκυτταρικό εντοπισμό της RAS, φαίνεται πως η υψηλή καμπυλότητα σχετίζεται με αυξημένη παρουσία H-RAS στην PM. Μάλιστα, σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7, επίδραση με τον αυξητικό παράγοντα TGF- β , ο οποίος αυξάνει την θετική καμπυλότητα της μεμβράνης, έδειξε μεγάλη συγκέντρωση της H-RAS στην μεμβράνη των κυττάρων (Damalas et al., 2022). Από την άλλη σε ινοβλάστες εμβρύου ποντικού, κύτταρα που εκφράζουν την αρνητική μορφή καβεολίνης-1, CavDGV, η οποία δρα ως αναστολέας και μειώνει την αριθμό των caveolae, η H-RAS δεν εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη, ανεξάρτητα από την παλμιτοϋλίωση (Damalas et al., 2022). Συμπερασματικά, η θέση της RAS στο κύτταρο είναι άμεσα συνδεδεμένη με την καμπυλότητα της πλασματικής μεμβράνης η οποία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την καβεολίνη-1 και των αριθμό των caveolae.

3. Δοξορουβικίνη

Τα αντικαρκινικά φάρμακα ανάλογα με την δράση τους διακρίνονται σε αλκυλιωτικούς παράγοντες, αντιμεταβολίτες, αναστολείς τοποϊσομεράσης, αναστολείς μιτωτικής ατράκτου και άλλα (Dallavalle et al., 2020). Η δοξορουβικίνη ανήκει στην κατηγορία των αναστολέων της τοποϊσομεράσης II και είναι ένα από τα ανθρακυκλινικά αντιβιοτικά. Φάρμακα σαν αυτά προκαλούν θραύσεις στους κλώνους του DNA και εμποδίζουν τη δράση των τοποϊσομερασών που εμπλέκονται στην διαδικασία αντιγραφής του DNA και στη διαδικασία μεταγραφής (Bukowski et al., 2020). Η δοξορουβικίνη έχει αποδειχθεί ότι έχει σημαντικό θεραπευτικό δυναμικό και θεωρείται ένα από τα πιο αποτελεσματικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα για τη θεραπεία διαφόρων καρκίνων όπως ο καρκίνος του μαστού, σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA).

3.1. Μηχανισμοί δράσης δοξορουβικίνης

Αν και ο πιο διαδεδομένος μηχανισμός δράσης της DOX είναι η πρόκληση βλαβών στο DNA (μέσω αναστολής της τοποϊσομεράσης II και παρεμβολής στο DNA), η ίδια φαίνεται να έχει πολλαπλούς αντικαρκινικούς μηχανισμούς όπως, δημιουργία ελεύθερων ριζών και επαγωγή απόπτωσης.

3.1.1. Πρόκληση βλαβών στο DNA

Πιο αναλυτικά για τον μηχανισμό με τον οποίο η DOX προκαλεί βλάβες στο DNA έχει αποδειχθεί πως όπως και άλλες ανθρακυκλίνες, έτσι και η DOX παρεμβάλλει το DNA μέσω του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου με γουανίνες σε γειτονικά ζεύγη βάσεων GC. Μάλιστα, υπάρχουν ενδείξεις πως με την παρεμβολή της DOX διαστρεβλώνεται η δομή του DNA και δημιουργείται υπερσυστροφή (Zlatanova & Victor, 2009). Παρόλα αυτά αυτός δεν είναι ο κύριος μηχανισμός της DOX, καθώς βασικός μηχανισμός θεωρείται ο "topoisomerase trapping". Το υπερελικωμένο

DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής και την μεταγραφή μπορεί να ξετυλιχθεί και να λειτουργήσει αποτελεσματικά ως πρότυπο για την εισαγωγή θραυσμάτων μονής ή διπλής έλικας (SSBs ή DSBs) από ένζυμα τοποϊσομεράσης τύπου I και II, αντίστοιχα (Kciuk et al., 2020). Το ένζυμο τοποϊσομεράση II είναι πιθανώς ο κύριος στόχος της DOX, ωστόσο η αναστολή της τοποϊσομεράσης I μπορεί επίσης να παίζει ρόλο στην κυτταροτοξικότητα της DOX. Πιστεύεται ότι χαμηλές δόσεις (<1 μM) DOX δεσμεύουν ομοιοπολικά την συνδεδεμένη τοποϊσομεράση II σε θέσεις θραύσης ds του DNA και αναστέλλουν την επανένωση του. Τα σημεία στα οποία η τοποϊσομεράση II έσπασε το DNA για να αποσυμπιέσει τη διπλή έλικα παραμένουν ανοιχτά και δεν ολοκληρώνεται η επανασύνδεση των τμημάτων (Kciuk et al., 2020). Η πρόκληση μονόκλωνων και δίκλωνων ρήξεων (SSBs & DSBs) έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μονοπατιών DNA damage response (DDR) μέσω ενζύμων όπως ATM, ATR, CHK1/CHK2 (F. Yang et al., 2013). Αυτό με την σειρά του μπορεί να προκαλέσει κυτταρική γήρανση ή απόπτωση.

3.1.2. Παραγωγή ελευθέρων ριζών - ROS

Αρχικά ως ελεύθερες ρίζες ορίζονται μόρια με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια, τα οποία κανονικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο κύτταρο λειτουργούν ως αγγελιοφόροι σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής (Zorov et al., 2014). Παρ' όλα αυτά, η υπερβολική παραγωγή ROS μπορεί να συμβάλει στην δημιουργία βλαβών του DNA μέσω της δράσης τους στις βάσεις του DNA και στον σκελετό σακχάρου-φωσφορικού (Cadet et al., 2010). Η μη επιδιόρθωση βλαβών μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση, αναστολή του κυτταρικού κύκλου και γήρανση. Ο μηχανισμός με τον οποίο η δοξορουβικίνη επάγει την παραγωγή ROS και ταυτόχρονα μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση είναι αρκετά περίπλοκος αλλά συνοψίζεται παρακάτω. Αρχικά η δοξορουβικίνη έχει την ικανότητα να προσδένεται απευθείας στην καρδιολιπίνη της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, όπου αλληλοεπιδρά και επάγει την παραγωγή ROS (Gilliam et al., 2012). Έπειτα, η DOX μπορεί να διακόψει την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC), καθιστώντας τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν δυσλειτουργικές. Με αυτόν τον τρόπο ενισχύει την διαρροή ηλεκτρονίων, προκαλώντας αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίου με αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξηση της παραγωγής ROS. Εξαιτίας των ελευθέρων ριζών η DOX μπορεί να ενεργοποιήσει την κινάση ATM, μέσω τροποποίησης των καταλοίπων κυστεΐνης της από οξειδωτικά ένζυμα όπως τα PRDX2 και TRX1, που οδηγεί σε σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών και ενεργοποίηση της ATM. Η ενεργοποιημένη ATM προάγει τη φωσφορυλίωση της CHK2 και την ενεργοποίηση του p53, οδηγώντας σε απόπτωση (Coluzzi et al., 2002). Ταυτόχρονα, έχει παρατηρηθεί πως μετά την χορήγηση DOX, οι ελεύθερες ρίζες οξειδώνουν τα λιπίδια παράγοντας μεταβολίτες όπως αλδεΐδες, οι οποίες είναι μεταλλαξιογόνες και κυτταροτοξικές, ενισχύοντας το οξειδωτικό στρες και την απόπτωση (Hlaváčková et al., 2015; Minotti et al., 2004). Τέλος υπάρχουν στοιχεία ότι η δοξορουβικίνη αναστέλλει την δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων (ενζύμων αποικοδόμησης ROS), όπως η καταλάση και η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD2), οδηγώντας σε περαιτέρω συγκέντρωση υπεροξειδικών ριζών (Navarro et al., 2006). Εν κατακλείδι, η δοξορουβικίνη

προάγει την παραγωγή ROS μέσω πολλαπλών μηχανισμών, που εμπλέκουν τα μιτοχόνδρια, την καταστολή αντιοξειδωτικών, την επαγωγή βλάβης στο DNA και τη συμμετοχή του κυτταρικού σηματοδοτικού μονοπατιού ATM/CHK2/p53.

4. Κυτταρική γήρανση

Η κυτταρική γήρανση είναι μια κατάσταση μόνιμης διακοπής του κυτταρικού κύκλου. Αυτό σημαίνει πως το κύτταρο δεν είναι πλέον ικανό να διαιρεθεί, ωστόσο παραμένει μεταβολικά ενεργό (Hayflick & Moorhead, 1961). Η διαδικασία αυτή παρατηρήθηκε πρώτη φορά σε καλλιέργεια ανθρώπινων διπλοειδών ινοβλαστών (Hayflick, 1965) και έπειτα σε διάφορους κυτταρικούς τύπους (Caldwell et al., 2012). Τα γηρασμένα κύτταρα *in vivo* που συσσωρεύονται με την πάροδο του χρόνου συμβάλλουν στην γήρανση του οργανισμού και στις ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία (Kumari & Jat, 2021). Η κυτταρική γήρανση δρα προστατευτικά έναντι στην καρκινογένεση μέσω της αναστολής πολλαπλασιασμού κυττάρων που έχουν συσσωρεύσει βλάβες. Η κυτταρική γήρανση μπορεί να είναι αποτέλεσμα εκφυλισμού των τελομερών (Αναδιπλασιαστική γήρανση) ή αποτέλεσμα απόκρισης σε μια σειρά από στρεσογόνους παράγοντες (Επαγόμενη από στρες πρόωρη κυτταρική γήρανση-SIPS).

4.1. Αναδιπλασιαστική γήρανση

Η αναδιπλασιαστική γήρανση περιγράφηκε πρώτη φορά από τους Hayflick και Moorehead οι οποίοι κατά την καλλιέργεια φυσιολογικών ανθρώπινων διπλοειδών ινοβλαστών παρατήρησαν ότι τα κύτταρα είχαν περιορισμένο όριο αναδιπλασιασμού, γνωστό και ως όριο του Hayflick, μετά το οποίο επερχόταν αναστολή του κυτταρικού κύκλου αλλά διατηρούταν η μεταβολική τους ενεργότητα (Hayflick, 1965; Hayflick & Moorhead, 1961). Στην πορεία διαπιστώθηκε ότι η διαδικασία αυτή σχετίζεται με τη σταδιακή βράχυνση των τελομερών. Τα τελομερή είναι επαναλήψεις νουκλεοτιδίων στα άκρα των χρωμοσωμάτων οι οποίες τα προστατεύουν από αποικοδόμηση, ανασυνδυασμό και τυχαία σύντηξη με γειτονικά χρωμοσώματα (Campisi et al., 2001). Στα σπονδυλωτά η αλληλουχία αυτών των επαναλήψεων είναι 5,-TTAGGG-3, με ένα μικρό κομμάτι μονόκλωνης προεξοχής στο 3' άκρο (Herbig et al., 2004). Κατά την αντιγραφή των χρωμοσωμάτων οι πολυμεράσες της αντιγραφής δεν μπορούν να αντιγράψουν τις άκρες των χρωμοσωμάτων και έτσι σε κάθε κύκλο αντιγραφής τα άκρα των χρωμοσωμάτων, που περιέχουν τα τελομερή, μικραίνουν (Calvin B. Harley et al., 1990). Το φαινόμενο αυτό έχει χαρακτηριστεί ως «πρόβλημα της τελικής αντιγραφής» (end replication problem) και ευθύνεται για την απώλεια περίπου 50–200 ζευγών βάσεων σε κάθε κυτταρική διαίρεση (Campisi et al., 2001). Όταν πλέον τα τελομερή έχουν μήκος 4-7kb (Calvin B. Harley et al., 1990), το κύτταρο τα αναγνωρίζει ως βλάβες στο DNA και ενεργοποιεί τον μηχανισμό απόκρισης στις βλάβες DDR (Herbig et al., 2004). Αξίζει να σημειωθεί ότι αρκεί ένα μόνο τελομερές να πέσει κάτω από το κρίσιμο μήκος για να κινητοποιηθεί η DDR και να ανασταλεί ο κυτταρικός κύκλος (Michael T. Hemann et al., 2001). Η επιμήκυνση των τελομερών μπορεί να επιτευχθεί μέσω της

τελομεράσης, ενός ενζύμου που προσθέτει επαναλήψεις στο ελεύθερο 3' άκρο (Mark E. Graham et al., 2007). Ωστόσο, στα σωματικά κύτταρα η τελομεράση δεν είναι λειτουργική λόγω της απουσίας της καταλυτικής της υπομονάδας (Fridlyanskaya et al., 2015; Zvereva et al., 2010). Έτσι, τα τελομερή των σωματικών κυττάρων δεν επιμηκύνονται μετά την φθορά τους και αυτό οδηγεί σε μόνιμη παύση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αναδιπλασιαστική γήρανση.

4.2. Επαγόμενη από το στρες πρόωρη κυτταρική γήρανση-SIPS

Πέρα από την βράχυνση των τελομερών υπάρχουν ακόμη πολλά ενδογενή κι εξωγενή σήματα που μπορούν να προκαλέσουν γήρανση στο κύτταρο. Μερικά από αυτά είναι το οξειδωτικό στρες, το μηχανικό στρες, η ακτινοβολία, η ενεργοποίηση ογκογονιδίων, βαρέα μέταλλα και διάφοροι φαρμακολογικοί παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί προκαλούν βλάβες στο γενετικό υλικό ενεργοποιώντας και σε αυτή την περίπτωση τον μηχανισμό απόκρισης στις βλάβες αυτές (DDR). Αν οι βλάβες δεν επιδιορθωθούν το κύτταρο οδηγείται σε γήρανση. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται επαγόμενη από το στρες πρόωρη κυτταρική γήρανση-SIPS καθώς η γήρανση προέρχεται άμεσα μετά την δράση αυτών των παραγόντων και πολύ γρηγορότερα από την αναδιπλασιαστική γήρανση. Βασική διαφορά ανάμεσα στην πρόωρη γήρανση και στην αναδιπλασιαστική είναι η μη εμπλοκή των τελομερών, καθώς η πρόωρη γήρανση συμβαίνει ανεξάρτητα από την φθορά των τελομερών παρόλο που και στις δύο περιπτώσεις ενεργοποιείται ο μηχανισμός DDR (Fridlyanskaya et al., 2015; Toussaint et al., 2000). Τα κύτταρα σε κατάσταση SIPS εμφανίζουν τα ίδια μορφολογικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με τα κύτταρα σε αναδιπλασιαστική γήρανση, τα οποία θα αναλυθούν στη συνέχεια.

4.3. Μονοπάτια p53/p21^{WAF1/CIP1} και p16^{INK4a}/pRB

Η βράχυνση των τελομερών αναγνωρίζεται από το κύτταρο ως βλάβες στο DNA. Η ανίχνευση γίνεται από πρωτεΐνες-αισθητήρες που στην συνέχεια ενεργοποιούν του βασικούς ρυθμιστές απόκρισης σε βλάβες, τις πρωτεϊνικές κινάσες ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) και ATR (Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3 Related kinase) (Kumari & Jat, 2021). Οι μονόκλωνες ρήξεις του DNA αναγνωρίζονται από την RPA (Replication Protein A) και το σύμπλοκο RAD9-RAD1-HUS1, ενώ οι δίκλωνες ρήξεις ανιχνεύονται κυρίως από την πρωτεΐνη 53BP1 και το σύμπλοκο MRE11-RAD50-NBS1. (Kumari & Jat, 2021). Αντίστοιχα η ανίχνευση μονόκλωνων ρήξεων οδηγεί σε ενεργοποίηση της ATR κινάσης ενώ οι δίκλωνες ρήξεις ενεργοποιούν την κινάση ATM προσελκύοντας τις στο σημείο της βλάβης (Raghavendra et al., 2025). Έπειτα, οι ATR και ATM κινάσες φωσφορυλιώνουν την ιστόνη H2AX σε γH2AX, η οποία σηματοδοτεί το σημείο βλάβης, προσελκύοντας περισσότερα μόρια ATM και ATR και ενισχύοντας τον μηχανισμό DDR (Kumari & Jat, 2021; Raghavendra et al., 2025). Οι δύο αυτές κινάσες ενεργοποιούν αντίστοιχα τις CHK1 και CHK2, οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη p53, σταθεροποιώντας και ενεργοποιώντας τη (Kumari & Jat, 2021). Η ενεργοποιημένη πλέον p53 αυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης p21^{WAF1/CIP1} η οποία αποτελεί άμεσο μεταγραφικό της στόχο

(El-Deiry et al., 1993). Η $p21^{WAF1/CIP1}$ ανήκει στην οικογένεια των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου (CDKIs) έχοντας έτσι την ικανότητα να μπλοκάρει τα σύμπλοκα κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών 1, 2 και 3 (CDK1/2/3), τα οποία υπο φυσιολογικές συνθήκες είναι απαραίτητα για την ομαλή πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, οδηγώντας έτσι σε παύση της κυτταρικής διαίρεσης (Kumari & Jat, 2021; Wade Harper et al., 1993). Η $p21^{WAF1/CIP1}$ δηλαδή, αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο, δίνοντας χρόνο για την επιδιόρθωση του DNA. Εάν η βλάβη στο DNA επιμένει, η παρατεταμένη σηματοδότηση DDR προκαλεί την έκφραση της $p16^{INK4a}$. Η πρωτεΐνη $p16^{INK4a}$ αναστέλλει την CDK4/6 και μειώνει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (RB). Το υποφωσφορυλιωμένο RB συνδέεται με τα E2Fs, παράγοντες μεταγραφής που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA και στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και αναστέλλει τα E2Fs. Η αναστολή των E2Fs από την οδό $p16^{INK4a}$ -RB διατηρεί μια κατάσταση αναστολής του κυτταρικού κύκλου (Takahashi A. et al., 2006). Πολλοί επιγενετικοί και μεταγραφικοί ρυθμιστές έχουν εμπλακεί στον έλεγχο της έκφρασης του $p16^{INK4a}$ (LaPak & Burd, 2014a). Πρόσφατα, φάνηκε ότι ο μεταβολισμός των μιτοχονδριακών λιπαρών οξέων παίζει βασικό ρόλο στην έκφραση του $p16^{INK4a}$ και στην επαγωγή της γήρανσης (Yamauchi et al., 2024). Τα λιπαρά οξέα, μαζί με τη γλυκόζη, αποτελούν σημαντική πηγή κυτταρικής ενέργειας και οξειδώνονται στα μιτοχόνδρια για να παράγουν ακετυλο-CoA. Η σηματοδότηση DDR προκαλεί μιτοχονδριακή δομική αναδιαμόρφωση και ενεργοποιεί την οξείδωση λιπαρών οξέων (FAO). Αυτό προάγει την ακετυλίωση του H3K27 κοντά στην θέση έναρξης της μεταγραφής του $p16^{INK4a}$ και την έκφραση του $p16^{INK4a}$ (Yamauchi et al., 2024). Η μακροχρόνια φαρμακολογική ενεργοποίηση του FAO προκαλεί κυτταρική γήρανση χωρίς να ενεργοποιεί τη σηματοδότηση DDR.

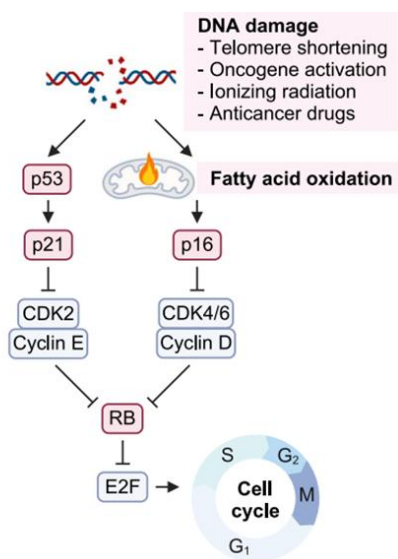


Figure 5: Σχεδιάγραμμα των οδών $p53$ και $p16^{INK4a}$ -RB στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου (Yamauchi & Takahashi, 2025).

4.4. Φαινότυπος γηρασμένων κυττάρων

Τα γηρασμένα κύτταρα εμφανίζουν διακριτές αλλαγές στην μορφολογία τους έναντι στα μη γηρασμένα κύτταρα. Οι μορφολογικές αλλαγές περιγράφονται από αυξημένο μέγεθος και από ακανόνιστο και πεπλατυσμένο σχήμα. Η διόγκωση του κυτταρικού σώματος φαίνεται πως είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του μονοπατιού mTOR, το οποίο ως απόκριση σε στρεσογόνα ερεθίσματα προωθεί τη σύνθεση πρωτεϊνών και λιπιδίων, καταστέλλοντας παράλληλα καταβολικές διεργασίες, όπως η αυτοφαγία (Kim & Guan, 2019). Από την άλλη, το ακανόνιστο και πεπλατυσμένο κυτταρικό σχήμα οφείλεται στο αυξημένο μέγεθος του ενδοπλασματικού δικτύου. Πιο συγκεκριμένα, η αύξηση του stress στο ενδοπλασματικό δίκτυο λόγω γήρανσης, οδηγεί μέσω πρωτεϊνών αισθητήρων του ενδοπλασματικού stress (π.χ. ATF6α), στην ενεργοποίηση του μονοπατιού Unfolded Protein Response (UPR) και στην παραγωγή μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών που αυξάνουν τελικά το μέγεθός του (Druelle et al., 2016). Την ίδια στιγμή, φαίνεται να υπάρχουν αλλαγές και στην σύσταση της πλασματικής μεμβράνης, οι οποίες επίσης συμβάλουν στο ακανόνιστο σχήμα των κυττάρων. Οι αλλαγές αυτές περιλαμβάνουν την αναδιάταξη του κυτταροσκελετού και κυρίως των ινιδίων βιμεντίνης, μιας πρωτεΐνης που η έκφρασή της αυξάνεται, ενώ η οξειδωμένη της μορφή παρατηρείται σε γηρασμένους ανθρώπινους ινοβλάστες (Frescas et al., 2017). Στην ανασύσταση της πλασματικής μεμβράνης των γηρασμένων κυττάρων οδηγεί και η αύξηση της καβεολίνης-1. Η καβεολίνη-1 δρα ως ρυθμιστής σημάτων και ελέγχει την ενεργοποίηση της κινάσης FAK (Focal adhesion Kinase), της ιντεγκρίνης β1 και των μικρών GTPασών Rho Rac1 and Cdc42. Τα μόρια αυτά είναι καθοριστικά για την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, και συνεπώς, για τη μορφολογία και την κινητικότητα του κυττάρου. (Di Micco et al., 2021). Παράλληλα, η σωστή ισορροπία ανάμεσα στο μέγεθος του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος είναι απαραίτητη για την ομαλή λειτουργία του κυττάρου. Όταν το κυτταροπλασματικό/πυρηνικό μέγεθος υπερβαίνει ορισμένα όρια, το κύτταρο χάνει την ικανότητά του να ρυθμίζει αποτελεσματικά την γονιδιακή έκφραση, τα δίκτυα σηματοδότησης και τον κυτταρικό κύκλο. Αυτό οδηγεί σε δυσλειτουργία και τελικά σε κυτταρική γήρανση (Neurohr et al., 2019).

4.5. Αναστολή κυτταρικής γήρανσης στα καρκινικά κύτταρα

Όπως αναλύεται παραπάνω τα φυσιολογικά κύτταρα, όταν συσσωρεύσουν βλάβες, γερνούν και σταματούν να διαιρούνται. Για τα καρκινικά κύτταρα δεν ισχύει το ίδιο, καθώς έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που παρακάμπτουν αυτή τη διαδικασία και παραμένουν αθάνατα. Πιο συγκεκριμένα, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να διατηρούν το μήκος των τελομερών τους καθώς υπερεκφράζουν το ένζυμο τελομεράση μαζί με την καταλυτική υπομονάδα της. Την ίδια στιγμή τα καρκινικά κύτταρα απενεργοποιούν το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53. Μάλιστα, το TP53, το οποίο κωδικοποιεί το p53, είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο στους ανθρώπινους καρκίνους (Kastenhuber & Lowe, 2017). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα κύτταρα να μην δέχονται κάποιο σήμα για παύση του κυτταρικού κύκλου και να συνεχίζουν να διαιρούνται

με βλάβες. Επίσης, σχεδόν σε όλους τους τύπους ανθρώπινων καρκίνων, η οδός p16^{INK4a}–RB απενεργοποιείται με διαγραφή ή επιγενετική σίγηση του γονιδίου p16 (CDKN2A) ή RB ή ακόμη και με ενίσχυση γονιδίων κυκλίνης (LaPak & Burd, 2014b). Έρευνες έχουν δείξει πως ποντίκια με knockout p53 ή p16 παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης αυθόρμητου καρκίνου (Lawrence A. Donehower et al., 2001; Norman E. Sharpless et al., 2001). Όλα τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα πως τα καρκινικά κύτταρα μέσω της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης καταφέρνουν να αποφύγουν την γήρανση και να διαιρούνται επ' αόριστο.

