



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ S6 ΚΙΝΑΣΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ
ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ»

ΙΩΑΝΝΑ ΚΟΤΣΩΝΗ
ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΟΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ (Επιβλέπων)
ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ..... (Μέλος)
ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ..... (Μέλος)

ΛΑΡΙΣΑ, 2016



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

«ROLE OF S6 KINASE IN THYROID CANCER»

*Στη γιαγιά μου,
που συνεχίζει να παλεύει.....*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στη Λάρισα στο εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά τη χρονική περίοδο 2015-2016, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου καθηγητή Κωνσταντίνου Δήμα. Για τη διεκπεραίωση της μελέτης υπήρξε άριστη συνεργασία σε όλους τους τομείς με τους συναδέλφους του εργαστηρίου φαρμακολογίας αλλά και των υπόλοιπων εργαστηρίων.

Αυτή η μελέτη πραγματοποιήθηκε ύστερα από αρκετή δουλειά και με την πολύτιμη βοήθεια κάποιων ανθρώπων που θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη καθηγήτρια του μεταπτυχιακού προγράμματος κ. Τσέζου Ασπασία, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την ευκαιρία που μου έδωσε να διευρύνω τις γνώσεις μου στο εργαστήριο φαρμακολογίας.

Ευχαριστώ θερμά τον κ. Δήμα Κωνσταντίνο, Επίκουρο Καθηγητή της Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και επιβλέπων της διπλωματικής μου εργασίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο εργαστήριο και στη συγκεκριμένη μελέτη, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλο αυτό το διάστημα, την καθοδήγηση που μου παρείχε και την άριστη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια της έρευνας καθώς και τις άμεσες υποδείξεις του για την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Την Τσιμπλούλη Χρυσήδα, επιστημονική συνεργάτιδα του εργαστηρίου Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου της Θεσσαλίας, για την συνεχόμενη καθοδήγηση και στήριξη, για τις πληροφορίες και υποδείξεις που μου έδινε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου.

Την Ευαγγελία Σερέτη, διδακτορική φοιτήτρια του εργαστηρίου Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου της Θεσσαλίας, για την υπομονή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπαίδευσής μου στο εργαστήριο, την υποστήριξή της κάθε στιγμή, την καθοδήγηση που μου παρείχε και τις συμβουλές της.

Την Καραγιαννέλου Θεοδοσία για την άψογη συνεργασία που είχαμε κατά την διάρκεια εκπαίδευσής μου στο εργαστήριο και τις χρήσιμες συμβουλές της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Milica Pesic επιστημονική συνεργάτιδα του τμήματος νευροβιολογίας του πανεπιστημίου του Βελιγραδίου της Σερβίας για τη δωρεά της καρκινικής κυτταρικής σειράς 8505C προς το εργαστήριο Φαρμακολογίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Μπέγα Ηλία, Πιτσικά Νικόλαο, Βαλιάκο Ηλία, Σακελλαρίδη Νίκο και Ευτυχία Ασπροδίνη, μέλη του εργαστηρίου φαρμακολογίας, για την πολύτιμη συμβολή τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους δικούς μου ανθρώπους, οικογένεια και φίλους, που με στήριξαν και μου έδειξαν εμπιστοσύνη στο ό,τι μπορώ να τα καταφέρω σε αυτό το άγνωστο για μένα επιστημονικό πεδίο έρευνας.

Οκτώβριος 2016,

Κοτσώνη Ιωάννα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν κύριους ρυθμιστές της κυτταρικής λειτουργίας. Οι ριβοσωμικές S6 κινάσες είναι μια οικογένεια ενδοκυτταρικών κινασών σερίνης – θρεονίνης που κατέχουν σημαντικό ρόλο στις κυτταρικές λειτουργίες και εμφανίζουν αυξημένη δραστικότητα σε πολλά καρκινικά κύτταρα.

Συγκεκριμένα, η υποοικογένεια p70 βρίσκεται καθοδικά του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K-Akt-mTOR και η υποοικογένεια p90rsk καθοδικά του μονοπατιού MAPK/ERK.

Σκοπός ήταν να μελετηθεί ο ρόλος της οικογένειας των S6 κινασών ως στόχος νέων στοχεύουσων πιο αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων για τον καρκίνο του θυρεοειδούς.

Για τον σκοπό αυτό έγινε *in vitro* έλεγχος κυτταροτοξικότητας επτά διαφορετικών αναστολέων, με τη μέθοδο SRB, σε καλλιέργειες καρκινικών θυρεοειδικών κυττάρων.

Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από δύο διαφορετικά καρκινώματα του θυρεοειδικού αδένα τα aPTC, που αναπτύχθηκαν από όγκο ασθενούς και τα 8505C (εγκαθιδρυμένη καρκινική κυτταρική σειρά από αναπλαστικό καρκίνωμα του θυρεοειδούς).

Με τη διαδικασία της Western Blot μελετήθηκε η έκφραση και ο ρόλος των S6 κινασών σε πρωτεϊνικά λήμματα που απομονώθηκαν από την κάθε καρκινική κυτταρική σειρά. Τέλος πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων για τη σύγκριση τους.

Οι αναστολείς της PDK1 εμφάνισαν αυξημένη δραστικότητα, της p70 ήπια αντιπολλαπλασιαστική δράση, και της p90 διαφορές στην αποτελεσματικότητά τους.

Η δράση του Tac, φαίνεται να μειώνει την έκφραση του φωσφορυλιωμένου καταλοίπου Ser227 ενώ δε φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του καταλοίπου Thr577 της κινάσης RSK2 και στις δύο κυτταρικές σειρές. Επίσης στην 8505C παρατηρείται μείωση των επιπέδων της ολικής πρωτεΐνης p70 και του φωσφορυλιωμένου καταλοίπου Thr389 ύστερα από επώαση με Tac ενώ στην aPTC παρατηρείται μείωση της έκφρασης της ολικής πρωτεΐνης p70 αλλά αύξηση του φωσφορυλιωμένου καταλοίπου Thr389.

Συμπερασματικά προκύπτει ότι είναι πολύ πιθανό οι S6 κινάσες να παίζουν κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του θυρεοειδικού καρκίνου με αποτέλεσμα να αποτελέσουν στόχους για την ανάπτυξη νέων βελτιωμένων στοχεύουσων θεραπειών.

ABSTRACT

Protein kinases are key regulators of cell function. The ribosomal S6 kinases are a family of intracellular serine – threonine kinases, which play an important role in cell function and exhibit increased activity in many cancer cells.

Specifically, p70 subfamily is located downstream of the signaling pathway PI3K-Akt-mTOR and subfamily p90rsk downstream of MAPK / ERK pathway.

The purpose was to study the role of the S6 kinases family as new target aimed for more effective therapeutic approaches for thyroid cancer.

Thus, an in vitro SRB cytotoxicity assay was conducted for seven different inhibitors, in cultures of cancerous thyroid cells.

Cells from two different tumors of the thyroid gland were used: aPTC, which are developed by the patient volume and 8505C (cancerous, established cell line of anaplastic thyroid carcinoma).

We studied the expression and the role of S6 kinase in protein samples isolated from each cancer cell line with Western Blot analysis. Finally a quantification was performed to compare the results.

PDK1 inhibitors showed increased activity, p70's mild antiproliferative activity, and p90's differences in their effectiveness.

Tac's activity seems to reduce the expression of the phosphorylated residue Ser227 and does not seem to significantly affect the phosphorylation levels of RSK2 kinase residue Thr577 in both cell lines. Also in 8505C, a reduction was observed in the levels of total protein p70 and in the phosphorylated residue Thr389 after incubation with Tac whereas in aPTC a decrease was observed in the expression of total protein p70 but at the phosphorylated residue Thr389 an increase was observed.

In conclusion it was shown that the S6 kinases affect the development and the progression of thyroid cancer thereby leading to the development of new and improved therapies for thyroid cancer.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος.....	1
Περίληψη.....	3
Abstract.....	4
Περιεχόμενα.....	5
Κατάλογος γραφημάτων.....	8
Λίστα πινάκων.....	10
Κεφάλαιο 1	
1. Εισαγωγή.....	12
1.1. Σκοπός και υπόβαθρο της μελέτης.....	12
1.2. Διαδικασία και προσέγγιση.....	12
Κεφάλαιο 2	
2. Επιστημονικές γνώσεις και πληροφορίες.....	15
2.1. Καρκίνος.....	15
2.2. Θυρεοειδής αδέννας.....	18
2.3. Καρκίνος Θυρεοειδούς Αδένα.....	20
2.4. Ταξινόμηση Νεοπλασιών του Θυρεοειδούς Αδένα.....	23
2.5. Καρκινώματα Θυρεοειδούς Αδένα.....	23
2.5.1. Καλά διαφοροποιημένο καρκίνωμα.....	24
2.5.1.1. Θηλώδες Καρκίνωμα (papillary thyroid carcinoma-PTC).....	24
2.5.1.2. Θυλακιδώδες Καρκίνωμα (Follicular Carcinoma-FTC).....	25
2.5.2. Καρκίνωμα Χαμηλής Διαφοροποίησης (Poorly differentiated carcinoma).....	25
2.5.2.1. Αναπλαστικό Καρκίνωμα (Anaplastic Carcinoma).....	26
2.5.3. Μυελοειδές Καρκίνωμα (Medullary Carcinoma-MTC).....	26
2.6. Στάδια του καρκίνου του θυρεοειδούς.....	27
2.6.1. Σύστημα TNM.....	27
2.7. Οικογένεια κινασών.....	28
2.7.1. Ριβοσωμική S6 κινάση (rsk).....	28
2.8. Υπο-οικογένεια πρωτεϊνών p90rsk, MAPK-mitogen activated protein kinase-1 (MAPKAP-K1).....	29
2.8.1. Σηματοδοτικό μονοπάτι.....	31
2.9. Υπο-οικογένεια πρωτεϊνών p70rsk, S6-H1 Kinase (S6 Kinase).....	33
2.9.1. Σηματοδοτικό μονοπάτι – ενεργοποίηση p70 S6 κινάσης.....	34

Κεφάλαιο 3

3.	Υλικά και Μέθοδοι.....	36
3.1.	Συλλογή δειγμάτων - Θυρεοειδικές Καρκινικές Κυτταρικές Σειρές.....	36
3.2.	Θρεπτικά μέσα των καρκινικών κυττάρων.....	37
3.3.	Καλλιέργεια και ανακαλλιέργεια καρκινικών κυττάρων.....	37
3.4.	Μέτρηση κυττάρων με Neubauer hemacytometer και χρήση χρωστικής trypan blue.....	39
3.5.	Κατάψυξη κυττάρων.....	41
3.6.	Απόψυξη κυττάρων.....	42
3.7.	In vitro έλεγχος αναστολέων για κυτταροτοξικότητα (cytotoxicity Assay, SRB).....	43
3.8.	Αναστολείς καρκινικών κυττάρων.....	45
3.9.	Καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων και επώαση με αναστολέα Tiliroside (Tac).....	49
3.10.	Λύση κυττάρων και απομόνωση πρωτεϊνών από καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων.....	50
3.11.	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ολικών πρωτεϊνών σε διάλυμα (Bradford Analysis).....	51
3.12.	Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western Blot analysis.....	52
3.13.	Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με Coomassie blue.....	59
3.14.	Ποσοτικοποίηση ανοσοαποτυπωμένων πρωτεϊνών.....	60
3.15.	Διαδικασία αποδέσμευσης αντισώματος από PVDF μεμβράνη (stripping).....	60
3.16.	Χημικά Αντιδραστήρια και αναλώσιμα.....	61

Κεφάλαιο 4

4.	Αποτελέσματα.....	62
4.1.	Μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταροτοξικότητας των καρκινικών κυττάρων υπό την επίδραση αναστολέων.....	62
4.1.1.	Συγκέντρωση αποτελεσμάτων ανά αναστολέα.....	66
4.2.	Ποσοτική μελέτη έκφρασης της πρωτεΐνης p70rsk με ανοσοαποτύπωση.....	71
4.3.	Ποσοτική μελέτη έκφρασης της πρωτεΐνης p90rsk με ανοσοαποτύπωση.....	72
4.4.	Πρωτεϊνική έκφραση της p90rsk και της p70rsk με ανοσοαποτύπωση μετά από επώαση με αναστολέα Tac.....	75
4.5.	Συγκεντρωτική σχηματική απεικόνιση αποτελεσμάτων.....	79

Κεφάλαιο 5

5. Συζήτηση – Συμπεράσματα.....	84
Βιβλιογραφία.....	87

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

- ΓΡΑΦΗΜΑ 1 : Καμπύλες ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων aPTC ανά αναστολέα μετά από επώαση τους για 48 ώρες με 4 αραιώσεις (100, 10, 1 και 0,1 μ M) του κάθε αναστολέα.
- ΓΡΑΦΗΜΑ 2 : Καμπύλες ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων 8505C ανά αναστολέα μετά από επώαση τους για 48 ώρες με 4 αραιώσεις (100, 10, 1 και 0,1 μ M) του κάθε αναστολέα
- ΓΡΑΦΗΜΑ 3 : Καμπύλες ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών ύστερα από επώαση για 48 ώρες με τον αναστολέα Tac
- ΓΡΑΦΗΜΑ 4 : Καμπύλες ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών ύστερα από επώαση για 48 ώρες με τον αναστολέα FMK
- ΓΡΑΦΗΜΑ 5 : Καμπύλες ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών ύστερα από επώαση για 48 ώρες με τον αναστολέα BI-D1870.
- ΓΡΑΦΗΜΑ 6 : Καμπύλες ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών ύστερα από επώαση για 48 ώρες με τον αναστολέα PF 4708671
- ΓΡΑΦΗΜΑ 7 : Καμπύλες ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών ύστερα από επώαση για 48 ώρες με τον αναστολέα GSK 2334470
- ΓΡΑΦΗΜΑ 8 : Καμπύλες ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών ύστερα από επώαση για 48 ώρες με τον αναστολέα SL 0101-1
- ΓΡΑΦΗΜΑ 9 : Καμπύλες ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών ύστερα από επώαση για 48 ώρες με τον αναστολέα BX-912
- ΓΡΑΦΗΜΑ 10 : Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της Phospho p70 (Thr389) και της ολικής p70 S6K και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές
- ΓΡΑΦΗΜΑ 11 : Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της Phospho p90 (Ser227) και της ολικής p90rsk και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές
- ΓΡΑΦΗΜΑ 12 : Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της Phospho p90 (Thr577) και της ολικής p90rsk και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές
- ΓΡΑΦΗΜΑ 13 : Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της Phospho p70 (Thr389) και της ολικής p70 S6K και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές ύστερα από επώαση με T-ac 20 μ M για 4 ώρες
- ΓΡΑΦΗΜΑ 14 : Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της Phospho p90 (Ser227) και της ολικής p90rsk και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές ύστερα από επώαση με T-ac 20 μ M για 4 ώρες

ΓΡΑΦΗΜΑ 15 : Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της Phospho p90 (Thr577) και της ολικής p90rsk και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές ύστερα από επώαση με T-ac 20μM για 4 ώρες

ΓΡΑΦΗΜΑ 16 : Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της Phospho p70 (Thr389) και της ολικής p70 S6K και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές ύστερα από επώαση με T-ac 20μM για 4 ώρες και χωρίς επώαση (treated - control)

ΓΡΑΦΗΜΑ 17 : Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της Phospho p90 (Thr577) και της ολικής p90rsk και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές ύστερα από επώαση με T-ac 20μM για 4 ώρες και χωρίς επώαση (treated - control)

ΓΡΑΦΗΜΑ 18 : Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της Phospho p90 (Ser227) και της ολικής p90rsk και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές ύστερα από επώαση με T-ac 20μM για 4 ώρες και χωρίς επώαση (treated - control)

ΓΡΑΦΗΜΑ 19 : Διαγραμματική απεικόνιση του λόγου της έκφρασης της κάθε φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης προς την αντίστοιχη ολική πρωτεΐνη και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές ύστερα από επώαση με T-ac 20μM για 4 ώρες και χωρίς επώαση (treated - control)

ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1 : Αριθμός θανάτων για κύριες αιτίες θανάτου

ΠΙΝΑΚΑΣ 2 : Αναμενόμενα περιστατικά και θάνατοι για τους 10 πιο δημοφιλείς τύπους καρκίνου για το 2016 στις Ηνωμένες Πολιτείες

ΠΙΝΑΚΑΣ 3 : Ποσότητες αντιδραστηρίων για την παρασκευή πηκτωμάτων

ΠΙΝΑΚΑΣ 4 : Αντιδραστήρια για την παρασκευή του Loading buffer

ΠΙΝΑΚΑΣ 5 : Αντιδραστήρια για την παρασκευή του Running buffer

ΠΙΝΑΚΑΣ 6 : Αντιδραστήρια για την παρασκευή του Transfer buffer

ΠΙΝΑΚΑΣ 7 : Αντιδραστήρια για την παρασκευή του TBS, TBS-T, TBS-T 5%

ΠΙΝΑΚΑΣ 8 : Αντισώματα που μελετήθηκαν με western blot analysis και οι αραιώσεις τους

ΠΙΝΑΚΑΣ 9 : Κυτταροτοξική δράση των αναστολέων για τις θυρεοειδικές καρκινικές σειρές PTC και 8505C

ΠΙΝΑΚΑΣ 10 : Ποσοστιαία ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων ανά συγκέντρωση του κάθε αναστολέα ανά καρκινικό κυτταρικό τύπο

ΠΙΝΑΚΑΣ 11 : Εμφάνιση μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα της φωσφορυλιωμένης μορφής της p70 (Thr389) και της ολικής p70 κατά την επώαση μόνο με θρεπτικό υλικό

ΠΙΝΑΚΑΣ 12 : Εμφάνιση μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα της φωσφορυλιωμένης μορφής της p90 (Ser227) και της ολικής p90 κατά την επώαση μόνο με θρεπτικό υλικό

ΠΙΝΑΚΑΣ 13 : Εμφάνιση μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα της φωσφορυλιωμένης μορφής της p90 (Thr577) και της ολικής p90 κατά την επώαση μόνο με θρεπτικό υλικό

ΠΙΝΑΚΑΣ 14 : Εμφάνιση μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα της φωσφορυλιωμένης μορφής της p70 (Thr389) και της ολικής p70 ύστερα από επώαση με T-ac 20μM για 4 ώρες

ΠΙΝΑΚΑΣ 15 : Εμφάνιση μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα της φωσφορυλιωμένης μορφής της p90 (Ser227) και της ολικής p90 ύστερα από επώαση με T-ac 20μM για 4 ώρες

ΠΙΝΑΚΑΣ 16 : Εμφάνιση μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα της φωσφορυλιωμένης μορφής της p90 (Thr577) και της ολικής p90 ύστερα από επώαση με T-ac 20μM για 4 ώρες

ΠΙΝΑΚΑΣ 17 : Ποσοστιαία μεταβολή της κάθε φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης συγκριτικά προς την αντίστοιχη ολική πρωτεΐνη και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές ύστερα από επώαση με T-ac 20μM για 4 ώρες και χωρίς επώαση (treated - control)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Αν και ο καρκίνος του θυρεοειδούς εμφανίζεται σπανιότερα σε αντίθεση με άλλες μορφές καρκίνου οι πιο επιθετικές του μορφές εξακολουθούν να είναι θανατηφόρες και να χρήζουν νέων πιο αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων. Σκοπός της εκπόνησης της παρούσης διπλωματικής εργασίας ήταν να μελετηθεί ο ρόλος της οικογένειας των S6 κινασών σαν πιθανοί φαρμακολογικοί στόχοι σε δύο διαφορετικά καρκινώματα του θυρεοειδικού αδένου, το επιθετικό θηλώδες καρκίνωμα (aggressive Papillary Thyroid Carcinoma, aPTC) και το αναπλαστικό καρκίνωμα του θυρεοειδούς (anaplastic thyroid carcinoma).

Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε αφενός η έκφραση και ο ρόλος των S6 κινασών στις θυρεοειδικές καρκινικές κυτταρικές σειρές aPTC και 8505C, αντιπροσωπευτικές του θηλώδους και του αναπλαστικού καρκινώματος αντίστοιχα και αφετέρου η *in vitro* αντικαρκινική δράση διαφόρων αναστολέων της λειτουργίας των κινασών αυτών και εξετάστηκε η κυτταροτοξική και η αντιπολλαπλασιαστική τους ικανότητα.

1.2. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς προσβάλλει περρισσότερες γυναίκες σε σχέση με το συνολικό αριθμό ασθενών και τα κρούσματά του κάθε χρόνο αυξάνονται. Αυτό οφείλεται κυρίως στο περιβάλλον που ζει ένα άτομο και στις συνήθειες που αποκτά κατά τη διάρκεια της ζωής του, παρά στους γενετικούς παράγοντες που μπορεί να συμβάλουν. Θεωρείται μια θεραπεύσιμη και ιάσιμη μορφή καρκίνου στις περισσότερες περιπτώσεις εμφάνισης, με μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης να κατέχει η μορφή του θηλώδους θυρεοειδικού καρκινώματος. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι διάγνωσης και θεραπείας που εφαρμόζονται σήμερα για την καλύτερη αντιμετώπιση του ασθενούς.

Οι ριβοσωμικές S6 κινάσες (ribosomal S6 kinases, RSKs) είναι μια οικογένεια από ενδοκυτταρικές κινάσες σερίνης – θρεονίνης που κατέχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των κυττάρων, στον πολλαπλασιασμό τους και στην επιβίωσή τους. Οποιαδήποτε διαφοροποίηση στην φυσιολογική τους λειτουργία μπορεί να επηρεάσει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου ή την έκφραση των γονιδίων και να οδηγήσει στην ανάπτυξη και την εξέλιξη κακοήθους όγκου.

Το σηματοδοτικό μονοπάτι mTOR /S6K φαίνεται ότι διαδραματίζει ιδιαίτερο ρόλο στην εμφάνιση διαφόρων ασθενειών όπως ο διαβήτης, η παχυσαρκία και ο καρκίνος [64]. Ειδικά η απορρύθμιση της λειτουργίας της p70S6 κινάσης μπορεί να αποτελέσει σημείο έναρξης και εξέλιξης της νόσου και η επανενεργοποίησή της πιθανώς να εμφανίσει θεραπευτικά αποτελέσματα σε πολλές μορφές καρκίνου [23].

Η S6 κινάση έχει αυξημένη δραστηριότητα σε πολλά καρκινικά κύτταρα και έχει συνδεθεί με ανθεκτικότητα σε φαρμακευτικές αγωγές και αντίσταση σε χημειοθεραπευτικά σχήματα, τονίζοντας τον ρόλο που έχουν αυτές οι πρωτεΐνες στην καρκινογένεση [51]. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι οι S6 κινάσες υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα μαστού σε σύγκριση με τα αντίστοιχα υγιή κύτταρα ελέγχου [23, 63, 86].