4.6. DOX και επαγωγή γήρανσης σε καρκινικά κύτταρα

Παρόλο που αναλύθηκε πως τα καρκινικά κύτταρα δεν παθαίνουν γήρανση, υπάρχουν ορισμένες περιπτώσεις, που μπορούν να επάγουν την γήρανση στα καρκινικά κύτταρα. Η βλάβη στο DNA που προκαλείται από ιονίζουσα ακτινοβολία και αντικαρκινικά φάρμακα, όπως η δοξορουβικίνη είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί το μονοπάτι απόκρισης σε βλάβη DNA (DDR) και τελικά προκαλεί κυτταρική γήρανση. Η επαγωγή γήρανσης κρίθηκε ως ο κύριος μηχανισμός θεραπευτικής δράσης του φαρμάκου δοξορουβικίνη στην κυτταρική σειρά σαρκώματος αρθρικού αδένου FU-SY-1 (Joyner et al., 2006). Οι Bojko et al. μελέτησαν τις επιδράσεις της DOX (συγκέντρωση 100-200 nM) σε διαφορετικές καρκινικές κυτταρικές σειρές όπως μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (A549), νευροβλάστωμα (SH-SY-5Y), καρκίνος του παχέος εντέρου (HCT116) και καρκίνος του μαστού (MDA-MB-231 και MCF-7). Η αναστολή της ανάπτυξης, η επαγωγή των DSB, η ανοδική ρύθμιση του P21 και η ενεργοποίηση του ATM (το τελευταίο δεν ενεργοποιήθηκε στα κύτταρα HCT116) αποδείχθηκαν μετά από φαρμακευτική αγωγή (Bojko et al., 2019). Πολλές άλλες μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι η DOX μπορεί επίσης να προκαλέσει γήρανση σε φυσιολογικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών (Bientinesi et al., 2022), των μικρογλοιακών κυττάρων (Marques et al., 2020), των καρδιακών προγονικών κυττάρων (Piegari et al., 2013), των καρδιομυοκυττάρων (Spallarossa et al., 2009), των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (Ali Bashiri Dezfouli et al., 2019) και των κυττάρων του θύμου αδένου (Sultana et al., 2010). Αυτό θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τη διερεύνηση της πιθανής αντικαρκινικής δράσης της DOX που σχετίζεται με την επαγωγή γήρανσης.

Σε αυτό το σημείο, είναι σημαντικό να αναφερθεί πως υπάρχουν στοιχεία που υποδηλώνουν ότι η γήρανση των καρκινικών κυττάρων μπορεί να είναι ανεπιθύμητη λόγω της τάσης των γηρασμένων κυττάρων να δημιουργούν ένα προκαρκινογόνο περιβάλλον. Για την αντιμετώπιση των γηρασμένων κυττάρων, οι ερευνητές έχουν δημιουργήσει μια νέα κατηγορία φαρμάκων που ονομάζεται σενολυτικά, τα οποία απομακρύνουν ειδικά τα γηρασμένα κύτταρα (Hu & Zhang, 2019).

5. Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία (autophagy) είναι μια φυσική διαδικασία διατήρησης της ομοιόστασης των κυττάρων, με την οποία το ίδιο το κύτταρο διασπά και ανακυκλώνει κατεστραμμένα οργάνδια,

περιοχές του κυτταροπλάσματος και μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες μέσω των λυσοσωμάτων (He & Klionsky, 2009). Η διαδικασία αυτή είναι μια εξελικτικά διατηρημένη διαδικασία μεταξύ των ευκαρυωτικών κυττάρων, καθώς φροντίζει για την ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης και της αποικοδόμησης πρωτεϊνών, η οποία είναι απαραίτητη για την φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη (Z. Yang & Klionsky, 2009). Έχουν παρατηρηθεί τρεις τύποι αυτοφαγίας σε κύτταρα θηλαστικών, η μικροαυτοφαγία, η αυτοφαγία μεσολαβούμενη από πρωτεΐνες συνοδούς και η μακροαυτοφαγία. Όλα τα είδη αυτοφαγίας τελικά οδηγούν σε μεταφορά των υποστρωμάτων στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση ή ανακύκλωση (Levine & Kroemer, 2019). Η μακροαυτοφαγία χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη των αυτοφαγοσωμάτων. Πρόκειται για οργανίδια με διπλή μεμβράνη τα οποία δημιουργούνται με την συμβολή πολλών πρωτεϊνών μέσω μιας διαδικασίας που οδηγεί στην σύντηξη τους με τα λυσοσώματα, σχηματίζοντας έτσι τα αυτολυσοσώματα στα οποία θα γίνει τελικά η αποικοδόμηση (Z. Yang & Klionsky, 2009). Επειδή, από τις τρεις μορφές η μακροαυτοφαγία είναι αυτή μέσω της οποίας αποικοδομούνται τα περισσότερα συστατικά, από εδώ και στο εξής θα γίνεται αναφορά σε αυτήν απλώς ως αυτοφαγία.

Η αυτοφαγία είναι μία αντίδραση του κυττάρου σε έλλειψη θρεπτικών συστατικών, με σκοπό την ανακύκλωση συστατικών για παροχή ενέργειας στο κύτταρο. Ωστόσο, η διαδικασία της αυτοφαγίας μπορεί και να εμφανίζει εξειδίκευση όσον αφορά το φορτίο που αποικοδομείται στα αυτολυσοσώματα και να συμβαίνει και σε συνθήκες επάρκειας θρεπτικών συστατικών, με στόχο την απομάκρυνση κατεστραμμένων ή περιττών οργανιδίων και επιβλαβών πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων που σχετίζονται με ασθένειες (π.χ. Alzheimer, Parkinson). Με βάση αυτό η αυτοφαγία διακρίνεται σε γενική και εκλεκτική (de Duve & Wattiaux, 1966; Dikic & Elazar, 2018). Ως γενική χαρακτηρίζεται η αυτοφαγία μέσω της οποίας αποικοδομούνται τυχαία τμήματα του κυττάρου, χωρίς να επιλέγονται συγκεκριμένα οργανίδια ή μόρια με σκοπό την γρήγορη παραγωγή ενέργειας και δομικών υλικών από οποιοδήποτε διαθέσιμο απόθεμα. Από την άλλη μέσω της εκλεκτικής αυτοφαγίας αποικοδομούνται συγκεκριμένα υποστρώματα με την βοήθεια μηχανισμών αναγνώρισής και απομόνωσής τους από το αυτοφαγόσωμα, με σκοπό να διατηρηθεί η υγεία του κυττάρου απομακρύνοντας προβληματικά ή τοξικά στοιχεία. Η εκλεκτική αυτοφαγία θα μπορούσε να διακριθεί σε ειδικές μορφές όπως η μιτοφαγία (mitophagy, εκλεκτική αποικοδόμηση μιτοχονδρίων), η λιποφαγία (lipophagy, εκλεκτική αποικοδόμηση ενδοκυτταρικών λιπιδικών σταγόνων) και η ριβοφαγία (ribophagy, εκλεκτική αποικοδόμηση ριβοσωμάτων) (Weidberg et al., 2011). Τέλος υπάρχει και η εκλεκτική αποικοδόμησης συγκεκριμένων πρωτεϊνών, η οποία βασίζεται στην σύνδεση των ATG8 πρωτεϊνών του αυτοφαγολυσοσώματος μέσω ειδικών μοτίβων LIRS με πρωτεΐνες που συνδέονται επιλεκτικά σε συγκεκριμένα υποστρώματα όπως p62/SQSTM1 και NBR1 (Johansen & Lamark, 2020). Επιπλέον μπορεί να πραγματοποιηθεί και άμεση σύνδεση των πρωτεϊνών προς αποικοδόμηση με τις ATG8

πρωτεΐνες μέσω του μοτίβου LIR που διαθέτουν κάποιες πρωτεΐνες-στόχοι (Birgisdottir et al., 2013).

5.1. Πρωτεΐνες της αυτοφαγίας

Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην δημιουργία του αυτοφαγοσώματος είναι προϊόντα έκφρασης εξελικτικά συντηρημένων γονιδίων (ATGs) και σύμφωνα με την λειτουργία τους κατανέμονται στις εξής 5 ομάδες.

1. Κινάση Σερίνης/Θρεονίνης ULK1 (Unc-51-like kinase 1) και πρωτεΐνες FIP200, ATG13, ATG101
2. Πρωτεΐνη ATG9
3. Πρωτεΐνες Vps34 (vacuolar protein sorting 34), PI3K, BECLIN-1, pg15, AMBPA1 και ATG14L ή UVRAG (UV radiation resistance associated gene protein). Η καταλυτική υπομονάδα του συμπλέγματος αυτού είναι η Vps34 η οποία μετατρέπει την φωσφατυδιλοϊνσιτόλη (PI) σε 3- φωσφορική φωσφατιδυλοϊνσιτόλη (PI-3-phosphate) και το σύστημα χαρακτηρίζεται ως κινάση της 3-φωσφατιδυλοϊνσιτόλης κλάσης III (PI3KCIII).
4. Πρωτεΐνες WIPI (WD repeat domain phosphoinositideinteracting) και ATG2
5. Σύστημα πρωτεϊνών με δράση παρόμοια με αυτή των λιγασών ουβικουιτίνης και αποτελείται από τις πρωτεΐνες ATG12-ATG5- ATG16L και την οικογένεια LC3 (microtubule associated proteins 1 A/1B, MAP1LC3): LC3A, LC3B, LC3C

Η κάθε ομάδα πρωτεϊνών επιτελεί σημαντικό ρόλο και συμμετέχει σε διαφορετικό στάδιο της αυτοφαγίας (Dikic & Elazar, 2018).

5.2. Δημιουργία του αυτοφαγοσώματος

Η δημιουργία του αυτοφαγοσώματος περιλαμβάνει 4 στάδια: Εκκίνηση, Εμπυρήνωση, Επέκταση, Ωρίμανση. Η εκκίνηση της αυτοφαγίας ξεκινάει από τα ωμεγασώματα (omegasomes). Πρόκειται για υποπεριοχές του Ενδοπλασματικού Δικτύου που αποτελούνται από λιπιδική μεμβράνη πλούσια σε 3 φωσφορική – φωσφατιδυλοϊνσιτόλη (Axe et al., 2008; Ylä-Anttila et al., 2009). Από τα ωμεγασώματα προκύπτει το φαγοφόρο, μία δομή διπλής μεμβράνης που αποτελεί την αρχική μορφή του αυτοφαγοσώματος (Axe et al., 2008). Τα αρχικά σήματα για έναρξη της αυτοφαγίας (π.χ. έλλειψη θρεπτικών) έχουν ως στόχο την φωσφορυλίωση της κινάσης ULK1, η οποία θα επάγει την δημιουργία του φαγοφόρου μαζί με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του συμπλέγματος FIP200, ATG13 και ATG101 (Dikic & Elazar, 2018). Στη συνέχεια στο σημείο προσέρχονται κυστίδια που περιέχουν την πρωτεΐνη ATG9, η οποία αποτελεί άμεσο στόχο της ULK1 (Young et al., 2006), τα οποία μεταφέρουν λιπίδια στο σημείο απαραίτητα για την συνέχιση της διαδικασίας. Σχεδόν ταυτόχρονα, η ULK1 φωσφολυριώνει την BECLIN-1 με αποτέλεσμα να ενεργοποιεί και να προσελκύεται στο σημείο το επόμενο σύμπλοκο πρωτεϊνών

PI3KC3 (Russell et al., 2013). Το σύμπλοκο αυτό λειτουργεί ως κινάση της PI3K και έτσι η τοπική παραγωγή PI3P προσελκύει με την σειρά της πρωτεΐνες WIPI ξεκινώντας την επιμήκυνση του φαγοφόρου. Η WIPI2 πρωτεΐνη έχει δείχθει ότι αλληλεπιδρά με την ATG16L του συμπλόκου πρωτεϊνών ATG12-ATG5-ATG16L (Doolley et al., 2014). Στην επιμήκυνση του φαγοφόρου και την μετατροπή του σε αυτοφαγόσωμα συμμετέχουν δύο συστήματα πρωτεϊνών που καταλύουν αντιδράσεις παρόμοιες με την ουβικουιτίνωση. Το πρώτο σύστημα αποτελείται από τις πρωτεΐνες ATG12- ATG5-ATG16L (Dikic & Elazar, 2018). Αρχικά, για την δημιουργία του συμπλόκου, η πρωτεΐνη ATG12 συνδέεται στην ATG5 με την βοήθεια των ATG7 και ATG10, δύο ενζύμων με δράση παρόμοια με E1 ένζυμο ενεργοποιητή και E2 ένζυμο δέσμησης ουβικουιτίνης αντίστοιχα (Nemoto et al., 2003; Tanida et al., 2001). Ακολουθεί η πρόσδεση του ATG16L στο σύμπλοκο, το οποίο έπειτα συνδέεται στο WIPI2 που βρίσκεται στην μεμβράνη του επιμηκυνόμενου αυτοφαγοσώματος (Doolley et al., 2014; Mizushima et al., 2003). Το δεύτερο σύστημα πρωτεϊνών που καταλύουν αντιδράσεις παρόμοιες με την ουβικουιτίνωση περιλαμβάνει την οικογένεια πρωτεϊνών LC3 (microtubule associated proteins 1 A/1B, MAP1LC3) (Weidberg et al., 2010). Το πρώτο βήμα καταλύεται από το την ATG4 πρωτεάση η οποία μετατρέπει την πρόιμη μορφή της LC3 (proLC3) στην κυτταροπλασματική μορφή της LC3-I μέσω αποκοπής του αμινοξέος κυστεΐνη από το άκρο της (Kabeya, 2000; Kabeya et al., 2004). Στη συνέχεια η δράση των ATG7 και ATG3 ως E1 ένζυμο ενεργοποιητή και E2 ένζυμο δέσμησης ουβικουιτίνης αντίστοιχα οδηγούν στην πρόσδεση της LC3-I σε μια ομάδα φωσφατιδυλεθυνολαμίνης (PE) μετατρέποντας την στην LC3-II μορφή, η οποία ενσωματώνεται στην μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος και λειτουργεί ως δείκτης δημιουργίας του (Ichimura et al., 2000). Για την σωστή πρόσδεση της LC3-I στην φωσφατιδυλεθυνολαμίνη του αυτοφαγοσώματος απαιτείται και η δράση του συμπλόκου ATG12-ATG5, το οποίο έχει δράση E3 λιγάσης της ουβικουιτίνης. Με την σύνδεση της LC3-II στην μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος ολοκληρώνεται η επιμήκυνση του και έχει πλέον δημιουργηθεί το αυτοφαγόσωμα γύρω από ένα μέρος του κυτταροπλάσματος το οποίο στη συνέχεια θα αποικοδομηθεί (Dikic & Elazar, 2018). Αντίθετα, στην περίπτωση της εκλεκτικής αυτοφαγίας σε αυτό το σημείο συμμετέχουν οι εκλεκτικοί υποδοχείς της αυτοφαγίας, όπως ο p62/SQSTM1 και η NBR1. Οι εκλεκτικοί υποδοχείς αποικοδομούνται επίσης μέσω αυτοφαγίας (Lamark et al., 2017).

5.3. Δημιουργία αυτολυσσοσώματος

Η διαδικασία της αυτοφαγίας ολοκληρώνεται με την ωρίμανση του αυτοφαγοσώματος, την σύντηξη του με το λυσόσωμα που δημιουργεί το αυτολυσόσωμα και την αποικοδόμηση του φορτίου (Dikic & Elazar, 2018). Η ωρίμανση του αυτοφαγοσώματος καταλύεται από την LC3-II, η οποία συνδέεται με τις πρωτεΐνες FYCO1 (FYVE and coiled-coil protein 1) και JIP1 (Fu et al., 2014) μέσω LIR μοτίβων που περιέχουν (Olsvik et al., 2015). Η σύνδεση αυτή είναι απαραίτητη ώστε οι μικροσωληνίσκοι να μεταφέρουν τα αυτοφαγοσώματα σε περιοχές εντοπισμού των λυσοσωμάτων. Εκεί πραγματοποιείται η σύντηξη αυτοφαγοσώματος με το λυσόσωμα, από τις

πρωτεΐνες SNARE (Dikic & Elazar, 2018). Συγκεκριμένα, από τις πρωτεΐνες SNARE, υπεύθυνη για την σύντηξη είναι η STX17 (Syntaxin 17) η οποία εντοπίζεται μόνο στην εξωτερική μεμβράνη των ώριμων αυτοφαγοσωμάτων και στα λυσοσώματα αλλά όχι στο φαγοφόρο. Έτσι εξασφαλίζεται η σύντηξη του λυσοσώματος μόνο με τα ώριμα αυτοφαγοσώματα (Itakura et al., 2012). Επιπλέον, η πρωτεΐνη ATG14L (ρυθμιστής του συστήματος PI3KCII) αλληλεπιδρά με την STX17 και προωθεί την σύνδεση της μεμβράνης του με το λυσοσώμα (Diao et al., 2015). Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν πως η φωσφορυλίωση της LC3-II από τις κινάσες STK3/STK4, καθώς και η Rab7 μικρή GTPάση επίσης προωθούν την δημιουργία αυτολυσοσωμάτων (Gutierrez et al., 2004; Wilkinson et al., 2015). Το περιεχόμενο του αυτολυσοσώματος αποικοδομείται από ένζυμα του λυσοσώματος, τις όξινες υδrolάσες και τα θρεπτικά συστατικά που προκύπτουν επαναχρησιμοποιούνται από το κύτταρο (Dikic & Elazar, 2018).

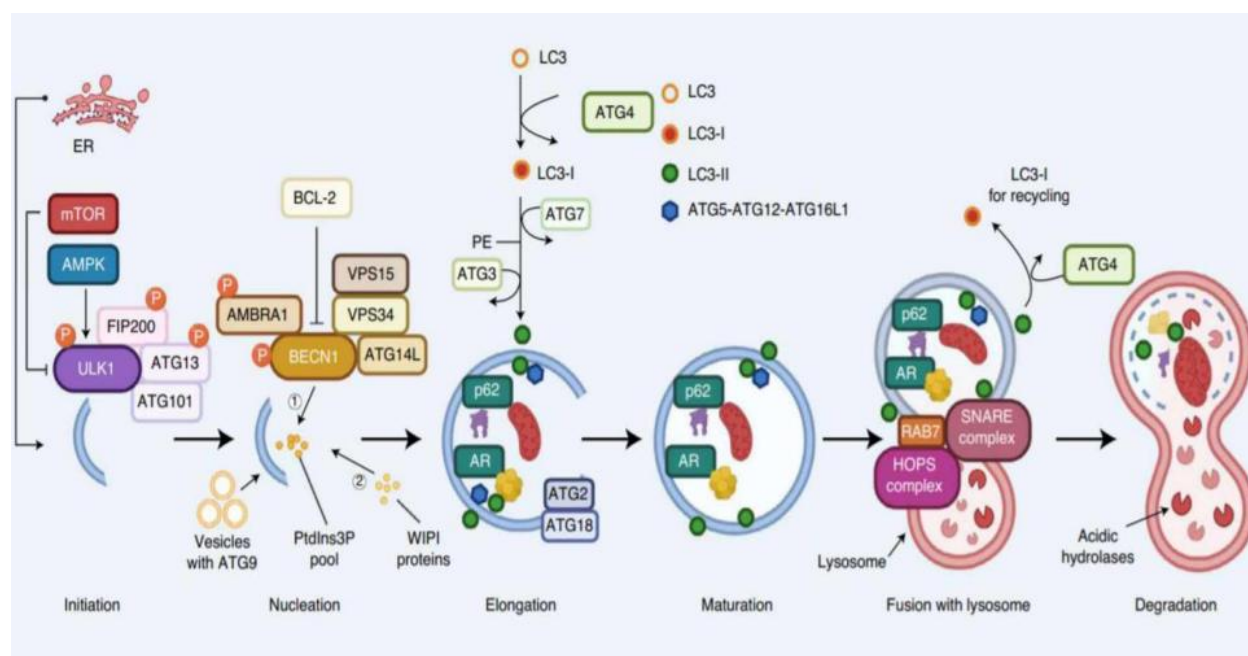


Figure 6: Στάδια δημιουργίας αυτοφαγοσώματος και αυτολυσοσώματος (Aman et al., 2021)

5.4. DOX και αυτοφαγία στα καρκινικά κύτταρα

Ο ρόλος της δοξορουβικίνης στην διαδικασία της αυτοφαγίας φαίνεται να είναι αρκετά μελετημένος τα τελευταία χρόνια. Σήμερα γνωρίζουμε πως η δοξορουβικίνη μπορεί να επάγει την αυτοφαγία, όπως αποδεικνύεται από τα αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνών LC3-II, p62 και Beclin1 (Kondo et al., 2005; Sui et al., 2013). Η ίδια, φαίνεται να προάγει την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και την ανθεκτικότητα τους σε φάρμακα και χημειοθεραπεία (Huang et al., 2016). Αυτό εξηγείται καθώς η ανοδική ρύθμιση της αυτοφαγίας σε απόκριση στη θεραπεία με DOX διευκολύνει την κυτταρική απομάκρυνση των κατεστραμμένων συστατικών, προωθώντας έναν μηχανισμό αντίστασης που μειώνει τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα της DOX (Dikic & Elazar, 2018; J. Wang & Qiu, 2022). Σε καρκινικά κύτταρα MCF-7 η δοξορουβικίνη φαίνεται να

επάγει μια μορφή αυτοφαγίας (μη κανονική), στην οποία παρατηρείται αύξηση της LC3-II και του επιλεκτικού υποδοχέα φορτίου p62, ενώ η έκφραση της Beclin-1 και της Atg7 παρέμεινε ίδια. Ταυτόχρονα, η ηλεκτρονική μικροσκοπία αποκάλυψε μια αύξηση στα κυτταροπλασματικά κενोटόπια που περιείχαν μιτοχόνδρια και άλλα κυτταρικά οργανίδια, γεγονός που υποδηλώνει επίσης αυτοφαγία. Σε αυτή την περίπτωση η αυτοφαγία συνέβαλε στην αντοχή των κυττάρων απέναντι στην θεραπεία με δοξορουβικίνη. Μάλιστα, γνωστός αναστολέα της αυτοφαγίας (χλωροκίνη), ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικός στην αποκατάσταση της ευαισθησίας στη δοξορουβικίνη σε ανθεκτικά κύτταρα MCF-7 (Guo et al., 2016). Έρευνα που μελέτησε την αυτοφαγική ροή σε πολλές κυτταρικές σειρές μεταξύ αυτών και την MDA-MB-231, διαπίστωσε πως το λυσοσωμικό γονίδιο ATR6AP1, το οποίο παίζει ρόλο στις αυτοφαγικές διεργασίες, είναι υπερεκφρασμένο στους ιστούς καρκίνου του μαστού. Η καταστολή του ATR6AP1 μειώνει την αντίσταση στη δοξορουβικίνη που προκαλείται από την αυτοφαγία αναστέλλοντας την αυτοφαγική ροή και τη λυσοσωμική οξίνιση σε κύτταρα καρκίνου του μαστού (Fei et al., 2024).

Παρά την αποτελεσματικότητα της δοξορουβικίνης ως αντικαρκινικό φάρμακο, η χρήση της περιορίζεται αρκετά λόγω της καρδιοτοξικότητας που προκαλεί. Η δοξορουβικίνη επηρεάζει και τα καρδιομυοκύτταρα, αυξάνοντας τα επίπεδα LC3-II, p62, Beclin-1 και άρα επάγοντας την αυτοφαγία, αλλά ταυτόχρονα μπλοκάρει τη συνέχεια του κύκλου μέσω αναστολής της οξεοποίησης των λυσοσωμάτων, η οποία οδηγεί σε συσσώρευση μη αποικοδομημένων αυτοφαγοσωμάτων και αυξημένη παραγωγή ROS. Έτσι η αναστολή της λυσοσωματικής αποδόμησης προκαλεί καρδιοτοξικότητα (Christidi & Brunham, 2021; Yu et al., 2023). Επιπλέον, υπάρχει πειραματική τεκμηρίωση ότι η δοξορουβικίνη μπλοκάρει τη σύντηξη των αυτοφαγοσωμάτων με τα λυσοσώματα σε κύτταρα καρδιομυοβλαστών H9c2, αφήνοντας ημιτελή την αυτοφαγική διαδικασία και προκαλώντας συσσώρευση δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων, αυξημένο οξειδωτικό στρες και τελικά κυτταρικό θάνατο (Toda et al., 2023).

6. Αυτοφαγία και κυτταρική γήρανση

Η σχέση μεταξύ κυτταρικής γήρανσης και αυτοφαγίας είναι πολύπλοκη καθώς η επιρροή της αυτοφαγίας στην κυτταρική γήρανση έχει διπλή κατεύθυνση. Αρχικά, η γενική αυτοφαγίας δρα προστατευτικά έναντι στην γήρανση, καθώς αποικοδομεί κατεστραμμένα οργανίδια και βιομόρια τα οποία σε διαφορετική περίπτωση συσσωρεύονται και προκαλούν κυτταροτοξικότητα (Kwon et al., 2017; Rubinsztein et al., 2011). Μάλιστα, *in vitro* και *in vivo* μελέτες σε ανθρώπινους ινοβλάστες έδειξαν πως σίγηση των αυτοφαγικών πρωτεϊνών ATG5 και ATG7 οδήγησε σε πρόωρη κυτταρική γήρανση (H. T. Kang et al., 2011), ενώ επαγωγή της αυτοφαγίας σε γηρασμένα ποντίκια και μύγες *Drosophila* (Harrison et al., 2009; Simonsen et al., 2008) αύξησε την διάρκεια ζωής τους, μέσω προστασίας από το οξειδωτικό στρες (Rastaldo et al., 2020). Παρόλα αυτά σε ήδη γηρασμένα κύτταρα η ενεργοποίηση της γενικής αυτοφαγίας συντηρεί την κυτταρική γήρανση καθώς μειώνει βλάβες που θα έπρεπε να αντιμετωπίσουν τα

κύτταρα και πολλές φορές λόγω αναποτελεσματικότητας θα κατέληγαν στον κυτταρικό θάνατο (Kwon et al., 2017).