Οι RSKs στον καρκίνο ρυθμίζουν τον κυτταρικό μετασχηματισμό, την ογκογένεση και τη μετάσταση, καθώς οι αλλαγές στην έκφραση των ισομορφών RSK έχουν αναφερθεί σε πολλές κακοήθειες, όπως στο μαστό, στον πνεύμονα και στον προστάτη [82].

Τέσσερις RSK ισομορφές έχουν ταυτοποιηθεί στους ανθρώπινους ιστούς. Η RSK1 η οποία βρίσκεται σε αφθονία στον μυελό των οστών, στους πνεύμονες και στα T λεμφοκύτταρα. Η RSK2 που βρίσκεται κυρίως στα T λεμφοκύτταρα, στον προστάτη και στους λεμφαδένες. Η RSK3 η οποία εκφράζεται κυρίως στους πνεύμονες, στον εγκέφαλο, στον νωτιαίο μυελό και στον αμφιβληστροειδή. Η έκφραση της RSK4 βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα συγκριτικά με τις υπόλοιπες ισομορφές και τα επίπεδά της ποικίλλουν λιγότερο μεταξύ των ιστών. Η λειτουργία των ισομορφών RSK φαίνεται να ποικίλει ανάλογα με το κυτταρικό σύστημα που έχει μελετηθεί [82].

Η RSK2 έχει βρεθεί να μεσολαβεί για τις προμεταστατικές λειτουργίες της ERK [16, 56]. Αντίθετα η υπερέκφραση του wild-type της RSK1 ανέστειλε τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα, γεγονός που σημαίνει ότι η δραστηριότητα αυτή μετάλλαξη κατάφερε να αναστείλει την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων [82, 60].

Αυτές οι διαφορές εξαρτώνται από τη δραστηριότητα της κάθε κινάσης και οι διαφορές που εμφανίζονται μεταξύ των κυτταρικών συστημάτων είναι αυτές που καθιστούν αρκετά δύσκολη την αξιολόγηση των θεραπευτικών δυνατοτήτων των αναστολέων της RSK [82].

Με τη διαδικασία της Western Blot πραγματοποιήθηκε η μελέτη των πρωτεϊνικών λημμάτων, που απομονώθηκαν από την κάθε καρκινική θυρεοειδική κυτταρική σειρά, για τον έλεγχο έκφρασης των πρωτεϊνικών κινάσων των δύο υποοικογενειών (p90rsk - MAPKAP-K1 και p70rsk – S6-H1) της ριβοσωμικής S6 κινάσης (RSK) στον καρκίνο του θυρεοειδούς.

Τέλος με τη διαδικασία του ελέγχου της κυτταροτοξικότητας in vitro, μελετήθηκαν επτά διαφορετικοί αναστολείς (BI-D1870, BX-912, FMK, GSK 2334470, PF 4708671, SL0101-1,

Tilirosides-TAC), για την κυτταροτοξική και αντιπολλαπλασιαστική τους δράση στις καρκινικές κυτταρικές σειρές.

2. ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

2.1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Ο καρκίνος, γνωστός και ως κακοήθης όγκος ή κακοήθης νεόπλασμα αποτελείται από ομάδα ασθενειών η οποία χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και εξάπλωση μη φυσιολογικών κυττάρων σε άλλα μέρη του σώματος [13, 50].

Θεωρείται ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας των ανεπτυγμένων χωρών και μπορεί να προσβάλει ανθρώπους όλων των ηλικιών. Αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου αμέσως μετά τις καρδιοπάθειες [38] (Πίνακας 1, πηγή: [Health United States, 2015 Table 19](#), Data are for 2014). Εάν η εξάπλωση παραμείνει ανεξέλεγκτη τότε οδηγεί στο θάνατο.

Πίνακας 1 : Αριθμός θανάτων για κύριες αιτίες θανάτου

<u>Ασθένεια</u>	<u>Αριθμός θανάτων</u>
Καρδιοπάθειες	614.348
Καρκίνος	591.699
Χρόνιες αναπνευστικές παθήσεις	147.101
Ατυχήματα (ακούσιοι τραυματισμοί)	136.053
Εγκεφαλικό επεισόδιο	133.103
Νόσος Alzheimer	93.541
Διαβήτης	76.488
Μορφές γρίπης και πνευμονία	55.227
Νεφρίτιδα, νεφρωσικό σύνδρομο, νέφρωση	48.146
Εσκεμμένος αυτοτραυματισμός (αυτοκτονία)	42.773

Ο καρκίνος ανήκει στην ομάδα των πολυπαραγοντικών νοσημάτων, δηλαδή μπορεί να προκληθεί από εξωτερικούς παράγοντες, όπως κάπνισμα, κακή διατροφή, λοιμογόνοι παράγοντες, UV και ιονίζουσα ακτινοβολία, αλλά και από ενδογενείς παράγοντες, όπως έκκριση ορμονών, κληρονομήσιμες γενετικές μεταλλάξεις και σωματικές μεταλλάξεις που μπορεί να συμβούν κατά τη διάρκεια της ζωής. Αυτό σημαίνει ότι για την εμφάνισή καρκίνου

μπορεί να υπάρξει ταυτόχρονη δράση περισσότερων του ενός παραγόντων από όσους προαναφέρθηκαν ή ακόμη και να δρουν με συγκεκριμένη σειρά [36].

Για να μετατραπεί ένα φυσιολογικό κύτταρο σε καρκινικό θα πρέπει να συμβούν μία ή περισσότερες μεταλλάξεις στα ογκογονίδια ή και στα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Αυτές οι μεταλλάξεις συνήθως οφείλονται σε λάθη που συμβαίνουν κατά τη μίτωση όπως απώλεια ή διπλασιασμός περιοχής χρωμοσώματος και μετάθεση μεταξύ δύο χρωμοσωμάτων όπως συμβαίνει στην χρόνια μυελογενή λευχαιμία.

Η διαφορά των φυσιολογικών κυττάρων και με τα καρκινικά είναι ότι τα πρώτα αυξάνονται, διαιρούνται και πεθαίνουν με αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο ενώ τα καρκινικά κύτταρα διαιρούνται ανεξέλεγκτα, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια μάζα κυττάρων που ονομάζεται όγκος.

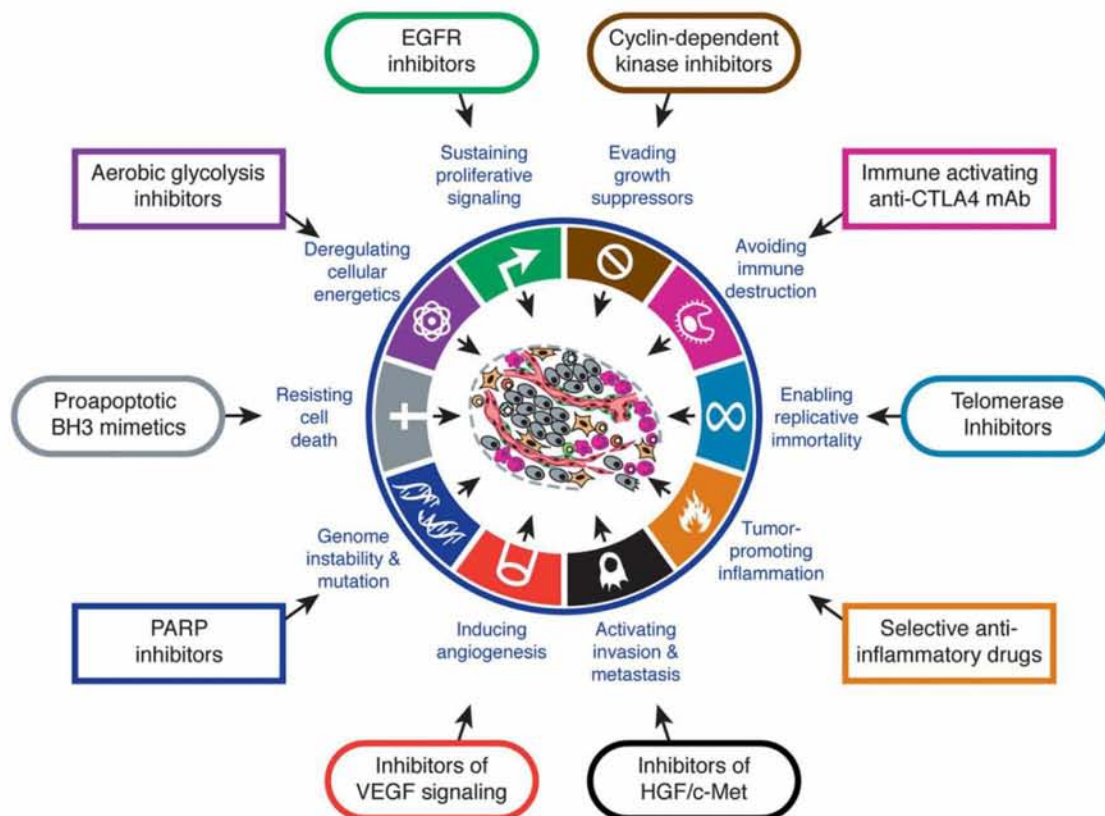
Πρέπει να αναφερθεί ότι δεν είναι όλοι οι όγκοι καρκινικοί. Οι όγκοι μπορεί να είναι καλοήθεις, δηλαδή να υπάρχει αργή ανάπτυξη των κυτάρων, τα κύτταρα να μη μεταναστεύουν σε άλλα όργανα του σώματος και να μην είναι διηθητικά, ή κακοήθεις, δηλαδή τα κύτταρα να πολλαπλασιάζονται με ταχύτατους ρυθμούς και να αποφεύγουν τον κυτταρικό θάνατο αγνοώντας τους μηχανισμούς ρύθμισης του οργανισμού, να αποκτούν ικανότητα μετάστασης και να γίνονται διηθητικά.

Τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων ή αλλιώς τα ορόσημα του καρκίνου (Εικόνα 1) σύμφωνα με τους D. Hanahan & R. A. Weinberg (2000) [17] είναι:

- I. Αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα
- II. Αναισθησία σε αντι-αυξητικά σήματα
- III. Αποφυγή απόπτωσης
- IV. Απεριόριστος πολλαπλασιασμός
- V. Συνεχόμενη αγγειογένεση για την αιμάτωσή τους
- VI. Διήθηση και μετάσταση

Η ίδια ερευνητική ομάδα το 2011 [18] πρόσθεσε άλλα τέσσερα χαρακτηριστικά τα οποία εντάχθηκαν στα ορόσημα του καρκίνου ως συμπληρωματικά (Εικόνα 1) στα προαναφερθέντα:

- VII. Γενετική αστάθεια και μεταλλάξεις
- VIII. Φλεγμονή που προωθεί τον καρκίνο
- IX. Απορρύθμιση κυτταρικής ενέργειας-μεταβολισμού
- X. Αποφυγή ανοσοκαταστροφής.



Εικόνα 1 : Ορόσημα του καρκίνου και θεραπευτική στόχευση κάθε χαρακτηριστικού

Ο καρκίνος μπορεί να εντοπιστεί από ορισμένα σημάδια και συμπτώματα, όπως ξαφνικές επαναλαμβανόμενες αιμορραγίες, συνεχόμενο βήχα, πόνο στο στήθος ή και δυσκολία στην αναπνοή, απότομη απώλεια βάρους, εμφάνιση νέου εξογκώματος, αλλαγή μορφολογίας κάποια κρεατοελιάς ακόμη και αλλαγή στις κενώσεις του εντέρου και να επιβεβαιωθεί με εξετάσεις, μαγνητική τομογραφία και βιοψία [33, 45, 50].

Κάθε τύπος καρκίνου μπορεί να εμφανίσει διαφορετικά συμπτώματα, να έχει διαφορετική εξέλιξη και επομένως να χρειαστεί διαφορετική αντιμετώπιση σε κάθε ασθενή.

Τις περισσότερες φορές γίνεται συνδιασμός θεραπειών μεταξύ ακτινοβολιών, χημειοθεραπειών, στοχευμένης θεραπείας ακόμη και χειρουργείου. Οι πιθανότητες επιβιώσεις εξαρτώνται από τον τύπο καρκίνου, το στάδιο στο οποίο βρίσκεται, την ηλικία του ατόμου, τον σχεδιασμό και την έναρξη του θεραπευτικού σχήματος και την ανταπόκριση του οργανισμού σε αυτό [92].

Υπάρχει όμως η πιθανότητα να μειωθούν ή και να προληφθούν κάποια είδη καρκίνου εάν κάποιος αποφύγει κατά τη διάρκεια της ζωής του το κάπνισμα και το αλκοόλ, προσέχει το σωματικό του βάρος καταναλώνοντας περισσότερα φρούτα, λαχανικά, προϊόντα ολικής αλέσεως και λιγότερο κόκκινο κρέας, αυξάνοντας τη φυσική του δραστηριότητα και αποφεύγοντας την υπέρθεση στην ακτινοβολία του ηλίου [61, 73].

2.2. ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΑΔΕΝΑ

Ο θυρεοειδής (Εικόνα 2) είναι ο μεγαλύτερος ενδοκρινής αδένας του ανθρώπινου σώματος. Βρίσκεται στη βάση του λαιμού, στην πρόσθια, μέση και κατώτερη τραχηλική χώρα, κάτω από τον θυρεοειδή χόνδρο και μπροστά από την τραχεία, δηλαδή στο πρόσθιο μέρος του λαιμού, λίγο πιο κάτω από το μήλο του Αδάμ [37]. Έχει σχήμα πεταλούδας και αποτελείται από δυο λοβούς, τον δεξιό λοβό και τον αριστερό λοβό, που συνδέονται (μπροστά από την τραχεία) με μια γέφυρα θυρεοειδικού ιστού, τον ισθμό [34, 37]. Στη μέση του ισθμού υπάρχει ακόμη ένας λοβός, μικρότερος από τους άλλους σε φυσιολογικές συνθήκες, ο πυραμοειδής λοβός.

Ο κάθε λοβός αποτελείται από ένα άθροισμα μικρότερων μονάδων, που λέγονται λόβια. Το κάθε λόβιο είναι ένα άθροισμα από πολλά σφαιρικά κυστίδια, που είναι η βασική ανατομική μονάδα του θυρεοειδικού ιστού, και είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία, αποθήκευση και απελευθέρωση των θυρεοειδικών ορμονών [32]. Αυτός ο αδένας παράγει ορμόνες που βοηθούν στον έλεγχο της καρδιάς, της θερμοκρασίας του σώματος, της αρτηριακής πίεσης, της αναπνοής, του σωματικού βάρους, βοηθάει στη σωστή λειτουργία του νευρικού συστήματος και στην εγκεφαλική ανάπτυξη σε παιδιά [34, 32].

Στο πίσω μέρος του θυρεοειδούς αδένου βρίσκονται τέσσερις παραθυρεοειδείς αδένες, δύο σε κάθε λοβό, πάνω και κάτω.

Το βάρος του θυρεοειδούς ζυγίζει 20-25 γραμμάρια και οι διαστάσεις του είναι :

- I. μήκος (ύψος) λοβού 3-4 cm
- II. πλάτος (λοβού) 1,5-2 cm
- III. πάχος 1,5-2 cm.

Ο θυρεοειδής αδένας αποτελείται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Αρχικά τα λόβια αποτελούνται από θυλακιώδη κύτταρα, ενώ παραθυλακιώδη κύτταρα, γνωστά και ως κύτταρα C, υπάρχουν σε όλο τον αδένου μεταξύ των λοβίων ακόμη και στα τοιχώματά τους. Επίσης αποτελείται και από λεμφοκύτταρα και λιποκύτταρα [32, 37].

Έχει την ικανότητα να παράγει τρεις βασικές διαφορετικές ορμόνες :

- I. τη θυροξίνη ή τετραϊωδοθυρονίνη (T4),
- II. την τριωδοθυρονίνη (T3) που ρυθμίζουν το μεταβολισμό όλων των ιστών,
- III. την καλσιτονίνη

Τα θυλακιώδη κύτταρα προσλαμβάνουν ιώδιο από το αίμα, το οποίο χρησιμοποιείται για την παραγωγή της θυροξίνης (T4) και της τριωδοθυρονίνης (T3), δύο ορμόνες που έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν το μεταβολισμό όλων των ιστών. Τα ίδια κύτταρα παράγουν επίσης

θυρεοσφαιρίνη (Tg), η οποία είναι μία πρωτεΐνη που λειτουργεί ως αποθήκη των T3 και T4 μέχρι ο οργανισμός να τις χρειαστεί [32]. Η καλσιτονίνη παράγεται από τα παραθυλακίωδη κύτταρα και είναι υπεύθυνη για τον έλεγχο των επιπέδων του ασβεστίου του αίματος [32, 37].

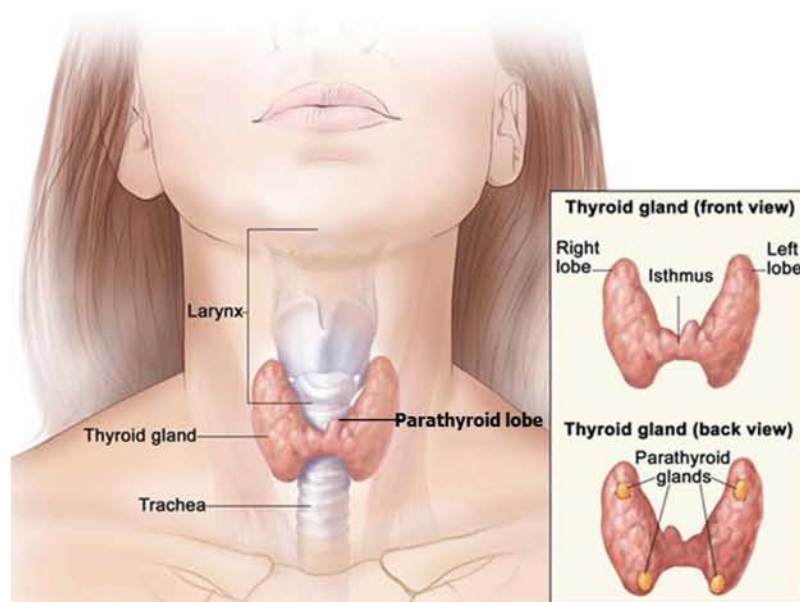
Η σύνθεση και η έκκριση των θυροειδικών ορμονών ρυθμίζεται από μία άλλη ορμόνη, την θυροειδοτρόπο ορμόνη (TSH) [32]. Η TSH παράγεται στην υπόφυση και εξαρτάται από την έκκριση της θυροεκλυτικής ορμόνης (TRH) η οποία παράγεται στον υποθάλαμο.

Απαραίτητο για τη σύνθεση όλων των θυροειδικών ορμονών είναι το ιώδιο.

Οι παθήσεις που μπορεί να εμφανίσει ο θυροειδής αδένας είναι :

- I. Ανωμαλίες ανάπτυξης του θυροειδούς,
- II. Παθήσεις που προκαλούν υπερθυροειδισμό,
- III. Παθήσεις που προκαλούν υποθυροειδισμό,
- IV. Θυροειδίτιδες και
- V. Καρκίνος του θυροειδούς.

Σε υγιή άτομα ο αδένας δεν είναι ορατός αλλά με την ψηλάφηση αναγνωρίζεται ως μαλακή μάζα. Κάθε διόγκωση του αναφέρεται κλινικά ως βρογχοκήλη. Η διόγκωσή του θυροειδούς αποτελεί κλινικό εύρημα, που όμως η εμφάνιση αυτή δεν αποτελεί πάντα κάποια πάθηση του αδένα. Η εξέτασή του περιλαμβάνει την αναζήτηση διογκωμένης μάζας και την αξιολόγηση του συνολικού μεγέθους του θυροειδούς και μία σειρά από εξετάσεις αίματος για τον έλεγχο της λειτουργικότητας του θυροειδούς (Thyroid function tests-TFTs) [12, 22].



Εικόνα 2 : Ανατομία θυροειδούς αδένα

2.3. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ

Τα κύτταρα του θυρεοειδούς αδένα κάποιες φορές αλλάζουν συμπεριφορά και αυτή η αλλαγή μπορεί να οδηγήσει σε καλοήγη όγκο όπως υποθυρεοειδισμό, οζίδια του θυρεοειδούς, υπερθυρεοειδισμός, θυρεοειδίτιδα ή βρογχοκήλη και άλλες φορές μπορεί να προκαλέσει καρκίνο. Τον πιο κοινό τύπο αποτελεί ο διαφοροποιημένος καρκίνος του θυρεοειδούς, με ποσοστό εμφάνισης μεγαλύτερο του 90% συγκριτικά με όλους τους τύπους του θυρεοειδικού καρκίνου, και απαρτίζεται από το θηλώδες (PTC) και το θηλακιώδες καρκίνωμα (FTC). Υπάρχουν και άλλες μορφές καρκίνου που μπορεί να αναπτυχθούν όπως το καρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης, το μυελοειδές καρκίνωμα (MTC) και το αναπλαστικό καρκίνωμα (ATC) [37].

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αποτελεί έναν κακοήγη όγκο που αναπτύσσεται στον θυρεοειδή αδένα και μπορεί να κάνει μεταστάσεις σε άλλα όργανα-ιστούς.

Αποτελεί τον συχνότερο καρκίνο από τα κακοήγη νεοπλάσματα των ενδοκρινών αδένων και η συχνότητα εμφάνισής του τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί. Σύμφωνα με το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου (NIH) στην Αμερική, ο καρκίνος του θυρεοειδούς αντιπροσωπεύει το 3,8% όλων των νέων περιπτώσεων καρκίνου με μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης στο γυναικείο φύλο [30]. Αποτελεί την όγδοη πιο συχνή μορφή καρκίνου στις Ηνωμένες Πολιτείες με ποσοστό 3,8% όλων των νέων περιστατικών εμφάνισης καρκίνου αλλά είναι θεραπεύσιμη και συνήθως ιάσιμη. Σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία το 2016 αναμένεται να εμφανιστούν 64,300 νέα περιστατικά (Πίνακας 2). Παρατηρείται κυρίως σε ενήλικα άτομα με μέση ηλικία εμφάνισης τα 45-54 έτη και πολύ σπάνια σε άτομα μικρότερα των 20 ετών [30].