Η εκλεκτική αυτοφαγία, έχει διφορούμενη σχέση με την γήρανση ανάλογα το υπόστρωμα που θα αποικοδομηθεί (Rastaldo et al., 2020). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αυτοφαγική αποικοδόμηση του GATA4 (μεταγραφικός παράγοντας πρωτεϊνών γηρασμένου φαινότυπου) μέσω του p62/SQSTM1 που δρα ανασταλτικά στην κυτταρική γήρανση, καθώς σε γηρασμένους ινοβλάστες βρέθηκε ότι η αποικοδόμηση του GATA4 μέσω αυτοφαγίας είχε ανασταλεί (C. Kang et al., 2015). Από την άλλη, μέσω εκλεκτικής αυτοφαγίας αποικοδομούνται και συστατικά του πυρήνα, συμβάλλοντας στην εγκαθίδρυση της γήρανσης. Πιο συγκεκριμένα, σε συνθήκες στρες η LC3B εντοπίζεται στον πυρήνα όπου αλληλεπιδρά με την Λαμίνη B1 ώστε να οδηγήσει στην αποικοδόμησή της. Μαζί με την Λαμίνη B1 όμως αποικοδομούνται και επικράτειες χρωματίνης σχετιζόμενες με Λαμίνη (LADs) με αποτέλεσμα την κυτταρική γήρανση (Dou et al., 2015).

Στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων η σχέση μεταξύ αυτοφαγίας και επαγόμενης από φάρμακο κυτταρικής γήρανσης δεν είναι ξεκάθαρη. Έρευνα έδειξε πως σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου HCT 116, η χαμηλή δόση καμπτοθεκίνης (CPT) προκάλεσε ταυτόχρονα αυτοφαγία και πρόωρη γήρανση μέσω της οδού AMPK-TSC2-mTOR και της οδού ATM-Chk2-p53-p21 αντίστοιχα. Η καταστολή της αυτοφαγίας σε αυτή την μελέτη, αύξησε σημαντικά την απόπτωση και μείωσε σημαντικά τη γήρανση, πιθανώς μπλοκάροντας την οδό p53/p21, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αυτοφαγία παίζει απαραίτητο ρόλο στη διατήρηση της γήρανσης των κυττάρων (Zhang et al., 2014). Έπειτα, σε άλλη έρευνα αξιοποιήθηκαν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7 και του παχέος εντέρου HCT-116 στα οποία έγινε επίδραση με καμπτοθεκίνη ή δοξορουβικίνη, η οποία επίσης προκαλεί ταυτόχρονα αυτοφαγία και επαγόμενη γήρανση. Για να εξεταστεί η πιθανή σχέση μεταξύ αυτοφαγίας και γήρανσης, έγινε αναστολή της αυτοφαγίας με χλωροκίνη και knockout των αυτοφαγικών γονιδίων ATG5 και ATG7. Η αναστολή της αυτοφαγίας δεν μπόρεσε να καταργήσει πλήρως την απόκριση γήρανσης, απλώς την καθυστέρησε, υποδηλώνοντας ότι αυτοφαγία και γήρανση συχνά συνυπάρχουν και έχουν κοινές οδούς (Goehe et al., 2012). Από την άλλη πλευρά, φαίνεται πως σε καρκινικά γαστρικά κύτταρα AGS, MKN-45 και KATO-III η αναστολή της αυτοφαγίας οδηγεί σε επιδείνωση της κυτταρικής γήρανση. Πιο συγκεκριμένα, αναστολή των κινασών CDK4/6 στα κύτταρα καρκίνου του στομάχου μέσω του αναστολέα CDK4/6 Palbociclib οδηγεί στην εφαρμογή κυτταρικής γήρανσης. Σε κύτταρα με ενεργή μορφή pRB (πρωτεΐνη στόχος συμπλοκών των CDK4 και CDK6 με κυκλίνες D) και p53, ο αναστολέας CDK4/6, Palbociclib, προκαλεί ταυτόχρονα και γήρανση και αυτοφαγία. Στην περίπτωση αυτή αναστολή της αυτοφαγίας επιδεινώνει τον γηρασμένο φαινότυπο, υποδεικνύοντας ότι η αυτοφαγία δρα προστατευτικά έναντι στην γήρανση και όχι ως μηχανισμός της (Valenzuela et al., 2017). Εν κατακλείδι, η αυτοφαγία ρυθμίζει την κυτταρική γήρανση με τρόπο εξαρτώμενο από το είδος και το πλαίσιο, δρώντας

άλλοτε προστατευτικά και άλλοτε προαγωγικά, γεγονός που αναδεικνύει την πολυπλοκότητά της ως θεραπευτικού στόχου.

7. Καρκινική σειρά MDA-MB 231

Τα MDA-MB-231 κύτταρα είναι μία πολύ γνωστή κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται ευρέως σε μελέτες για τον καρκίνο του μαστού. Η προέλευση της είναι ανθρώπινα κύτταρα από τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (triple-negative breast cancer – TNBC). Αυτό σημαίνει πως τα κύτταρα αυτά δεν εκφράζουν υποδοχείς οιστρογόνων (ER–), δεν εκφράζουν υποδοχείς προγεστερόνης (PR–), και δεν υπερεκφράζουν το HER2/neu. Πρόκειται για εξαιρετικά επιθετικά και μεταστατικά κύτταρα ιδίως προς ιστούς όπως οι πνεύμονες και τα οστά. Τα MDA-MB 231 είναι μεσεγχυματικά κύτταρα, δηλαδή έχουν υποστεί επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), κάτι που τους προσδίδει κινητικότητα και μεγάλη ικανότητα για κυτταρική μετανάστευση. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα έχουν κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που διαφέρουν από αυτά των επιθηλιακών κυττάρων. Αρχικά, τα επιθηλιακά κύτταρα κάνουν σφιχτές κυτταρικές συνδέσεις μεταξύ τους, σε αντίθεση με τα μεσεγχυματικά κύτταρα που έχουν χαλαρές επαφές. Στα επιθηλιακά κύτταρα επίσης υπάρχει πολωμένος κυτταρικός προσανατολισμός, ενώ τα μεσεγχυματικά κύτταρα εμφανίζουν απώλεια πολικότητας. Τα MDA-MB 231 εκφράζουν μεσεγχυματικούς δείκτες όπως την βιμεντίνη (υψηλά επίπεδα). Αντίθετα, εκφράζουν σε χαμηλά επίπεδα τον επιθηλιακό δείκτη E-καδερίνη (Garcia et al., 2021). Σε έρευνες ωστόσο, έχει φανεί πως με επανέκφραση της E-καδερίνης, είτε μέσω εξωγενούς εισαγωγής είτε μέσω επαγωγής από το μικροπεριβάλλον, τα κύτταρα MDA-MB 231 μπορούν να ξανά αποκτήσουν επιθηλιακό φαινότυπο (Chao et al., 2010). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται μεσεγχυματική-επιθηλιακή μετάβαση (MET). Η μεσεγχυματική φαινοτυπική ταυτότητα των MDA-MB-231 τους προσδίδει μεγαλύτερη ικανότητα να μεταναστεύουν, να διηθούν ιστούς και να δημιουργούν μεταστάσεις, χαρακτηριστικά που τα καθιστούν κατάλληλα για μελέτες επιθετικότητας και φαρμακολογικής παρέμβασης στον καρκίνο. Ο λόγος που επιλέχθηκε η συγκεκριμένη καρκινική σειρά για τον σκοπό της εργασίας είναι πως η MDA-MB 231 φέρει μεταλλάξεις και εμφανίζει αυξημένα επίπεδα ενεργοποιημένης Ras-GTP, σε σύγκριση με κανονικά επιθηλιακά κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, μετάλλαξη τόσο στο KRAS (G13D) όσο και σε πρωτεΐνες BRAF οδηγούν σε ενεργοποίηση της οδού RAS-MAPK (Eckert et al., 2004; Nagaria et al., 2017). Επίσης, τα MDA-MB 231 κύτταρα εμφανίζουν σχεδόν πλήρη απουσία της GAP πρωτεΐνης νευροϊνωματίνης (NF1), γεγονός που οδηγεί σε αυξημένη Ras/MAPK σηματοδότηση (Ogata et al., 2001).

ΣΚΟΠΟΣ

Η εργασία αποσκοπεί στη διερεύνηση του ρόλου της δοξορουβικίνης στη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας της πρωτεΐνης RAS και στον εντοπισμό των αλλαγών στην τοπολογία της μετά από φαρμακευτική επίδραση. Χρησιμοποιώντας την τεχνική ζωντανής κυτταρικής απεικόνισης με συνεστιακό μικροσκόπιο (live cell imaging), μελετάται η συμπεριφορά της RAS στην καρκινική κυτταρική σειρά MDA-MB 231 και η σχέση της με πρωτεΐνες-ρυθμιστές, όπως η καβεολίνη-1, καθώς και με κυτταρικές διεργασίες όπως η μεσεγχυματική-επιθηλιακή μετάβαση (MET), η γήρανση και η αυτοφαγία. Στόχος είναι να αποσαφηνιστεί ο τρόπος με τον οποίο η RAS επηρεάζεται από την παρουσία αντικαρκινικών φαρμάκων και να αναδειχθούν πιθανοί μηχανισμοί που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

8. Καλλιέργεια καρκινικών μεσεγχυματικών κυττάρων MDA-MB 231

Υλικά καλλιέργειας

- **Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας:** Για την καλλιέργεια των MDA-MB 231 χρησιμοποιήθηκε το Dulbecco's Modified Eagle Medium από την εταιρεία Biowest (DMEM, BioWest). Το θρεπτικό αυτό περιέχει υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη η οποία είναι η βασική πηγή άνθρακα των κυττάρων. Το θρεπτικό μέσο πριν την χρήση του εμπλουτίστηκε με αυξητικούς παράγοντες μέσω της προσθήκης ορού εμβρύου βοός σε αναλογία 10%v/v (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco). Τέλος, το θρεπτικό περιέχει ακόμη τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη σε αναλογία 1% v/v για την αποφυγή μολύνσεων των κυττάρων κατά την καλλιέργειά τους. Συντηρείται στο ψυγείο στους 4°C και θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 37°C μισή ώρα πριν την χρήση του.
- **Διάλυμα Hank's Balanced Solution:** Το ρυθμιστικό διάλυμα Phosphate Buffer Solution (PBS, Lonza) είναι ένα ισοζυγισμένο αλατούχο διάλυμα που χρησιμοποιείται ευρέως σε κυτταροκαλλιέργειες. Είναι σχεδιασμένο για να διατηρεί τις συνθήκες οσμωτικότητας, pH και ιοντικής ισορροπίας των κυττάρων. Συντηρείται σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).
- **Θρυψίνη:** Η θρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που καταλύει την υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών. Χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις που επιθυμούμε να αποκολλήσουμε τα κύτταρα από την επιφάνεια του μέσου καλλιέργειας όπου είναι προσκολλημένα. Συντηρείται στο ψυγείο στους 4°C και θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 37°C μισή ώρα πριν την χρήση του καθώς αυτή είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου.

8.1. Διαχείριση και Ανακαλλιέργεια καρκινικών κυττάρων

Οποιαδήποτε διαχείριση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής τάξης II ο οποίος διατηρεί ασηπτικές συνθήκες και προστατεύει τα κύτταρα από επιμολύνσεις. Ως μέσο ανάπτυξης των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν φλάσκες πολυστυρενίου οι οποίες διέθεταν ειδικό φίλτρο που επιτρέπει την οξυγόνωση των κυττάρων. Για την καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM (BioWest) ενώ η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε μέσα σε κλίβανο επώασης υπό σταθερή θερμοκρασία 37°C, επαρκή υγρασία και σταθερή συγκέντρωση 5% CO₂ στην εσωτερική ατμόσφαιρα (πρότυπες συνθήκες). Κατά την διάρκεια της έρευνας γινόταν συχνά ανακαλλιέργεια των κυττάρων όταν ή κυτταρική πυκνότητα ήταν υψηλή, δηλαδή ξεπερνούσε το 80-90% , όταν άλλαζε το pH του μέσου (εμφανές μέσω αλλαγής χρώματος) και όταν υπήρχαν προγραμματισμένα πειράματα που απαιτούσαν φρέσκα κύτταρα σε χαμηλή πυκνότητα. Η τακτική ανακαλλιέργεια διατηρεί τα κύτταρα υγιή. Η πορεία ανάπτυξης των κυττάρων παρατηρήθηκε με οπτικό μικροσκόπιο αντίθετης φάσης.

Πρωτόκολλο ανακαλλιέργειας κυττάρων για φλάσκα T75

- Αφαίρεση παλαιού θρεπτικού υλικού
- Πλύση των κυττάρων με 5ml διαλύματος PBS
- Προσθήκη 1,5ml θρυψίνης και επακόλουθη επώαση στον κλίβανο για 3 λεπτά
- Παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων στο μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης με σκοπό τη διαπίστωση της αποκολλητικής δράσης της θρυψίνης – Αν χρειαστεί ελαφρό χτύπημα της φλάσκας
- Προσθήκη 10ml από το νέο πλήρες θρεπτικό μέσο το οποίο απενεργοποιεί την θρυψίνη
- Πιπετάρισμα πολλές φορές ώστε να σπάσουν οι συνδέσεις των κυττάρων και να υπάρχουν μεμονωμένα κύτταρα
- Από τον συνολικό όγκο της φλάσκας γίνεται μεταφορά σε νέα φλάσκα ο όγκος που επιθυμούμε ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων που θέλουμε να κρατήσουμε.
- Συμπλήρωση με νέο πλήρες θρεπτικό μέσο μέχρι επίτευξη τελικού όγκου 10ml
- Επώαση των κυττάρων στον κλίβανο

8.2. Απόψυξη καρκινικών κυττάρων

Πρωτόκολλο απόψυξης κυττάρων

- Σε falcon των 15ml προστίθενται 2ml πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM
- Μεταφορά του cryovial που περιέχει τα καρκινικά κύτταρα στο υδατόλουτρο (37°C) για 10 έως 15 δευτερόλεπτα
- Απόχυση του περιεχομένου του cryovial στο falcon που περιέχει το πλήρες θρεπτικό
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων (1800 στροφές, 5-7 λεπτά, 25°C)
- Προσεκτική απομάκρυνση του υπερκειμένου
- Προσθήκη 5ml διαλύματος FBS και επαναδιάλυση του ιζήματος
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων (1800 στροφές, 5-7 λεπτά, 25°C)
- Προσεκτική απομάκρυνση του υπερκειμένου
- Προσθήκη 2ml νέου πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM και επαναδιάλυση ιζήματος
- Μεταφορά των κυττάρων σε T75 φλάσκες από πολυστυρένιο
- Προσθήκη 8ml νέου πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM
- Επώαση στον κλίβανο

8.3. Κατάψυξη καρκινικών κυττάρων

Όταν θέλουμε να αποθηκεύσουμε κύτταρα για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να τα καλλιεργούμε ενεργά τα καταψύχουμε στους -80°C μαζί με κρυοπροστατευτικό διάλυμα. Ο αριθμός των cryovials που θα αποθηκευτούν εξαρτάται από την πλήρωση της φλάσκας. Για μία T75 φλάσκα με 90% confluence αποθηκεύονται 3-4 cryovials

Πρωτόκολλο κατάψυξης κυττάρων

- Αφαίρεση όλου του θρεπτικού μέσου από την φλάσκα
- Πλύση με 5 ml PBS
- Προσθήκη 1,5ml θρυψίνης και επώαση στον κλίβανο 3 λεπτά
- Προσθήκη 5ml θρεπτικού για απενεργοποίηση της θρυψίνης
- Συλλογή και μεταφορά των κυττάρων σε falcon των 15ml
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στα 1500 rpm, στους 20°C
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Επαναδιάλυση του ιζήματος με 5ml freezing solution (70% πλήρες θρεπτικό DMEM, 20% FBS, 10% DMSO). Η προσθήκη του freezing solution γίνεται σταγόνα-σταγόνα
- Μεταφορά 1 ml των κυττάρων σε κάθε cryovial
- Τοποθέτηση των κυττάρων στους -20°C για 60 λεπτά
- Τοποθέτηση των κυττάρων στους -80°C

8.4. Στρώσιμο κυττάρων σε plate- Plating

Για την παρατήρηση της RAS πρωτεΐνης πριν και μετά την επίδραση της δοξορουβικίνης με συνεστακό μικροσκόπιο χρησιμοποιήθηκαν 8 wells plate (μ-Slide 8 Well high Ibidi company add details). Από τα 8 wells χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα 6, 3 ως control και 3 για την επίδραση με το αντικαρκινικό φάρμακο. Σε κάθε plate τοποθετήθηκαν 40.000 κύτταρα. Ο τελικός όγκος των 8 wells plate είναι 300μl.

Υλικά

- Πλήρες θρεπτικό DMEM με 10% FBS (BioWest)
- PBS (Lonza)
- Θρυψίνη (BioWest)
- Πλάκα Neubauer και καλυπτρίδα
- 8 well plate

Πρωτόκολλο plating

- Αφαίρεση παλαιού θρεπτικού υλικού
- Πλύση των κυττάρων με 5ml διαλύματος PBS
- Προσθήκη 1,5ml θρυψίνης και επακόλουθη επώαση στον κλίβανο για 3 λεπτά
- Παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων στο μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης με σκοπό τη διαπίστωση της αποκολλητικής δράσης της θρυψίνης – Αν χρειαστεί ελαφρό χτύπημα της φλάσκας
- Μεταφορά των κυττάρων σε 50ml falcon με 7-8ml πλήρες θρεπτικό DMEM
- 10μl από το διάλυμα των κυττάρων τοποθετούνται σε κάθε μία από τις δύο οπές της πλάκας Neubauer
- Μέτρηση των κυττάρων
- Υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων στο 1ml
- Υπολογισμός του όγκου του διαλύματος που αντιστοιχεί σε 300.000 κύτταρα
- Στα 8 wells plate τοποθετείται το πλήρες θρεπτικό μέσο που ο όγκος του υπολογίζεται από την αφαίρεση του όγκου των κυττάρων από τον τελικό όγκο
- Τοποθέτηση κυττάρων στο κέντρο των wells
- Επώαση στον κλίβανο

8.5. Εισαγωγή πλασμιδίου στα καρκινικά κύτταρα – Transfection

24 ώρες μετά το plating πραγματοποιήθηκε transfection των κυττάρων, δηλαδή εισαγωγή πλασμιδίου pcDNA3 που περιείχε το γονίδιο ενδιαφέροντος. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο που έφερε το λιπιδιακό άκρο της HRAS (tH). Η τελική ποσότητα του πλασμιδίου σε κάθε well ήταν 100ng. Σε μία τέτοια διαδικασία είναι απαραίτητη η ανάμειξη του DNA με κάποιο transfection reagent. Στην συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η Lipofectamine 2000. Η lipofectamine είναι ένας εμπορικά διαθέσιμος λιποσωμικός παράγοντας μεταφοράς που χρησιμοποιείται ευρέως για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA (ή και RNA) σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Η δράση της βασίζεται στα κατιονικά λιπίδια της, τα οποία έλκονται από το αρνητικά φορτισμένο DNA, σχηματίζοντας σύμπλοκα λιποσώματα-DNA. Τα σύμπλοκα μπορούν να συντηχθούν με τη μεμβράνη των κυττάρων ή να εισέλθουν μέσω ενδοκύτωσης. Αφού εισέλθει, το DNA απελευθερώνεται από το λιπώσωμα και κατευθύνεται προς τον πυρήνα, όπου θα γίνει η έκφραση του γονιδίου ενδιαφέροντος (Cardarelli et al., 2016).

Υλικά

- Πλήρες θρεπτικό DMEM (BioWest)
- Opti-mem (Gibco)
- Stock 500ng/μl πλασμιδίου
- Lipofectamine 1mg/ml (Invitrogen)

Πρωτόκολλο εισαγωγής πλασμιδίου σε καρκινικά κύτταρα (transfection)

- Αφαίρεση παλιού θρεπτικού από τα wells
- Προσθήκη 250μl νέου πλήρες θρεπτικού σε κάθε well
- Επιστροφή του plate στον κλίβανο
- Προσθήκη 120μl opti-mem και 5μl πλασμιδίου σε ένα erpendorf (συγκέντρωση DNA 20ng/μl)
- Προσθήκη 46μl opti-mem και 4μl lipofectamine σε δεύτερο Eppendorf (συγκέντρωση lipofectamine 0,08mg/ml)
- Σε 12 erpendorf προστίθενται 20μl opti-mem
- Προσθήκη 5μl από το διάλυμα DNA στα πρώτα 6 erpendorf (συγκέντρωση DNA 4ng/μl)
- Προσθήκη 5μl από το διάλυμα lipofectamine στα δεύτερα 6 erpendorf (συγκέντρωση lipofectamine 0,016mg/ml)
- Ανάμειξη των 6 erpendorf με το διάλυμα DNA με τα 6 erpendorf με το διάλυμα lipofectamine αντίστοιχα (συγκέντρωση DNA 2ng/μl και συγκέντρωση lipofectamine 0,008mg/ml)
- Αναμονή για 5λεπτά στον θάλαμο
- Προσθήκη του συνολικού όγκου κάθε erpendorf (50μl) σε κάθε well του plate αντίστοιχα
- Επώαση σε κλίβανο

8.6. Επίδραση με doxorubicin

24 ώρες μετά την μεταφορά του πλασμιδίου στα κύτταρα με την επιθυμητή ισόμορφή της RAS πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε επίδραση των κυττάρων με το αντικαρκινικό φάρμακο δοξορουβικίνη. Πριν την επίδραση με το φάρμακο έγινε αλλαγή θρεπτικού στο plate από πλήρες DMEM με 10% FBS σε DMEM με 5% FBS.

Υλικά

- Πλήρες θρεπτικό DMEM με 5% FBS (BioWest)
- Doxorubicin 2mg/ml (Pfizer)

Έγινε επίδραση με 12,5 nM και 100 nM DOX

8.7. Παρατήρηση κυττάρων με συνεστιακό μικροσκόπιο

Η ζωντανή κυτταρική απεικόνιση με συνεστιακό μικροσκόπιο (live-cell confocal imaging) είναι μία τεχνική που επιτρέπει την παρακολούθηση ζωντανών κυττάρων σε πραγματικό χρόνο, με υψηλή ευκρίνεια. Το συνεστιακό μικροσκόπιο χρησιμοποιεί laser και έτσι αποδίδει καθαρές, οπτικά τομογραφικές εικόνες. Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν γονίδιο για την φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP υπό την ρύθμιση του ίδιου υποκινητή με το γονίδιο ενδιαφέροντος.

Επομένως, το σήμα που παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο φανέρωνε την τοπολογία της RAS πρωτεΐνης στο εσωτερικό των κυττάρων. Η GFP διεγείρεται με φως γύρω στα 488nm, και εκπέμπει φθορισμό στο πράσινο φάσμα, περίπου στα 509nm, οπότε είναι εύκολα ανιχνεύσιμο με συνεστιακό μικροσκόπιο.

8.8. Μέθοδος προσδιορισμού δραστικότητας SA-β-gal

Για να μελετηθεί εάν η επίδραση με δοξορουβικίνη στα καρκινικά κύτταρα προκαλεί επαγόμενη από φάρμακο κυτταρική γήρανση αξιοποιήθηκε η δοκιμή προσδιορισμού δραστικότητας της β-γαλακτοσιδάσης (SA-β-gal). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ενζυμική δραστικότητα της β-γαλακτοσιδάσης η οποία αυξάνεται στα γερασμένα κύτταρα. Πιο αναλυτικά, η β-γαλακτοσιδάση (β-gal) είναι ένα λυσοσωμικό ένζυμο που κωδικοποιείται από το γονίδιο GLB1 και υπάρχει φυσιολογικά σε όλα τα κύτταρα για να διασπά β-γλυκοζιδικούς δεσμούς. Το βέλτιστο pH δράσης του ενζύμου είναι 4,5 (όξινο). Στα γερασμένα κύτταρα ωστόσο παρατηρείται υπερέκφραση του GLB1, με αποτέλεσμα αυξημένη δραστικότητα του ενζύμου ακόμη και σε pH 6 (ελαφρώς όξινο). Επομένως, στη μέθοδο αυτή γίνεται χρήση του χρωμογόνου υποστρώματος 5-βρόμο-3ινδολυλ-4-χλώρο-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης (Xgal) το οποίο όταν διασπαστεί από την β-γαλακτοσιδάση σε pH 6 δίνει μπλε χρώμα. Η καταμέτρηση των μπλε κυττάρων, όπως και η αναλογία τους σε σχέση με τα υπόλοιπα κύτταρα φανερώνει αν πράγματι έχει επαχθεί κυτταρική γήρανση καθώς και σε τι ποσοστό των κυττάρων εμφανίζεται. Ο προσδιορισμός δραστηριότητας αυτού του ενζύμου αποτελεί τον πιο διαδεδομένο δείκτη κυτταρικής γήρανσης καθώς είναι αρκετά αξιόπιστος (Gary & Kindell, 2005).

Για την μέθοδο αυτή στρώθηκαν 500.000 κυττάρων σε 6 wells plate. Έπειτα από 24 ώρες έγινε αλλαγή θρεπτικού από DMEM με 10% FBS σε DMEM με 5% FBS και επίδραση με 12,5 nM και 100 nM δοξορουβικίνη σε 2 wells αντίστοιχα. Τα 2 τελευταία wells λειτούργησαν ως control χωρίς να γίνει επίδραση με το φάρμακο. 24 ώρες μετά την επίδραση του φαρμάκου ακολούθησε η μέθοδος προσδιορισμού του ενζύμου.

Υλικά

- Διάλυμα μονιμοποίησης: 0,2% φορμαλδεΰδη και 0,2% γλουταραλδεΰδη διαλυμένα σε PBS
- Διάλυμα χρώσης: περιέχει τα εξής άλατα:
 - Ρυθμιστικό διάλυμα 40 mM Κιτρικό οξύ/ Φωσφορικό Νάτριο
 - 5 mM $C_6N_6FeK_4$
 - 5 mM $C_6N_6FeK_3$
 - 150 mM NaCl
 - 2 mM $MgCl_2$
 - 1 mg/ml 5-βρόμο-3ινδολυλ-4-χλώρο-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης (Xgal, Sigma Aldrich:B4252 250MG)

Πρωτόκολλο προσδιορισμού δραστηριότητας SA-β-gal

- Απομάκρυνση θρεπτικού μέσου από τα wells
- Διπλή πλύση κυττάρων με κρύο διάλυμα PBS (4°C)
- Μονιμοποίηση των κυττάρων με 2 ml από το διάλυμα μονιμοποίησης
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) για 5 λεπτά
- Διπλή ήπια πλύση κυττάρων με κρύο διάλυμα PBS (4°C)
- Χρώση των κυττάρων με 1,5 ml από το διάλυμα χρώσης
- Επώαση σε κλίβανο επώασης στους 37°C απουσία CO₂ για 16-24 ώρες
- Απομάκρυνση διαλύματος χρώσης
- Τριπλή πλύση κυττάρων με κρύο διάλυμα PBS (4°C)
- Λήψη φωτογραφιών με οπτικό μικροσκόπιο

8.9. Λύσης κυττάρων και απομόνωση πρωτεϊνών

Σε 6 wells plate στρώθηκαν 500.000 κύτταρα σε κάθε well. Έπειτα από 24 ώρες έγινε αλλαγή θρεπτικού από DMEM με 10% FBS σε DMEM με 5% FBS και επίδραση στα κύτταρα με δοξορουβικίνη 12,5nM και 100nM. 24 μετά την προσθήκη δοξορουβικίνης ακολούθησε λύση κυττάρων και απομόνωση των συνολικών πρωτεϊνών.

Υλικά

- Διάλυμα λύσης κυττάρων (lysis buffer)
 - 30 mM Tris (Invitrogen)
 - 10% Γλυκερόλη (Invitrogen)
 - 150 mM NaCl (Sharlau)
 - 1% NP40 (Ambion)
 - Αναστολείς πρωτεασών
- Πάγος
- Συσκευή Vortex

Πρωτόκολλο λύσης κυττάρων και απομόνωση πρωτεϊνών

- Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από όλα τα wells
- Διπλή πλύση των κυττάρων με διάλυμα PBS
- Τοποθέτηση του 6 well plate σε πάγο
- Προσθήκη 100μl από το Lysis Buffer ανά 10⁶ κύτταρα
- Ανάδευση των κυττάρων του 6 well plate στη συσκευή Vortex για 15 δευτερόλεπτα ανά 5 λεπτά για σύνολο 50 λεπτών
- Το περιεχόμενο των wells μεταφέρεται σε eppendorf των 2ml
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων σε 1400 rpm για 15 λεπτά στους 4°C

- Προσεκτική συλλογή υπερκειμένου και μεταφορά του σε νέο eppendorf
- Αποθήκευση στους -20°C

8.10. Προσδιορισμός απόλυτης συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Για τον υπολογισμό των ποσοτήτων των άγνωστων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην απορρόφηση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 η οποία μεταβάλλεται από τα 465nm στα 595nm όταν αλληλοεπιδράσει με πρωτεΐνες. Η χρωστική προσδένεται κυρίως σε βασικά και αρωματικά αμινοξέα πρωτεϊνών, σχηματίζοντας σύμπλοκο που έχει μπλε χρώμα. Με την μέθοδο Bradford μπορούν να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις πρωτεϊνών γνωστής συγκέντρωσης, μια διαδικασία που μαζί με την κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης οδηγεί στον προσδιορισμό της απόλυτης συγκέντρωσης πρωτεϊνικών δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης. Στην συγκεκριμένη περίπτωση μετρήθηκε η απορρόφηση διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης αλβουμίνης από ορό βοός (Bovine Serum Albumine, BSA) με σκοπό να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη. Για την μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων έγινε αραιώση 5 φορές.

Υλικά

- Stock BSA 2mg/ml
- Διάλυμα 1:3 RIPA:PBS
- BCA protein Assay Kit 23227 (ThermoFisher Scientific)
- 96 wells plate

Πρωτόκολλο Bradford

- Κατασκευή των πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης 1.5μg/μ, 1μg/μ, 0.75μg/μ, 0.5μg/μ, 0.25μg/μ, 0.125μg/μ BSA σε eppendorf. Τα διαλύματα κατασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις. Η αραιώση γίνεται με διάλυμα 1:3 RIPA:PBS γιατί αυτό περιέχουν και τα δείγματα.
- Προσθήκη 25μl από κάθε διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης σε διαφορετικό well του 96 wells plate
- Προσθήκη 25μl 1:3 RIPA:PBS σε ένα wells το οποίο θα λειτουργήσει ως blank
- Προσθήκη 20μl PBS σε όσα wells θα προστεθεί δείγμα
- Προσθήκη 5μl δείγματος σε όσα wells υπάρχει PBS (αραιώση 1:5)
- Προσθήκη 200μl διαλύματος χρωστικής σε όλα τα wells
- Επώαση για 30 λεπτά στους 37°C έως πλήρη ανάπτυξη του χρώματος
- Φωτομέτρηση στα 595nm
- Κατασκευή της πρότυπης καμπύλης με βάση τις τιμές απορρόφησης των διάφορων συγκεντρώσεων (διάγραμμα OD/συγκέντρωση)

- Υπολογισμός της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών των δειγμάτων πριν και μετά την επίδραση δοξορουβικίνης

8.11. Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση στηρίζεται στο γεγονός ότι ένα μόριο με καθαρό φορτίο, όπως οι πρωτεΐνες θα μετακινηθεί όταν υπάρχει ηλεκτρικό πεδίο. Η ταχύτητα μετακίνησης (u) μίας πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z), και τον συντελεστή τριβής (f) σύμφωνα με τον τύπο: $U = E z / f$. Σε μία ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, ώστε οι πρωτεΐνες να χάσουν την τρισδιάστατη δομή τους και να διατηρήσουν μόνο την αμινοξική τους αλληλουχία, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως βάσει του μοριακού βάρους (Mr). Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης καθώς το πήκτωμα λειτουργεί ως μοριακός φίλτρο που διαχωρίζει τις πρωτεΐνες επιτρέποντας στις πιο ελαφριές να μετακινηθούν πιο γρήγορα από τις πιο βαριές. Το μείγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειϊκού νατρίου (SDS). Το SDS είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που δεσμεύεται στις κύριες αλυσίδες των πρωτεϊνών σε αναλογία ενός μορίου SDS ανά δύο αμινοξέα με αποτέλεσμα να καταστρέφονται μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης. Έτσι το σύμπλοκο του SDS με την αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη έχει μεγάλο φορτίο ανάλογο της μάζας της. Το αρνητικό αυτό φορτίο που αποκτά η πρωτεΐνη είναι πολύ μεγαλύτερο από αυτό που είχε αρχικά η φυσική πρωτεΐνη και έτσι το αρχικό φορτίο της θεωρείται αμελητέο. Η μετακίνηση γίνεται σε λεπτή κατακόρυφη στιβάδα και έτσι η μετακίνηση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι απολύτως ανάλογη με το λογάριθμο της μάζας τους.

Υλικά

- Πηκτή πολυακρυλαμιδίου
- Διάλυμα χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης (SampleBuffer, Invitrogen)
- Μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών πρωτεϊνών (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fischer Scientific)
- Δις απεσταγμένο H_2O
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x : Μίξη 100mL διαλύματος ηλεκτροφόρησης 10x (NuPageMES Running buffer) με 900 mL ddH $_2O$

8.11.1. Παρασκευή δειγμάτων πριν την φόρτωση

Από το πρωτεϊνικό λύμα που έχει απομονωθεί από τα κύτταρα φορτώνονται 20μg σε κάθε πηγαδάκι της πηκτής πολυακρυλαμιδίου. Ο όγκος του διαλύματος των πρωτεϊνών που αντιστοιχεί σε 20μg υπολογίζεται με την βοήθεια της καμπύλης προσδιορισμού συγκεντρώσεων των δειγμάτων. Τα 20μg πρωτεϊνικού λύματος αναμειγνύονται με 6μl loading buffer 4x που

περιέχει την χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης. Τέλος, προστίθεται ddH₂O έως τελικό όγκο 24μl. Η παρασκευή των δειγμάτων γίνεται σε errendorf των 0,2ml και έπειτα τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμικό κυκλοποιητή για να γίνει η αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Επιλέγεται το πρόγραμμα ADOPROT και οι συνθήκες αποδιάταξης είναι 95°C για 5 λεπτά.

8.11.2. Διαχωρισμός Πρωτεϊνών – SDS PAGE

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών είναι ασυνεχής διαδικασία και εκτελείται σε δύο διαδοχικά πήκτωμα: ένα πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel) στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα και ένα πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) το οποίο ακολουθεί ακριβώς κάτω από το πήκτωμα πακεταρίσματος και γίνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών. Το stacking gel «συμπυκνώνει» τις πρωτεΐνες σε μία μικρή ζώνη, έτσι ώστε οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος να ξεκινήσουν ταυτόχρονα από το πήκτωμα διαχωρισμού. Χρησιμοποιήθηκαν δύο separating gel με διαφορετικές περιεκτικότητες πολυακρυλαμίδης. Το ένα gel είχε περιεκτικότητα 10% το οποίο διαχωρίζει καλύτερα τις μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεΐνες και το άλλο είχε περιεκτικότητα 12% το οποίο διαχωρίζει καλύτερα τις μικρές μοριακού βάρους πρωτεΐνες. Στα παρακάτω πινακάκια φαίνονται οι ποσότητες κάθε συστατικού που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των gels.

Separating gel 12%	Separating gel 10%	Stacking gel 3,9%
2 mL 30% Acrylamide/0,8% bisacrylamide	1,67 mL 30% Acrylamide/0,8% bisacrylamide	0,65 mL 30% Acrylamide/0,8% bisacrylamide
1,25 mL 4x Tris-Cl/SDS pH 8.8	1,25 mL 4x Tris-Cl/SDS pH 8.8	1,25 mL 4x Tris-Cl/SDS pH 6.8
1,75 mL H ₂ O	2,08 mL H ₂ O	3,05 mL H ₂ O
0,05 mL 10%(w/v) ammonium persulfate	0,05 mL 10%(w/v) ammonium persulfate	25 μL 10%(w/v) ammonium persulfate
0,015 mL TEMED	0,015 mL TEMED	5 μL TEMED

Διαδικασία

- Στήσιμο της ειδικής συσκευής ηλεκτροφόρησης της εταιρίας BioRad
- Τοποθέτηση κασέτας με gels πολυακρυλαμιδίου στο μεσαίο μέρος της συσκευής
- Προσθήκη 600 mL Running buffer 1X τόσο στο μπροστινό όσο και στο οπίσθιο μέρος της κασέτας με τα gels
- Προσθήκη 200 mL Running buffer 1X στην κασέτα ενδιάμεσα από τα δύο gels
- Στο πρώτο πηγαδάκι των gels πολυακρυλαμιδίου φορτώνεται ο ladder (3μl από εταιρία)
- Φόρτωση 24μl από κάθε δείγμα (2 φορές από 12μl). Τα δύο gels φορτώνονται αντικατροπτικά

- Ρύθμιση της έντασης του ρεύματος στα 70 Volt για 15 λεπτά έως ότου τα δείγματα περάσουν το stacking gel – Έναρξη ηλεκτροφόρησης
- Μετά το πέρας των 15 λεπτών τα Volt ρυθμίζονται στα 175 για 50 λεπτά.

8.11.3. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη – Transfer

Μετά τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών ακολουθεί μεταφορά σε μεμβράνη στην οποία στη συνέχεια πραγματοποιείται η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών.

Υλικά

- Συσκευή Trans-blot WetTransferCell (BioRad)
- Διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer 1X)
 - 10% Transfer buffer 10X
 - 20% Μεθανόλη
 - 70% Δις απεσταγμένο H₂O
 - Μεμβράνη PVDF
- Χαρτί τύπου Whitman
- Ειδικά σφουγγαράκια
- Διάλυμα Ponceau 5% σε acetic acid
- Διάλυμα πλύσης TBS-Tween
 - 10% TBS buffer 10X
 - 90% Δις απεσταγμένο H₂O
 - 1% Tween-20 (BioRad)

Πρωτόκολλο μεταφοράς πρωτεϊνών

- Η μεμβράνη PVDF στην οποία θα μεταφερθούν οι πρωτεΐνες πρέπει πρώτα να ενεργοποιηθεί, δηλαδή να γίνει υδρόφιλη μέσω επώασης για 30 δευτερόλεπτα σε μεθανόλη
- Επώαση των gels πολυακρυλαμίδιου μαζί με τέσσερα σφουγγαράκια, οχτώ χαρτάκια και των δυο μεμβρανών PVDF για τουλάχιστον 10 λεπτά σε transfer buffer 1X
- Δημιουργία sandwich σε ειδικό καλούπι της συσκευής. Με την σειρά τοποθετούνται σφουγγαράκι, χαρτί Whitman, gel, μεμβράνη PVDF, χαρτί Whitman, σφουγγαράκι.
- Τα δύο sandwich που αντιστοιχούν στα δυο gel διαφορετικής περιεκτικότητας τοποθετούνται στην κασέτα και έπειτα στο κέντρο της συσκευής
- Προσθήκη 1L Transfer buffer 1X στη συσκευή
- Ρύθμιση της συσκευής στα 400 A για 90 λεπτά
- Μετά το πέρας 90 λεπτών για επιβεβαίωση πως οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν στην μεμβράνη κάνουμε χρώση με Ponceau, μια κόκκινη χρωστική που θα εμφανίσει τις «μπάντες» των πρωτεϊνών στην μεμβράνη.

- Ακολουθούν τρεις πλύσεις με TBS-T διάλυμα για 10 λεπτά υπό ανάδευση

8.11.4. Blocking

Μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη PVDF ακολουθεί το blocking ώστε να αποτραπεί η μη ειδική σύνδεση αντισωμάτων στη μεμβράνη. Για να συμβεί αυτό η μεμβράνη επάζεται σε διάλυμα με πρωτεΐνες “μπλοκαρίσματος”. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε non fat dry milk powder blocking buffer σε TBS-T 5%. Η επώαση της μεμβράνης με blocking buffer έγινε για 50 λεπτά. Οι πρωτεΐνες του διαλύματος καλύπτουν τις ελεύθερες θέσεις στη μεμβράνη ώστε, όταν προστεθούν τα αντισώματα να συνδεθούν μόνο στις στοχευμένες πρωτεΐνες, και όχι τυχαία σε “γυμνές” περιοχές της μεμβράνης, μειώνοντας έτσι τον θόρυβο (background) στο τελικό σήμα. Μετά το πέρας 50 λεπτών με blocking buffer ακολουθεί μια πλύση με TBS-T διάλυμα για 10 λεπτά υπό ανάδευση.

8.11.5. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Western (Western Blot)

Η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western βασίζεται στην δράση ενός «σετ» αντισωμάτων τα οποία ονομάζονται πρωτοταγές και δευτεροταγές. Το πρωτοταγές αντίσωμα αναγνωρίζει και συνδέεται ειδικά με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος ενώ το δευτεροταγές αντίσωμα αναγνωρίζει και συνδέεται στο πρωτοταγές. Το δευτεροταγές αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο Horseradish Peroxidase (HRP) ώστε μετά τη σύνδεσή του να είναι εφικτή η οπτικοποίηση της πρωτεΐνης σε film ακτινών X. Οι φωτεινές “μπάντες” που εμφανίζονται είναι αντιπροσωπευτικές των επιπέδων έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ποσοτικοποίηση της. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν. Όλα τα πρωτοταγή αντισώματα είναι διαλυμένα σε 5% BSA σε TBS-T και όλα τα δευτεροταγή σε 5% blocking buffer.

Πρωτεΐνη ενδιαφέροντος	Πρωτοταγές Αντίσωμα	Δευτεροταγές Αντίσωμα
Caveolin-1	Rabbit polyclonal anti cav-1 1:1000	Goat anti-rabbit HRP, 1:10000 (Boster, BA1054-1)
e- cadherin	Rabbit monoclonal anti e-cadherin 1:1000	Goat anti-rabbit HRP, 1:10000 (Boster, BA1054-1)
PI3K-CIII	Rabbit monoclonal anti PI3K-CIII 1:1000	Goat anti-rabbit HRP, 1:10000 (Boster, BA1054-1)
P62	Mouse monoclonal anti p62, 1:1000	Goat anti-mouse HRP, 1:10000 (Boster, BA1050-1)
ATG5	Rabbit monoclonal anti ATG5 1:1000	Goat anti-rabbit HRP, 1:10000 (Boster, BA1054-1)
P21	Rabbit monoclonal anti p21, 1:1000	Goat anti-rabbit HRP, 1:10000 (Boster, BA1054-1)
LC3A/B	Rabbit polyclonal anti LC3A/B, 1:1000	Goat anti-rabbit HRP, 1:10000 (Boster, BA1054-1)

β-actin	Mouse monoclonal anti actin β, 1:1000	Goat anti-mouse HRP, 1:10000 (Boster, BA1050-1)
---------	--	--

Η β-actin χρησιμοποιείται ως ενδογενής έλεγχος (control), δηλαδή ως σημείο αναφοράς για τη σύγκριση της έκφρασης άλλων πρωτεϊνών. Η ίδια επιλέγεται συχνά διότι είναι μία δομική πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού που εκφράζεται σταθερά σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και δεν επηρεάζεται σημαντικά από πειραματικές μεταβολές (πχ. Επίδραση φαρμάκου)

Πρωτόκολλο ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών

- Επώαση της μεμβράνης με το διάλυμα πρωτοταγές αντισώματος, στους 4°C ολονύκτια υπό ανάδευση
- Τριπλή πλύση της μεμβράνης με TBS-T διάλυμα για 10 λεπτά υπό ανάδευση
- Επώαση με το δευτεροταγές αντίσωμα για 60 λεπτά, υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου
- Τριπλή πλύση της μεμβράνης με TBS-T διάλυμα για 10 λεπτά υπό ανάδευση

Το τελικό βήμα αποτελεί η αποτύπωση του σήματος των αντισωμάτων μέσω αυτοραδιογραφίας. Για τον σκοπό αυτό η μεμβράνη επωάζεται σε ενισχυτικό σήματος (ECL) για 1-5 λεπτά, το οποίο απομακρύνεται στη συνέχεια με διηθητικό χαρτί. Έπειτα, η μεμβράνη μεταφέρεται σε ειδικό αναλυτή (UVITEC Alliance) ο οποίος μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή θα μας δώσει το σήμα των αντισωμάτων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

9.1. Αλλαγή στην μορφολογία των κυττάρων έπειτα από επίδραση με δοξορουβικίνη

Τα κύτταρα που στρώθηκαν σε 6 wells plate, μετά την επίδραση με δοξορουβικίνη και προτού απομονωθεί το πρωτεϊνικό τους λύμα, παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης για να εντοπιστούν πιθανές αλλαγές στην μορφολογία τους.

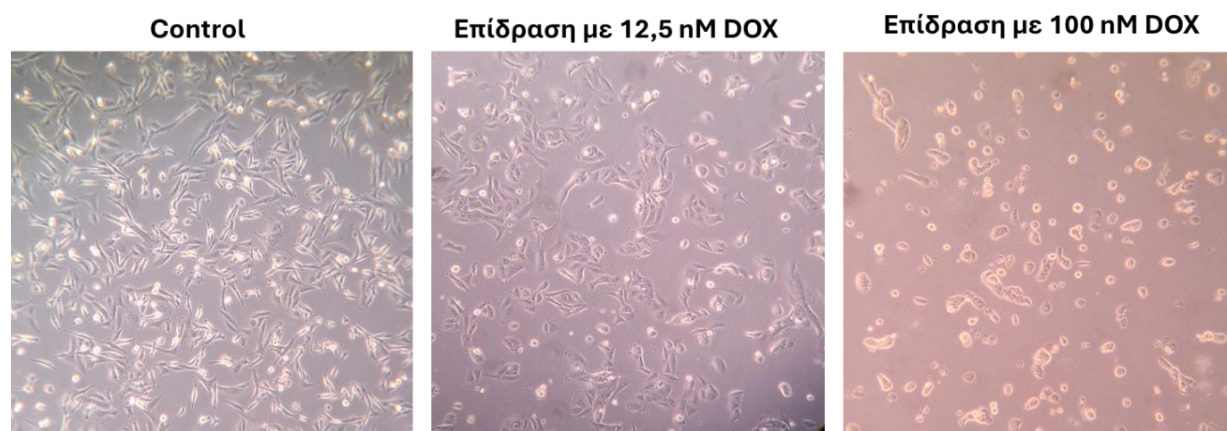
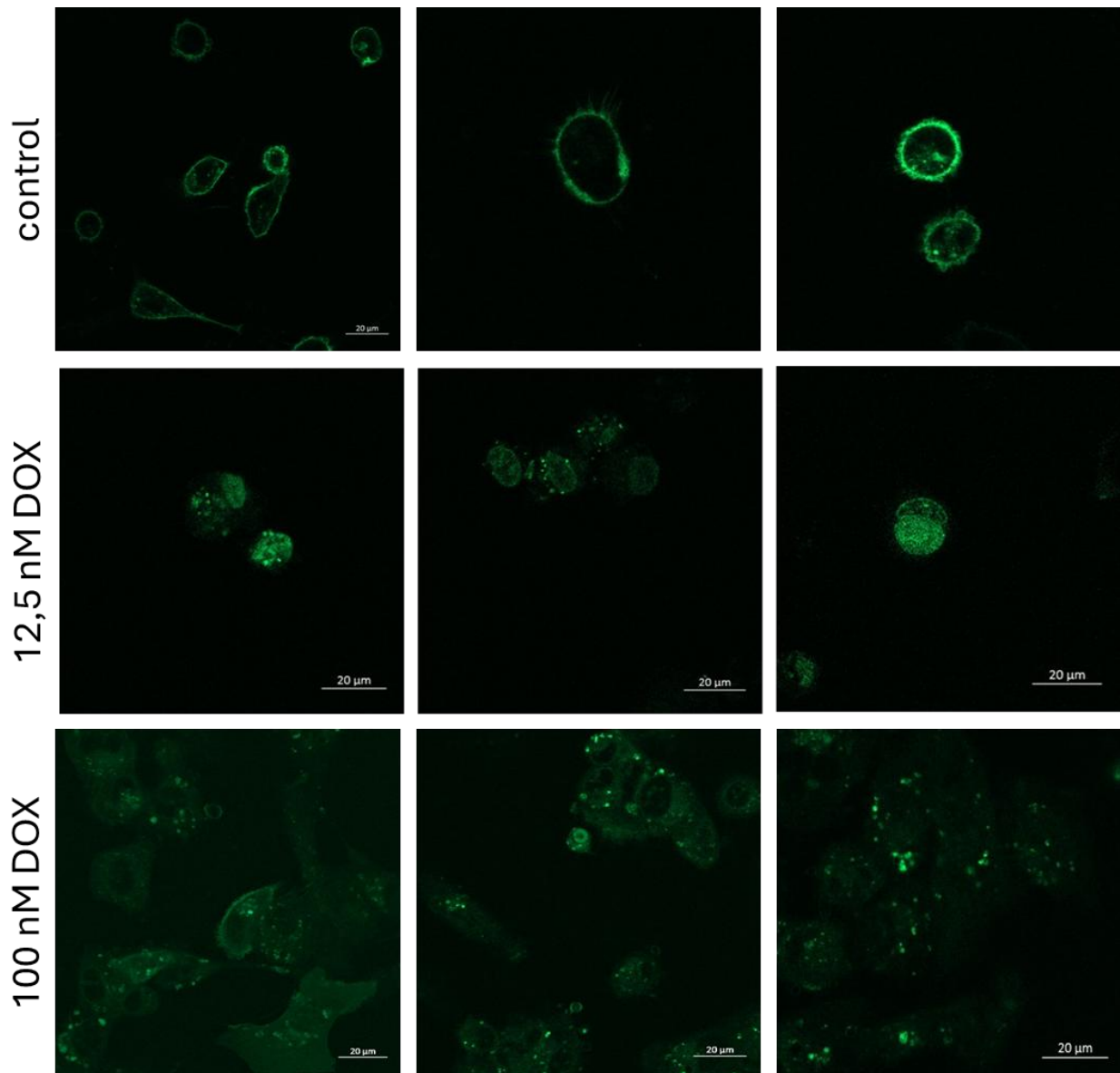


Figure 7: Φωτογραφίες από μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης του 6 wells plate. Στην αριστερή εικόνα φαίνεται η μορφολογία των κυττάρων MDA-MB 231 χωρίς επίδραση φαρμάκου. Στην μεσαία εικόνα φαίνεται η μορφολογία των κυττάρων έπειτα από 12,5 nM δοξορουβικίνης. Στην δεξιά εικόνα φαίνεται η μορφολογία των κυττάρων έπειτα από 100 nM δοξορουβικίνης.