Πίνακας 2 : Αναμενόμενα περιστατικά και θάνατοι για τους 10 πιο δημοφιλείς τύπους καρκίνου για το 2016 στις Ηνωμένες Πολιτείες

<u>Τύπος Καρκίνου</u>	<u>Αναμενόμενα νέα περιστατικά το 2016</u>	<u>Αναμενόμενοι θάνατοι το 2016</u>
Καρκίνος μαστού	246.660	40.450
Καρκίνος πνεύμον και βρόγχου	224.390	158.080
Καρκίνος προστάτη	180.890	26.120
Καρκίνος παχέος εντέρου και ορθού	134.490	49.190
Καρκίνος ουροδόχου κύστεως	76.960	16.390
Μελάνωμα δέρματος	76.380	10.130
Non-Hodgkin λέμφωμα	72.580	20.150
Καρκίνος θυρεοειδούς	64.300	1.980
Καρκίνος νεφρικής πυέλου και νεφρού	62.700	14.240
Λευχαιμία	60.140	24.400

Η βιολογική συμπεριφορά του καρκίνου του θυρεοειδούς κυμαίνεται από χαμηλής κακοήθειας ως έντονα επιθετικό. Τα περισσότερα περιστατικά εμφανίζονται με τη μορφή θηλώδους καρκινώματος με ποσοστό 79,7% των γυναικών που εμφάνισαν καρκίνο στο θυρεοειδή αδένα, ακολουθεί η εμφάνιση θυλακιδώδους καρκινώματος με ποσοστό 14% στην ίδια ομάδα γυναικών, αμέσως μετά εμφανίζεται με ποσοστό 1,7% το μυελοειδές καρκίνωμα και το αναπλαστικό σε ποσοστό 0,5% [72].

Αυξάνεται η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου σε άτομα με ιστορικό έκθεσης σε υψηλές δόσεις ακτινοβολίας, ειδικά κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας, όπως και σε άτομα με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του θυρεοειδούς. Επίσης καρκίνος στο θυρεοειδή μπορεί να προκληθεί από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το ραδιενεργό ιώδιο, το οποίο

απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια πυρηνικής καταστροφής, όπως έγινε στο ατύχημα του Chernobyl το 1986 και στη Fukushima το 2011.

Υπάρχουν και κάποιες κληρονομικές ασθένειες που συνδέονται με την εμφάνιση του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου όπως η πολλαπλή ενδοκρινής νεοπλασία τύπου 2 (MEN2), η παχυσαρκία, η ακρομεγαλία και το πολύ ψηλό ύψος [32].

Η διάγνωση του καρκίνου του θυρεοειδούς περιλαμβάνει κάποιες μεθόδους οι οποίες χρησιμεύουν για να βρεθεί και το στάδιο του καρκίνου. Τον πιο αξιόπιστο δείκτη αποτελεί η διάγνωση που γίνεται με βιοψία με λεπτή βελόνα (FNA) ενός θυρεοειδούς όζου ή μετά την απομάκρυνσή του με χειρουργική επέμβαση. Υπάρχουν και άλλοι τρόποι για τη διάγνωση όπως η λήψη ενός καλού ιστορικού από τον υπεύθυνο ιατρό σε συνδιασμό με εξετάσεις αίματος για τον έλεγχο των τιμών των ορμονών του θυρεοειδούς, υπέρηχο, δοκιμές με ραδιενεργό ιώδιο που μπορούν να βρουν ακόμη και το στάδιο του καρκίνου, αξονική τομογραφία, μαγνητική τομογραφία (MRI), ακτινογραφία θώρακος και τομογραφία PET [32].

Δεν υπάρχουν ειδικοί βιοχημικοί δείκτες που να διαχωρίζουν τους καλοήθεις από τους κακοήθεις όζους. Πολύ σημαντικό παράγοντα αποτελεί ο προσδιορισμός της τιμής της καλσιτονίνης προεγχειρητικά στις περιπτώσεις μυελοειδούς καρκινώματος.

Η θεραπεία του συγκεκριμένου καρκίνου θα πρέπει να σχεδιάζεται ώστε να μπορεί να ανταποκριθεί στις ανάγκες του κάθε ατόμου. Η απόφαση για το είδος της θεραπείας που θα ακολουθήσει ο ασθενής βασίζεται :

- I. Στον τύπο του καρκίνου του θυρεοειδούς,
- II. Στο στάδιο της ασθένειας,
- III. Στο βαθμό διαφοροποίησης (καλά διαφοροποιημένο καρκίνωμα ή χαμηλής διαφοροποίησης),
- IV. Στην ηλικία του ατόμου και
- V. Γενικά στην υγεία του.

Το θεραπευτικό σχήμα που θα εφαρμοστεί μπορεί να αποτελείται από μεμονομένες θεραπείες αλλά και από συνδιασμό θεραπειών για καλύτερα αποτελέσματα. Οι επιλογές του θεράποντα ιατρού περιλαμβάνουν τις ακόλουθες θεραπείες :

- I. Χειρουργική επέμβαση,
- II. Θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο (RAI, I-131)
- III. Ορμονική θεραπεία
- IV. Θεραπεία με εξωτερική ακτινοβολία
- V. Χημειοθεραπεία
- VI. Βιολογική θεραπεία [32, 48].

Πολύ σημαντικό είναι ο ασθενής να παρακολουθείται ανά τακτά διαστήματα μετά το τέλος της θεραπείας του, ειδικά στα πρώτα χρόνια.

Οι κλινικές δοκιμές διερευνούν νέους τρόπους για την πρόληψη, την ανίχνευση και το θεραπευτικό σχήμα του καρκίνου. Υπάρχουν κλινικές μελέτες που αφορούν τον καρκίνο του θυρεοειδούς ανά τον κόσμο και είναι ανοιχτές στα άτομα με αυτή τη μορφή καρκίνου.

2.4. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΝΕΟΠΛΑΣΙΩΝ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ

Ο καθορισμός του κυτταρικού τύπου αποτελεί βασικό παράγοντα στην πρόγνωση του καρκίνου του θυρεοειδούς. Οι νεοπλασίες του θυρεοειδούς αδένα μπορούν να ταξινομηθούν σύμφωνα με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους σε δύο μεγάλες κατηγορίες :

- I. καλά διαφοροποιημένο καρκίνωμα
- II. καρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης.

Αυτές οι δύο κατηγορίες χωρίζονται περαιτέρω σε τέσσερις βασικούς τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς και είναι :

- I. Θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς (papillary thyroid carcinoma - PTC)
- II. Θυλακιδώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς (Follicular Carcinoma - FTC)
- III. Μυελοειδές καρκίνωμα του θυρεοειδούς (Medullary Carcinoma)
- IV. Αναπλαστικό καρκίνωμα του θυρεοειδούς (Anaplastic Carcinoma)

Υπάρχουν και κάποιες μορφές ακόμη, όπως λέμφωμα και σάρκωμα θυρεοειδούς ή άλλοι σπάνιοι όγκοι, αλλά αποτελούν σπάνιες περιπτώσεις εμφάνισης με ποσοστό 4% όλων των περιπτώσεων [30, 32, 35, 48].

τους κυτταρικούς τύπους μπορούμε να τους ξεχωρίσουμε οπτικά βασιζόμενοι στο πως φαίνονται τα καρκινικά κύτταρα κάτω από ένα μικροσκόπιο [30].

2.5. ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ

Ένας καρκινικός όγκος ή κακοήθης όγκος του θυρεοειδούς μπορεί να εξαπλωθεί ή να εμφανίσει μεταστάσεις σε διάφορα όργανα του σώματος.

2.5.1. ΚΑΛΑ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκει το θηλώδες καρκίνωμα (PTC) και το θυλακιώδες καρκίνωμα (FTC). Αυτές οι δύο υποκατηγορίες αποτελούν περίπου το 90% όλων των καρκίνων που εμφανίζονται στο θυρεοειδή. Είναι καλά διαφοροποιημένοι όγκοι, που σημαίνει ότι τα καρκινικά κύτταρα μοιάζουν με τα υγιή κύτταρα του ιστού [32, 37].

2.5.1.1. ΘΗΛΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ (PAPILLARY THYROID CANCER - PTC)

Αποτελεί τον πιο κοινό τύπο καρκίνου του θυρεοειδούς με ποσοστό εμφάνισης 80%, μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία και η εμφάνισή του είναι πιο συχνή στις γυναίκες. Η ανάπτυξή του ξεκινάει από τα θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς και η εμφάνιση τους στο μικροσκόπιο δείχνει μικρές μακριές προεξοχές που ονομάζονται θηλές. Κοινό επίσης αποτελεί η εμφάνιση τους σε περισσότερες από μία θέσεις στον θυρεοειδή που ονομάζεται πολυεστιακός καρκίνος., αναπτύσσονται με αργό ρυθμό και υπάρχει καλή ανταπόκριση στη θεραπεία [32, 37].

Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές θηλώδους καρκινώματος και αυτό γίνεται εμφανές μόνο με παρατήρηση σε μικροσκόπιο. Η πιο συχνή παραλλαγή είναι η θυλακιώδης μορφή που έχει χαρακτηριστικά των θηλωδών και των θυλακιωδών καρκινωμάτων ταυτόχρονα και αντιμετωπίζεται όπως το τυπικό θηλώδες καρκίνωμα. Υπάρχουν και άλλες πιο σπάνιες παραλλαγές που τείνουν να είναι πιο επιθετικές μορφές, πράγμα που σημαίνει ότι μπορούν να αναπτυχθούν και να εξαπλωθούν πολύ πιο γρήγορα [32, 37].

Στο θηλώδες καρκίνωμα έχουν βρεθεί αρκετές μεταλλάξεις στο DNA. Πολλοί από αυτούς τους καρκίνους έχουν αλλαγές σε συγκεκριμένα τμήματα του γονιδίου RET. Η μεταλλαγμένη του μορφή, γνωστή ως ογκογονίδιο PTC, βρίσκεται σε ποσοστό 10-30%. Σε μεγαλύτερο ποσοστό μπορεί να εμφανιστεί σε παιδιά ή σε άτομα που έχουν εκτεθεί σε ακτινοβολία. Οι μεταλλάξεις RET αποκτώνται κατά τη διάρκεια της ζωής και δεν κληρονομούνται [37].

Πολλές φορές υπάρχει ένα γονίδιο BRAF μεταλλαγμένο. Η μετάλλαξη BRAF είναι λιγότερο συχνή σε παιδιά και σε άτομα που έχουν εκτεθεί σε ακτινοβολία. Καρκίνοι με μετάλλαξη στο γονίδιο BRAF τείνουν να αναπτύσσονται και να εξαπλώνονται γρηγορότερα

σε άλλα μέρη του σώματος. Είναι πολύ σπάνιο να υπάρχουν ταυτόχρονα μεταλλάξεις και στα δύο γονίδια BRAF και RET-PTC [37].

Έχουν συνδεθεί και άλλες μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια, όπως στο γονίδιο MET και στο γονίδιο NTRK1 [37].

2.5.1.2. ΘΥΛΑΚΙΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ (FOLLICULAR CARCINOMA FTC)

Αποτελεί έναν λιγότερο κοινό καρκινικό τύπο με ποσοστό μικρότερο του 10% όλων των καρκίνων του θυρεοειδούς. Ξεκινάει από τα θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς και αναπτύσσεται συνήθως με αργό ρυθμό, έχει καλή προγνωστική και θεραπευτική ικανότητα τις περισσότερες φορές. Το καρκίνωμα Hurthle, γνωστό και ως καρκίνωμα oxyphil, είναι μια παραλλαγή του και εμφανίζεται σε ποσοστό 3%. Φαίνεται να έχει χαμηλότερο προγνωστικό και θεραπευτικό δείκτη από το κλασικό θυλακιώδες καρκίνωμα [32, 37].

Επίκτητες μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο RAS καθώς και αλλαγές στο PAX8-PPAR-γ φαίνεται να παίζουν ρόλο στην πρόκληση θυλακιώδους καρκίνου του θυρεοειδούς [37].

2.5.2. ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΧΑΜΗΛΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ (POORLY DIFFERENTIATED CARCINOMA)

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκει το αναπλαστικό καρκίνωμα. Αποτελεί μια επιθετική μορφή καρκίνου που αναπτύσσεται και εξαπλώνεται πολύ γρήγορα και καλύπτει το 2% όλων των καρκίνων του θυρεοειδούς. Ξεκινάει από τα θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς και κάποιες φορές μπορεί να εμφανιστεί ως συνέχεια εξέλιξης του διαφοροποιημένου καρκινώματος. Συχνά η διάγνωσή του γίνεται αφού έχει κάνει μεταστάσεις σε άλλους ιστούς στο λαιμό ή σε άλλα μέρη του σώματος, όπως οστά ή πνεύμονες. Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι υπάρχει κίνδυνος υποτροπής της ασθένειας αμέσως μετά την διακοπή της θεραπείας [32, 37].

2.5.2.1. ΑΝΑΠΛΑΣΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ (ANAPLASTIC CARCINOMA)

Αποτελεί την πιο επιθετική μορφή καρκίνου με ταχεία ανάπτυξη και εξάπλωση σε άλλους ιστούς με ποσοστό εμφάνισης 2% όλων των καρκίνων του θυρεοειδούς. Εμφανίζεται συνήθως σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας και η ανταπόκριση στη θεραπεία του αναπλαστικού καρκινώματος έχει μικρές πιθανότητες. Τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζονται με ανώμαλη δομή και φαίνονται πολύ διαφορετικά από τα υγιή [32, 37].

Αυτή η κατηγορία καρκίνου φαίνεται να έχει μερικές από τις μεταλλάξεις που προαναφέρθηκαν στις προηγούμενες κατηγορίες και πολύ συχνά εμφανίζει μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 και στο ογκογονίδιο CTNNB1 [37].

2.5.3. ΜΥΕΛΟΕΙΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ (MEDULLARY CARCINOMA-MTC)

Αποτελεί ένα ασυνήθιστο είδος με ποσοστό εμφάνισης περίπου 5% όλων των καρκίνων του θυρεοειδούς και εμφανίζεται πιο συχνά σε άτομα ηλικίας 50-60 ετών. Ξεκινάει από τα παραθυλακοειδή κύτταρα (C κύτταρα) στο θυρεοειδή και ανήκει στις σποραδικές μορφές καρκίνου. Οι άνθρωποι που εμφανίζουν αυτή τη μορφή καρκίνου έχουν μεταλλάξεις σε διάφορα μέρη του γονιδίου RET, σε αντίθεση με τους ασθενείς που εμφανίζουν θηλώδες καρκίνωμα [32, 37].

Μπορεί να κληρονομηθεί και αυτό προκαλείται από τη μετάλλαξη του γονιδίου RET, που συχνά συμβαίνει ως μέρος μίας γενετικής ασθένειας που ονομάζεται πολλαπλή ενδοκρινή νεοπλασία τύπου 2 (Multiple endocrine neoplasia type 2 -MEN2). Δύο μορφές της ασθένειας MEN2 σχετίζονται με κληρονομικό μυελοειδές καρκίνωμα, η MEN2A και η MEN2B [32].

Η MEN2A μπορεί να προκαλέσει μυελοειδές καρκίνωμα μαζί με όγκους στους παραθυρεοειδείς αδένες και στα επινεφρίδια, γνωστά και ως φαιοχρωμοκυττώματα.

Η MEN2B μπορεί να προκαλέσει μυελοειδές καρκίνωμα μαζί με άλλους όγκους, συμπεριλαμβανομένων των φαιοχρωμοκυττωμάτων και νευρώματα [32].

Οικογενής μορφή ονομάζεται η ανάπτυξη μυελοειδούς καρκινώματος σε διαφορετικά άτομα μιας οικογένειας χωρίς όμως να σχετίζεται με MEN2 [32].

2.6. ΣΤΑΔΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Η σταδιοποίηση είναι ένας τρόπος ταξινόμησης του καρκίνου με βάση το μέγεθος του όγκου και το πόσο μακριά από τον θυρεοειδή έχει εξαπλωθεί ή μετασταθεί. Σύμφωνα με το στάδιο στο οποίο βρίσκεται μπορεί ο θεράπων ιατρός να σχεδιάσει την θεραπεία του κάθε ασθενούς.

Το πιο κοινό σύστημα για την σταδιοποίηση του θυρεοειδικού καρκίνου είναι το TNM, όπου σε κάθε στάδιο δίνεται ένας αριθμός από το 1-4 γραμμένος στα λατινικά. Ισχύει ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός τόσο μεγαλύτερη εξάπλωση έχει ο καρκίνος.

Παράλληλη χρησιμοποιούνται οι όροι τοπικός (ο καρκίνος βρίσκεται μόνο στο θυρεοειδή και δεν έχει εξαπλωθεί), περιφερειακός (ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί γύρω από το θυρεοειδή) και μακρινός (ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε πιο μακρινά σημεία του σώματος). Κάθε ομάδα καρκίνου που προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2.5 έχει τη δική της σταδιοποίηση [32].

2.6.1. ΣΥΣΤΗΜΑ TNM

Η σταδιοποίηση σύμφωνα με το σύστημα TNM περιγράφεται ως εξής :

T → Περιγράφει το μέγεθος του πρωτογενούς όγκου και αν υπάρχει ανάπτυξη του στους γύρω ιστούς. Συνήθως αναφέρεται ως ένας αριθμός από το 1-4. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός σημαίνει ότι ο όγκος είναι μεγαλύτερος ή έχει αρχίσει να αναπτύσσεται σε κοντινούς ιστούς.

N → Περιγράφει την κατάσταση των λεμφαδένων γύρω από το θυρεοειδή. Συμβολίζεται με N0 που σημαίνει ότι δεν υπάρχει εξάπλωση του καρκίνου στους λεμφαδένες και με N1 που σημαίνει ότι ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες ενώ μπορεί να περιγράψει και τη θέση των λεμφαδένων.

M → Περιγράφει την ύπαρξη εξάπλωσης ή μετάστασης του καρκίνου σε άλλα μέρη του σώματος. Συμβολίζεται με M0 που σημαίνει ότι ο καρκίνος δεν έχει εξαπλωθεί σε άλλα μέρη ή ιστούς του σώματος και με M1 που σημαίνει ότι υπάρχει μετάσταση σε άλλα μέρη του σώματος [32, 35].

2.7. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΚΙΝΑΣΩΝ

Οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν κύριους ρυθμιστές της κυτταρικής λειτουργίας, με εμφανή ρόλο στη μεταγωγή του σήματος και στο συντονισμό πολύπλοκων διαδικασιών, όπως η λειτουργία του κυτταρικού κύκλου. Ένα χαρακτηριστικό που είναι κοινό στα μέλη της οικογένειας RSK, είναι ότι κάθε ένα διαθέτει δύο ανόμοιες ολοκληρωμένες καταλυτικές περιοχές κινάσης (N- και C-τερματικές περιοχές) που συνδέονται μεταξύ τους με μία ρυθμιστική περιοχή [11, 54]. Η περιοχή της N-τερματικής κινάσης είναι υπεύθυνη για τη δραστηριότητα της φωσφοτρανσφεράσης μεταξύ των υποστρωμάτων (φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων), ενώ η περιοχή της C-τερματικής κινάσης είναι απαραίτητη για την ενζυματική ενεργοποίηση της περιοχής της N-τερματικής κινάσης (αυτοφωσφορυλίωση της RSK) [2, 24, 70, 89, 94].

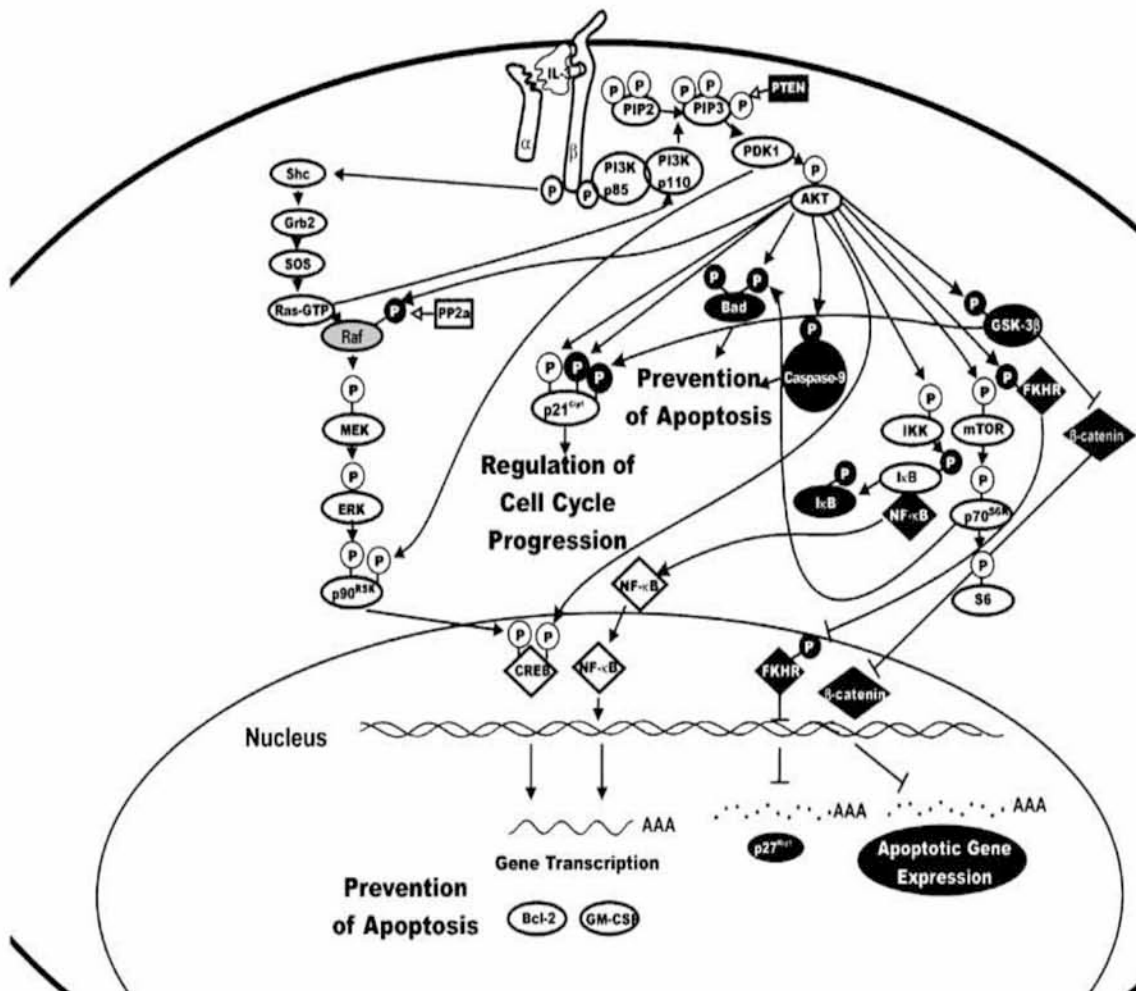
2.7.1. ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΗ S6 ΚΙΝΑΣΗ (RSK)

Η ριβοσωμική S6 κινάση (RSK) είναι μία οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών που παίζουν ρόλο στη μεταγωγή των σημάτων. Διακρίνονται σε δύο υποοικογένειες των RSK :

- I. την p90rsk, γνωστή και ως MAPK-activated protein kinase-1 (MAPKAP-K1) και
- II. την p70rsk, γνωστή και ως S6-H1 Kinase ή πιο απλά S6 Kinase.