Παρατηρήσεις:

- Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του φαρμάκου, μειώνεται η κυτταρική πυκνότητα. Στα 12,5 nM φαίνεται τα κύτταρα να βρίσκονται σε παύση του κυτταρικού κύκλου. Στα 100 nM φαίνεται να αυξάνεται ο κυτταρικός θάνατος.
- Στην πρώτη εικόνα τα κύτταρα φαίνεται να έχουν την χαρακτηριστική επιμήκη μορφή των μεσεγχυματικών καρκινικών κυττάρων MDA-MB 231. Τα περισσότερα δείχνουν καλά προσκολλημένα στην επιφάνεια, ζωντανά, ενεργά και με ενδείξεις υγιούς πολλαπλασιασμού.
- Στην δεύτερη εικόνα τα κύτταρα φαίνεται να έχουν χάσει την χαρακτηριστική δομή τους. Τα κύτταρα είναι λιγότερο επιμηκυμένα και περισσότερο πεπλατυσμένα και μεγάλα. Φαίνεται να δημιουργούν περισσότερες συνδέσεις μεταξύ τους σε σχέση με τα κύτταρα που δεν έχει γίνει επίδραση φαρμάκου. Υπάρχουν ήπιες ενδείξεις απόπτωσης.
- Στην τρίτη εικόνα παρατηρείται σημαντική στρογγυλοποίηση των κυττάρων και αποκόλληση από την επιφάνεια. Υπάρχει μεγάλος αριθμός μικρών και σφαιρικών κυττάρων, κάτι που υποδηλώνει έντονο στρες, απόπτωση ή νέκρωση.

9.2. Εντοπισμός της tH-RAS στο εσωτερικό των κυττάρων



Παρατηρήσεις:

- Στα MDA-MB 231 κύτταρα που δεν έχει γίνει καμία επίδραση η tH-RAS βρίσκεται στην μεμβράνη των κυττάρων. Λογικό αφού τα κύτταρα είναι καρκινικά μεσεγχυματικά
- Στα MDA-MB 231 κύτταρα που έχει γίνει επίδραση με 12,5 nM δοξορουβικίνης η tH-RAS εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα
- Στα MDA-MB 231 κύτταρα που έχει γίνει επίδραση με 100 nM δοξορουβικίνης tH-RAS εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και σε ορισμένα σημεία στο εσωτερικό του κυττάρου φαίνεται να συσσωρεύεται.

9.3. Αποτελέσματα της μεθόδου προσδιορισμού δραστικότητας SA-β-gal

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν όντως έχει επαχθεί κυτταρική γήρανση σε καρκινικά κύτταρα MDA-MB 231 έπειτα από επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων με το αντικαρκινικό φάρμακο δοξορουβικίνη για 24 ώρες, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου β-γαλακτοσιδάσης. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με καρκινικά κύτταρα στα οποία δεν έχει γίνει καμία επίδραση.

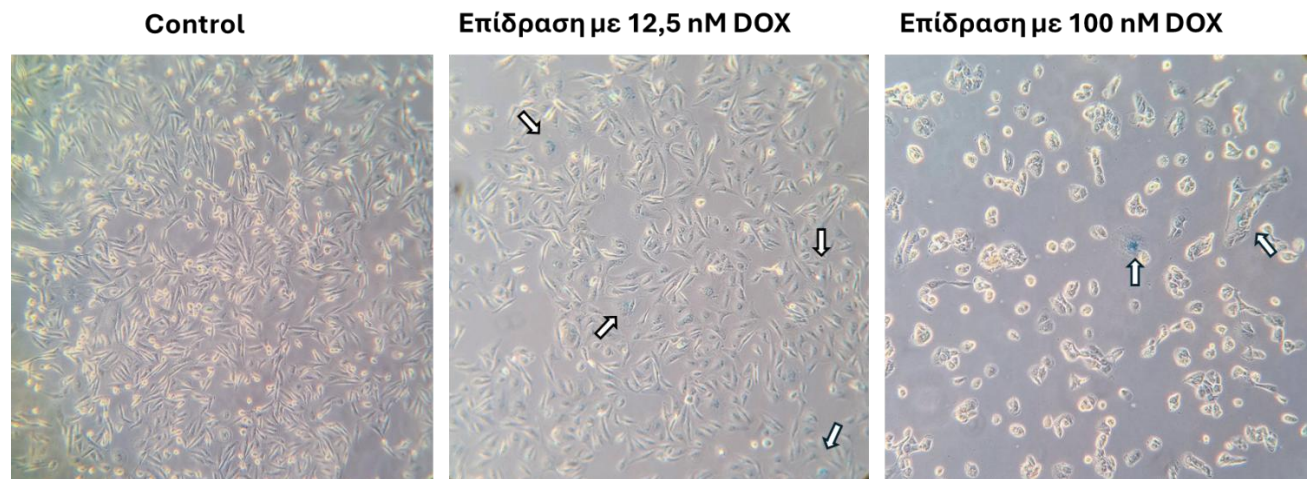
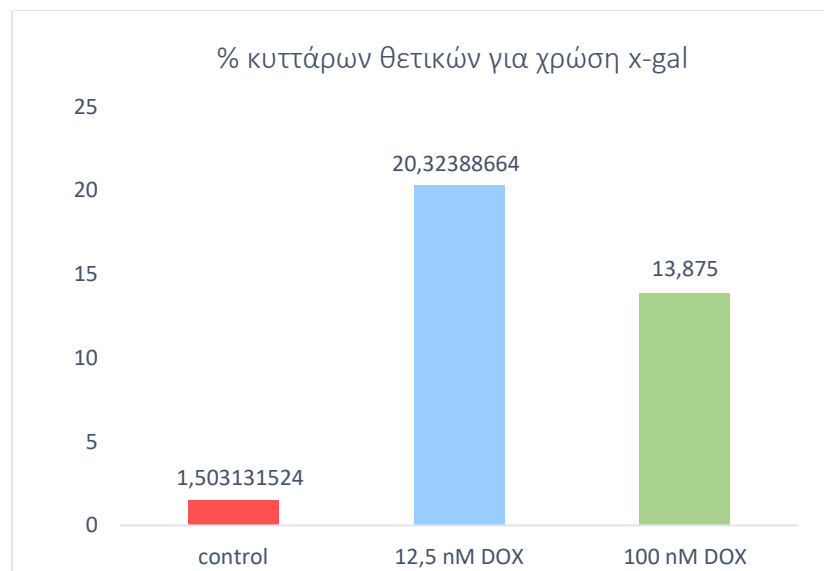


Figure 8: Χρώση SA-b-Gal σε καρκινικά κύτταρα MDA-MB 231 χωρίς καμία επίδραση (αριστερή εικόνα) και σε καρκινικά κύτταρα MDA-MB 231 έπειτα από επίδραση με 12,5 nM δοξορουβικίνη (μεσαία εικόνα) και 100 nM δοξορουβικίνη (δεξιά εικόνα).



Equation 1: Υπολογισμός και απεικόνιση ποσοστού κυττάρων θετικών για χρώση β-γαλακτοσιδάσης σε καρκινικά κύτταρα MDA-MB 231 χωρίς καμία επίδραση (αριστερή μπάρα) και σε καρκινικά κύτταρα MDA-MB 231 έπειτα από επίδραση με 12,5 nM δοξορουβικίνη (μεσαία μπάρα) και 100 nM δοξορουβικίνη (δεξιά μπάρα).

Παρατηρήσεις:

- Στην πλειοψηφία των κυττάρων της πρώτης εικόνας δεν ανιχνεύεται δραστικότητα της β-γαλακτοσιδάσης, επομένως ο πληθυσμός χαρακτηρίζεται ως μη γερασμένος.
- Στην δεύτερη εικόνα παρατηρείται αυξημένο ποσοστό κυττάρων θετικών σε χρώση β-γαλακτοσιδάσης. Σύμφωνα με την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων στο διάγραμμα φαίνεται να υπάρχει ποσοστό θετικών για χρώση β-γαλακτοσιδάσης, και κατ' επέκτασιν γερασμένων κυττάρων περίπου 20%.
- Στην τρίτη εικόνα παρατηρείται επίσης αυξημένο ποσοστό θετικών σε χρώση κυττάρων, αλλά μειωμένο σε σχέση με αυτό που προκάλεσε η επίδραση μικρότερης συγκέντρωσης φαρμάκου. Σύμφωνα με το διάγραμμα το ποσοστό γήρανσης σε αυτή την περίπτωση κυμαίνεται στο 13%.

9.4. Αποτελέσματα της ποσοτικής ποσοτικοποίησης του επιθηλιακού δείκτη E-cadherin

Έπειτα από την αλλαγή του φαινοτύπου, που παρατηρήθηκε στα κύτταρα μετά την επίδραση του αντικαρκινικού φαρμάκου, ακολούθησε αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της E-cadherin για να διερευνηθεί αν οι διαφορετικές συγκεντρώσεις της δοξορουβικίνης μπορούν να προκαλέσουν επιθηλιακή μετάπτωση MET στα κύτταρα MDA-MB 231.

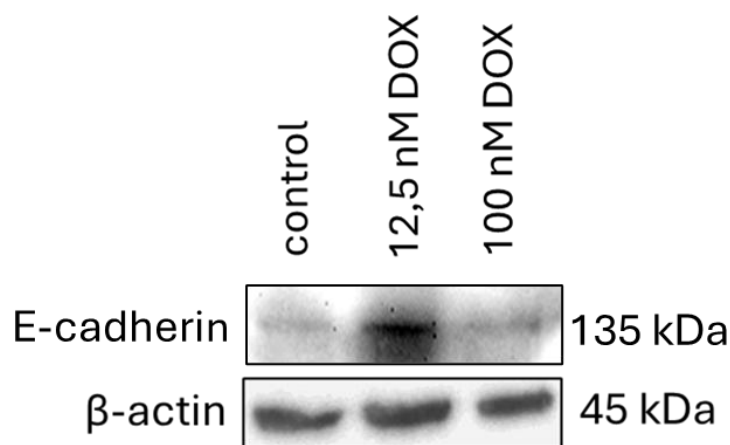
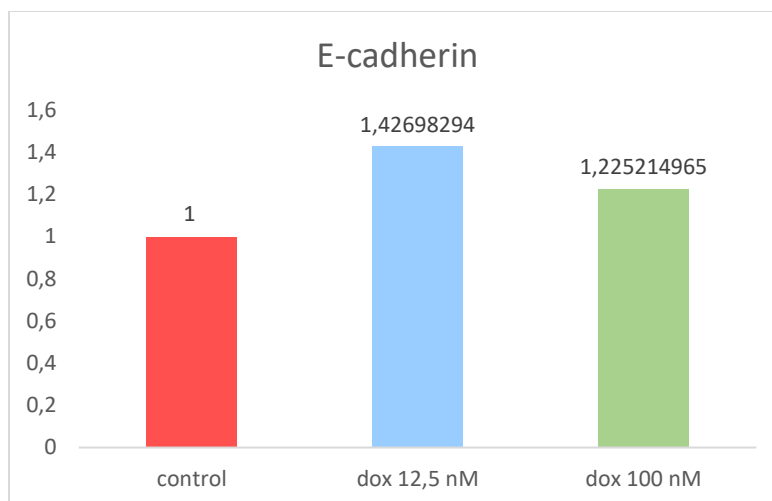


Figure 9: Ανοσοαποτύπωση κατά Western που απεικονίζει τα επίπεδα E-cadherin (135 kDa) σε MDA-MB 231 κύτταρα και MDA-MB 231 κύτταρα έπειτα από επίδραση με 12,5 nM και 100 nM δοξορουβικίνη. Ως loading control χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη (45 kDa).



Equation 2: Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων της E-καδερίνης σε MDA-MB 231 κύτταρα και MDA-MB 231 κύτταρα έπειτα από επίδραση με 12,5 nM και 100 nM δοξορουβικίνη. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα ImageJ και ως loading control για την σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

Παρατηρήσεις:

- Τα επίπεδα της E-cadherin φαίνεται να αυξάνονται στα κύτταρα που έχει γίνει επίδραση με δοξορουβικίνη σε σχέση με τα control.
- Η αύξηση των επιπέδων της E-cadherin είναι μεγαλύτερη στα κύτταρα που έχει γίνει επίδραση με την μικρότερη συγκέντρωση φαρμάκου (12,5 nM) από ότι η αύξηση που παρατηρείται στα κύτταρα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση φαρμάκου (100 nM).

9.5. Αποτελέσματα της ποσοτικής ποσοτικοποίησης της caveolin-1

Προκειμένου να μελετηθεί η σχέση ανάμεσα στην αλλαγή τοπολογίας της RAS πρωτεΐνης στο εσωτερικό των κυττάρων και της καβεολίνης, μετρήθηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης πριν και μετά την επίδραση του φαρμάκου.

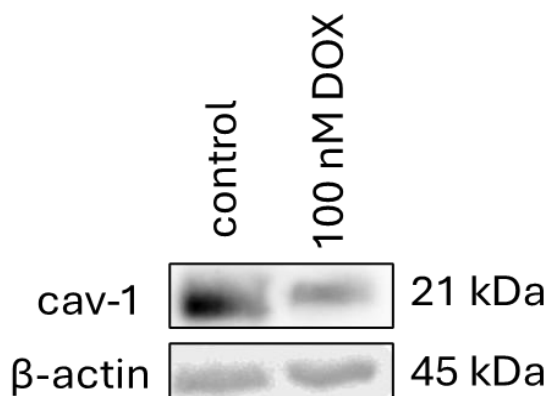
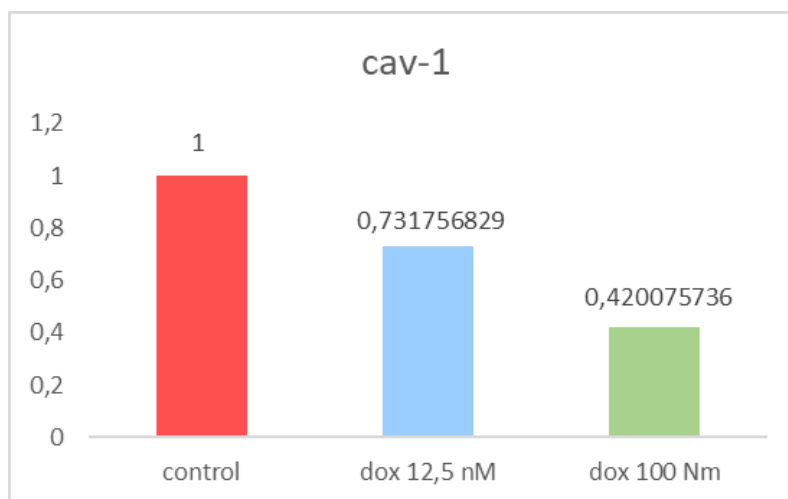


Figure 10: Ανοσοαποτύπωση κατά Western που απεικονίζει τα επίπεδα καβεολίνης-1 (21 kDa) σε MDA-MB 231 κύτταρα και MDA-MB 231 κύτταρα έπειτα από επίδραση με 100 nM δοξορουβικίνη. Ως loading control χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη (45 kDa).



Equation 3: Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων της καβεολίνης-1 σε MDA-MB 231 κύτταρα και MDA-MB 231 κύτταρα έπειτα από επίδραση με 12,5 nM και 100 nM δοξορουβικίνη. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα ImageJ και ως loading control για την σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

Παρατηρήσεις:

- Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της καβεολίνης-1 μειώνονται σημαντικά στα κύτταρα που έχει γίνει επίδραση με δοξορουβικίνη σε σχέση με τα control.
- Η μείωση των επιπέδων της καβεολίνης-1 είναι μεγαλύτερη στα κύτταρα που έχει γίνει επίδραση με την μεγαλύτερη συγκέντρωση φαρμάκου (100 nM) από ότι η μείωση που παρατηρείται στα κύτταρα με την μικρότερη συγκέντρωση φαρμάκου (12,5 nM).

9.6. Αποτελέσματα της ποσοτικής ποσοτικοποίησης του δείκτη κυτταρικής γήρανσης p21

Για την ενίσχυση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας προσδιορισμού δραστικότητας SA-β-gal αξιολογήθηκαν και τα επίπεδα της πρωτεΐνης p21, η οποία αποτελεί δείκτη γήρανσης των κυττάρων.

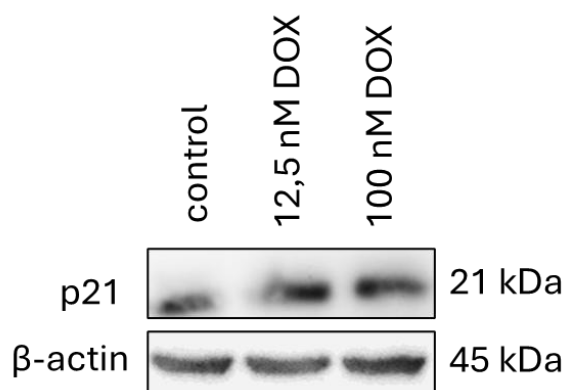
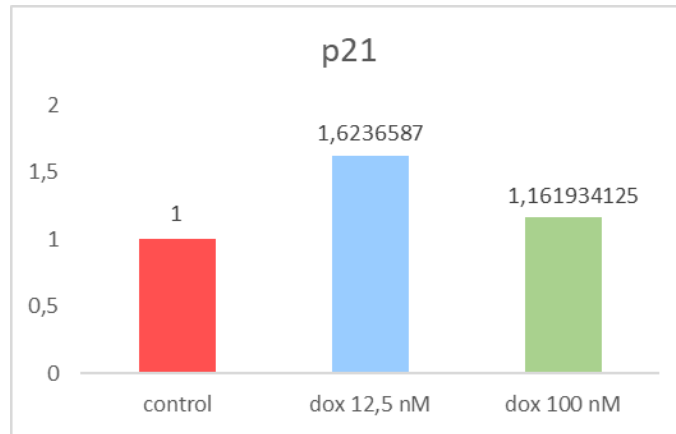


Figure 11: Ανοσοαποτύπωση κατά Western που απεικονίζει τα επίπεδα της p21 (21 kDa) σε MDA-MB 231 κύτταρα και MDA-MB 231 κύτταρα έπειτα από επίδραση με 12,5 nM και 100 nM δοξορουβικίνη. Ως loading control χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη (45 kDa).



Equation 4: Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων της p21 σε MDA-MB 231 κύτταρα και MDA-MB 231 κύτταρα έπειτα από επίδραση με 12,5 nM και 100 nM δοξορουβικίνη. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα ImageJ και ως loading control για την σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

Παρατηρήσεις:

- Τα επίπεδα της p21 φαίνεται να αυξάνονται στα κύτταρα που έχει γίνει επίδραση με δοξορουβικίνη σε σχέση με τα control.
- Η αύξηση των επιπέδων της p21 είναι μεγαλύτερη στα κύτταρα που έχει γίνει επίδραση με την μικρότερη συγκέντρωση φαρμάκου (12,5 nM) από ότι η αύξηση που παρατηρείται στα κύτταρα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση φαρμάκου (100 nM).

9.7. Αποτελέσματα της ποσοτικής ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών που της αυτοφαγίας
 Ήδη από την εισαγωγή γνωρίζουμε πως η δοξορουβικίνη μπορεί να προκαλέσει κάποια μορφή αυτοφαγίας σε καρκινικά κύτταρα. Για να διερευνηθεί παραπάνω η σχέση της δοξορουβικίνης με την αυτόφαγία έγινε μέτρηση των επιπέδων των πρωτεϊνών ATG5, PI3K-CIII, p62 και LC3I/II

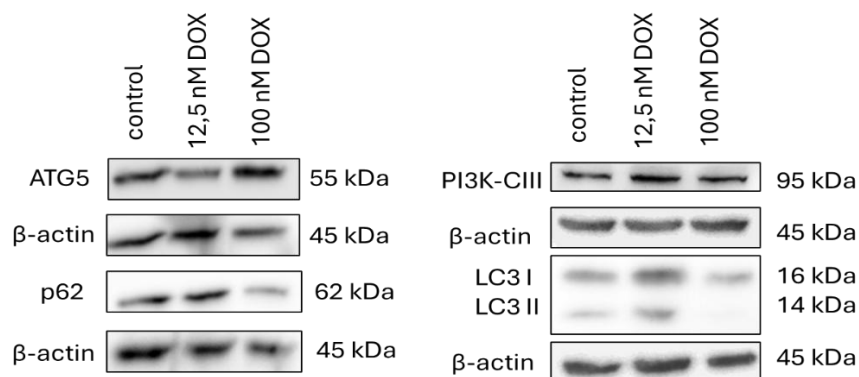
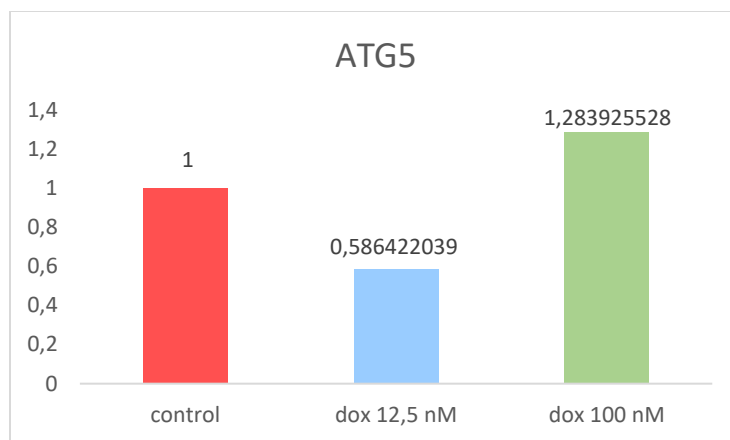
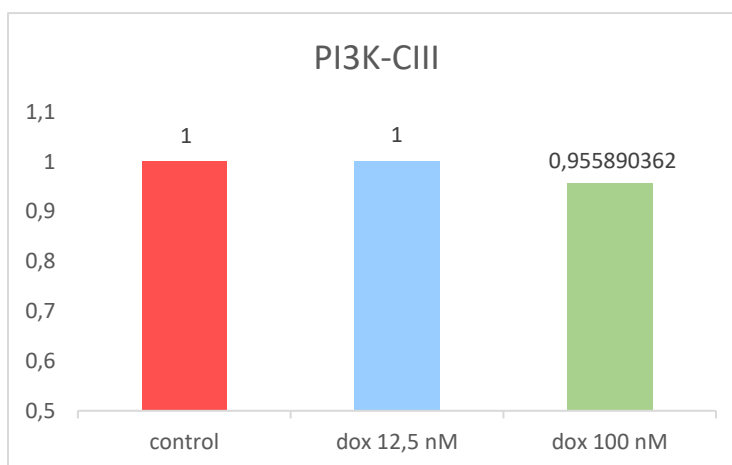


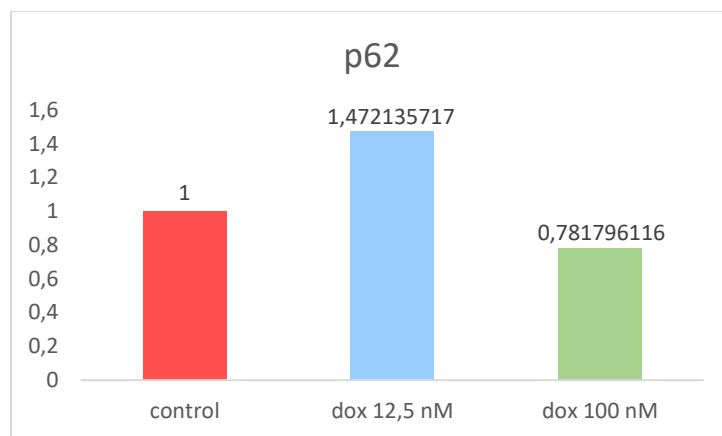
Figure 12: Ανοσοαποτύπωση κατά Western που απεικονίζει τα επίπεδα των ATG5 (55 kDa), PI3K-CIII (95 kDa), p62 (62 kDa), LC3I (14 kDa) και LC3II (16 kDa) σε MDA-MB 231 κύτταρα και MDA-MB 231 κύτταρα έπειτα από επίδραση με 12,5 nM και 100 nM δοξορουβικίνη. Ως loading control χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη (45 kDa).