Το μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK και το μονοπάτι Ras/PI3K/PTEN/Akt (Εικόνα 3) αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για να ρυθμίζουν την αύξηση των κυττάρων και σε ορισμένες περιπτώσεις την ογκογένεση [69].

Οι RSKs είναι ενδοκυτταρικές κινάσες σερίνης-θρεονίνης και ενεργοποιούνται από το μονοπάτι MAPK/ERK. Υπάρχουν τέσσερις παραλλαγές της RSK στον άνθρωπο, η RSK1, η RSK2, η RSK3 και η RSK4 και η p70rsk χωρίζεται σε S6K1 και σε S6K2.



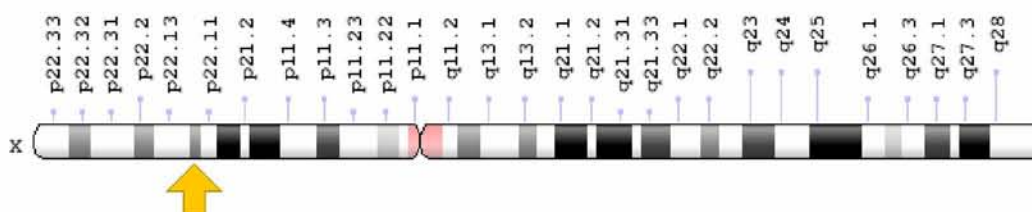
Εικόνα 3 : Σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στην ενεργοποίηση της p70rsk και της p90rsk (οικογένεια RSK). Πηγή Nature Publishing Group

2.8. ΥΠΟ-ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ p90rsk, MAPK-MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE-1 (MAPKAP-K1)

Οι MAPKs είναι κινάσες σερίνης-θρεονίνης που παίζουν ρόλο στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση και συνδέονται με διάφορες κυτταρικές δραστηριότητες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η επιβίωση, η απόπτωση, η αγγειογένεση, η ανοσοαπόκριση και ο μετασχηματισμός των κυττάρων [14, 20, 66, 68, 87, 91]. Οποιαδήποτε διαφοροποίηση στη φυσιολογική τους λειτουργία επιφέρει επιπτώσεις στις βιολογικές λειτουργίες που προαναφέρθηκαν [21].

Η πρωτεΐνη p90rsk παράγεται από το γονίδιο RPS6KA3 (ribosomal protein S6 kinase A3), βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του X χρωμοσώματος μεταξύ των θέσεων 22.2 και 22.1 (Xp22.2-p22.1) και περιέχει 22 εξόνια (Εικόνα 4). Μεταλλάξεις σ' αυτό το γονίδιο έχουν συνδεθεί με το σύνδρομο Coffin-Lowry, μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από νοητική

υστέρηση, σκελετικές και αναπτυξιακές ανωμαλίες [28, 29]. Έχουν ταυτοποιηθεί και άλλες μεταλλάξεις στο γονίδιο RPS6KA3 σε ανθρώπους με νοητική υστέρηση, οι οποίοι όμως δεν παρουσίαζαν τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά του συνδρόμου Coffin–Lowry. Αυτή η κατάσταση είναι γνωστή ως φυλοσύνδετη νοητική υστέρηση, επειδή το γονίδιο RPS6KA3 βρίσκεται στο X χρωμόσωμα. Αυτές οι μεταλλάξεις σύμφωνα με την επιστημονική κοινότητα αποτελούν σπάνια αιτία νοητικής υστέρησης [28].



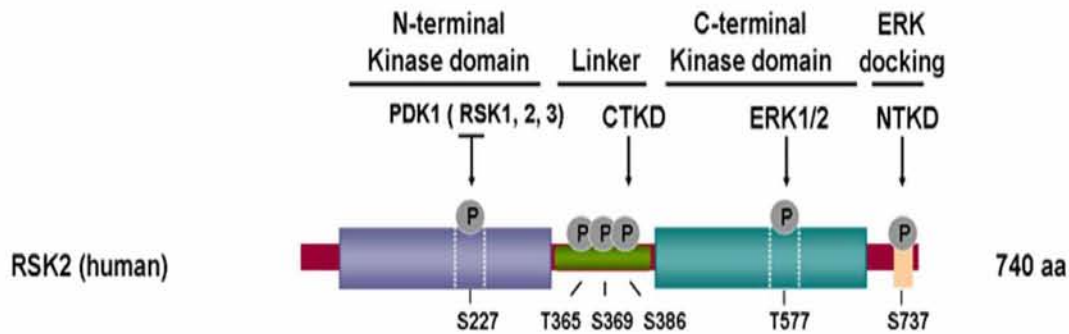
Εικόνα 4 : Απεικόνιση του του X χρωμοσώματος. Με το κίτρινο βελάκι φαίνεται σε ποιο σημείο του χρωμοσώματος βρίσκεται το γονίδιο RPS6KA3

Οι RSK1, RSK2 και RSK3 ενεργοποιούνται μέσω συντονισμένης φωσφορυλίωσης από την MAPK, αυτοφωσφορυλίωση και την φωσφοϊνοσιτίδη-3-OH κινάση (PI3K) ως απόκριση σε πολλούς αυξητικούς παράγοντες, νευροδιαβιβαστές και πολυπεπτιδικές ορμόνες [11]. Η φωσφορυλίωση της C-τερματικής περιοχής της κινάσης από την ERK επιτρέπει την ενεργοποίηση της N-τερματικής περιοχής της κινάσης, η οποία μεσολαβεί για τη φωσφορυλίωση του υποστρώματος [70].

Στη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από την Mérienne Karine et al., χρησιμοποιήθηκαν δύο μονόκλωνα αντισώματα που διεγείρονται από τις φωσφορυλιωμένες μορφές της N-τερματικής και C-τερματικής περιοχής της RSK2 (P-S227 και P-T577 αντίστοιχα) και φάνηκε ότι τα σήματα προερχόμενα από στρες, όπως το υπεριώδες φως (UV), επάγουν φωσφορυλίωση και ενεργοποιούν τις τρεις μορφές RSKs σε τέτοιο βαθμό που μπορούν να συγκριθούν με την ενεργοποίηση μέσω του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) [70].

Η PDK1 φωσφορυλιώνει την Ser227 στο βρόχο ενεργοποίησης της αμινο-τερματικής περιοχή της κινάσης RSK2, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της κινάσης τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Η μόνιμα ενεργοποιημένη PDK1 συνεργάζεται με την ERK για την ενεργοποίηση της RSK κατόπιν έκθεσης των κυττάρων σε UV ακτινοβολία ή σε αυξητικούς παράγοντες [53, 70].

Η δομή, οι υπομονάδες και οι θέσεις φωσφορυλίωσης της RSK2 φαίνονται αναλυτικά στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5 : Σχηματική αναπαράσταση της ανθρώπινης πρωτεΐνης RSK2. NKD και CKD αποτελούν το N-τερματικό και το C-τερματικό πεδίο της κινάσης αντίστοιχα. Παρουσιάζονται οι θέσεις των ρυθμιστικών θέσεων φωσφορυλίωσης και τα αντίστοιχα αντισώματα

Η p90^{rsk} βρίσκεται στο μονοπάτι MAPK/ERK καθοδικά της ERK1/2, φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται από την Erk1/2 ως απόκριση σε πολλούς αυξητικούς παράγοντες, ορμονικά πολυπεπίδια και νευροδιαβιβαστές. Για την ενεργοποίησή της είναι σημαντικό να φωσφορυλιωθούν πολλές θέσεις εντός και εκτός της περιοχής της RSK κινάσης [11, 46].

Χαρακτηρίζεται από τα δύο ανόμοια λειτουργικά πεδία κινάσης που διαθέτει τα οποία συνδέονται μέσω μια ρυθμιστικής περιοχής σύνδεσης, και από μία καρβοξυτερματική θέση σύνδεσης για σήματα προερχόμενα από ERKs (extracellular signal–regulated kinases) [24, 88]. Εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο, στην περιοχή που είναι υπεύθυνη για τη μάθηση και τη γνωστική λειτουργία [46]. Η δραστηριότητα αυτής της πρωτεΐνης έχει ενοχοποιηθεί για τον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης και της κυτταρικής διαφοροποίησης [44].

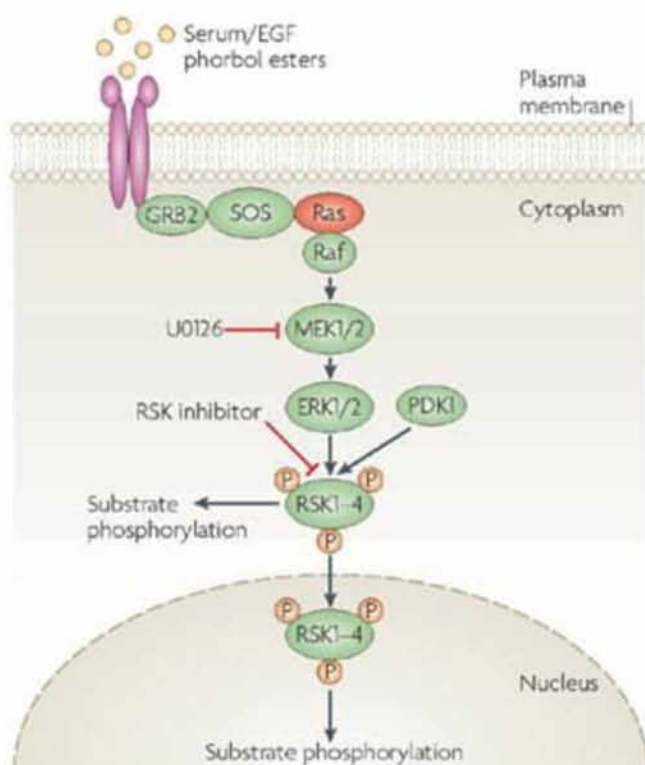
2.8.1. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ

Το σηματοδοτικό μονοπάτι της MAPK (Εικόνα 6) κατέχει ένα σημαντικό ρόλο στην μετατροπή των πληροφοριών από εξωκυτταρικά ερεθίσματα σε γονιδιακή έκφραση [5, 58, 70]. Η λειτουργία αυτού του μονοπατιού ενισχύει σήματα για συνεχόμενο πολλαπλασιασμό και μετατροπή των κυττάρων σε καρκινικά, ενεργοποιώντας μηχανισμούς βιωσιμότητας και αποφεύγοντας τον κυτταρικό θάνατο. Η δυσλειτουργία των γονιδίων που εκφράζουν τις συγκεκριμένες κινάσες οδηγεί είτε στη διέγερση είτε στην αναστολή του συγκεκριμένου μονοπατιού [69]. Το σηματοδοτικό μονοπάτι RAS/RAF/MEK/ERK (Εικόνα 5) στον άνθρωπο βρίσκεται αλλοιωμένο σε ποσοστό περίπου 30% στις διάφορες μορφές καρκίνου [76].

Αρχικά ενεργοποιείται η πρωτεΐνη Ras η οποία λειτουργεί ως μοριακός διακόπτης της μεταγωγής του σήματος. Η ανενεργή μορφή της Ras είναι συνδεδεμένη με GDP ενώ η ενεργή μορφή της RAS είναι συνδεδεμένη με GTP. Στη συνέχεια συνδέεται με την εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης και εμφανίζει ενεργότητα GTPάσης. Οι μεταλλάξεις μετατρέπουν τη Ras σε ογκογονίδιο αναστέλλοντας την ικανότητα της Ras να υδρολύει το GTP, με αποτέλεσμα να είναι συνεχώς ενεργοποιημένη.

Η RAF, η οποία είναι μια κυτταροπλασματική κινάση σερίνης-θρεονίνης, μεταφέρει το σήμα από την κυτταρική μεμβράνη στο πυρήνα του κυττάρου και ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση από την ενεργό μορφή της RAS (RAS-GTP).

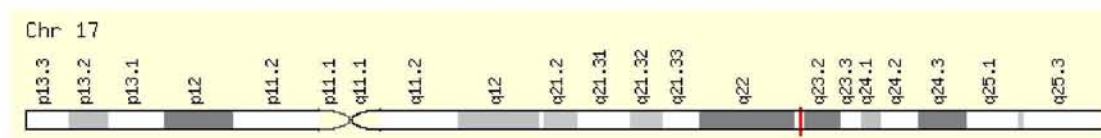
Ύστερα η ενεργοποιημένη RAF με φωσφορυλίωση ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες MEK1 και MEK2, οι οποίες ενεργοποιούν κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες υπεύθυνες για την κυτταρική διαίρεση (CDKs). Με διπλή φωσφορυλίωση στα κατάλοιπα αμινοξέων τυροσίνης και θρεονίνης οι MEK κινάσες ενεργοποιούν τις ERK κινάσες οι οποίες φωσφορυλιώνουν μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι στη συνέχεια συνδέονται σε συγκεκριμένες ρυθμιστικές περιοχές του DNA και επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση του κυττάρου [81].



Εικόνα 6 : Σηματοδοτικό μονοπάτι RAS/RAF/MEK/ERK/MAPK. Πηγή Nature reviews, Molecular Cell Biology

2.9. ΥΠΟ-ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ p70rsk, S6-H1 KINASE (S6 KINASE)

Η p70 S6 κινάση είναι μία ενεργοποιημένη μιτογόνος πρωτεϊνική κινάση που κωδικοποιείται από το γονίδιο RPS6KB1, βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 17q23.1 (Εικόνα 7), περιέχει 19 εξόνια και είναι απαραίτητη για την κυτταρική ανάπτυξη και την εξέλιξη της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου [7, 43, 79, 84].



Εικόνα 7 : Απεικόνιση του χρωμοσώματος 17q23.1. Με το κόκκινο σημάδι φαίνεται σε ποιο σημείο του χρωμοσώματος βρίσκεται το γονίδιο RPS6KB1

Η δραστηριότητα αυτού του γονιδίου έχει συσχετιστεί με διάφορους καρκινικούς τύπους στον άνθρωπο. Ασθένειες που σχετίζονται με το γονίδιο RPS6KB1 περιλαμβάνουν την οζώδη σκλήρυνση και την νόσο της στένωσης μιτροειδούς βαλβίδας (40). Η Οζώδης σκλήρυνση είναι μια γενετική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη πολυάριθμων μη καρκινικών (καλοήθων) όγκων σε πολλά μέρη του σώματος. Αυτού του είδους οι όγκοι μπορεί να προκαλέσουν αναπτυξιακά προβλήματα όπως επιληπτικές κρίσεις, υπερκινητικότητα, επιθετικότητα, μαθησιακά προβλήματα και αυτιστική συμπεριφορά (42). Η νόσος της στένωσης μιτροειδούς βαλβίδας, γνωστή και ως χρόνια ρευματική μιτροειδής βαλβίδα, σχετίζεται με καρδιακή και στεφανιαία νόσο, και εμφανίζει πολλά συμπτώματα συμπεριλαμβανομένου του μιτροειδικού προσωπείου (41).

Είναι μία κινάση σερίνης / θρεονίνης η οποία δρα καθοδικά της PIP3 και της φωσφοϊνσιτιδίου-εξαρτώμενης κινάσης-1 (PDK1) στο μονοπάτι PI3K [7, 62]. Έχουν ταυτοποιηθεί δύο ισομορφές της p70 S6K, η 70kDa κυτταροπλασματική μορφή και η 85kDa πυρηνική μορφή [62]. Η φωσφορυλίωση της S6 κινάσης στη θρεονίνη 389 έχει χαρακτηριστεί ως ορόσημο για την ενεργοποίησή της από το mTOR.

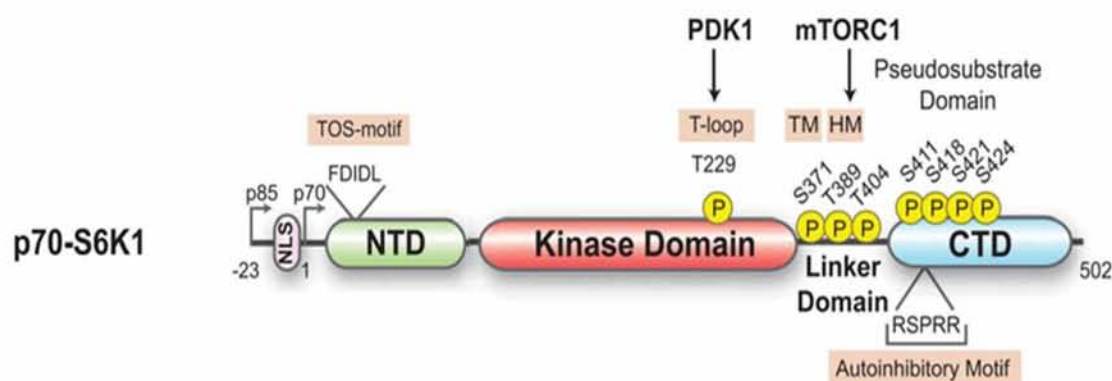
Η p70S6 κινάση ανήκει στην υποοικογένεια AGC, η οποία περιλαμβάνει έναν αριθμό σημαντικών μορίων σηματοδότησης συμπεριλαμβανομένης της Akt [57]. Μπορεί να διαιρεθεί σε πέντε σημαντικές λειτουργικές περιοχές :

- I. την αμινο (N)-τερματική περιοχή,
- II. την AGC-κινάση-συντηρημένη καταλυτική περιοχή,
- III. την περιοχή του συνδέτη,
- IV. την περιοχή αυτο-αναστολής και

V. την καρβοξυλική (C)-τερματική περιοχή [6].

Η p70^{rsk} χαρακτηρίζεται από δύο ανόμοιες καταλυτικές περιοχές κινάσης και φωσφορυλιώνει αρκετά κατάλοιπα της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S6. Αυτή η δραστηριότητά της οδηγεί σε αυξημένη πρωτεϊνοσύνθεση, κυτταρική ανάπτυξη, κυτταρικό πολλαπλασιασμό και έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση καρκίνου στον άνθρωπο.

Η δραστηριότητα της p70 S6 κινάσης ελέγχεται από πολλές φωσφορυλιώσεις που λαμβάνουν χώρα μέσα στην καταλυτική περιοχή, στην περιοχή σύνδεσης και στην περιοχή ψευδοϋποστρώματος. Τις πιο κρίσιμες φωσφορυλιώσεις για τη λειτουργία της κινάσης αποτελούν αυτή της θρεονίνης 229 (Thr229) στην καταλυτική περιοχή και έπειτα της θρεονίνης 389 (Thr389) στην περιοχή σύνδεσης [84]. Αυτές οι φωσφορυλιώσεις διεγείρονται από αυξητικούς παράγοντες όπως η ινσουλίνη, ο EGF και ο FGF [1, 84]. Η δομή, οι υπομονάδες και οι θέσεις φωσφορυλίωσης της p70 S6K φαίνονται αναλυτικά στην Εικόνα 8.



Εικόνα 8 : Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης p70-S6K1. NKD και CKD αποτελούν το N-τερματικό και το C-τερματικό πεδίο της κινάσης αντίστοιχα. Παρουσιάζονται οι θέσεις των ρυθμιστικών θέσεων φωσφορυλίωσης και τα αντίστοιχα αντισώματα

2.9.1. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ - ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ p70 S6 ΚΙΝΑΣΗΣ

Η p70S6 λειτουργεί ως μέρος του σηματοδοτικού μονοπατιού που περιλαμβάνει το mTOR (the mammalian target of rapamycin). Το mTOR βρίσκεται και αυτό καθοδικά στο μονοπάτι της κινάσης Akt και μπορεί να ενεργοποιηθεί με διάφορους τρόπους και στη συνέχεια ενεργοποιεί την p70S6 κινάση. Η Akt ενεργοποιείται με διέγερση του κυττάρου από έναν αυξητικό παράγοντα, όπως ο IGF-1, και στη συνέχεια ενεργοποιεί το mTOR, αναστέλοντας το σύμπλοκο Tsc και οδηγώντας τελικά στην ενεργοποίηση της p70S6K.

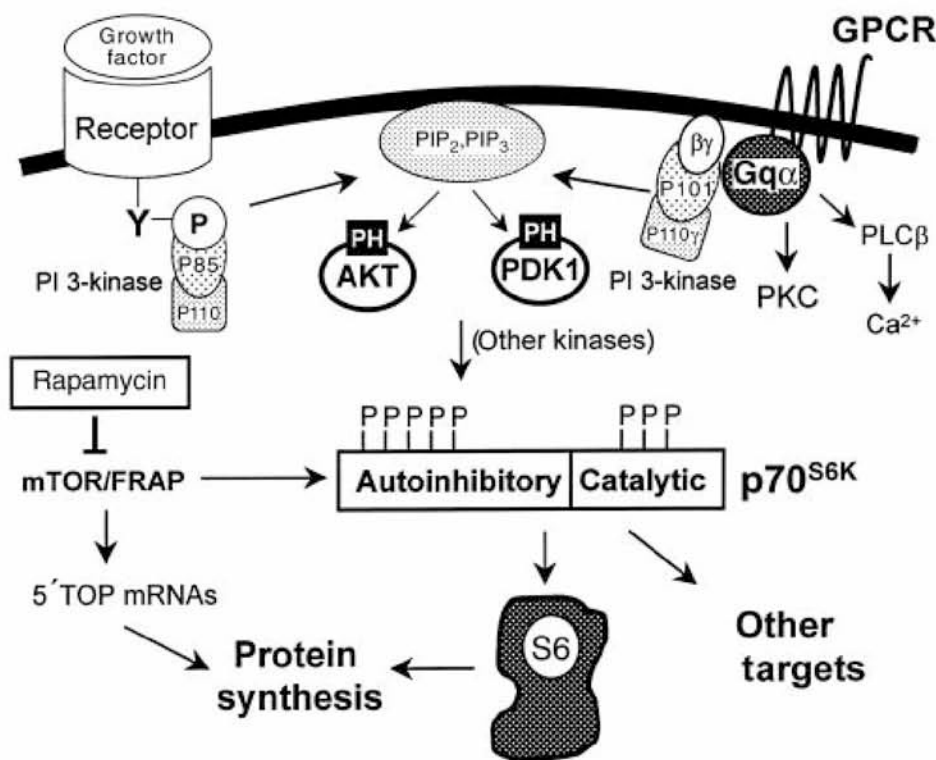
Η ενεργοποίηση της p70S6K επιτυγχάνεται μέσα από μια σειρά φωσφορυλιώσεων σε οκτώ ή περισσότερα κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης [62]. Σύμφωνα με τους Dufner and Thomas, οι θέσεις φωσφορυλίωσης έχουν ταυτοποιηθεί ως S404, S411, S418, S424 και T421 στην C-τερματική αυτο-ανασταλτική περιοχή και T229, S371 and T389, που είναι ζωτικής σημασίας για την καταλυτική δραστηριότητα [19]. Οι αυτο-ανασταλτικές περιοχές πιθανώς φωσφορυλιώνονται από την p38 και την ERK, μέλη της ενεργοποιημένης οικογένειας της MAPK [77]. Η φωσφορυλίωση σε αυτές τις θέσεις προκαλεί μεταβολές στη διαμόρφωσή τους με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η φωσφορυλίωση των καταλυτικών θέσεων [62].

Πολλές σηματοδοτικές πρωτεΐνες έχουν εμπλακεί για την φωσφορυλίωση αυτών των θέσεων, όπως η φωσφοϊνσιτιδίου-εξαρτώμενη κινάση-1 (PDK1), η Akt, η πρωτεϊνική κινάση C (PKC), οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDKs) και το mTOR [1, 55, 74, 78, 83].

Η πλήρης ενεργοποίηση της p70S6 κινάσης απαιτεί την φωσφορυλίωση της T229 από την PDK1 και την φωσφορυλίωση της T389 από το mTOR [4, 10, 52].

Η Akt επίσης φωσφορυλιώνεται από την PDK1 σε παρόμοια θέση και επηρεάζει την ενεργοποίηση της p70S6 κινάσης [3, 55].

Γενικά η σηματοδότηση μεταξύ της Akt, της p70S6 κινάσης και της PDK1 είναι αρκετά πολύπλοκη (Εικόνα 9).



Εικόνα 9 : Σηματοδοτικό μονοπάτι Akt . Πηγή Immunology and Cell Biology

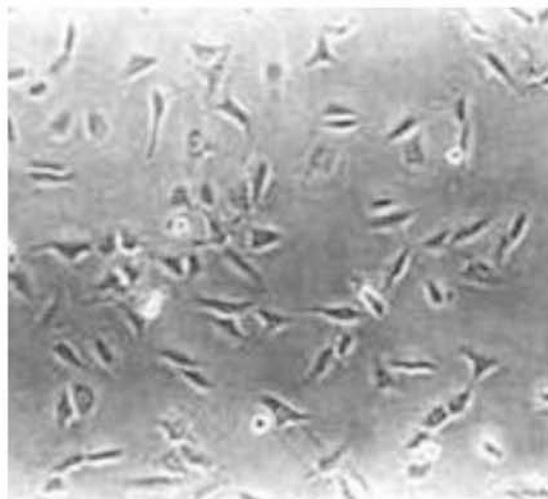
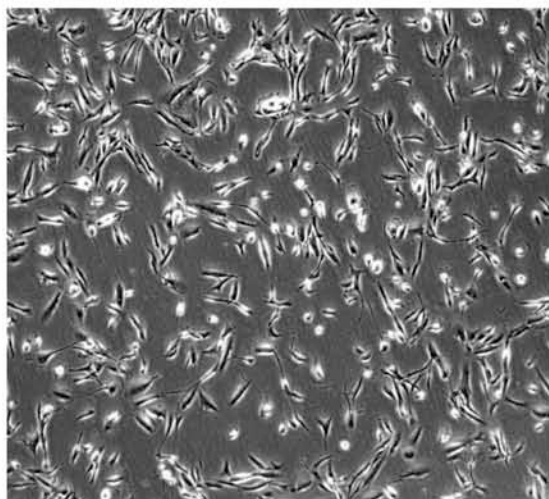
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ - ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΕΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε καρκινικές κυτταρικές σειρές θυρεοειδούς. Επιλέχθηκαν 2 κυτταρικές σειρές καρκινωμάτων διαφορετικών ιστολογικών τύπων, aPTC και 8505C.

Τα aPTC είναι ανθρώπινα κύτταρα θηλώδους καρκινώματος που αναπτύσσονται προσκολλημένα σε φιάλη καλλιέργειας. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν, απομονώθηκαν από ασθενή όπως αναφέρεται στην μελέτη της ερευνητικής ομάδας της Kouvaraki MA et al. (2011) [65] και χρησιμοποιήθηκαν επίσης για ακόμη μία έρευνα από την ερευνητική ομάδα των Moraitis D et al. (2014) [15] (Εικόνα 10).

Τα 8505C προέρχονται από επιθυλιακό ιστό θυρεοειδούς αδένου και αποτελούν ανθρώπινο αναπλαστικό (αδιαφοροποίητο) καρκίνωμα το οποίο αναπτύσσεται προσκολλημένο σε φλάσκες καλλιέργειας (Εικόνα 11). Απομονώθηκαν για πρώτη φορά από μία 78χρονη γυναίκα το 1993 [90]. Τα συγκεκριμένα καρκινικά κύτταρα ήταν δωρεά από τη Δρ Milica Pesic επιστημονική συνεργάτιδα του τμήματος νευροβιολογίας του πανεπιστήμιου του Βελιγραδίου της Σερβίας.



Εικόνα 10 : καρκινική κυτταρική σειρά aPTC Εικόνα 11 : καρκινική κυτταρική σειρά 8505C

3.2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ως θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε RPMI (αρχικός όγκος 500ml) στο οποίο πάντα προστίθενται Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (P/S) 6ml, L-Γλουταμίνη (L-Glu) 6ml και ορός εμβρύου βοοειδούς (FBS) σε συγκέντρωση 5% του αρχικού όγκου του RPMI. Από δω και στο εξής όπου αναφέρεται θρεπτικό υλικό RPMI θα θεωρείται ότι είναι εμπλουτισμένο με αυτά τα συστατικά στις ποσότητες που αναφέρθηκαν.

Η Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη χρησιμοποιείται για την πρόληψη της βακτηριακής μόλυνσης των κυτταρικών καλλιιεργειών λόγω της αποτελεσματικής τους δράσης κατά των gram-θετικών και gram-αρνητικών βακτηρίων.

Η L-Γλουταμίνη υποστηρίζει την ανάπτυξη των κυττάρων που έχουν απαιτήσεις σε υψηλή ενέργεια και αποτελεί εναλλακτική πηγή ενέργειας για κύτταρα που διαιρούνται γρήγορα και δε μπορούν να χρησιμοποιήσουν αποτελεσματικά τη γλυκόζη ως πηγή ενέργειας. Θεωρείται ως ένα από τα γρηγορότερα διαθέσιμα αμινοξέα που χρησιμοποιούνται ως πηγή ενέργειας για πολλούς ταχέως διαιρούμενους κυτταρικούς τύπους in vitro.

Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, όπου και θα αναφερθούν αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό με συγκέντρωση FBS 10%.

Όλες οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C, 5% CO₂ και 95% υγρασία.

3.3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Οι κυτταρικές σειρές αναπτύσσονται σε φλάσκες κυτταροκαλλιιεργειών με ή χωρίς φίλτρο επιφάνειας 25.0, 75.0, 162-175 και 225cm ή σε τρυβλία κυτταροκαλλιιεργειας μεγέθους 35, 60, 100, 140-150mm. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν φλάσκες κυτταροκαλλιιεργειών μεγέθους 25.0cm και 75.0cm.

Γίνεται καθημερινή παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο, ώστε να ελέγχεται η κατάστασή τους. Κύτταρα τα οποία είναι προσκολλημένα στο κάτω μέρος της φλάσκας θεωρούνται ζωντανά και υγιή. Αντίθετα όσα κύτταρα επιπλέουν στο θρεπτικό μέσο θεωρούνται νεκρά.

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε βασίστηκε στο πρωτόκολλο της Mary C. Phelan (1998) [67]. Η ανακαλλιιεργεια των κυττάρων γίνεται όταν έχουν καλύψει περίπου το 80% της φλάσκας στην οποία καλλιιεργούνται και η μέθοδος είναι η ακόλουθη. Όλα τα υλικά για να

μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν πρέπει να έχουν φτάσει τη θερμοκρασία των 37°C και αυτό γίνεται με τη βοήθεια ενός υδατόλουτρου.

1. Μεταφέρονται σε θάλαμο νηματικής ροής (Cell Culture Hood), ώστε να είναι δυνατή η εργασία υπό στείρες συνθήκες.

2. Όλα τα υλικά πριν εισαχθούν στον θάλαμο νηματικής ροής καθαρίζονται προσεκτικά με αιθανόλη 70%.

3. Με αποστειρωμένη πλαστική ορολογική πιπέτα γίνεται αναρρόφηση όλου του θρεπτικού υλικού και απομακρύνεται.

4. Πλύσιμο των κυττάρων μία ή δύο φορές με PBS 1% (Phosphate Buffered Saline, απαλλαγμένο ιόντων Ca^{2+} , Mg^{2+} και φαινολοσουλφονοφθαλεΐνη ή PSP) για να απομακρυνθούν εναπομείναντα ίχνη ορού, τα οποία μπορούν να αναστείλουν τη δράση της θρυψίνης.

5. Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας θρυψίνης 1% ώστε να καλύψει όλη την επιφάνεια της φλάσκας όπου είναι προσκολλημένα τα κύτταρα (1ml στις φλάσκες κυτταροκαλλιιεργειών μεγέθους 25.0cm και 2ml στις φλάσκες κυτταροκαλλιιεργειών μεγέθους 75.0cm)

6. Τοποθέτηση της φλάσκας στον επωαστικό κλίβανο για 1 έως 2 λεπτά ώστε να καταφέρει να δράσει η θρυψίνη και να ξεκολλήσουν τα κύτταρα από την επιφάνεια. Ελέγχεται η αποκόλληση των κυττάρων στο μικροσκόπιο και αν χρειαστεί τα τοποθετούμε ξανά στον επωαστικό κλίβανο για άλλα 1 έως 2 λεπτά.

7. Αμέσως μόλις παρατηρηθεί η αποκόλληση των κυττάρων, μεταφέρονται στον θάλαμο νηματικής ροής και προστίθεται με αποστειρωμένη πλαστική ορολογική πιπέτα θρεπτικό υλικό (4ml στις φλάσκες κυτταροκαλλιιεργειών μεγέθους 25.0cm και 8ml στις φλάσκες κυτταροκαλλιιεργειών μεγέθους 75.0cm) ώστε να ανασταλεί η δράση της θρυψίνης. Γίνεται αναρρόφηση όλου του υλικού και αφήνεται πάλι πίσω στη φλάσκα, 2 με 3 φορές, ώστε να ξεπλυθεί καλά και να απομακρυνθούν τυχόν υπάρχοντα κύτταρα από τα τοιχώματα.

8. Μεταφέρεται όλο το υλικό σε σωληνάρια πλαστικά (falcon) των 15ml, ανακινείται καλά και επιστρέφεται στην φλάσκα μόνον η ποσότητα η οποία απαιτείται σύμφωνα με την αραιώση που έχει υπολογιστεί να γίνει (παράδειγμα αραιώση 1/3 ή 1/4).

9. Στη συνέχεια συμπληρώνεται στη φλάσκα θρεπτικό υλικό ώστε ο συνολικός όγκος να είναι 5-6ml στις φλάσκες κυτταροκαλλιιεργειών μεγέθους 25.0cm και 12-15ml στις φλάσκες κυτταροκαλλιιεργειών μεγέθους 75.0cm.

10. Τέλος επιστρέφεται στον επωαστικό κλίβανο και κάθε δύο ημέρες γίνεται ανανέωση του θρεπτικού υλικού με φρέσκο μέχρι η πληρότητα των κυττάρων να φτάσει περίπου το 80%.

Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας ονομάζεται πέρασμα (passage) και ο αριθμός των περασμάτων κάθε κυτταρικής σειράς μπορεί να μας δώσει πληροφορίες για την γήρανσή της.

3.4. ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ NEUBAUER HEMACYTOMETER ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ TRYPAN BLUE

Ο αριθμός των κυττάρων μπορεί να μετρηθεί σε ένα δείγμα γνωστού όγκου και στη συνέχεια να υπολογιστεί ο αριθμός των κυττάρων που περιέχεται στο αρχικό ελαιώρημα από το οποίο προήλθε το δείγμα. Αυτό μπορεί να γίνει με τη χρησιμοποίηση ειδικής αντικειμενοφόρου πλάκας, το αιμοκυτταρόμετρο ή ευρύτερα γνωστό ως πλάκα Neubauer. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε βασίστηκε στο πρωτόκολλο της Phelan MC (1998) [67].

Ο σχεδιασμός του αιμοκυτταρόμετρου μπορεί να διαφέρει. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η βελτιωμένη Neubauer (Εικόνα 12). Το κεντρικό τμήμα της αντικειμενοφόρου πλάκας είναι η πλατφόρμα καταμέτρησης που οριοθετείται από ένα αυλάκι του ενός χιλιοστού. Η κεντρική πλατφόρμα χωρίζεται σε δύο θαλάμους καταμέτρησης από ένα εγκάρσιο αυλάκι. Κάθε θάλαμος καταμέτρησης αποτελείται από ένα θάλαμο στον οποίο είναι χαραγμένο ένα πλέγμα 3×3 mm. Αυτό το πλέγμα χωρίζεται σε εννέα δευτερογενή τετράγωνα, μεγέθους καθένα 1×1 mm.

Για τον προσδιορισμό του αριθμού των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν τα τέσσερα γωνιακά τετράγωνα (Εικόνα 13). Αυτά χωρίζονται περαιτέρω σε 16 τριτοβάθμια τετράγωνα για να βοηθήσουν στην καταμέτρηση των κυττάρων. Στην επάνω πλευρά του αιματοκυτταρόμετρου τοποθετείται μια καλυπτρίδα, η οποία είναι μία παχιά επιφάνεια γυαλιού. Το κυτταρικό ελαιώρημα τοποθετείται σε μια καθορισμένη περιοχή ώστε να μπορεί να γίνει η μέτρηση και να υπολογιστεί η πυκνότητα των κυττάρων.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε αναγράφεται αναλυτικά.

1. Καθαρίζεται η επιφάνεια του αιματοκυτταρόμετρου και η καλυπτρίδα με αιθανόλη 70% και τοποθετείται η καλυπτρίδα στην επάνω μεριά του. Θα πρέπει να είναι καθαρό, στεγνό, απαλλαγμένο από χνούδια και δακτυλικά αποτυπώματα.

2. Γίνεται η προετοιμασία του αιωρήματος των κυττάρων. Ακολουθούνται τα στάδια 1-8 του υποκεφαλαίου 3.3.

3. Σε ένα erpendorf tube προστίθεται 10μl χρωστικής κυανό του τρυπανίου (trypan blue) και 90μl αιωρήματος κυττάρων που βρίσκονται στο falcon ύστερα από καλή ανάδευση.

4. Με μία μονοκάναλη πιπέτα μεταφέρεται το περιεχόμενο του erpendorf tube στην άκρη του θαλάμου καταμέτρησης του αιματοκυτταρόμετρου, κρατώντας το άκρο της πιπέτας κάτω από την καλυπτρίδα ώστε να διανεμηθεί όλο το αινώρημα και αφήνεται για λίγα λεπτά ώστε να ηρεμήσουν τα κύτταρα.

5. Με τη βοήθεια ενός φορητού μετρητή χειρός ξεκινάει η καταμέτρηση των κυττάρων σε κάθε μία από τις 4 πλευρές γύρω από τον “σταυρό” όπως φαίνεται στην εικόνα.

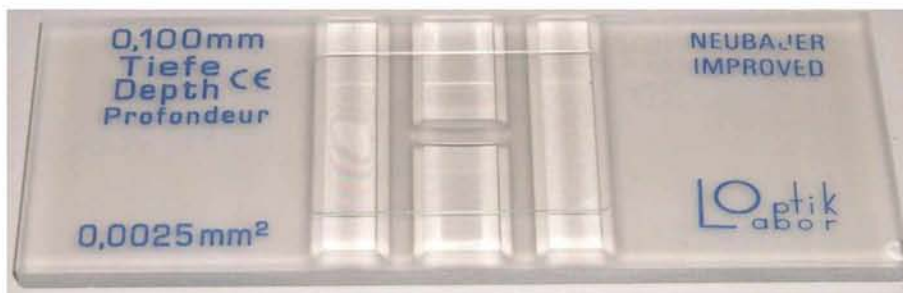
6. Καθορίζεται ο αριθμός των κυττάρων με τους παρακάτω υπολογισμούς.

$$\text{Κύτταρα/ml} = \text{μέσος αριθμός ανά τετράγωνο} \times 10^4.$$

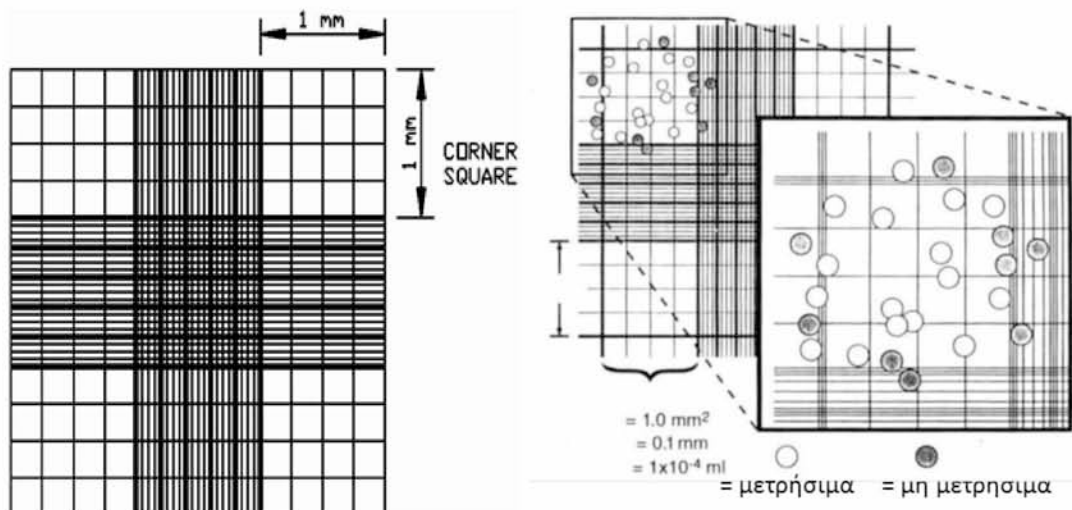
Ολικά κύτταρα = κύτταρα / ml \times συνολικό αρχικό όγκο του κυτταρικού εναιωρήματος από το οποίο ελήφθη το δείγμα.

Ο αριθμός 10^4 είναι ο συντελεστής διόρθωσης όγκου για το αιματοκυτταρόμετρο διότι κάθε τετράγωνο έχει μέγεθος $1 \times 1 \text{ mm}$ και βάθος $0,1 \text{ mm}$.

7. Με αποιονισμένο νερό ξεπλένεται η καλυπτρίδα και το αιμοκυτταρόμετρο και απολυμένεται με αιθανόλη 70%, στεγνώνεται προσεκτικά και αποθηκεύεται για μελλοντική χρήση.



Εικόνα 12 : Neubauer Hemacytometer



Εικόνα 13 : Χώρος μέτρησης κυττάρων της πλάκας Neubauer και σχηματική απεικόνιση υπολογισμού κυττάρων

3.5. ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η αποθήκευση των κυττάρων κάποιες φορές είναι επιθυμητή για μελλοντική μελέτη τους. Για το πάγωμα των κυττάρων χρησιμοποιείται ένας κρυοπροστατευτικός παράγοντας, διότι χωρίς αυτόν η κατάψυξη των κυττάρων θα ήταν θανατηφόρα τις πιο πολλές φορές. Έναν τέτοιο παράγοντα αποτελεί και το DMSO (διμεθυλοσουλφοξειδίο) σε συνδιασμό με το θρεπτικό υλικό. Η δράση του DMSO βοηθάει στη μείωση του σημείου πήξεως και βοηθάει τα κύτταρα να ψύχονται με πιο αργό ρυθμό, με αποτέλεσμα την μείωση ανάπτυξης παγοκρυστάλλων και την αποφυγή καταστροφής των κυττάρων. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε βασίστηκε στο πρωτόκολλο της Phelan MC (1998) [67].

Το DMSO χρησιμοποιείται σε ποσοστό 10% και προστίθεται 90% θρεπτικό μέσο. Αναμιγνύεται καλά και έτσι έχουμε το θρεπτικό μέσο παγώματος των κυττάρων ή αλλιώς freezing medium και αποθηκεύεται στους 4°C για να είναι πάντα κρύο πριν χρησιμοποιηθεί. Όλη η διαδικασία γίνεται σε στείρες συνθήκες στον θάλαμο νηματικής ροής.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε αναγράφεται αναλυτικά.

1. Ακολουθούνται τα στάδια 1-7 του υποκεφαλαίου 3.4.
2. Το falcon με το περιεχόμενό του μεταφέρεται για φυγοκέντρηση στις 1200rpm για 5 λεπτά.
3. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και γίνεται επαναιώρηση του πέλετ που έχει μείνει κάτω και είναι τα κύτταρα.

4. Για κάθε 4×10^6 κύτταρα προσθέτω 1ml freezing medium. Οπότε αναλόγως με τον συνολικό αριθμών των κυττάρων προσθέτω την ανάλογη ποσότητα freezing medium στο falcon.

5. Σε κρυοφιαλίδια μεταφέρω μετά από καλή ανάδευση κάθε φορά 1ml από την ποσότητα που υπάρχει στο falcon.

6. Μεταφέρω στους -80°C , για μέγιστο χρονικό διάστημα τους 6 μήνες. Σε περίπτωση που τα κύτταρα πρέπει να αποθηκευτούν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα μεταφέρονται σε καταψύκτη υγρού αζώτου.

3.6. ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Όταν χρειάζονται για μελέτη κύτταρα που έχουν καταψυχθεί παλαιότερα, η διαδικασία της απόψυξης πρέπει να γίνεται γρήγορα, για να αποφευχθεί ο σχηματισμός παγοκρυστάλλων που μπορεί να προκαλέσει κυτταρική λύση. Κατά την διαδικασία της απόψυξης χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό με συγκέντρωση FBS 10%. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε βασίστηκε στο πρωτόκολλο της Phelan MC (1998) [67].

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε αναγράφεται αναλυτικά.

1. Μετακινείται το επιθυμητό κρυοφιαλίδιο από τους -80°C ή τον καταψύκτη υγρού αζώτου σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 37°C και αφήνεται στο νερό μέχρι να ξεπαγώσει το freezing medium (λιγότερο από 1 λεπτό).