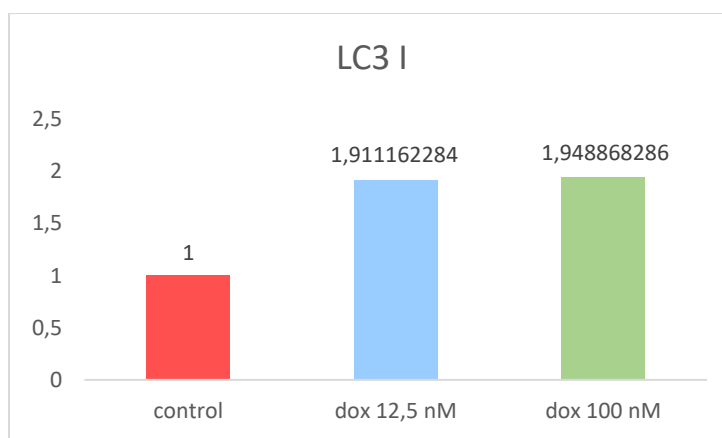
Equation 5: Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων της ATG5 σε MDA-MB 231 κύτταρα και MDA-MB 231 κύτταρα έπειτα από επίδραση με 12,5 nM και 100 nM δοξορουβικίνη. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα ImageJ και ως loading control για την σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.



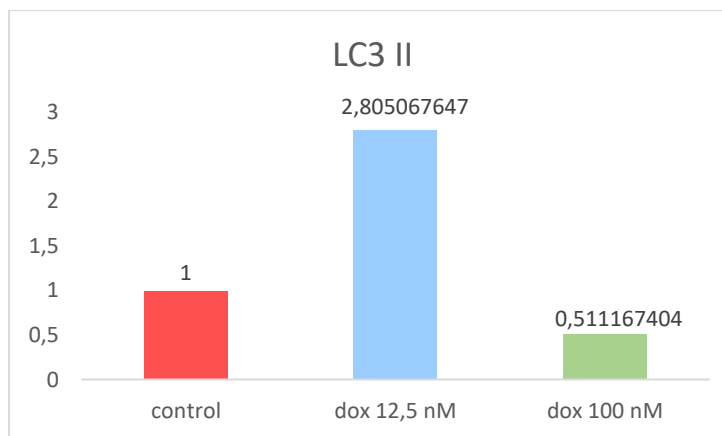
Equation 6: Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων της PI3K-CIII σε MDA-MB 231 κύτταρα και MDA-MB 231 κύτταρα έπειτα από επίδραση με 12,5 nM και 100 nM δοξορουβικίνη. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα ImageJ και ως loading control για την σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.



Equation 7: Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων της p62 σε MDA-MB 231 κύτταρα και MDA-MB 231 κύτταρα έπειτα από επίδραση με 12,5 nM και 100 nM δοξορουβικίνη. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα ImageJ και ως loading control για την σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.



Equation 8: Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων της LC3I σε MDA-MB 231 κύτταρα και MDA-MB 231 κύτταρα έπειτα από επίδραση με 12,5 nM και 100 nM δοξορουβικίνη. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα ImageJ και ως loading control για την σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.



Equation 9: Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων της LC3II σε MDA-MB 231 κύτταρα και MDA-MB 231 κύτταρα έπειτα από επίδραση με 12,5 nM και 100 nM δοξορουβικίνη. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα ImageJ και ως loading control για την σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

Παρατηρήσεις

- Τα επίπεδα της ATG5 μειώνονται μετά από επίδραση με 12,5 nM δοξορουβικίνης, ενώ αυξάνονται μετά από επίδραση με 100 nM φαρμάκου.
- Τα επίπεδα της PI3K-CIII δεν μεταβάλλονται μετά την επίδραση του φαρμάκου.
- Τα επίπεδα της p62 αυξάνονται μετά από επίδραση με 12,5 nM δοξορουβικίνης, ενώ μειώνονται μετά από επίδραση με 100 nM φαρμάκου.
- Τα επίπεδα της LC3I αυξάνονται εξίσου μετά την επίδραση και δύο συγκεντρώσεων φαρμάκου.
- Τα επίπεδα της LC3II αυξάνονται σημαντικά μετά την επίδραση με 12,5 nM δοξορουβικίνης, ενώ μειώνονται σημαντικά μετά την επίδραση με 100 nM φαρμάκου.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Προτού ακολουθήσουν τα συμπεράσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι απαραίτητη μία σύντομη αναφορά σε ό,τι έχει προηγηθεί. Σκοπός της μελέτης, ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της δοξορουβικίνης στην ενδοκυτταρική τοπολογία και κυκλοφορία της πρωτεΐνης RAS. Ταυτόχρονα, έγινε προσπάθεια να αποσαφηνιστεί ο τρόπος με τον οποίο η δοξορουβικίνη επηρεάζει την σχέση RAS και καβεολίνης-1, τη μορφολογία των καρκινικών κυττάρων, τη δυνατότητα πρόκλησης μεσεγχυματικής-επιθηλιακής μετάβασης (MET) και την ενεργοποίηση μοριακών μηχανισμών που σχετίζονται με την κυτταρική γήρανση και τη ρύθμιση της αυτοφαγικής ροής. Για τον σκοπό αυτό, αξιοποιήθηκε η καρκινική μεσεγχυματική σειρά MDA-MB 231. Συγκεκριμένα, αφού τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τριβλίο έως ικανοποιητικό ποσοστό πυκνότητας, στρώθηκαν σε 8 wells plate και επιμολύνθηκαν με πλασμίδιο που έφερε την αλληλουχία για το λιπιδιακό άκρο της ισομορφής H-RAS. Έπειτα από 24 ώρες έγινε αλλαγή θρεπτικού σε 5% FBS medium και επίδραση με 12,5 nM και 100 nM δοξορουβικίνης για άλλες 24 ώρες. Η θέση της πρωτεΐνης στο κύτταρο παρατηρήθηκε με την βοήθεια συνεστιακού μικροσκοπίου ζωντανής κυτταρικής απεικόνισης. Ταυτόχρονα, έπειτα από επίδραση του αντικαρκινικού φαρμάκου, χωρίς επιμόλυνση με πλασμίδιο, απομονώθηκε το συνολικό πρωτεϊνικό λύμα των κυττάρων με στόχο την μέτρηση των επιπέδων κάποιων πρωτεϊνών με την μέθοδο Western Blot (ανοσοαποτύπωση). Τα συμπεράσματα καθώς και η ανάλυση των αποτελεσμάτων ακολουθούν παρακάτω.

Το πρώτο συμπέρασμα από τα αποτελέσματα της εργασίας φαίνεται να είναι πως η επίδραση της δοξορουβικίνης μπορεί πιθανόν να προκαλέσει επιθηλιακή μετάπτωση στα καρκινικά μεσεγχυματικά κύτταρα MDA-MB 231. Αυτό στηρίζεται στην αλλαγή μορφολογίας που παρατηρείται μετά την επίδραση του φαρμάκου. Τα κύτταρα χάνουν το χαρακτηριστικό επίμηκες σχήμα τους και φαίνεται να έχουν έναν πιο μεγάλο και τετραγωνισμένο φαινότυπο. Επίσης, παρατηρείται πως τα κύτταρα έρχονται πιο κοντά μεταξύ τους και δημιουργούν συνδέσεις, κάτι που είναι γνωστό για τα επιθηλιακά κύτταρα. Ο ισχυρισμός επιθηλιακής μετάβασης των κυττάρων ενδυναμώνεται από την αύξηση των επιπέδων του επιθηλιακού δείκτη E-καδερίνης στα κύτταρα MDA-MB 231 που καλλιεργήθηκαν με αντικαρκινικό φάρμακο. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον, είναι πως η μορφολογία των κυττάρων αλλάζει και με τις δύο συγκεντρώσεις φαρμάκου (12,5 nM και 100 nM), αλλά όχι με τον ίδιο τρόπο. Αυτό αποτυπώνεται και στα επίπεδα της E-καδερίνης καθώς μεγαλύτερη αύξηση παρατηρείται στην μικρή συγκέντρωση φαρμάκου (12,5 nM).

Σε πρόσφατη μελέτη οι Drago et al. διερεύνησαν τον ρόλο της επιθηλιοποίησης στην καρκινογένεση και την υποτροπή του καρκίνου του μαστού. Αυτό που διαπίστωσαν είναι πως η μετάβαση των καρκινικών κυττάρων από μεσεγχυματικό σε επιθηλιακό φαινότυπο (MET), έχει διπλό ρόλο. Από τη μία πλευρά η ίδια μπορεί να οδηγήσει τα κύτταρα σε κατάσταση μειωμένου

πολλαπλασιασμού και μειωμένης κινητικότητας, δηλαδή σε μια κατάσταση καρκινικής αδράνειας, ενώ από την άλλη πλευρά συνοδεύεται από αύξηση του οξειδωτικού στρες, ενεργοποίηση της αυτοφαγίας και συσσώρευση βλαβών στο DNA. Οι συσσωρευμένες αυτές βλάβες ενδέχεται να επιτρέψουν σε αδρανή καρκινικά κύτταρα να «ζυπνήσουν» μελλοντικά, οδηγώντας σε μετάσταση και υποτροπή του καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν και στην κυτταρική σειρά MDA-MB 231 στην οποία προκλήθηκε επιθηλιοποίηση μέσω συστημάτων επαγωγίμης υπερέκφρασης των γονιδίων OVOL1 και OVOL2, τα οποία εισήχθησαν στα κύτταρα με τη βοήθεια λεντιϊκών φορέων και ενεργοποιούνταν παρουσία δοξυκυκλίνης. Η υπερέκφραση αυτών των παραγόντων οδήγησε σε καταστολή δεικτών EMT όπως ZEB1 και βιμεντίνη και ταυτόχρονη αύξηση επιθηλιακών δεικτών όπως η E-καδερίνη, προκαλώντας μορφολογική μετάβαση των κυττάρων σε πιο επιθηλιακή μορφή και εμφάνιση χαρακτηριστικών που παραπέμπουν σε καρκινική αδράνεια (Drago-Garcia et al., 2025). Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω, μια πιθανή ερμηνεία για τα αποτελέσματα της εργασίας είναι πως έπειτα από επίδραση δοξορουβικίνης τα καρκινικά κύτταρα MDA-MB 231 μεταβαίνουν από μεσεγχυματικό σε επιθηλιακό φαινότυπο, σταματούν να πολλαπλασιάζονται γρήγορα και γίνονται λιγότερο κινητικά έτσι ώστε να “κρυφτούν” από θεραπείες και φάρμακα.

Δεύτερο σημαντικό εύρημα αυτής της εργασίας είναι η αλλαγή τοπολογίας της RAS πρωτεΐνης μετά την επίδραση της δοξορουβικίνης και η σχέση της με τα επίπεδα καβεολίνης-1 εντός του κυττάρου. Με την βοήθεια του συνεστιακού μικροσκοπίου ζωντανής κυτταρικής απεικόνισης, παρατηρήθηκε πως το λιπιδιακό άκρο της HRAS στα MDA-MB 231 κύτταρα που δεν έχει γίνει καμία επίδραση (control) εντοπίζεται κυρίως στην μεμβράνη του κυττάρου. Αυτό είναι πολύ λογικό καθώς η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά είναι καρκινική μεσεγχυματική, που σημαίνει πως η RAS πρωτεΐνη είναι διαρκώς ενεργοποιημένη και άρα συνδεδεμένη με την μεμβράνη του κυττάρου (Nandan & Sivaraman, 2025). Μετά την επίδραση 12,5 nM δοξορουβικίνης το λιπιδιακό άκρο της H-RAS έφυγε από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και μετακινήθηκε προς το κυτταρόπλασμα. Η αποσύνδεση της tH-RAS από την μεμβράνη του κυττάρου δικαιολογείται και από την μείωση των επιπέδων καβεολίνης-1 που παρατηρήθηκαν μετά την επίδραση του φαρμάκου. Όπως προαναφέρεται (ενότητα 1.5), η HRAS εμφανίζει προτίμηση σε περιοχές υψηλής καμπυλότητας ενώ ταυτόχρονα η παρεμπόδιση της καβεολίνης-1 είναι ικανή να στρατολογήσει την πρωτεΐνη εκτός κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Πιθανολογείται λοιπόν, πως η δοξορουβικίνη μέσω κάποιου μηχανισμού εμποδίζει την έκφραση καβεολίνης-1 ή αυξάνει την διάσπαση της, άρα μειώνεται ο αριθμός των caveolae κι' έτσι το λιπιδιακό άκρο της HRAS μετακινείται προς το κυτταρόπλασμα. Το ίδιο ισχύει και για την επίδραση με 100 nM δοξορουβικίνης, καθώς ούτε σε αυτή την περίπτωση το λιπιδιακό άκρο της H-RAS παρατηρείται στην μεμβράνη του κυττάρου. Αντίθετα, παρατηρείται στο κυτταρόπλασμα και σε πολλές περιπτώσεις φαίνεται σαν να συγκεντρώνεται σε συγκεκριμένα κυτταρικά οργανίδια. Η μείωση των επιπέδων της καβεολίνης-1 που παρατηρείται και σε αυτή την συγκέντρωση συμφωνεί με

την απομάκρυνση της tH-RAS από την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Μάλιστα, η μείωση των επιπέδων της καβεολίνης-1 είναι μεγαλύτερη στα 100 nM φαρμάκου από ότι στα 12,5 nM, η οποία δεδομένης της υψηλής τοξικότητας του φαρμάκου θα μπορούσε να εξηγείται λόγω απόπτωσης των κυττάρων ως απόκριση σε υψηλή συγκέντρωση φαρμάκου. Από την βιβλιογραφία συμπεραίνουμε πως υπάρχει μια σχέση αλληλεξάρτησης ανάμεσα στην καβεολίνη-1 και την απόπτωση, καθώς πέρα την υπόθεση ότι τα επίπεδα της καβεολίνης-1 μειώνονται λόγω απόπτωσης, υπάρχουν στοιχεία που φανερώνουν πως η μείωση της καβεολίνης-1 συμβάλει στην απόπτωση. Έρευνα σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα έδειξε πως καβεολίνη-1 μπορεί να ενεργοποιήσει την οδό WNT/ β -catenin, με αποτέλεσμα μείωση των αποπτωτικών σημάτων, χαμηλότερη ενεργοποίηση κασπασών και άρα αυξημένη επιβίωση. Αντίθετα, σίγηση της καβεολίνης-1 με χρήση siRNA, μείωσε την ενεργότητα της οδού Wnt/ β -catenin και οδήγησε σε ενίσχυση της απόπτωσης (X. Wang et al., 2020). Την ίδια στιγμή, είναι γνωστό πως η καβεολίνη-1 παίζει ρόλο στην σωστή λειτουργία των μιτοχονδρίων, τα οποία έχουν καίρια σημασία στην διαδικασία της απόπτωσης. Πιο συγκεκριμένα, ο εντοπισμός της καβεολίνης-1 στα μιτοχόνδρια συνδέεται με σταθεροποίηση του δυναμικού της μεμβράνης και μειωμένη παραγωγή ROS. Από την άλλη όταν η καβεολίνη-1 σιγείται παρατηρείται υπερπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης, αύξηση ROS, άνοιγμα του πρωτεϊνικού συμπλόκου-καναλιού mPTP και απελευθέρωση κυτοχρώματος-c, που οδηγεί τελικά σε απόπτωση (Capera et al., 2021).

Στην πορεία της έρευνας, όπως είναι ήδη γνωστό από την βιβλιογραφία, επιβεβαιώθηκε πως η δοξορουβικίνη μπορεί να επάγει κυτταρική γήρανση στα καρκινικά κύτταρα. Αυτή η διαδικασία είναι αρκετά περίπλοκη καθώς τα καρκινικά κύτταρα δεν υπόκεινται φυσικά σε γήρανση. Η επαγωγή γήρανσης στα καρκινικά κύτταρα φαίνεται αρχικά από τα αποτελέσματα της μεθόδου προσδιορισμού δραστηριότητας SA- β -gal. Στα κύτταρα που έχει γίνει επίδραση με δοξορουβικίνη, παρατηρείται αυξημένο ποσοστό μπλε κυττάρων, δηλαδή αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου β γαλακτοσιδάση. Αυτό άμεσα σηματοδοτεί αυξημένο λυσοσωμικό φορτίο, το οποίο έμμεσα πιθανόν να σηματοδοτεί την γήρανση του κυττάρου ή την αυτοφαγική διαδικασία. Η αύξηση των επιπέδων του δείκτη κυτταρικής γήρανσης p21 στα κύτταρα που έχουν καλλιεργηθεί με δοξορουβικίνη ενισχύει το σενάριο για επαγωγή γήρανσης σε αυτά τα κύτταρα. Μάλιστα, τα δύο αυτά αποτελέσματα ταιριάζουν και ποσοτικά, καθώς μεγαλύτερο ποσοστό μπλε κυττάρων παρατηρείται στην συγκέντρωση φαρμάκου που τα επίπεδα p21 εμφανίζουν την μεγαλύτερη αύξηση. Ενώ αντίστοιχα, στην συγκέντρωση φαρμάκου που εμφανίζεται μικρότερο ποσοστό μπλε κυττάρων υπάρχει και μικρότερη αύξηση των επιπέδων p21. Πιο συγκεκριμένα, στα 12,5 nM αντικαρκινικού φαρμάκου παρατηρείται ποσοστό κυττάρων θετικών για χρώση x-gal περίπου 20% και αύξηση των επιπέδων p21 σε σχέση με το control κατά 1,62 φορές. Αντίστοιχα, στα 100 nM αντικαρκινικού φαρμάκου παρατηρείται ποσοστό κυττάρων θετικών για χρώση x-gal περίπου 13% και αύξηση των επιπέδων p21 σε σχέση με το control κατά 1,16 φορές. Στο σημείο αυτό είναι σημαντικό να αναφερθεί πως ο βασικός ρυθμιστής της p21 είναι η p53. Στη

καρκινική κυτταρική σειρά MDA-MB 231 ωστόσο, η p53 είναι μεταλλαγμένη. Αυτό σημαίνει πως η αύξηση της p21 που παρατηρείται ρυθμίζεται από οδούς ανεξάρτητα από την p53. Σε παλαιότερες μελέτες, έχει φανεί πως ουσίες όπως η 6-ανιλίνο-5,8-κινολινοκινόνη (LY83583) και η γενιστεΐνη, που έχει αντικαρκινική δράση, μπορούν να προκαλέσουν αναστολή του κυτταρικού κύκλου και αύξηση των επιπέδων p21 σε κύτταρα με μη λειτουργική p53 μέσω ενεργοποίησης του υποκινητή του γονιδίου CDKN1A της πρωτεΐνης p21 (Choi et al., 2000; Lodygin et al., 2002). Την ίδια στιγμή, ανεξάρτητα από την p53 υπάρχουν ακόμη πολλοί γνωστοί παράγοντες όπως οι Sp1, Smads, KLF, STATs που μπορούν να επάγουν την έκφραση της p21 και άρα την κυτταρική γήρανση (Al Bitar & Gali-Muhtasib, 2019).

Έπειτα, η συγκεκριμένη εργασία θέλησε να διερευνήσει την σχέση μεταξύ δοξορουβικίνης και αυτοφαγίας. Στα 12,5 nM αντικαρκινικού φαρμάκου παρατηρούμε αύξηση των επιπέδων LC3II και p62. Αυτό πιθανόν σηματοδοτεί μπλοκαρισμένη αυτοφαγική ροή με αποτέλεσμα συσσώρευση των πρωτεϊνών LC3II και p62. Όπως είναι γνωστό, η LC3II είναι πρωτεϊνικός δείκτης της δημιουργίας του αυτοφαγοσώματος και η p62 είναι πρωτεΐνη υποδοχέας φορτίου, που αναγνωρίζει τις πρωτεΐνες που έχουν σημαδευτεί με ουβικουιτίνη καθώς και την LC3II που βρίσκεται πάνω στη μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος με σκοπό να “φορτώσει” τις πρωτεΐνες στο εσωτερικό του αυτοφαγοσώματος για αποικοδόμηση. Όταν το αυτοφαγοσωμάτιο συγχωνευτεί με το λυσοσωμάτιο, το μόριο προς αποικοδόμηση μαζί με την LC3II και την p62 διασπώνται από τα λυσοσωμικά ένζυμα. Επομένως, σε μια ολοκληρωμένη αυτοφαγική ροή τα επίπεδα της LC3II και της p62 θα έπρεπε να μειώνονται. Η αύξηση λοιπόν, των επιπέδων LC3II και p62 που παρατηρήσαμε, πιθανόν υποδηλώνει μη ολοκληρωμένη αυτοφαγική ροή. Μάλιστα, η μείωση των επιπέδων της ATG5 ενισχύει την ιδέα ότι δεν αυξάνεται πραγματικά η βιογένεση του αυτοφαγοσώματος. Σε αυτό το σημείο, για πιο άρτια ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να ληφθεί υπόψη η ταυτόχρονη επαγωγή κυτταρικής γήρανσης στα κύτταρα MDA-MB 231. Σε γηρασμένα κύτταρα μπορεί να υπάρξει μεταγραφική αύξηση του SQSTM1, του γονιδίου που δίνει την p62, ανεξάρτητα από την αυτοφαγία. Πιο συγκεκριμένα, σε καταστάσεις στρες, γήρανσης, χημειοθεραπείας ενεργοποιείται ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ. Ο NF-κΒ είναι ο βασικός ρυθμιστής των SASP, των παραγόντων που εκκρίνουν τα γηρασμένα κύτταρα στο μικροπεριβάλλον τους και ταυτόχρονα μπορεί να επάγει την έκφραση του SQSTM1 (Taniguchi et al., 2016). Από τα παραπάνω λοιπόν, μπορούμε να συμπεράνουμε πως η αύξηση των επιπέδων p62 μπορεί να προέρχεται είτε από μπλοκάρισμα αυτοφαγίας, είτε από μεταγραφική επαγωγή λόγω ενεργοποίησης NF-κΒ σε κατάσταση στρες. Για να υπάρχει ξεκάθαρη εικόνα του οφείλεται η αύξηση των επιπέδων p62 θα πρέπει να γίνει μέτρηση και των επιπέδων mRNA μέσω RT-qPCR.

Στα 100 nM αντικαρκινικού φαρμάκου παρατηρούμε αύξηση των επιπέδων ATG5 και LC3I και ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων LC3II και p62. Αυτό συμφωνεί με την επανεκκίνηση της αυτοφαγίας. Η αύξηση των επιπέδων ATG5 υποστηρίζει την αυξημένη ικανότητα σχηματισμού αυτοφαγοσώματος. Παράλληλα, σε αυτή την περίπτωση πιθανόν η αυτοφαγία ολοκληρώνεται

κι έτσι αποικοδομούνται μαζί και οι πρωτεΐνες LC3II και p62 από τα λυσοσωμικά ένζυμα, με αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων τους. Η ενεργοποίηση της αυτογραφίας θα μπορούσε ίσως να ερμηνεύει και την μεγάλη μείωση των επιπέδων καβεολίνης-1 που παρατηρείται στα 100 nM. Από την άλλη, επειδή παρατηρούμε μειωμένο αριθμό κυττάρων και πολύ στρεσαρισμένα κύτταρα στα 100 nM, μια ακόμη ερμηνεία θα μπορούσε να είναι πως η μείωση της LC3-II και της p62 προκύπτει επειδή τα κύτταρα υφίστανται πρωτεολυτική διάσπαση λόγω απόπτωσης. Μάλιστα, στην βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές περιπτώσεις που η δοξορουβικίνη μπορεί να προκαλέσει απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, σε MDA-MB 231 η δοξορουβικίνη μειώνει την έκφραση του αντι-αποπτωτικού παράγοντα Bcl-2 και αυξάνει τις αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax, κασπάση-8 και κασπάση-3 (Pilco-Ferreto & Calaf, 2016). Επίσης, έρευνες που έχουν γίνει σε ηπατοκυτταρικές σειρές έχουν δείξει πως η δοξορουβικίνη μπορεί να προκαλέσει απόπτωση σε κύτταρα με μη λειτουργική p53 (Lee et al., 2002). Για να αποδειχθεί πως η μείωση των πρωτεϊνών οφείλεται σε απόπτωση θα πρέπει να γίνουν περαιτέρω πειράματα όπως μέτρηση των επιπέδων των κασπασών, μέτρηση μιτοχονδριακής λειτουργίας, δοκιμή Annexin V / PI με κυτταρομετρία ροής για ανίχνευση απόπτωσης κτλ. Από όλα τα παραπάνω, συμπεραίνουμε πως η δοξορουβικίνη επιδρά στην αυτοφαγία των MDA-MB 231 με δόσοεξαρτώμενο τρόπο.