2. Μετακινείται στον θάλαμο νηματικής ροής, αφού καθαριστεί με 70% αιθανόλη.

3. Μεταφέρεται το περιεχόμενο προσεκτικά σε falcon και προστίθενται 2ml θρεπτικό υλικό.

4. Μεταφέρεται για φυγοκέντρηση στις 1200rpm για 5 λεπτά.

5. Οδηγείται στο θάλαμο νηματικής ροής και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Γίνεται επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων και προστίθεται 1ml θρεπτικό υλικό.

6. Μεταφέρεται προσεκτικά όλο το περιεχόμενο του falcon σε μία φλάσκα (όπου έχουν σημειωθεί οι απαραίτητες πληροφορίες στην εξωτερική πλευρά) και συμπληρώνονται 5ml επιπλέον θρεπτικό υλικό.

7. Γίνεται έλεγχος της κυτταροκαλλιέργειας μετά από 24 ώρες για να διασφαλιστεί ότι τα κύτταρα έχουν προσκολληθεί στο κάτω μέρος της φλάσκας και

ανανεώνεται το θρεπτικό υλικό ώστε να απομακρυνθούν τα νεκρά από το υπερκείμενο.

Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS μέχρι να σταθεροποιηθεί η κατάσταση τους. Αμέσως μετά αλλάζουμε το θρεπτικό σε 5% FBS.

3.7. IN VITRO ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ (CYTOTOXICITY ASSAY, SRB)

Ο έλεγχος της κυτταροτοξικής δράσης των αναστολέων έγινε με τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης Β (SRB – Sulforhodamine B) σύμφωνα με το πρωτοκόλλο του Εθνικού Ινστιτούτου Καρκίνου (National Cancer Institute, NCI). Η SRB είναι μία έντονη ροζ χρωστική αμινοξανθίνης με δύο σουλφονικές ομάδες όπου σε ελαφρά όξινο περιβάλλον συνδέεται με τα βασικά αμινοξέα των κυτταρικών πρωτεϊνών [75].

Η μέθοδος θεωρείται η πιο κατάλληλη για μελέτη κυτταροτοξικότητας, επιβίωσης κυττάρων και έλεγχο πολλαπλασιασμού κυττάρων.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε αναγράφεται αναλυτικά.

1. Την πρώτη ημέρα γίνεται έλεγχος των κυττάρων ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η πυκνότητά τους μέσα στη φλάσκα καλύπτει το 70-80% και το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ανανεώνεται, έτσι ώστε τα κύτταρα να επανέλθουν σε λογαριθμικό πολλαπλασιασμό.

2. Την δεύτερη ημέρα γίνεται μέτρηση των κυττάρων με Neubauer hemacytometer και χρήση χρωστικής trypan blue όπως αναφέρεται στο υποκεφάλαιο 3.4. Σε 96 μικροκυψελίδες κυτταροκαλλιέργειας (96-wells plate) προστίθενται 100μl θρεπτικού υλικού από τα κύτταρα σε συγκέντρωση 5000 cells/well. Η συγκέντρωση των κυττάρων μπορεί να διαφέρει και αυτό εξαρτάται από τον ρυθμό πολλαπλασιασμού της κάθε κυτταρικής σειράς. Στη συνέχεια τοποθετούνται στον κλίβανο για επώαση για 24ώρες, ώστε να επανέλθουν σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος τα κύτταρα πρέπει να βρίσκονται σε εκθετική φάση ανάπτυξης.

3. Την Τρίτη ημέρα, αφού έχουν περάσει οι 24 ώρες στο ένα plate (Tz) προστίθεται 50μl κρύο τριχλωρο-οξικό οξύ (TCA) 50% w/v ώστε κάθε καρκινική κυτταρική σειρά να μονιμοποιηθεί με αποτέλεσμα να υπάρχει η αρχική εικόνα του πληθυσμού καλλιέργειας και αφήνεται στους 4°C για 1 ώρα. Αμέσως μετά αφαιρείται

το υπερκείμενο, ξεπλένεται με νερό 4-5 φορές, αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου και αποθηκεύεται στους 4°C.

4. Οι αναστολείς αραιώνονται σε θρεπτικό καλλιεργητικό μέσο σε συγκέντρωση 2 φορές μεγαλύτερη από την επιθυμητή τελική συγκέντρωση. Στη συνέχεια γίνονται διαδοχικές αραιώσεις του 10 και έτσι προκύπτουν οι τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις του κάθε αναστολέα.

5. Αμέσως μετά προστίθενται 100μl από κάθε συγκέντρωση στο αντίστοιχο πηγαδάκι, στο οποίο προϋπάρχουν 100μl θρεπτικού μέσου, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση κάθε αναστολέα να φτάνει στην επιθυμητή τελική συγκέντρωση. Όλες οι συγκεντρώσεις τοποθετούνται σε τριπλές μικροκυψελίδες κυτταροκαλλιέργειας.

6. Ως κύτταρα μάρτυρες χρησιμοποιούνται μερικά wells στα οποία προστίθενται 100μl θρεπτικού καλλιεργητικού μέσου (control).

7. Τα μικροπλακίδια επωάζονται για άλλες 48 ώρες στον κλίβανο.

8. Την Πέμπτη ημέρα το πείραμα λήγει με την προσθήκη 50μl κρύου τριχλωροοξικού οξέος (TCA) 50% w/v σε κάθε μικροκυψελίδα, για μονιμοποίηση των κυττάρων και αφήνεται στους 4°C για 1 ώρα. Αμέσως μετά αφαιρείται το υπερκείμενο, ξεπλένεται με νερό 4-5 φορές και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

9. Σε κάθε μικροκυψελίδα που χρησιμοποιήθηκε, προσθέτουμε 50μl SRB 0.4% διαλυμένη σε 1% οξικό οξύ και αφήνονται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.

10. Στη συνέχεια αφαιρείται το υπερκείμενο από τα plates, ξεπλένονται με 1% οξικό οξύ 3-4 φορές ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια βαφής που δεν έχει προσδεθεί και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου να στεγνώσουν.

11. Αμέσως μετά προστίθενται 150μl Trizma Base 10Mm και αφήνονται για 10 λεπτά στον κλίβανο, ώστε να διαλυθεί η προσδεδεμένη βαφή που υπάρχει σε κάθε well.

Τέλος μετράται η οπτική απορρόφηση του διαλύματος σε φασματοφωτόμετρο στα 515nm και οι τιμές αναγράφονται αυτόματα.

Ο υπολογισμός της ποσοστιαίας ανάπτυξης των κυττάρων (Growth Rate %) για κάθε συγκέντρωση που έχει χρησιμοποιηθεί, μπορεί να γίνει σύμφωνα με τις μετρήσεις οπτικής απορρόφησης κάθε μικροκυψελίδας που απεικονίζουν τα κύτταρα την στιγμή της προσθήκης ουσιών (Tz), τα κύτταρα μάρτυρες (control) και τα κύτταρα που έχει προστεθεί ποσότητα της

εξεταζόμενης ουσίας στην κάθε επιθυμητή συγκέντρωση, με την χρήση των παρακάτω τύπων:

$$[(Ti-Tz) / (C-Tz)] \times 100 \text{ για συγκεντρώσεις όπου } Ti \geq Tz$$

$$[(Ti-Tz) / Tz] \times 100 \text{ για συγκεντρώσεις όπου } Ti < Tz.$$

Επίσης υπολογίζονται και οι παράμετροι:

I. Growth Inhibition 50% (GI50), που είναι η συγκέντρωση του αναστολέα κατά την οποία επιτυγχάνεται αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων κατά 50%. Υπολογίζεται από τον τύπο $[(Ti-Tz) / (C-Tz)] \times 100 = 50$.

II. Total growth inhibition (TGI), που είναι η συγκέντρωση του αναστολέα κατά την οποία επιτυγχάνεται ολική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων. Υπολογίζεται από τον τύπο $Ti = Tz$.

III. Lethal concentration 50% (LC50), που είναι η συγκέντρωση του αναστολέα κατά την οποία το 50% του αρχικού πληθυσμού των κυττάρων πεθαίνουν. Υπολογίζεται από τον τύπο $[(Ti-Tz)/Tz] \times 100 = -50$.

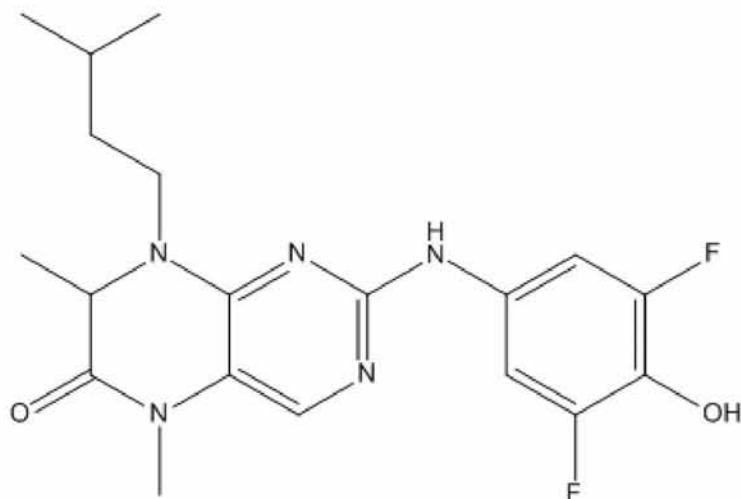
IV. Therapeutic Index (TI), είναι ο λόγος της LC50 προς τη GI50. Όσο μεγαλύτερος είναι ο δείκτης τόσο ασφαλέστερο είναι το φάρμακο. Υπολογίζεται από τον τύπο Therapeutic Index = LC50/ GI50.

3.8. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Οι αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθοι:

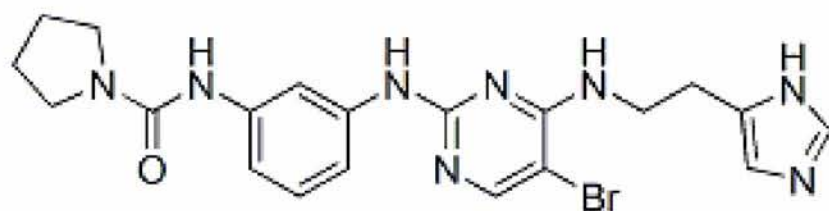
1. BI-D1870, αποτελεί ισχυρό και ειδικό αναστολέα των ισομορφών της p90 ριβοσωμικής S6 κινάσης (RSK) τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, ο οποίος αναστέλλει την RSK1, RSK2, RSK3, RSK4 *in vitro* με τιμή IC50 10-30nM. (Εικόνα 14)

Η συγκέντρωση IC50 (Inhibitory Concentration 50) μετράει την ικανότητα μιας ουσίας να αναστέλλει μια δεδομένη βιοχημική ή βιολογική διεργασία ή κάποιο συστατικό μιας διαδικασίας, δηλαδή ένα ένζυμο, κύτταρο, κυτταρικό υποδοχέα ή μικροοργανισμό κατά 50%. Σύμφωνα με τον FDA, αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φαρμάκου που απαιτείται για 50% *in vitro* αναστολή [39].



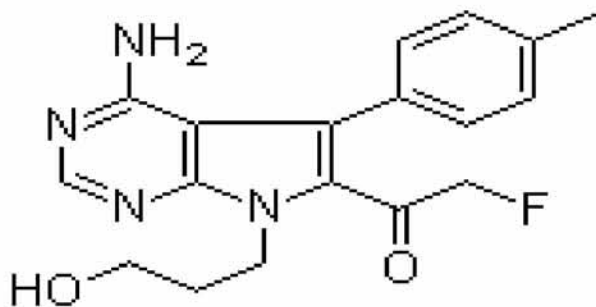
Εικόνα 14: χημική δομή αναστολέα BI-D1870.

2. BX-912, είναι αναστολέας της 3-φωσφοϊνοσιτιδης-εξαρτώμενης κινάσης-1 (PDK1). (Εικόνα 15)



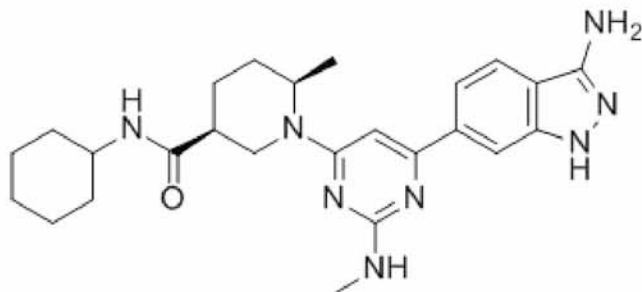
Εικόνα 15: χημική δομή BX-912

3. FMK, αποτελεί ισχυρό, ιδιαίτερα εξειδικευμένο και μη αναστρέψιμο αναστολέα των ισομορφών RSK1 και RSK2 της p90 ριβοσωμικής S6. Ο FMK προσδένεται στην C-τερματική περιοχή της κινάσης στη θέση δέσμευσης-ATP (C-terminal kinase domain, CTKD) και αναστέλλει την αυτοφωσφορύλιωση της RSK στη Ser386. (Εικόνα 16)



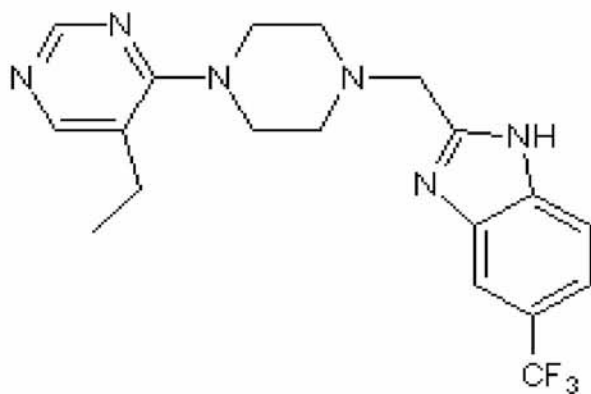
Εικόνα 16: χημική δομή FMK

4. GSK 2334470, είναι ισχυρός αναστολέας της 3-φωσφοϊνοσιτίδης-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης-1 (PDK1) με τιμή $IC_{50} \approx 10 \text{ nM}$. (Εικόνα 17)



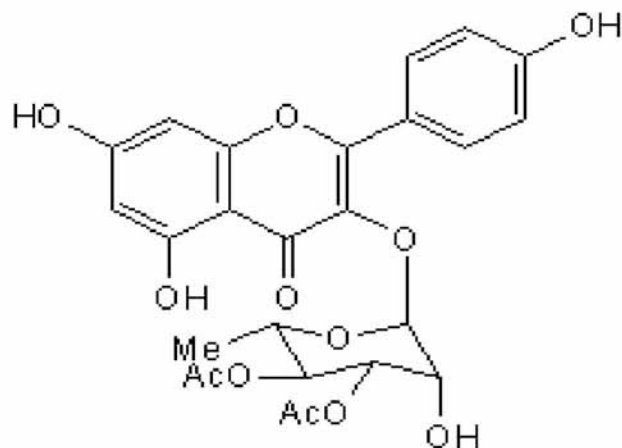
Εικόνα 17: χημική δομή GSK 2334470

5. PF 4708671, είναι ένας πολύ εξειδικευμένος αναστολέας της ριβοσωμικής p70 S6 κινάση (S6K1), που αναστέλλει την S6K1-διαμεσολαβούμενη φωσφορυλίωση της S6 πρωτεΐνης σε απόκριση προς τον IGF-1, ενώ δεν έχει καμία επίδραση στις πολύ συγγενείς RSK και MSK κινάσες. (Εικόνα 18)



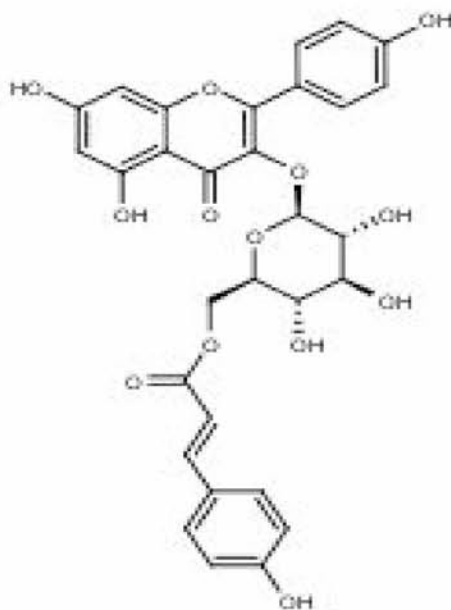
Εικόνα 18: χημική δομή PF 4708671

6. SL 0101-1, εκλεκτικός αναστολέας της ριβοσωμικής κινάσης S6 (RSK) με τιμή $IC_{50} = 89 \text{ nM}$ για την RSK2. Δεν αναστέλλει τις ανοδικά κινάσες όπως MEK, Raf και PKC. (Εικόνα 19)



Εικόνα 19: χημική δομή SL 0101-1

7. Tiliroside (T-ac), είναι μια φλαβονόλη που χαρακτηρίζεται ως Kaempferol-3-O-glucoside-6"-E-coumaroyl. Βρίσκεται στη φύση και μπορεί να παραληφθεί από τους αποξηραμένους καρπούς του φυτού *Platanus Orientalis*. (Εικόνα 20)



Εικόνα 20: χημική δομή Tiliroside (T-ac)

Οι αναστολείς παραλήφθηκαν σε μορφή σκόνης και έγινε η διάλυση τους στην ανάλογη ποσότητα DMSO ώστε η συγκέντρωσή τους να είναι $C = 20\text{Mm}$. Χωρίστηκαν σε μικρές ποσότητες σε erpendorf και αποθηκεύτηκαν στους -20°C .

3.9. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ TILIROSIDE (T-ac)

Οι κυτταρικές σειρές αναπτύσσονται σε φλάσκες κυτταροκαλλιιεργειών επιφάνειας 25.0cm². Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ακόλουθη.

1. Τοποθετούνται 1.000.000 κύτταρα από κάθε καρκινική κυτταρική σειρά σε διαφορετική φλάσκα με θρεπτικό υλικό και αφήνονται 24 ώρες για επώαση.

2. Αμέσως μετά προστίθεται ο αναστολέας σε τελική συγκέντρωση 20μM στο υπάρχον θρεπτικό υλικό. Πριν την προσθήκη του αναστολέα γίνεται πάντα παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο, ώστε να ελέγχεται η κατάστασή τους. Αφήνονται στον κλίβανο για 4 ώρες επώαση. Παράλληλα διατηρείται στις ίδιες συνθήκες ακόμη μία φλάσκα με τον ίδιο αριθμό κυττάρων στην οποία δεν προστίθεται αναστολέας ώστε να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

3. Αφού περάσουν οι 4 ώρες ακολουθείται η διαδικασία που αναγράφεται στο υποκεφάλαιο 3.3 από το βήμα 3-7 με τη μόνη διαφορά ότι όλη η διαδικασία γίνεται στον πάγο και οι φλάσκες δεν τοποθετούνται καθόλου στον κλίβανο μόλις προσθέσουμε την θρυψίνη.

4. Μεταφέρεται όλο το υλικό σε σωληνάρια πλαστικά (falcon) των 15ml και οδηγείται προς φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 1.200 στροφές.

5. Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και γίνεται επαναιώρηση του πέλετ που έχει μείνει κάτω και προστίθεται 3-4ml PBS, ανακινείται και γίνεται ακόμη μία φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 1.200 στροφές.

6. Αμέσως μετά απομακρύνεται το υπερκείμενο και αφήνονται τα falcon χωρίς καπάκι ανάποδα για να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του υγρού που μπορεί να περιέχει στα τοιχώματα και να στεγνώσουν.

7. Ακολουθεί λύση των κυττάρων (αναγράφεται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 3.10) και προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνών (αναγράφεται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 3.11).

8. Το λήμμα των κυττάρων που έχει προκύψει αποθηκεύεται στους -80°C για μελλοντική ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών κατά western blot analysis (αντίστοιχο υποκεφάλαιο 3.12).

3.10. ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η λύση των κυττάρων γίνεται για να καταφέρουμε να απομονώσουμε τις πρωτεΐνες από τα κύτταρα και να μελετήσουμε την έκφρασή τους. Όλη η διαδικασία λύσης των κυττάρων πραγματοποιείται σε πάγο. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε αναγράφεται αναλυτικά.

1. Ακολουθείται η διαδικασία που αναγράφεται στο υποκεφάλαιο 3.3 από το βήμα 1-7 με τη μόνη διαφορά ότι όλη η διαδικασία γίνεται στον πάγο και οι φλάσκες δεν τοποθετούνται καθόλου στον κλίβανο μόλις προσθέσουμε την θρυψίνη.

2. Μεταφέρεται όλο το υλικό σε σωληνάρια πλαστικά (falcon) των 15ml και οδηγείται προς φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1.200 στροφές.

3. Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και γίνεται επαναιώρηση του ιζήματος που έχει μείνει κάτω και προστίθεται 3-4ml PBS, ανακινείται και γίνεται ακόμη μία φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1.200 στροφές.

4. Αμέσως μετά απομακρύνεται το υπερκείμενο και αφήνονται τα falcon χωρίς καπάκι ανάποδα για να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του υγρού που μπορεί να περιέχει στα τοιχώματα και να στεγνώσουν.

5. Ετοιμάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (lysis buffer) το οποίο περιέχει:

- I. RIPA 10x
- II. H₂O
- III. Phosphatase Inhibitor
- IV. Protease Inhibitor Cocktail

6. Αφού γίνει επαναιώρηση του ιζήματος, προσθέτω σε κάθε falcon ανάλογη ποσότητα lysis buffer και τα μεταφέρω σε erpendorf. Γενικά ισχύει ότι για κάθε 10⁶ κύτταρα χρησιμοποιούμε 60μl lysis buffer.

7. Αφήνεται το lysis buffer να δράσει για 30 λεπτά και κάθε 5 λεπτά γίνεται πολύ καλή ανάδευση σε αναδευτήρ vortex.

8. Στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές στους 4°C.

9. Αμέσως μετά μεταφέρω όλο το υπερκείμενο σε καινούριο erpendorf και πετάω το παλιό. Για σιγουριά επαναλαμβάνω τα βήματα 8-9 ακόμη μία φορά.

10. Εάν το εναιώρημα δεν είναι καθαρό και διαυγές τότε επαναλαμβάνω τα βήματα 6-9 άλλη μία φορά. Αν το εναιώρημα είναι καθαρό και διαυγές τότε σημαίνει

ότι έχω τις πρωτεΐνες στο erpendorf απαλλαγμένες από το ‘‘σύννεφο’’ του DNA και αποθηκεύονται στους -80°C .

3.11. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ (BRADFORD ANALYSIS)

Με τη μέθοδο Bradford μπορεί εύκολα να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών σ’ ένα διάλυμα με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων σε μήκος κύματος $\lambda=515\text{nm}$. Είναι από τις πιο σύντομες και αξιόπιστες μεθόδους.

Για τον ακριβή υπολογισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με βάση την οπτική απορρόφηση, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη με γνωστές συγκεντρώσεις αλβουμίνης βόειου ορού (Bovine Serum Albumin - BSA). Η αλβουμίνη πρέπει να είναι διαλυμένη στο ίδιο διάλυμα που είναι και οι πρωτεΐνες, των οποίων η συγκέντρωση υπολογίζεται.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών έγινε σύμφωνα με το πρωτοκόλλο της ThermoFisher Pierce™ BCA Protein Assay Kit [47]. Η διαδικασία που ακολουθείται αναγράφεται παρακάτω.

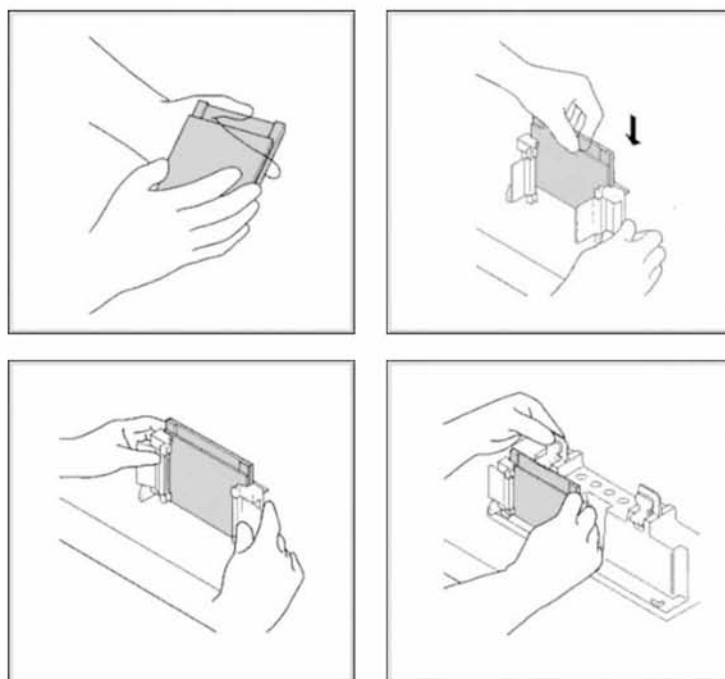
1. Σε μία στήλη από ένα 96 well plate κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη δειγμάτων αλβουμίνης βοοειδούς (BSA) γνωστής συγκέντρωσης με τιμές 2mg/ml - 1.5mg/ml - 1.0mg/ml - 0.75mg/ml - 0.5mg/ml - 0.25mg/ml - 0.125mg/ml .
2. Σε άλλη στήλη του ίδιου plate γίνεται η προετοιμασία των δειγμάτων.
3. Γίνεται η προετοιμασία του BCA Working Reagent και προστίθεται η ίδια ποσότητα σε κάθε μικροκυψελίδα των δειγμάτων αλβουμίνης βοοειδούς και των προς προσδιορισμό δειγμάτων.
4. Τοποθετούνται στον κλίβανο για 30 λεπτά.
5. Αμέσως μετά αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
6. Γίνεται φωτομέτρηση στα 515 nm και υπολογίζεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών των δειγμάτων σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη.

3.12. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ WESTERN BLOT ANALYSIS

Η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών με το σύστημα Tris-γλυκίνη-SDS περιγράφηκε το 1970 από τον Laemmli [59].

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών βασίστηκαν στα πρωτόκολλα της Biorad (Εγχειρίδιο οδηγιών Mini-PROTEAN® 3 Cell [26] και Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell [27]) και αναγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

1. Αρχικά γίνεται η συναρμολόγηση της συσκευής για την παρασκευή των πηκτωμάτων (Εικόνα 21).



Εικόνα 21 : Συναρμολόγηση συσκευής για την παρασκευή πηκτωμάτων

2. Παρασκευάζονται τα πηκτώματα διαχωρισμού των πρωτεϊνών. Κάθε πήκτωμα αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτώματα, εκ των οποίων η κατώτερη στοιβάδα καλείται πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel 8-10%) και το πήκτωμα που τοποθετείται άνωθεν ονομάζεται επισωρεύσεως (stacking gel 5%). Ανάλογα με το μοριακό βάρος της υπό εξέταση πρωτεΐνης, παρασκευάζεται πήκτωμα διαχωρισμού (resolving) με συγκεκριμένη συγκέντρωση ακρυλαμίδης. Η συγκέντρωση ακρυλαμίδης αυξάνει όσο μειώνεται το μοριακό βάρος της υπό εξέταση πρωτεΐνης. Τα πηκτώματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3 : Ποσότητες αντιδραστηρίων για την παρασκευή πηκτωμάτων

<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>Stacking gel 5%</u>	<u>Resolving gel</u> <u>8%</u>	<u>Resolving gel 10%</u>
DDI H ₂ O (ml)	5,7	4,7	4,1
30% Degassed Acrylamide/Bis (ml)	1,7	2,7	3,3
1.5M Tris-HCl pH 8,8 (ml)	-	2,5	2,5
0.5M Tris-HCl pH 6,8 (ml)	2,5	-	-
10% w/v SDS (ml)	0,1	0,1	0,1
10% APS (μl)	50	50	50
TEMED (μl)	10	5	5

3. Πρώτα παρασκευάζεται το resolving gel και αφήνεται 30-40 λεπτά έως ότου πήξει καλά.

4. Μόλις προσθέσουμε το stacking gel τοποθετούμε τα ειδικά χτενάκια, που χρησιμεύουν στη δημιουργία θέσεων (πηγαδάκια) για την προσθήκη του δείγματος και αφήνεται 20-30 για να πήξει καλά.

5. Παράλληλα γίνεται η προετοιμασία των δειγμάτων, τα οποία φυλάσσονται στους -80°C. Σε eppendorf τοποθετείται η επιθυμητή ποσότητα δείγματος (να περιέχεται 15-25μg πρωτεΐνης), προστίθεται ανάλογη ποσότητα PBS και ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) σε ποσότητα 1/3 του συνολικού όγκου δείγματος και PBS. Προστίθεται loading buffer διότι η μερκαπτοαιθανόλη βοηθάει στη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών, το SDS φορτίζει αρνητικά τις πρωτεΐνες και τις απόδιατάσσει, το μπλε της βρωμοφαινόλης βοηθάει την παρακολούθηση της ηλεκτροφόρησης, το Tris-HCl 0,5M είναι μια οργανική ουσία που προσδίδει το κατάλληλο pH (6,8) για τη διατήρηση των πρωτεϊνών καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας και η γλυκερόλη είναι παχύρρευστο υγρό και βοηθάει το δείγμα να βυθιστεί στον πάτο της οπής της πηκτής και να σχηματιστούν οι ‘‘μπάντες’’. Η παρασκευή του Loading buffer παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4 : Αντιδραστήρια για την παρασκευή του Loading buffer

<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>(μl)</u>
20% SDS	100
0.5M Tris-HCl pH 6,8 (ml)	100
Γλυκερίνη	400
B-μερκαπτοαιθανόλη	100
0,2% μπλε της βρωμοφαινόλης	100

6. Μόλις τα erpendorf με τα δείγματα είναι έτοιμα τοποθετούνται σε νερό που βράζει στους 95°C για 5 λεπτά για να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών.

7. Όταν το πήκτωμα έχει πήξει, απομακρύνεται το ειδικό χτενάκι και μεταφέρεται η συσκευή του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στα πηγάδια του stacking gel φορτώνεται η επιθυμητή ποσότητα των δειγμάτων από τα erpendorf. Στην πρώτη και στην τελευταία θέση του stacking gel επιστοιβάζεται ο μάρτυρας (marker), ο οποίος είναι μίγμα έγχρωμων πρότυπων μοριακών μεγεθών (BlueStar Prestained Protein Marker Plus), ώστε να προσδιορίζεται εύκολα το Μοριακό Βάρος των δειγμάτων κατά την ανοσοαποτύπωση.

8. Ηλεκτροφορούνται κάθετα σε ηλεκτροφορητική συσκευή της BIORAD υπό τάση 100V περίπου για 20 λεπτά και στη συνέχεια υπό τάση 200V περίπου για 40 λεπτά, μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x (running buffer). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνηση των δειγμάτων από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο του συστήματος. Η παρασκευή του running buffer παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5 : Αντιδραστήρια για την παρασκευή του Running buffer

<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>Running buffer 10x</u> <u>pH 8,3</u>	<u>Running buffer 1x</u>
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (g)	30,3	-
Glycine (g)	144	-
SDS (g)	10	-
ddH ₂ O (ml)	up to 1000	900
Running buffer 10x pH 8,3 (ml)	-	100

9. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης τα πηκτώματα αποσπώνται από τη συσκευή. Το stacking gel αποκόπτεται και απομακρύνεται, ενώ το resolving gel χρησιμοποιείται για την μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF για ανοσοαποτύπωση κατά Western. Η PVDF μεμβράνη είναι υδρόφοβη, επομένως για να καταστεί υδρόφιλη πρέπει πρώτα να εμβαπτιστεί σε μεθανόλη για 1 λεπτό και στη συνέχεια σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 1x (Transfer buffer) πάντα υπό ανάδευση στη παλαρίνα. Η παρασκευή του Transfer buffer παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.

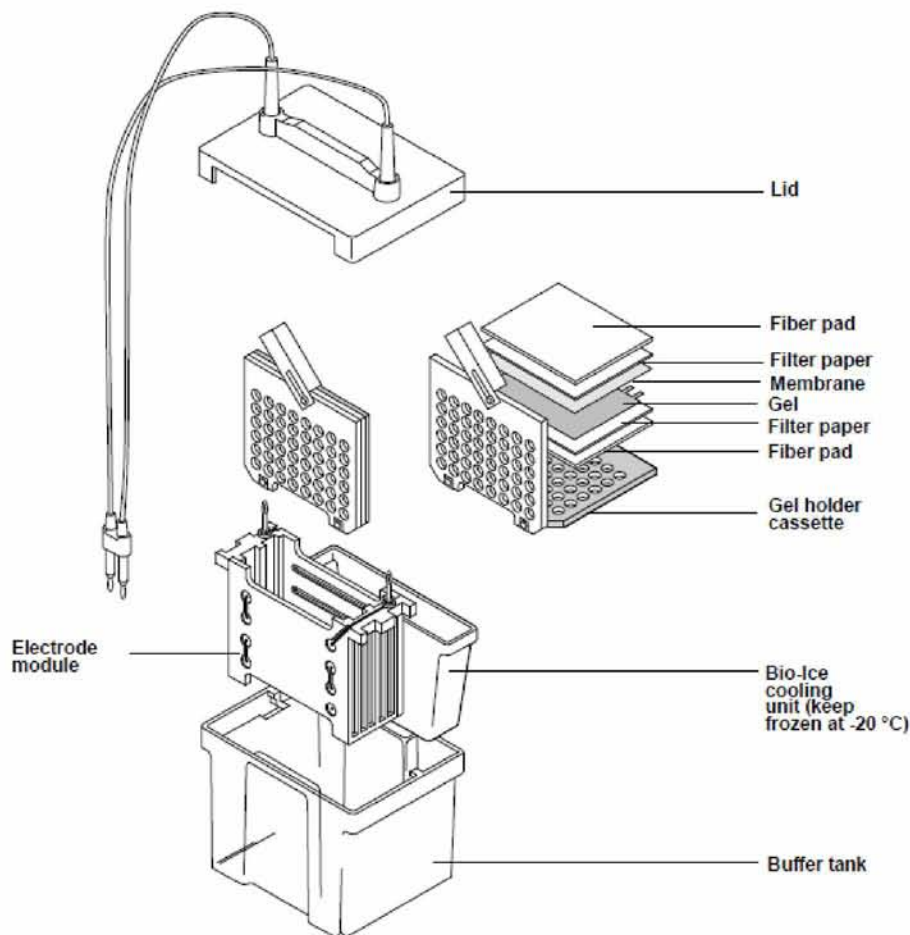
Πίνακας 6 : Αντιδραστήρια για την παρασκευή του Transfer buffer

<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>Transfer buffer 10x</u> <u>pH 8,3</u>	<u>Transfer buffer 1x</u>
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (g)	30,3	-
Glycine (g)	144	-
ddH ₂ O (ml)	up to 1000	700
Μεθανόλη (ml)	-	200
Transfer buffer 10x pH 8,3 (ml)	-	100

10. Σε Transfer buffer εμβαπτίζονται όλα όσα θα χρειαστούν για τη δημιουργία του “σάντουιτς μεταφοράς”. Από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο τοποθετούνται δύο σφουγγάρια το ένα πάνω από το άλλο, επάνω τους ένα διηθητικό χαρτί Whatman, στη συνέχεια η πηκτή και από πάνω η μεμβράνη, ύστερα ένα στεγνό διηθητικό χαρτί Whatman και τέλος ακόμη ένα σφουγγάρι. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτεί η συνεχόμενη εμβάπτιση σε Transfer buffer κατά τη διαδικασία δημιουργίας του “σάντουιτς μεταφοράς”. Κλείνεται και τοποθετείται μαζί με μία παγοκύστη, για να κρατάει σταθερή τη θερμοκρασία, στη συσκευή μεταφοράς Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Biorad) στην οποία περιέχεται Transfer buffer (Εικόνα 22).

11. Η μεταφορά των πρωτεϊνών σε PVDF μεμβράνη γίνεται με την εφαρμογή ομοιογενούς ηλεκτρικού πεδίου (ηλεκτρομεταφορά) ρεύματος 100V για περίπου 1 ώρα, σε συνθήκες ελεγχόμενης θερμοκρασίας και υπό συνεχή ανάδευση, μέχρις ότου

αυξηθούν τα mA κατά 100. Μπορεί να γίνει έλεγχος για τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη με προσωρινή χρώση της μεμβράνης με Ponceau S (0,1% Ponceau S σε 5% οξικό οξύ) για 1 λεπτό και αμέσως μετά ξέπλυμα 2-3 φορές με απεσταγμένο νερό.



Εικόνα 22 : Συναρμολόγηση συσκευής για μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη PVDF

12. Ακολουθεί το μπλοκ των μη εξειδικευμένων θέσεων των πρωτεϊνών της μεμβράνης με επώαση με TBS-T που περιέχει 5% FBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνεχή ανάδευση στη μπαλαρίνα. Η παρασκευή του TBS, TBS-T και TBS-T 5% παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7 : Αντιδραστήρια για την παρασκευή του TBS, TBS-T, TBS-T 5%

<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>TBS</u>	<u>TBS-T</u>	<u>TBS-T 5%</u>
1.0M Tris-HCl pH 7,4 (ml)	50	-	-
NaCl ₂ 0,9% (ml)	450	-	-
Tween 20 (μl)	-	500	-
FBS (ml)	-	-	5
TBS (ml)	-	500	-
TBS-T (ml)	-	-	95

13. Στη συνέχεια απομακρύνεται το TBS-T 5% και γίνονται τρεις εκπλύσεις για 5 λεπτά με TBS-T υπό συνεχή ανάδευση στη μπαλαρίνα σε θερμοκρασία δωματίου.

14. Ακολουθεί επώαση με TBS-T 5% στο οποίο περιέχεται το πρωτογενές αντίσωμα (αναγνωρίζει τη θέση του στόχου και προσδένεται) σε κατάλληλη αραιώση. Η επώαση πραγματοποιείται όλη νύχτα στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση στη μπαλαρίνα (Πίνακας 6).

15. Απομακρύνεται το διάλυμα με το πρωτογενές αντίσωμα και γίνονται τρεις εκπλύσεις για 5 λεπτά με TBS-T υπό συνεχή ανάδευση στη μπαλαρίνα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πρωτογενή αντισώματα αποθηκεύονται στους -80°C και μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν αρκετές φορές.

16. Ακολουθεί επώαση με TBS-T 5% στο οποίο περιέχεται το δευτερογενές αντίσωμα (είναι συνδεδεμένο με υπεροξειδάση και αναγνωρίζει το σύμπλοκο που έχει δημιουργήσει το πρωτογενές αντίσωμα) στην επιθυμητή αραιώση. Η επώαση πραγματοποιείται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση στη μπαλαρίνα (Πίνακας 8).

Πίνακας 8 : Αντισώματα που μελετήθηκαν με western blot analysis και οι αραιώσεις τους

<u>Πρωτεΐνη</u>	<u>1^ο Αντίσωμα</u>	<u>2^ο Αντίσωμα</u>
total p70 S6 kinase	P70 S6 kinase (49D7) Rabbit mAb 1/500	Anti-Rabbit IgG 1/6000
p70 S6 kinase phosphorylated at Thr389	Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (108D2) 1/500	Anti-Rabbit IgG 1/6000
total RSK2 proteins	Rsk-2 Antibody (E-1) 1/500	Anti-Mouse IgG 1/6000
RSK2 phosphorylated at Thr577	p-Rsk-2 Antibody (F-7) 1/500	Anti-Mouse IgG 1/6000
RSK2 phosphorylated at Ser227	p-Rsk Antibody (Ser 227) 1/500	Anti-Rabbit IgG 1/6000
GAPDH	Anti-GAPDH Antibody 1/5000	Anti-Mouse IgG 1/6000

17. Αφαιρείται το διάλυμα με το δευτερογενές αντίσωμα και γίνονται τρεις εκπλύσεις για 5 λεπτά με TBS-T υπό συνεχή ανάδευση στη μπαλαρίνα σε θερμοκρασία δωματίου.
18. Το ανοσοαποτύπωμα των πρωτεϊνών στη μεμβράνη εμφανίζεται με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL). Η μεμβράνη επώαζεται με το υπόστρωμα χημειοφωταύγειας για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και τα αποτελέσματα γίνονται ορατά με τη χρήση μηχανήματος Uvitec Cambridge και του λογισμικού Uvitec Alliance 4.7 [49].

3.13. ΧΡΩΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΜΕ COOMASIE BLUE

Αποτελεί μια σύντομη μέθοδο ελέγχου της καθαρότητας του πήκτωματος αμέσως μετά την ηλεκτροφόρηση και τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF. Όσες πρωτεΐνες έχουν μείνει πίσω στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης βάφονται με Coomassie Blue και γίνονται ορατές. Η διαδικασία που ακολουθείται αναγράφεται παρακάτω.

1. Αρχικά παρασκευάζεται το διάλυμα χρωστικής Coomassie Blue με τα ακόλουθα χημικά αντιδραστήρια:

- I. 40% Μεθανόλη
- II. 10% Οξικό οξύ
- III. 50% Δις-απεσταγμένο νερό
- IV. 0.1% Coomassie R-250

2. Τοποθετείται σε πλαστική θήκη το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και προστίθεται διάλυμα χρωστικής Coomassie Blue τόσο ώστε να καλύψει όλο το πήκτωμα.

3. Αφήνεται για επώαση υπό συνεχή ανάδευση στη μπαλαρίνα σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα.

4. Αμέσως μετά απομακρύνεται η χρωστική, ξεπλένεται με απιονισμένο νερό 2-3 φορές και προστίθεται διάλυμα αποχρωματισμού για τη χρωστική Coomassie Blue τόσο ώστε να καλύψει όλο το πήκτωμα. Το διάλυμα αποχρωματισμού παρασκευάζεται με τα ακόλουθα χημικά αντιδραστήρια:

- I. 20% Μεθανόλη
- II. 10% Οξικό οξύ
- III. 70% Δις-απεσταγμένο νερό

5. Αφήνεται όλη νύχτα για επώαση υπό συνεχή ανάδευση στη μπαλαρίνα στους 4°C.

6. Τέλος απομακρύνεται το διάλυμα αποχρωματισμού και ξεπλένεται με απιονισμένο νερό 1-2 φορές. Αν έχουν μείνει πρωτεΐνες στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης έχουν χρωματιστεί με Coomassie Blue και πλέον είναι ορατές.

3.14. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η ποσοτικοποίηση των ανοσοαποτυπωμένων πρωτεϊνών γίνεται όπου κρίνεται απαραίτητο με τη χρήση του λογισμικού UVIsoft – UViband [49] και του ImageJ 1.50i και όλες οι ανοσοαποτυπωμένες πρωτεΐνες βαθμονομούνται σύμφωνα με την ανοσοαποτυπωμένη πρωτεΐνη GAPDH.

3.15. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΑΠΟ PVDF MEMBRANE (STRIPPING)

Αυτή η διαδικασία γίνεται όταν θέλουμε να αποδεσμεύσουμε από τη μεμβράνη PVDF ένα αντίσωμα προκειμένου να την επώασουμε με κάποιο άλλο. Η διαδικασία που ακολουθείται αναφέρεται πιο κάτω.

1. Ετοιμάζεται το stripping buffer με τα ακόλουθα χημικά αντιδραστήρια:
 - I. 20ml SDS 10%
 - II. 12,5ml Tris 0,5M
 - III. 700μl β-mercaptoethanol
 - IV. 66,8ml Δις-απιονισμένο νερό
2. Σε falcon προστίθεται stripping buffer, τοποθετείται μέσα προσεκτικά η μεμβράνη και κλείνεται πολύ καλά.
3. Τοποθετείται σε υδατόλουτρο, με τη μισή επιφάνεια να βρίσκεται μέσα στο νερό υπό συνεχή ανάδευση για 30 λεπτά στους 56°C.
4. Αμέσως μετά ακολουθούν 3 εκπλύσεις με TBS-T για 5 λεπτά η κάθε μία.
5. Στη συνέχεια γίνεται επώαση με 5% TBS-T σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση στη μπαλαρίνα (block).
6. Αφαιρείται το 5% TBS-T και προστίθεται το αντίσωμα με το οποίο θέλουμε να γίνει επώαση. Αφήνεται όλη νύχτα στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση στη μπαλαρίνα.
7. Ακολουθεί η διαδικασία που αναγράφεται στο υποκεφάλαιο 3.12 από το βήμα 15-18.

3.16. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

Από την εταιρία Sigma-Aldrich προμηθευτήκαμε sodium dodecyl sulfate (SDS), protease inhibitor cocktail, μεθανόλη, αιθανόλη, ammonium persulfate (APS), οξικό οξύ, σουλφοροδαμίνη Β (SRB), L-γλουταμίνη, γλυκίνη, τριχλωροοξικό οξύ (TCA), δευτερογενή αντισώματα anti-mouse IgG και anti-rabbit IgG.