Στην ρύθμιση της αυτοφαγίας μετά την επίδραση της δοξορουβικίνης μπορεί να εμπλέκεται και η RAS πρωτεΐνη, καθώς ανάλογα τον τύπο καρκίνου και τις συνθήκες, η RAS είναι ικανή να αναστείλει ή να ενεργοποιήσει την αυτοφαγία. Πιο συγκεκριμένα, το μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR1 που ενεργοποιείται από την RAS είναι ο κύριος αναστολέας της αυτοφαγίας. Αυτό συμβαίνει διότι το mTORC1 φωσφορυλιώνει και καταστέλλει το σύμπλοκο ULK1/Atg13/FIP200, εμποδίζοντας την έναρξη της αυτοφαγίας. Από την άλλη πλευρά, η RAS συχνά ενεργοποιεί την οδό Rac1/MKK7/JNK προάγοντας την αυτοφαγία. Η JNK φωσφορυλιώνει την Bcl-2 με αποτέλεσμα την απελευθέρωση Beclin-1. Επιπλέον, το σήμα της JNK μπορεί να αυξήσει έκφραση ATG5/ATG7, ενισχύοντας το μηχανισμό σύζευξης LC3 και σχηματισμού αυτοφαγοσωμάτων (Schmukler et al., 2014). Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει την μείωση της αυτοφαγίας έπειτα από επίδραση 12,5 nM DOX. Η RAS μετακινείται στο κυτταρόπλασμα, επομένως δεν είναι πλέον ενεργή. Το μονοπάτι Rac1/MKK7/JNK αναστέλλεται με αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων ATG5 που παρατηρήθηκαν και άρα την μείωση της φυτοφαγικής ροής.

Συνοπτικά, όλη η εργασία κατέληξε στα εξής βασικά συμπεράσματα:

- Η δοξορουβικίνη προκαλεί αλλαγή στην μορφολογία των κυττάρων MDA-MB 231 και λογικά συμβάλει στην μεσεγχυματική-επιθηλιακή μετάβαση (MET) (αποτελέσματα από την μέτρηση των επιπέδων E-καδερίνης).

- Η δοξορουβικίνη είναι ικανή να μετατοπίσει την tH-RAS στα MDA-MB 231 από την μεμβράνη των κυττάρων στο εσωτερικό των κυττάρων (αποτελέσματα από το confocal και την μέτρηση των επιπέδων καβεολίνης-1).
- Η δοξορουβικίνη μπορεί να επάγει κυτταρική γήρανση στα καρκινικά κύτταρα MDA-MB 231 (αποτελέσματα από την μεθόδου προσδιορισμού δραστικότητας SA-β-gal και την μέτρηση των επιπέδων του δείκτη κυτταρικής γήρανσης p21).
- Η δοξορουβικίνη σε μικρή συγκέντρωση (12,5 nM) πιθανόν μπλοκάρει την αυτοφαγική ροή, ενώ σε μεγάλη συγκέντρωση (100 nM) την επάγει (αποτελέσματα από την μέτρηση των επιπέδων αυτογραφικών πρωτεϊνών).

Με την ολοκλήρωση της εργασίας αξίζει να αναφερθεί πως η μελέτη της RAS και των μηχανισμών που ρυθμίζουν την τοπολογία και τη λειτουργία της συνεχίζει να αποτελεί στόχο στην αντικαρκινική θεραπεία. Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη ειδικών αναστολέων, όπως οι KRAS G12C, έδειξε ότι ακόμη και οι πιο περίπλοκες μεταλλάξεις της RAS μπορούν να γίνουν αντικείμενα φαρμακολογίας. Ωστόσο, η ετερογένεια των μεταλλάξεων και η αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στα φάρμακα καταδεικνύουν την ανάγκη για νέες προσεγγίσεις. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, που αναδεικνύουν τον ρόλο της δοξορουβικίνης στην αλλαγή της τοπολογίας της RAS, στη μείωση της καβεολίνης-1, αλλά και στην ενεργοποίηση διεργασιών όπως η αυτοφαγία, η γήρανση και η μεσεγχυματική-επιθηλιακή μετάβαση, θα μπορούσαν να ανοίξουν τον δρόμο για νέες θεραπευτικές κατευθύνσεις. Στο μέλλον, η στόχευση της αλληλεπίδρασης RAS-καβεολίνης-1 ή της ικανότητας χημειοθεραπευτικών παραγόντων να κατευθύνουν τα κύτταρα σε μεσεγχυματική-επιθηλιακή μετάβαση και κυτταρική γήρανση, θα μπορούσε να προσφέρει καινοτόμες στρατηγικές, είτε ως μοναδικές θεραπείες είτε σε συνδυασμό με υπάρχουσες θεραπείες που βασίζονται σε αναστολείς της RAS.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Al Bitar, S., & Gali-Muhtasib, H. (2019). The Role of the Cyclin Dependent Kinase Inhibitor p21cip1/waf1 in Targeting Cancer: Molecular Mechanisms and Novel Therapeutics. *Cancers*, 11(10), 1475. <https://doi.org/10.3390/cancers11101475>
- Ali Bashiri Dezfouli, Jamileh Salar-Amoli, Ali Akbar Pourfathollah, Mina Yazdi, Mahin Nikougoftar-Zarif, Mohammad Khosravi, & Jalal Hassan. (2019). *Doxorubicin-induced senescence through NF-κB affected by the age of mouse mesenchymal stem cells*.
- Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., Griffiths, G., & Ktistakis, N. T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology*, 182(4), 685–701. <https://doi.org/10.1083/jcb.200803137>
- Ballester, R., Furth, M. E., & Rosen, O. M. (1987). Phorbol ester- and protein kinase C-mediated phosphorylation of the cellular Kirsten ras gene product. *Journal of Biological Chemistry*, 262(6), 2688–2695. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)61562-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)61562-5)
- Bernards, A. (2003). GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1603(2), 47–82. [https://doi.org/10.1016/S0304-419X\(02\)00082-3](https://doi.org/10.1016/S0304-419X(02)00082-3)
- Bientinesi, E., Lulli, M., Becatti, M., Ristori, S., Margheri, F., & Monti, D. (2022). Doxorubicin-induced senescence in normal fibroblasts promotes in vitro tumour cell growth and invasiveness: The role of Quercetin in modulating these processes. *Mechanisms of Ageing and Development*, 206, 111689. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2022.111689>
- Birgisdottir, Å. B., Lamark, T., & Johansen, T. (2013). The LIR motif – crucial for selective autophagy. *Journal of Cell Science*, 126(15), 3237–3247. <https://doi.org/10.1242/jcs.126128>
- Bist, A., Fielding, P. E., & Fielding, C. J. (1997). Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. In *Cell Biology* (Vol. 94). www.pnas.org.
- Bojko, A., Czarnecka-Herok, J., Charzynska, A., Dabrowski, M., & Sikora, E. (2019). Diversity of the senescence phenotype of cancer cells treated with chemotherapeutic agents. *Cells*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/cells8121501>
- Bosch, M., Marí, M., Herms, A., Fernández, A., Fajardo, A., Kassan, A., Giralt, A., Colell, A., Balgoma, D., Barbero, E., González-Moreno, E., Matias, N., Tebar, F., Balsinde, J., Camps, M.,

- Enrich, C., Gross, S. P., García-Ruiz, C., Pérez-Navarro, E., ... Pol, A. (2011). Caveolin-1 deficiency causes cholesterol-dependent mitochondrial dysfunction and apoptotic susceptibility. *Current Biology*, 21(8), 681–686. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.030>
- Boyartchuk, V. L., Ashby, M. N., & Rine, J. (1997). Modulation of Ras and a-Factor Function by Carboxyl-Terminal Proteolysis. *Science*, 275(5307), 1796–1800. <https://doi.org/10.1126/science.275.5307.1796>
- Buhrman, G., O'Connor, C., Zerbe, B., Kearney, B. M., Napoleon, R., Kovrigina, E. A., Vajda, S., Kozakov, D., Kovrigin, E. L., & Mattos, C. (2011). Analysis of Binding Site Hot Spots on the Surface of Ras GTPase. *Journal of Molecular Biology*, 413(4), 773–789. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2011.09.011>
- Bukowski, K., Kciuk, M., & Kontek, R. (2020). Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21093233>
- Cadet, J., Douki, T., & Ravanat, J. L. (2010). Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(1), 9–21. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2010.03.025>
- Caldwell, M. E., Denicola, G. M., Martins, C. P., Jacobetz, M. A., Maitra, A., Hruban, R. H., & Tuveson, D. A. (2012). Cellular features of senescence during the evolution of human and murine ductal pancreatic cancer. *Oncogene*, 31(12), 1599–1608. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.350>
- Calvin B. Harley, Carol W. Greider, & A. Bruce Futchert. (1990). *LETTERS TO NATURE*.
- Campisi, J., Kim, S.-H., Lim, C.-S., & Rubio, M. (2001). *Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection*. www.elsevier.com/locate/expgero
- Campos, A., Burgos-Ravanal, R., González, M. F., Huilcaman, R., González, L. L., & Quest, A. F. G. (2019). Cell intrinsic and extrinsic mechanisms of caveolin-1-enhanced metastasis. In *Biomolecules* (Vol. 9, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom9080314>
- Capera, J., Pérez-Verdaguer, M., Peruzzo, R., Navarro-Pérez, M., Martínez-Pinna, J., Alberola-Die, A., Morales, A., Leanza, L., Szabó, I., & Felipe, A. (2021). A novel mitochondrial Kv1.3–caveolin axis controls cell survival and apoptosis. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.69099>
- Cardarelli, F., Digiaco, L., Marchini, C., Amici, A., Salomone, F., Fiume, G., Rossetta, A., Gratton, E., Pozzi, D., & Caracciolo, G. (2016). The intracellular trafficking mechanism of

- Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep25879>
- Chao, Y. L., Shepard, C. R., & Wells, A. (2010). Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. *Molecular Cancer*, 9. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-179>
- Choi, Y. H., Lee, W. H., Park, K., & Zhang, L. (2000). p53-independent Induction of p21 (WAF1/CIP1), Reduction of Cyclin B1 and G2/M Arrest by the Isoflavone Genistein in Human Prostate Carcinoma Cells. *Japanese Journal of Cancer Research*, 91(2), 164–173. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2000.tb00928.x>
- Christidi, E., & Brunham, L. R. (2021). Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cell Death & Disease*, 12(4), 339. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03614-x>
- Coluzzi, M., Sabatini, A., Della Torre, A., Di Deco, M. A., & Petrarca, V. (2002). A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science*, 298(5597), 1415–1418. <https://doi.org/10.1126/science.1077769>
- Couet, J., Li, S., Okamoto, T., Ikezu, T., & Lisanti, M. P. (1997). *Identification of Peptide and Protein Ligands for the Caveolin-scaffolding Domain IMPLICATIONS FOR THE INTERACTION OF CAVEOLIN WITH CAVEOLAE-ASSOCIATED PROTEINS**. <http://www-jbc.stanford.edu/jbc/>
- Dai, Q., Choy, E., Chiu, V., Romano, J., Slivka, S. R., Steitz, S. A., Michaelis, S., & Philips, M. R. (1998). Mammalian Prenylcysteine Carboxyl Methyltransferase Is in the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 273(24), 15030–15034. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.24.15030>
- Dallavalle, S., Dobričić, V., Lazzarato, L., Gazzano, E., Machuqueiro, M., Pajeva, I., Tsakovska, I., Zidar, N., & Fruttero, R. (2020). Improvement of conventional anti-cancer drugs as new tools against multidrug resistant tumors. *Drug Resistance Updates*, 50, 100682. <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2020.100682>
- Damalas, A., Vonkova, I., Tutkus, M., & Stamou, D. (2022). TGFβ-induced changes in membrane curvature influence Ras oncoprotein membrane localization. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17482-8>
- de Almeida, C. J. G. (2017). Caveolin-1 and Caveolin-2 can be antagonistic partners in inflammation and beyond. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 8, Issue NOV). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01530>

- de Duve, C., & Wattiaux, R. (1966). Functions of Lysosomes. *Annual Review of Physiology*, 28(1), 435–492. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.28.030166.002251>
- Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D., & d'Adda di Fagagna, F. (2021). Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(2), 75–95. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w>
- Diao, J., Liu, R., Rong, Y., Zhao, M., Zhang, J., Lai, Y., Zhou, Q., Wilz, L. M., Li, J., Vivona, S., Pfuetzner, R. A., Brunger, A. T., & Zhong, Q. (2015). ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature*, 520(7548), 563–566. <https://doi.org/10.1038/nature14147>
- Díaz, J., Mendoza, P., Ortiz, R., Díaz, N., Leyton, L., Stupack, D., Quest, A. F. G., & Torres, V. A. (2014). Rab5 is required in metastatic cancer cells for caveolin-1-enhanced Rac1 activation, migration and invasion. *Journal of Cell Science*, 127(11), 2401–2406. <https://doi.org/10.1242/jcs.141689>
- Diesch, J., Sanij, E., Gilan, O., Love, C., Tran, H., Fleming, N. I., Ellul, J., Amalia, M., Haviv, I., Pearson, R. B., Tulchinsky, E., Mariadason, J. M., Sieber, O. M., Hannan, R. D., & Dhillon, A. S. (2014). Widespread FRA1-Dependent Control of Mesenchymal Transdifferentiation Programs in Colorectal Cancer Cells. *PLoS ONE*, 9(3), e88950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088950>
- Dikic, I., & Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(6), 349–364. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>
- Dooley, H. C., Razi, M., Polson, H. E. J., Girardin, S. E., Wilson, M. I., & Tooze, S. A. (2014). WIPI2 Links LC3 Conjugation with PI3P, Autophagosome Formation, and Pathogen Clearance by Recruiting Atg12–5–16L1. *Molecular Cell*, 55(2), 238–252. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.05.021>
- Dou, Z., Xu, C., Donahue, G., Shimi, T., Pan, J.-A., Zhu, J., Ivanov, A., Capell, B. C., Drake, A. M., Shah, P. P., Catanzaro, J. M., Daniel Ricketts, M., Lamark, T., Adam, S. A., Marmorstein, R., Zong, W.-X., Johansen, T., Goldman, R. D., Adams, P. D., & Berger, S. L. (2015). Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature*, 527(7576), 105–109. <https://doi.org/10.1038/nature15548>
- Drago-Garcia, D., Giri, S., Chatterjee, R., Simoni-Nieves, A., Abedrabbo, M., Genna, A., Rios, M. L. U., Lindzen, M., Sekar, A., Gupta, N., Aharoni, N., Bhandari, T., Mayalagu, A., Schwarzmüller, L., Tarade, N., Zhu, R., Mohan-Raju, H.-R., Karatekin, F., Roncato, F., ... Yarden, Y. (2025). Re-epithelialization of cancer cells increases autophagy and DNA damage: Implications for

- breast cancer dormancy and relapse. *Science Signaling*, 18(883).
<https://doi.org/10.1126/scisignal.ado3473>
- Druelle, C., Drullion, C., Deslé, J., Martin, N., Saas, L., Cormenier, J., Malaquin, N., Huot, L., Slomianny, C., Bouali, F., Vercamer, C., Hot, D., Pourtier, A., Chevet, E., Abbadie, C., & Pluquet, O. (2016). ATF6 α regulates morphological changes associated with senescence in human fibroblasts. *Oncotarget*, 7(42), 67699–67715.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.11505>
- Eckert, L. B., Repasky, G. A., U, A. S., McFall, A., Zhou, H., Sartor, C. I., & Der, C. J. (2004). Involvement of Ras Activation in Human Breast Cancer Cell Signaling, Invasion, and Anoikis. In *CANCER RESEARCH* (Vol. 64). <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/64/13/4585/2516008/zch01304004585.pdf>
- Edkins, S., & O'Meara, S. (2006). Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 5(8), 928–932. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.8.3251>
- El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Edward Mercer, W., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1993). WAR, a Potential Mediator of ~53 Tumor Suppression. In *Cell* (Vol. 75).
- Engelman, J. A., Wykoff, C. C., Yasuharai, S., Song, K. S., Okamotoi, T., & Lisanti, M. P. (1997). *Recombinant Expression of Caveolin-1 in Oncogenically Transformed Cells Abrogates Anchorage-independent Growth**. <http://www.jbc.org>
- Fei, Y., Yan, X., Liang, M., Zhou, S., Xu, D., Li, L., Xu, W., Song, Y., Zhu, Z., & Zhang, J. (2024). Lysosomal gene ATP6AP1 promotes doxorubicin resistance via up-regulating autophagic flux in breast cancer. *Cancer Cell International*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12935-024-03579-9>
- Feng, J., Wang, X., Zhu, W., Chen, S., & Feng, C. (2017). MicroRNA-630 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition by regulating FoxM1 in gastric cancer cells. *Biochemistry (Moscow)*, 82(6), 707–714. <https://doi.org/10.1134/S0006297917060074>
- Fielding, C. J., Bist, A., & Fielding, P. E. (1997). Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers. In *Cell Biology* (Vol. 94). www.pnas.org.
- Fielding, P. E., & Fielding, C. J. (1995). Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry*, 34(44), 14288–14292.
<https://doi.org/10.1021/bi00044a004>

- Filippini, A., & D'alessio, A. (2020). Caveolae and lipid rafts in endothelium: Valuable organelles for multiple functions. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 9, pp. 1–16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom10091218>
- Fiucci, G., Ravid, D., Reich, R., & Liscovitch, M. (2002). *Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells*. <https://doi.org/10.1038/sj/onc/1205300>
- Fivaz, M., & Meyer, T. (2005). Reversible intracellular translocation of KRas but not HRas in hippocampal neurons regulated by Ca²⁺/calmodulin. *The Journal of Cell Biology*, 170(3), 429–441. <https://doi.org/10.1083/jcb.200409157>
- Frescas, D., Roux, C. M., Aygun-Sunar, S., Gleiberman, A. S., Krasnov, P., Kurnasov, O. V., Strom, E., Virtuoso, L. P., Wrobel, M., Osterman, A. L., Antoch, M. P., Mett, V., Chernova, O. B., & Gudkov, A. V. (2017). Senescent cells expose and secrete an oxidized form of membrane-bound vimentin as revealed by a natural polyreactive antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(9). <https://doi.org/10.1073/pnas.1614661114>
- Fridlyanskaya, I., Alekseenko, L., & Nikolsky, N. (2015). Senescence as a general cellular response to stress: A mini-review. In *Experimental Gerontology* (Vol. 72, pp. 124–128). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.09.021>
- Fu, M., Nirschl, J. J., & Holzbaur, E. L. F. (2014). LC3 Binding to the Scaffolding Protein JIP1 Regulates Processive Dynein-Driven Transport of Autophagosomes. *Developmental Cell*, 29(5), 577–590. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.04.015>
- Garcia, E., Luna, I., Persad, K. L., Agopsowicz, K., Jay, D. A., West, F. G., Hitt, M. M., & Persad, S. (2021). Inhibition of triple negative breast cancer metastasis and invasiveness by novel drugs that target epithelial to mesenchymal transition. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91344-7>
- Gary, R. K., & Kindell, S. M. (2005). Quantitative assay of senescence-associated β -galactosidase activity in mammalian cell extracts. *Analytical Biochemistry*, 343(2), 329–334. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2005.06.003>
- Gilliam, L. A. A., Moylan, J. S., Patterson, E. W., Smith, J. D., Wilson, A. S., Rabbani, Z., & Reid, M. B. (2012). Doxorubicin acts via mitochondrial ROS to stimulate catabolism in C2C12 myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 302, 195–202. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00217.2011.-Doxorubicin>
- Goehe, R. W., Di, X., Sharma, K., Bristol, M. L., Henderson, S. C., Valerie, K., Rodier, F., Davalos, A. R., & Gewirtz, D. A. (2012). The Autophagy-Senescence Connection in Chemotherapy: Must

- Tumor Cells (Self) Eat Before They Sleep? *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 343(3), 763–778. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.197590>
- Guo, B., Tam, A., Santi, S. A., & Parissenti, A. M. (2016). Role of autophagy and lysosomal drug sequestration in acquired resistance to doxorubicin in MCF-7 cells. *BMC Cancer*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2790-3>
- Gutierrez, M. G., Munafó, D. B., Berón, W., & Colombo, M. I. (2004). Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *Journal of Cell Science*, 117(13), 2687–2697. <https://doi.org/10.1242/jcs.01114>
- Hancock, J. F., Cadwallader, K., & Marshall, C. J. (1991). Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane binding of prenylated p21K-ras(B). *The EMBO Journal*, 10(3), 641–646. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07992.x>
- Hancock, J. F., Magee, A. I., Childs, J. E., & Marshall, C. J. (1989). All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell*, 57(7), 1167–1177. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90054-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90054-8)
- Harrison, D. E., Strong, R., Sharp, Z. D., Nelson, J. F., Astle, C. M., Flurkey, K., Nadon, N. L., Wilkinson, J. E., Frenkel, K., Carter, C. S., Pahor, M., Javors, M. A., Fernandez, E., & Miller, R. A. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, 460(7253), 392–395. <https://doi.org/10.1038/nature08221>
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37(3), 614–636. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- He, C., & Klionsky, D. J. (2009). Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 67–93. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102808-114910>
- Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P. C., Chen, D. J., & Sedivy, J. M. (2004). Telomere Shortening Triggers Senescence of Human Cells through a Pathway Involving ATM, p53, and p21 CIP1 , but Not p16 INK4a essential for t-loop formation, and overexpression of a dominant-negative variant results in telomere un-capping and loss of the G-rich strand. The concomitant recruitment of DNA damage sensor proteins to chromosome ends supports the hypothesis that unprotected. In *Molecular Cell* (Vol. 14). <http://www.molecule.org/cgi/content/full/14/>

- Hlaváčová, M., Gumulec, J., Stračina, T., Fojtů, M., Raudenská, M., Masařík, M., Nováková, M., & Paulová, H. (2015). Different doxorubicin formulations affect plasma 4-hydroxy-2-nonenal and gene expression of aldehyde dehydrogenase 3A1 and thioredoxin reductase 2 in rat. *Physiological Research*, 64, S653–S660. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933223>
- Hobbs, G. A., Der, C. J., & Rossman, K. L. (2016). RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of Cell Science*, 129(7), 1287–1292. <https://doi.org/10.1242/jcs.182873>
- Hu, X., & Zhang, H. (2019). Doxorubicin-induced cancer cell senescence shows a time delay effect and is inhibited by epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Medical Science Monitor*, 25, 3617–3623. <https://doi.org/10.12659/MSM.914295>
- Huang, Z., Zhou, L., Chen, Z., Nice, E. C., & Huang, C. (2016). Stress management by autophagy: Implications for chemoresistance. *International Journal of Cancer*, 139(1), 23–32. <https://doi.org/10.1002/ijc.29990>
- Hunter, J. C., Manandhar, A., Carrasco, M. A., Gurbani, D., Gondi, S., & Westover, K. D. (2015). Biochemical and structural analysis of common cancer-associated KRAS mutations. *Molecular Cancer Research*, 13(9), 1325–1335. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0203>
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 408(6811), 488–492. <https://doi.org/10.1038/35044114>
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C., & Mizushima, N. (2012). The Hairpin-type Tail-Anchored SNARE Syntaxin 17 Targets to Autophagosomes for Fusion with Endosomes/Lysosomes. *Cell*, 151(6), 1256–1269. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.001>
- Jang, H., Banerjee, A., Chavan, T. S., Lu, S., Zhang, J., Gaponenko, V., & Nussinov, R. (2016). The higher level of complexity of K-Ras4B activation at the membrane. *The FASEB Journal*, 30(4), 1643–1655. <https://doi.org/10.1096/fj.15-279091>
- Johansen, T., & Lamark, T. (2020). Selective Autophagy: ATG8 Family Proteins, LIR Motifs and Cargo Receptors. *Journal of Molecular Biology*, 432(1), 80–103. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.07.016>
- Jones, Gerald., Toda, Akihito., & Kimura, Naoyo. (2001). *Don't laugh, Charizard! Viz Communications.*

- Joyner, D. E., Bastar, J. D., & Randall, R. L. (2006). Doxorubicin induces cell senescence preferentially over apoptosis in the FU-SY-1 synovial sarcoma cell line. *Journal of Orthopaedic Research*, 24(6), 1163–1169. <https://doi.org/10.1002/jor.20169>
- Ju, H., Zou, R., Venema, V. J., & Venema, R. C. (1997). *Direct Interaction of Endothelial Nitric-oxide Synthase and Caveolin-1 Inhibits Synthase Activity**. <http://www.jbc.org>
- Kabeya, Y. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO Journal*, 19(21), 5720–5728. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.21.5720>
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of Cell Science*, 117(13), 2805–2812. <https://doi.org/10.1242/jcs.01131>
- Kang, C., Xu, Q., Martin, T. D., Li, M. Z., Demaria, M., Aron, L., Lu, T., Yankner, B. A., Campisi, J., & Elledge, S. J. (2015). The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science*, 349(6255). <https://doi.org/10.1126/science.aaa5612>
- Kang, H. T., Lee, K. B., Kim, S. Y., Choi, H. R., & Park, S. C. (2011). Autophagy Impairment Induces Premature Senescence in Primary Human Fibroblasts. *PLoS ONE*, 6(8), e23367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023367>
- Kastenhuber, E. R., & Lowe, S. W. (2017). Putting p53 in Context. In *Cell* (Vol. 170, Issue 6, pp. 1062–1078). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>
- Kaya, S., Wiesmann, N., Goldschmitt, J., Krüger, & M., Al-Nawas, & B., & Heider, & J. (2021). *Differences in the expression of caveolin-1 isoforms in cancer-associated and normal fibroblasts of patients with oral squamous cell carcinoma*. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-03887-8/Published>
- Kciuk, M., Marciniak, B., & Kontek, R. (2020). Irinotecan—still an important player in cancer chemotherapy: A comprehensive overview. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 14, pp. 1–21). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21144919>
- Kim, J., & Guan, K.-L. (2019). mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth. *Nature Cell Biology*, 21(1), 63–71. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0205-1>
- Koleske, A. J., Baltimore, D., & Lisantit, M. P. (1995). Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells (cancer/growth regulation/oncogene/potocytosis). In *Cell Biology* (Vol. 92). <https://www.pnas.org>

- Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R., & Kondo, S. (2005). The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nature Reviews Cancer*, 5(9), 726–734. <https://doi.org/10.1038/nrc1692>
- Kornbluth, S., Jove, R., & Hanafusa, H. (1987). *Characterization of avian and viral p60src proteins expressed in yeast (tyrosine protein kinase/yeast expression plasmid)* (Vol. 84). <https://www.pnas.org>
- Kumari, R., & Jat, P. (2021). Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.645593>
- Kwon, Y., Kim, J. W., Jeoung, J. A., Kim, M.-S., & Kang, C. (2017). Autophagy Is Pro-Senescence When Seen in Close-Up, but Anti-Senescence in Long-Shot. *Molecules and Cells*, 40(9), 607–612. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0151>
- Lajoie, P., & Nabi, I. R. (2010). Lipid Rafts, Caveolae, and Their Endocytosis. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 282(C), 135–163. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(10\)82003-9](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(10)82003-9)
- Lamark, T., Svenning, S., & Johansen, T. (2017). Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. *Essays in Biochemistry*, 61(6), 609–624. <https://doi.org/10.1042/EBC20170035>
- Lamaze, C., Tardif, N., Dewulf, M., Vassilopoulos, S., & Blouin, C. M. (2017). The caveolae dress code: structure and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 47, 117–125. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2017.02.014>
- LaPak, K. M., & Burd, C. E. (2014a). The molecular balancing act of p16ink4a in cancer and aging. In *Molecular Cancer Research* (Vol. 12, Issue 2, pp. 167–183). <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0350>
- LaPak, K. M., & Burd, C. E. (2014b). The molecular balancing act of p16ink4a in cancer and aging. In *Molecular Cancer Research* (Vol. 12, Issue 2, pp. 167–183). <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0350>
- Lawrence A. Donehower, Betty L. Slagle, Michele Harvey, Mark J. McArthur, Charles A. Montgomery Jr, Janet S. Butel, & Allan Bradley. (2001). *Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours.*
- Le Lay, S., Hajduch, E., Lindsay, M. R., Le Lièvre, X., Thiele, C., Ferré, P., Parton, R. G., Kurzchalia, T., Simons, K., & Dugail, I. (2006). Cholesterol-induced caveolin targeting to lipid droplets in

- adipocytes: A role for caveolar endocytosis. *Traffic*, 7(5), 549–561.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00406.x>
- Lee, T., Lau, T., & Ng, I. (2002). Doxorubicin-induced apoptosis and chemosensitivity in hepatoma cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 49(1), 78–86.
<https://doi.org/10.1007/s00280-001-0376-4>
- Leevers, S. J., Paterson, H. F., & Marshall, C. J. (1994). Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature*, 369(6479), 411–414.
<https://doi.org/10.1038/369411a0>
- Levine, B., & Kroemer, G. (2019). Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell*, 176(1–2), 11–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.048>
- Li, S., Couet, J., & Lisanti, M. P. (1996). *Src Tyrosine Kinases, G Subunits, and H-Ras Share a Common Membrane-anchored Scaffolding Protein, Caveolin CAVEOLIN BINDING NEGATIVELY REGULATES THE AUTO-ACTIVATION OF Src TYROSINE KINASES**. <http://www-jbc.stanford.edu/jbc/>
- Liu, Y., Zhang, M., Qian, J., Bao, M., Meng, X., Zhang, S., Zhang, L., Zhao, R., Li, S., Cao, Q., Li, P., Ju, X., Lu, Q., Li, J., Shao, P., Qin, C., & Yin, C. (2015). miR-134 Functions as a Tumor Suppressor in Cell Proliferation and Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Targeting KRAS in Renal Cell Carcinoma Cells. *DNA and Cell Biology*, 34(6), 429–436.
<https://doi.org/10.1089/dna.2014.2629>
- Lodygin, D., Menssen, A., & Hermeking, H. (2002). Induction of the Cdk inhibitor p21 by LY83583 inhibits tumor cell proliferation in a p53-independent manner. *Journal of Clinical Investigation*, 110(11), 1717–1727. <https://doi.org/10.1172/JCI16588>
- Lu, X., Guo, H., Chen, X., Xiao, J., Zou, Y., Wang, W., & Chen, Q. (2016). Effect of RhoC on the epithelial-mesenchymal transition process induced by TGF- β 1 in lung adenocarcinoma cells. *Oncology Reports*, 36(6), 3105–3112. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5146>
- Marí, M., Caballero, F., Colell, A., Morales, A., Caballeria, J., Fernandez, A., Enrich, C., Fernandez-Checa, J. C., & García-Ruiz, C. (2006). Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metabolism*, 4(3), 185–198.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.07.006>
- Mark E. Graham, George O. Lovrecz, Nicolai Bache, Phillip J. Robinson, & Roger R. Reddel. (2007). *Protein Composition of Catalytically Active Human Telomerase from Immortal Cells*.
- Marques, L., Johnson, A. A., & Stolzing, A. (2020). Doxorubicin generates senescent microglia that exhibit altered proteomes, higher levels of cytokine secretion, and a decreased ability

- to internalize amyloid β . *Experimental Cell Research*, 395(2), 112203.
<https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2020.112203>
- Mazhab-Jafari, M. T., Marshall, C. B., Smith, M. J., Gasmi-Seabrook, G. M. C., Stathopoulos, P. B., Inagaki, F., Kay, L. E., Neel, B. G., & Ikura, M. (2015). Oncogenic and RASopathy-associated K-RAS mutations relieve membrane-dependent occlusion of the effector-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(21), 6625–6630.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1419895112>
- Michael T. Hemann, Margaret A. Strong, Ling-Yang Hao, & Carol W. Greider. (2001). *The Shortest Telomere, Not Average Telomere Length, Is Critical for Cell Viability and Chromosome Stability*. <http://www.cell.com/cgi/content/full/107/1/>
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56(2), 185–229. <https://doi.org/10.1124/PR.56.2.6>
- Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of Cell Science*, 116(9), 1679–1688. <https://doi.org/10.1242/jcs.00381>
- Murata, M., Peranen, J., Schreinert, R., Wielandt, F., Kurzchalia, T. V., & Simons, K. (1995). *VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein (membrane microdomains/intracellular transport/membrane reconstitution)* (Vol. 92). <https://www.pnas.org>
- Nagarra, T. S., Shi, C., Leduc, C., Hoskin, V., Sikdar, S., Sangrar, W., & Greer, P. A. (2017). Combined targeting of Raf and Mek synergistically inhibits tumorigenesis in triple negative breast cancer model systems. *Oncotarget*, 8(46), 80804–80819.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.20534>
- Nandan, P. K., & Sivaraman, J. (2025). Elucidating Ras protein as a dual therapeutic target for inflammation and cancer: a review. In *Discover Oncology* (Vol. 16, Issue 1). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s12672-025-02783-x>
- Navarro, R., Busnadiego, I., Ruiz-Larrea, M. B., & Ruiz-Sanz, J. I. (2006). Superoxide anions are involved in doxorubicin-induced ERK activation in hepatocyte cultures. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1090, 419–428. <https://doi.org/10.1196/annals.1378.045>
- Nemoto, T., Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Minematsu-Ikeguchi, N., Yokota, M., Ohsumi, M., Ueno, T., & Kominami, E. (2003). The Mouse APG10 Homologue, an E2-like Enzyme for Apg12p Conjugation, Facilitates MAP-LC3 Modification. *Journal of Biological Chemistry*, 278(41), 39517–39526. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300550200>

- Neurohr, G. E., Terry, R. L., Lengefeld, J., Bonney, M., Brittingham, G. P., Moretto, F., Miettinen, T. P., Vaites, L. P., Soares, L. M., Paulo, J. A., Harper, J. W., Buratowski, S., Manalis, S., van Werven, F. J., Holt, L. J., & Amon, A. (2019). Excessive Cell Growth Causes Cytoplasm Dilution And Contributes to Senescence. *Cell*, 176(5), 1083-1097.e18.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.018>
- Norman E. Sharpless, Nabeel Bardeesy, Kee-Ho Lee, & Daniel Carrasco. (2001). *Loss of p16^{Ink4a} with retention of p19^{Arf} predisposes mice to tumorigenesis*.
- Ogata, H., Sato, H., Takatsuka, J., & De Luca, L. M. (2001). Human breast cancer MDA-MB-231 cells fail to express the neurofibromin protein, lack its type I mRNA isoform and show accumulation of P-MAPK and activated Ras. *Cancer Letters*, 172(2), 159–164.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00648-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00648-6)
- Olsvik, H. L., Lamark, T., Takagi, K., Larsen, K. B., Evjen, G., Øvervatn, A., Mizushima, T., & Johansen, T. (2015). FYCO1 Contains a C-terminally Extended, LC3A/B-preferring LC3-interacting Region (LIR) Motif Required for Efficient Maturation of Autophagosomes during Basal Autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 290(49), 29361–29374.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.686915>
- Ostrem, J. M., Peters, U., Sos, M. L., Wells, J. A., & Shokat, K. M. (2013). K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature*, 503(7477), 548–551.
<https://doi.org/10.1038/nature12796>
- Parker, J. A., & Mattos, C. (2018). The K-Ras, N-Ras, and H-ras isoforms: Unique conformational preferences and implications for targeting oncogenic mutants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031427>
- Peters, K.-R., Carley, W. W., & Palade, G. E. (1985). *Endothelial Plasmalemmal Vesicles Have a Characteristic Striped Bipolar Surface Structure*.
- Piegari, E., De Angelis, A., Cappetta, D., Russo, R., Esposito, G., Costantino, S., Graiani, G., Frati, C., Prezioso, L., Berrino, L., Urbanek, K., Quaini, F., & Rossi, F. (2013). Doxorubicin induces senescence and impairs function of human cardiac progenitor cells. *Basic Research in Cardiology*, 108(2). <https://doi.org/10.1007/s00395-013-0334-4>
- Pilco-Ferreto, N., & Calaf, G. M. (2016). Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. *International Journal of Oncology*, 49(2), 753–762.
<https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3558>
- Pol, A., Martin, S., Fernández, M. A., Ingelmo-Torres, M., Ferguson, C., Enrich, C., & Parton, R. G. (2005). Cholesterol and Fatty Acids Regulate Dynamic Caveolin Trafficking through the Golgi

- Complex and between the Cell Surface and Lipid Bodies □ V. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 2091–2105. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04>
- Prakash, P., Zhou, Y., Liang, H., Hancock, J. F., & Gorfe, A. A. (2016). Oncogenic K-Ras Binds to an Anionic Membrane in Two Distinct Orientations: A Molecular Dynamics Analysis. *Biophysical Journal*, 110(5), 1125–1138. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2016.01.019>
- Raghavendra, A. S., Kettner, N. M., Kwiatkowski, D., Damodaran, S., Wang, Y., Ramirez, D., Gombos, D. S., Hunt, K. K., Shen, Y., Keyomarsi, K., & Tripathy, D. (2025). Phase I trial of hydroxychloroquine to enhance palbociclib and letrozole efficacy in ER+/HER2– breast cancer. *Npj Breast Cancer*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41523-025-00722-1>
- Rastaldo, R., Vitale, E., & Giachino, C. (2020). Dual Role of Autophagy in Regulation of Mesenchymal Stem Cell Senescence. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00276>
- Rauen, K. A. (2013). The RASopathies. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 14(1), 355–369. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153523>
- Razani, B., Engelman, J. A., Wang, X. B., Schubert, W., Zhang, X. L., Marks, C. B., Macaluso, F., Russell, R. G., Li, M., Pestell, R. G., Di Vizio, D., Hou, H., Kneitz, B., Lagaud, G., Christ, G. J., Edelmann, W., & Lisanti, M. P. (2001). Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *Journal of Biological Chemistry*, 276(41), 38121–38138. <https://doi.org/10.1074/jbc.m105408200>
- Rubinsztein, D. C., Mariño, G., & Kroemer, G. (2011). Autophagy and Aging. *Cell*, 146(5), 682–695. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.030>
- Russell, R. C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H. W., Chang, Y.-Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T. P., Dillin, A., & Guan, K.-L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nature Cell Biology*, 15(7), 741–750. <https://doi.org/10.1038/ncb2757>
- Saridaki, Z., Weidhaas, J. B., Lenz, H.-J., Laurent-Puig, P., Jacobs, B., De Schutter, J., De Roock, W., Salzman, D. W., Zhang, W., Yang, D., Pilati, C., Bouché, O., Piessevaux, H., & Tejpar, S. (2014). A *let-7* microRNA-Binding Site Polymorphism in *KRAS* Predicts Improved Outcome in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Treated with Salvage Cetuximab/Panitumumab Monotherapy. *Clinical Cancer Research*, 20(17), 4499–4510. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0348>
- Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., Kabsch, W., Wiesmüller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., & Wittinghofer, A. (1997). The Ras-RasGAP Complex: Structural Basis for GTPase Activation and Its Loss in Oncogenic Ras Mutants. *Science*, 277(5324), 333–339. <https://doi.org/10.1126/science.277.5324.333>

- Schlegel, A., & Lisanti, M. P. (2000). A molecular dissection of caveolin-1 membrane attachment and oligomerization. Two separate regions of the caveolin-1 c-terminal domain mediate membrane binding and oligomer/oligomer interactions in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 275(28), 21605–21617. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002558200>
- Schlegel, A., Wang, C., Katzenellenbogen, B. S., Pestell, R. G., & Lisanti, M. P. (1999). *Caveolin-1 Potentiates Estrogen Receptor (ER) Signaling CAVEOLIN-1 DRIVES LIGAND-INDEPENDENT NUCLEAR TRANSLOCATION AND ACTIVATION OF ER**. <http://www.jbc.org>
- Schmick, M., Vartak, N., Papke, B., Kovacevic, M., Truxius, D. C., Rossmannek, L., & Bastiaens, P. I. H. (2014). KRas Localizes to the Plasma Membrane by Spatial Cycles of Solubilization, Trapping and Vesicular Transport. *Cell*, 157(2), 459–471. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.02.051>
- Schmukler, E., Kloog, Y., & Pinkas-Kramarski, R. (2014). *Ras and autophagy in cancer development and therapy* (Vol. 5, Issue 3). www.impactjournals.com/oncotarget
- Shields, M. A., Ebine, K., Sahai, V., Kumar, K., Siddiqui, K., Hwang, R. F., Grippo, P. J., & Munshi, H. G. (2013). Snail Cooperates with KrasG12D to Promote Pancreatic Fibrosis. *Molecular Cancer Research*, 11(9), 1078–1087. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0637>
- Simanshu, D. K., Nissley, D. V., & McCormick, F. (2017). RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. In *Cell* (Vol. 170, Issue 1, pp. 17–33). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.009>
- Simonsen, A., Cumming, R. C., Brech, A., Isakson, P., Schubert, D. R., & Finley, K. D. (2008). Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult Drosophila. *Autophagy*, 4(2), 176–184. <https://doi.org/10.4161/auto.5269>
- Singh, S. S. (2015). Targeting the PI3K/Akt signaling pathway in gastric carcinoma: A reality for personalized medicine? *World Journal of Gastroenterology*, 21(43), 12261. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i43.12261>
- Smart, E. J., Ying, Y.-S., Conrad, P. A., & Anderson, R. G. W. (1994). *Caveolin Moves from Caveolae to the Golgi Apparatus in Response to Cholesterol Oxidation*.
- Spallarossa, P., Altieri, P., Aloï, C., Garibaldi, S., Barisione, C., Ghigliotti, G., Fugazza, G., Barsotti, A., Brunelli, C., & Doxorubicin, B. C. (2009). Doxorubicin induces senescence or apoptosis in rat neonatal cardiomyocytes by regulating the expression levels of the telomere binding factors 1 and 2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297, 2169–2181. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00068.2009>-Low

- Stokoe, D., Macdonald, S. G., Cadwallader, K., Symons, M., & Hancock, J. F. (1994). Activation of Raf as a Result of Recruitment to the Plasma Membrane. *Science*, 264(5164), 1463–1467. <https://doi.org/10.1126/science.7811320>
- Sui, X., Chen, R., Wang, Z., Huang, Z., Kong, N., Zhang, M., Han, W., Lou, F., Yang, J., Zhang, Q., Wang, X., He, C., & Pan, H. (2013). Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death & Disease*, 4(10), e838–e838. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.350>
- Sultana, R., Di Domenico, F., Tseng, M., Cai, J., Noel, T., Chelvarajan, R. L., Pierce, W. D., Cini, C., Bondada, S., St. Clair, D. K., & Butterfield, D. A. (2010). Doxorubicin-Induced Thymus Senescence. *Journal of Proteome Research*, 9(12), 6232–6241. <https://doi.org/10.1021/pr100465m>
- Swarthout, J. T., Lobo, S., Farh, L., Croke, M. R., Greentree, W. K., Deschenes, R. J., & Linder, M. E. (2005). DHHC9 and GCP16 Constitute a Human Protein Fatty Acyltransferase with Specificity for H- and N-Ras. *Journal of Biological Chemistry*, 280(35), 31141–31148. <https://doi.org/10.1074/JBC.M504113200>
- Takahashi A., Ohtani N., Yamakoshi K., Iida S.-I., Tahara H., Nakayama K., Ide T., & Saya H. (2006). *Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence.*
- Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Ueno, T., & Kominami, E. (2001). The Human Homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p Is a Protein-activating Enzyme for Multiple Substrates Including Human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 1701–1706. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000752200>
- Taniguchi, K., Yamachika, S., He, F., & Karin, M. (2016). p62/ <sc>SQSTM</sc> 1—Dr. Jekyll and Mr. Hyde that prevents oxidative stress but promotes liver cancer. *FEBS Letters*, 590(15), 2375–2397. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12301>
- Toda, N., Sato, T., Muraoka, M., Lin, D., Saito, M., Li, G., Song, Q.-C., Yanagisawa, T., & Yamauchi, M. (2023). Doxorubicin induces cardiomyocyte death owing to the accumulation of dysfunctional mitochondria by inhibiting the autophagy fusion process. *Free Radical Biology and Medicine*, 195, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.12.082>
- Toussaint, O., Medrano, E. E., & Von Zglinicki, T. (2000). Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Experimental Gerontology*, 35(8), 927–945. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00180-7](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00180-7)

- Valenzuela, C. A., Vargas, L., Martinez, V., Bravo, S., & Brown, N. E. (2017). Palbociclib-induced autophagy and senescence in gastric cancer cells. *Experimental Cell Research*, 360(2), 390–396. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.09.031>
- Vetter Ingrid R. (2014). *Ras Superfamily Small G Proteins: Biology and Mechanisms 1 General Features, Signaling*.
- Vogel, A., Reuther, G., Weise, K., Triola, G., Nikolaus, J., Tan, K., Nowak, C., Herrmann, A., Waldmann, H., Winter, R., & Huster, D. (2009). The Lipid Modifications of Ras that Sense Membrane Environments and Induce Local Enrichment. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(46), 8784–8787. <https://doi.org/10.1002/anie.200903396>
- Volonte, D., & Galbiati, F. (2020). Caveolin-1, a master regulator of cellular senescence. In *Cancer and Metastasis Reviews* (Vol. 39, Issue 2, pp. 397–414). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09875-w>
- Wade Harper, J., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., & Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 75(4), 805–816. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90499-G](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90499-G)
- Wang, J., & Qiu, L. (2022). Drug-induced self-assembled nanovesicles for doxorubicin resistance reversal via autophagy inhibition and delivery synchronism. *Theranostics*, 12(8), 3977–3994. <https://doi.org/10.7150/thno.70852>
- Wang, X., Lu, B., Dai, C., Fu, Y., Hao, K., Zhao, B., Chen, Z., & Fu, L. (2020). Caveolin-1 Promotes Chemoresistance of Gastric Cancer Cells to Cisplatin by Activating WNT/ β -Catenin Pathway. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00046>
- Wang, Y., Li, Y., Zhong, J., Li, M., Zhou, Y., Lin, Q., Zong, S., Luo, W., Wang, J., Wang, K., Wang, J., & Xiong, L. (2023). Tumor-derived Cav-1 promotes pre-metastatic niche formation and lung metastasis in breast cancer. *Theranostics*, 13(5), 1684–1697. <https://doi.org/10.7150/thno.79250>
- Weidberg, H., Shvets, E., & Elazar, Z. (2011). Biogenesis and Cargo Selectivity of Autophagosomes. *Annual Review of Biochemistry*, 80(1), 125–156. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052709-094552>
- Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V., & Elazar, Z. (2010). LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *The EMBO Journal*, 29(11), 1792–1802. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.74>
- Weise, K., Kapoor, S., Denter, C., Nikolaus, J., Opitz, N., Koch, S., Triola, G., Herrmann, A., Waldmann, H., & Winter, R. (2011). Membrane-Mediated Induction and Sorting of K-Ras

- Microdomain Signaling Platforms. *Journal of the American Chemical Society*, 133(4), 880–887. <https://doi.org/10.1021/ja107532q>
- Wilkinson, D. S., Jariwala, J. S., Anderson, E., Mitra, K., Meisenhelder, J., Chang, J. T., Ideker, T., Hunter, T., Nizet, V., Dillin, A., & Hansen, M. (2015). Phosphorylation of LC3 by the Hippo Kinases STK3/STK4 Is Essential for Autophagy. *Molecular Cell*, 57(1), 55–68. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.019>
- Wittinghofer, A., & Vetter, I. R. (2011). Structure-Function Relationships of the G Domain, a Canonical Switch Motif. *Annual Review of Biochemistry*, 80(1), 943–971. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062708-134043>
- Xiao, J., Zhao, T., Fang, W., Chen, Y., Wu, H., Li, P., Chen, X., Yan, R., Jiang, Y., Li, S., Yang, H., Wu, C., Qin, X., Liao, X., Cai, lulu, Li, T., & Liu, Y. (2022). Caveolin-1 signaling-driven mitochondrial fission and cytoskeleton remodeling promotes breast cancer migration. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 152, 106307. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2022.106307>
- Yamamoto, M., Toya, Y., Schwencke, C., Lisanti, M. P., Myers, M. G., & Ishikawa, Y. (1998). *Caveolin Is an Activator of Insulin Receptor Signaling**. <http://www.jbc.org>
- Yamauchi, S., Sugiura, Y., Yamaguchi, J., Zhou, X., Takenaka, S., Odawara, T., Fukaya, S., Fujisawa, T., Naguro, I., Uchiyama, Y., Takahashi, A., & Ichijo, H. (2024). Mitochondrial fatty acid oxidation drives senescence. In *Sci. Adv* (Vol. 10). <https://www.science.org>
- Yamauchi, S., & Takahashi, A. (2025). Cellular senescence: mechanisms and relevance to cancer and aging. In *Journal of Biochemistry* (Vol. 177, Issue 3, pp. 163–169). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jb/mvae079>
- Yang, F., Kemp, C. J., & Henikoff, S. (2013). Doxorubicin Enhances Nucleosome Turnover around Promoters. *Current Biology*, 23(9), 782–787. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2013.03.043>
- Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2009). *An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy* (pp. 1–32). https://doi.org/10.1007/978-3-642-00302-8_1
- Yin, G., Huang, J., Petela, J., Jiang, H., Zhang, Y., Gong, S., Wu, J., Liu, B., Shi, J., & Gao, Y. (2023). Targeting small GTPases: emerging grasps on previously untamable targets, pioneered by KRAS. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 8, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01441-4>
- Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., & Eskelinen, E.-L. (2009). 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy*, 5(8), 1180–1185. <https://doi.org/10.4161/auto.5.8.10274>

- Young, A. R. J., Chan, E. Y. W., Hu, X. W., Köchl, R., Crawshaw, S. G., High, S., Hailey, D. W., Lippincott-Schwartz, J., & Tooze, S. A. (2006). Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *Journal of Cell Science*, 119(18), 3888–3900. <https://doi.org/10.1242/jcs.03172>
- Yu, X., Yang, Y., Chen, T., Wang, Y., Guo, T., Liu, Y., Li, H., & Yang, L. (2023). Cell death regulation in myocardial toxicity induced by antineoplastic drugs. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1075917>
- Zhang, J., Zhang, S., Song, J., Sun, K., Zong, C., Zhao, Q., Liu, W., Li, R., Wu, M., & Wei, L. (2014). Autophagy inhibition switches low-dose camptothecin-induced premature senescence to apoptosis in human colorectal cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 90(3), 265–275. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.05.009>
- Zhou, Y., & Hancock, J. F. (2018). A novel prenyl-polybasic domain code determines lipid-binding specificity of the K-Ras membrane anchor. *Small GTPases*, 1–5. <https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1379583>
- Zlatanova, J., & Victor, J. M. (2009). How are nucleosomes disrupted during transcription elongation? *HFSP Journal*, 3(6), 373–378. <https://doi.org/10.2976/1.3249971>
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiol Rev*, 94, 909–950. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013.-Byproducts>
- Zvereva, M. I., Shcherbakova, D. M., & Dontsova, O. A. (2010). Telomerase: Structure, functions, and activity regulation. In *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 75, Issue 13, pp. 1563–1583). Maik Nauka Publishing / Springer SBM. <https://doi.org/10.1134/S0006297910130055>