Από την εταιρία Thermo Fisher Scientific προμηθευτήκαμε Tween 20, 96-well plates, χρωστική ουσία coomassie brilliant blue R-250, ECL western blotting substrate, το σετ για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών (Bradford) και την μεμβράνη διφθοριούχου πολυβινυλιδενίου (PVDF) που χρησιμοποιήθηκε κατά τη western blot analysis.

Από την Applichem προμηθευτήκαμε TEMED, χρωστική ουσία ponceau S και bromophenol blue.

Από την εταιρία Scharlab προμηθευτήκαμε Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane και από την Nippon Genetics τον μάρτυρα που χρησιμοποιήθηκε κατά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών (BlueStar Prestained Protein Marker Plus).

Τα αντισώματα p70 S6 kinase (49D7) και Phospho p70 S6 kinase (T389), όπως επίσης RIPA 10x και phosphatase inhibitor τα προμηθευτήκαμε από την εταιρία Cell Signaling.

Τα αντισώματα RSK-2 (E-1), P-RSK (Ser227) και P-RSK-2 (F-7) τα προμηθευτήκαμε από την εταιρία Santa Cruz Biotechnology και από την εταιρία Biolegend προμηθευτήκαμε το αντίσωμα GAPDH.

Από τη Biorad laboratories προμηθευτήκαμε Acrylamide Bis 30%, από την εταιρία Merck προμηθευτήκαμε 2-β-μερκαπτοαιθανόλη, από την Fluka Chemika χλωριούχο νάτριο και από την εταιρία Carl Roth προμηθευτήκαμε γλυκερίνη.

Από τους αναστολείς προμηθευτήκαμε τον SL 0101-1 από την Tocris bioscience, τον T-ac από την Extrasynthese και τους υπόλοιπους από την Adooq.

Τα falcon, τις φλάσκες και τις πιπέτες τα προμηθευτήκαμε από την εταιρία Corning ενώ τις πιπέτες τύπου Tipor-V από την Orange scientific. Τα κρυσταλλικά τα προμηθευτήκαμε από την εταιρία Sarstedt.

Το διμεθυσουλφοξείδιο (DMSO) το προμηθευτήκαμε από την Acros Organics και από την εταιρία Biochrom προμηθευτήκαμε τη χρωστική ουσία Trypan Blue και το αντιβιοτικό διάλυμα Penicillin/Streptomycin.

Από την εταιρία Biosera προμηθευτήκαμε τον εμβρυϊκό ορό μοσχαριού (FBS) και την θρυψίνη ενώ το PBS και το θρεπτικό υλικό RPMI 1640 τα προμηθευτήκαμε από την Gibco.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το σημείο αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του ποσοστού για κάθε συγκέντρωση, στη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταροτοξικότητας των καρκινικών κυττάρων, ήταν τα κύτταρα μάρτυρες στα οποία προστέθηκε μόνον η αντίστοιχη ποσότητα θρεπτικού υλικού.

Από τις τιμές της οπτικής απορρόφησης που λαμβάνονταν κάθε φορά από την φασματοφωτομετρική μέτρηση, για κάθε μικροκυψελίδα, σχεδιάστηκε μια καμπύλη βαθμονόμησης στην οποία υπολογιζόταν η ποσοστιαία ανάπτυξη των κυττάρων (Growth Rate %) για κάθε συγκέντρωση του κάθε αναστολέα που έχει χρησιμοποιηθεί.

Τα αποτελέσματα που παρατίθενται υπολογίζονταν κάθε φορά με τον ίδιο τρόπο και αποτελούν τη μέση τιμή από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα. Έτσι, για κάθε συγκέντρωση του κάθε αναστολέα παρασκευάζονταν τρεις μικροκυψελίδες, καταχωρούνταν οι τιμές της απορρόφησης και για τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά ο μέσος όρος αυτών.

Για την μελέτη της ποσοτικής έκφρασης των πρωτεϊνών της p70rsk και της p90rsk με ανοσοαποτύπωση όλες οι ανοσοαποτυπωμένες πρωτεΐνες που μελετήθηκαν βαθμονομούνται σύμφωνα με την ανοσοαποτυπωμένη πρωτεΐνη GAPDH. Το ίδιο ισχύει και για την πρωτεϊνική έκφραση της p70rsk και της p90rsk μετά από επώαση με τον αναστολέα T-ac σε συγκέντρωση 20μM (treated). Καλλιέργειες κυττάρων που επώαστηκαν μόνο με θρεπτικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (control). Τα αποτελέσματα που παρατίθενται υπολογίζονταν κάθε φορά με τον ίδιο τρόπο και αποτελούν τη μέση τιμή από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα. Η ανάλυση όλων των αποτελεσμάτων έγινε το πρόγραμμα ImageJ 1.50i, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA.

4.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ

Η κυτταρική σειρά PTC έδειξε υψηλή ευαισθησία απέναντι στους αναστολείς BI-D 1870, BX-912, GSK2334470 και T-ac ενώ η κυτταρική σειρά 8505C έδειξε υψηλότερη ευαισθησία στους αναστολείς BX-912, T-ac και GSK2334470.

Τη σημαντικότερη δράση από όλους τους αναστολείς εμφάνισε ο αναστολέας T-ac, καθώς είχε την χαμηλότερη τιμή στην παράμετρο GI50 και για τις δύο καρκινικές κυτταρικές

σειρές. Ανάμεσα στις δυο κυτταρικές σειρές ωστόσο μεγαλύτερη ευαισθησία στον αναστολέα T-ac εμφανίζεται να έχει η κυτταρική σειρά 8505C.

Καμία δραστικότητα δεν εμφανίζεται να έχουν οι αναστολείς FMK και SL 0101-1.

Κανένας αναστολέας δεν εμφάνισε αξιόλογη κυτταροτοξική δράση και για τις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Τα αποτελέσματα των παραμέτρων, αναστολή ανάπτυξης κατά 50% (GI50), ολική αναστολή ανάπτυξης (TGI), θανατηφόρα συγκέντρωση κατά 50% (LC50) και θεραπευτικός δείκτης (TI), από την μελέτη της κυτταροτοξικότητας και της αντιπολλαπλασιαστικής δράσεις των αναστολέων έναντι των δύο ανθρώπινων θυρεοειδικών καρκινικών κυτταρικών σειρών παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

Στον Πίνακα 10 αναγράφονται αναλυτικά οι τιμές όλων των συγκεντρώσεων του κάθε αναστολέα για τους δύο θυρεοειδικούς καρκινικούς κυτταρικούς τύπους με μέγιστη συγκέντρωση 100μM και ελάχιστη 0,1μM.

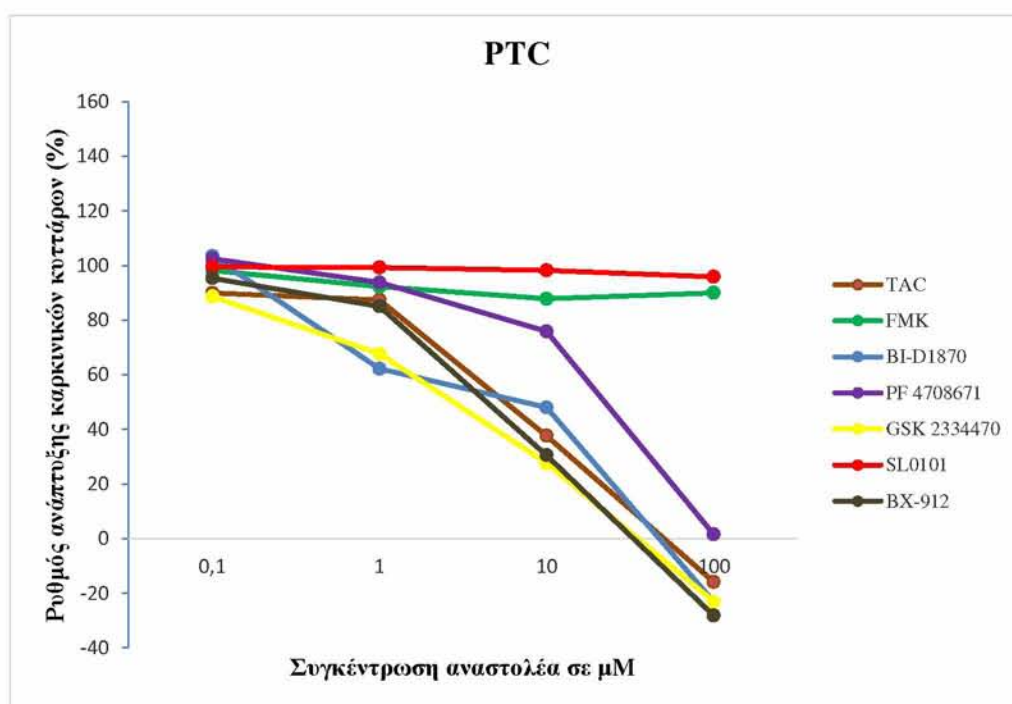
Πίνακας 9 : Κυτταροτοξική δράση των αναστολέων για τις θυρεοειδικές καρκινικές σειρές aPTC και 8505C

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	
		PTC	8505C
BI-D1870	GI50	8,8	17,3
	TGI	70,8	96,1
	LC50	>100	>100
	TI	11,4	5,8
BX-912	GI50	6,8	7,1
	TGI	56,9	91,6
	LC50	>100	>100
	TI	14,7	14,0
FMK	GI50	>100	>100
	TGI	>100	>100
	LC50	>100	>100
	TI	1,0	1,0
GSK 2334470	GI50	5,0	8,0
	TGI	59,0	>100
	LC50	>100	>100
	TI	20,1	12,5
PF 4708671	GI50	41,4	32,4
	TGI	101,9	78,8
	LC50	>100	>100
	TI	2,4	3,1
T-ac	GI50	4,6	2,5
	TGI	11,5	6,1
	LC50	79,3	>100
	TI	17,3	40,1
SL 0101-1	GI50	>100	>100
	TGI	>100	>100
	LC50	>100	>100
	TI	1,0	1,0

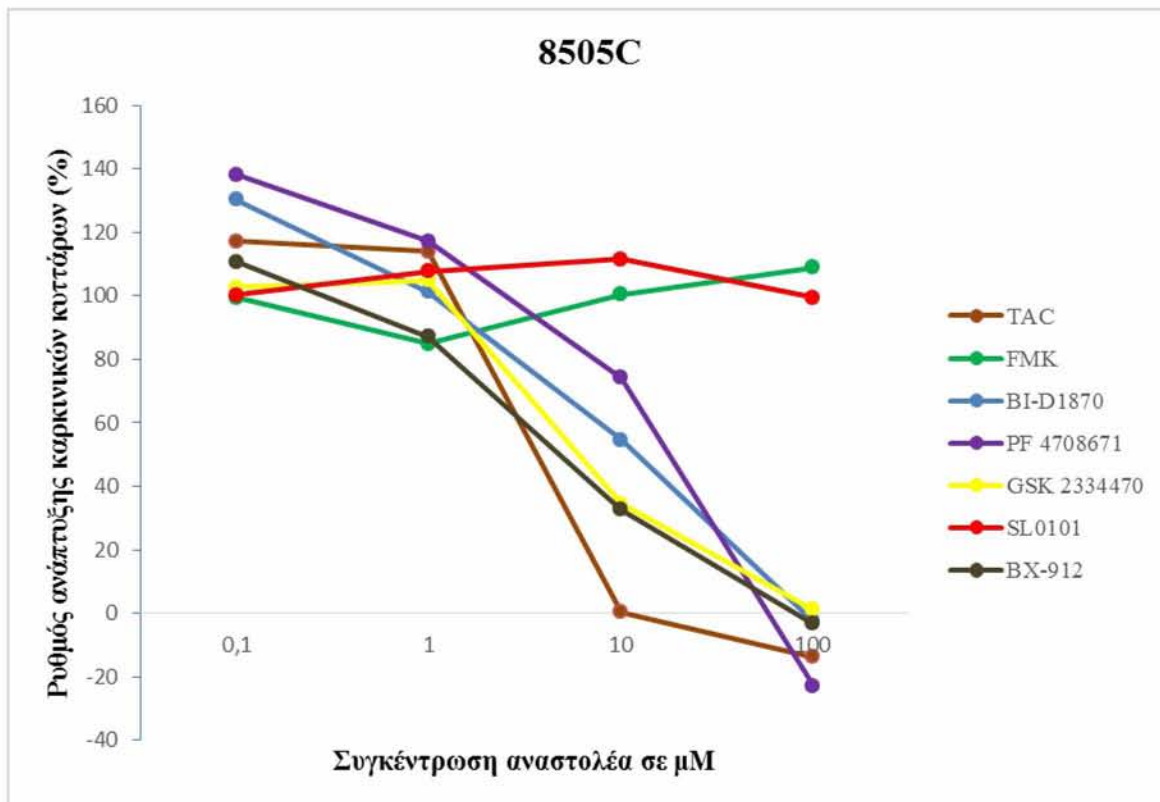
Πίνακας 10 : Ποσοστιαία ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων ανά συγκέντρωση του κάθε αναστολέα ανά καρκινικό κυτταρικό τύπο

ΚΥΤΤΑΡΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ	ΡΥΘΜΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (%) ΑΝΑ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ						
		BI-D1870	BX-912	FMK	GSK 2334470	PF 4708671	T-ac	SL 0101-1
aPTC	100μM	-23,1	-28,1	90,0	-23,1	1,6	-15,9	95,9
	10μM	48,1	30,6	87,9	27,6	75,9	37,7	98,2
	1μM	62,3	85,1	92,3	67,7	93,8	87,4	99,3
	0,1μM	103,5	95,4	98,2	88,7	102,5	90,0	99,5
8505C	100μM	-2,5	-3,4	108,9	1,2	-22,9	-13,7	99,5
	10μM	54,6	32,6	100,5	34,4	74,1	0,3	111,5
	1μM	101,3	87,2	84,9	104,9	117,2	113,9	107,7
	0,1μM	130,4	110,8	99,4	102,7	138,3	117,2	100,2

Ο ποσοστιαίος ρυθμός ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων για κάθε συγκέντρωση του κάθε αναστολέα, εκφραζόμενη σε μM, εμφανίζεται συγκεντρωτικά για τα καρκινικά κύτταρα aPTC στο Γράφημα 1 και για τα καρκινικά κύτταρα 8505C στο Γράφημα 2.



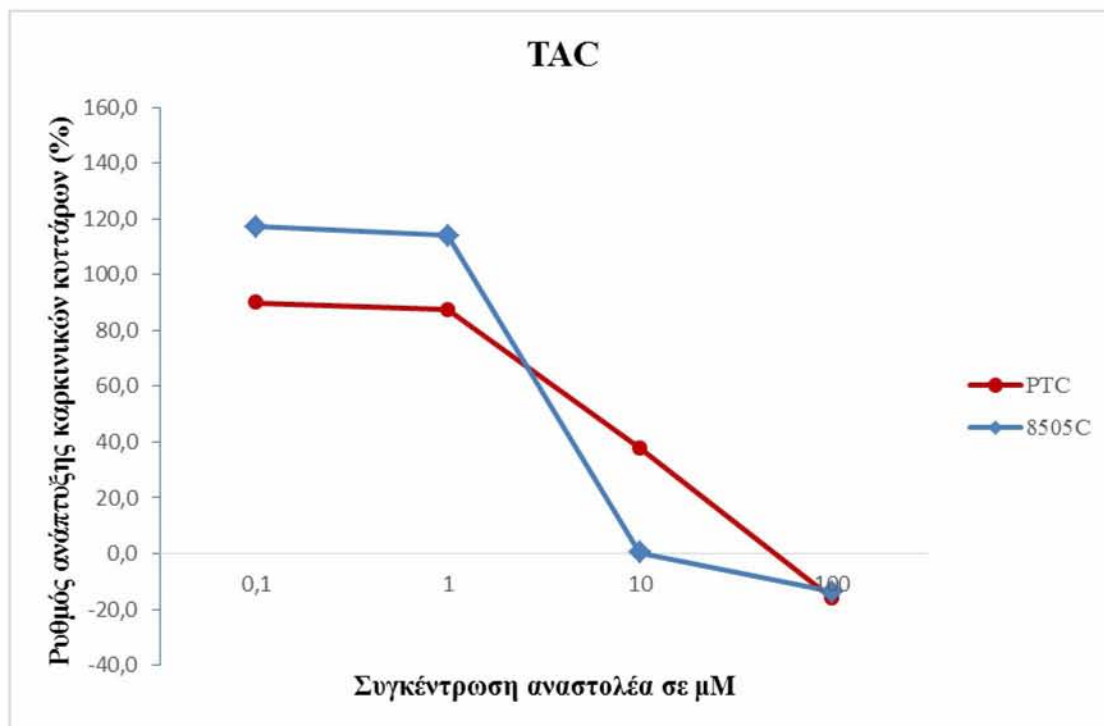
Γράφημα 1 : Καμπύλες ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων aPTC ανά αναστολέα μετά από επώαση τους για 48 ώρες με 4 αραιώσεις (100, 10, 1 και 0,1μM) του κάθε αναστολέα.



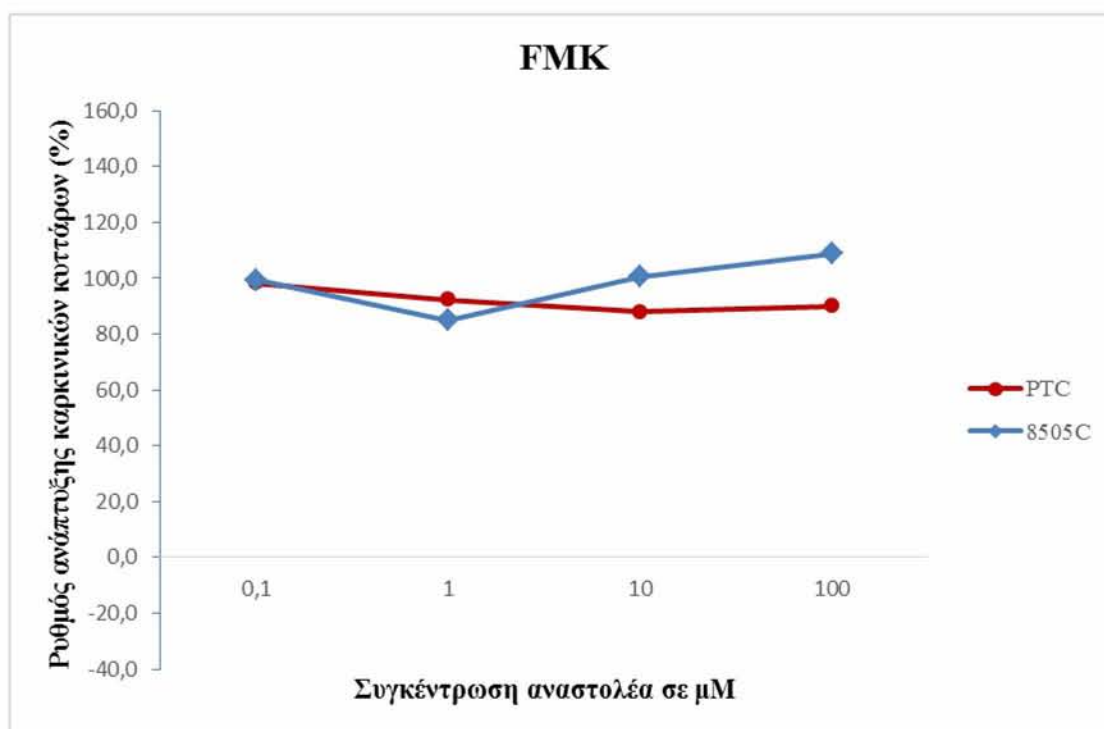
Γράφημα 2 : Καμπύλες ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων 8505C ανά αναστολέα μετά από επώαση τους για 48 ώρες με 4 αραιώσεις (100, 10, 1 και 0,1 μM) του κάθε αναστολέα

4.1.1. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΝΑ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ

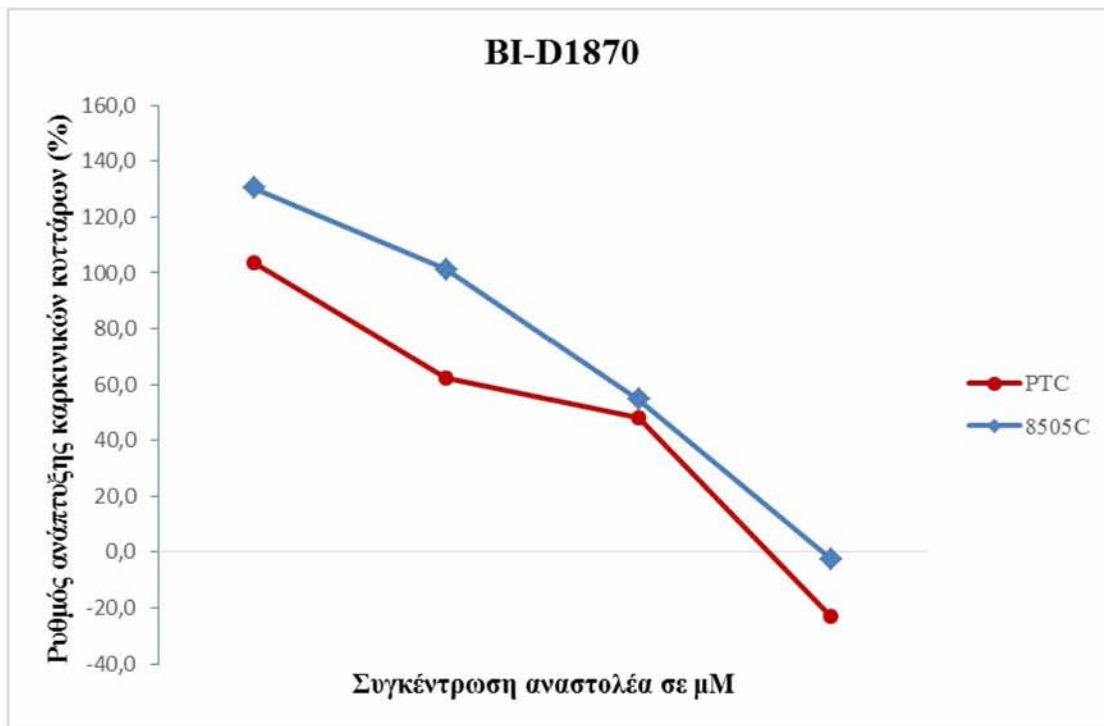
Στα Γραφήματα 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών, ύστερα από επώαση με τον κάθε αναστολέα για 48 ώρες στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις εκφρασμένες σε μM , στις οποίες φαίνεται η δραστικότητα του κάθε αναστολέα και στις δύο θυρεοειδικές καρκινικές κυτταρικές σειρές.



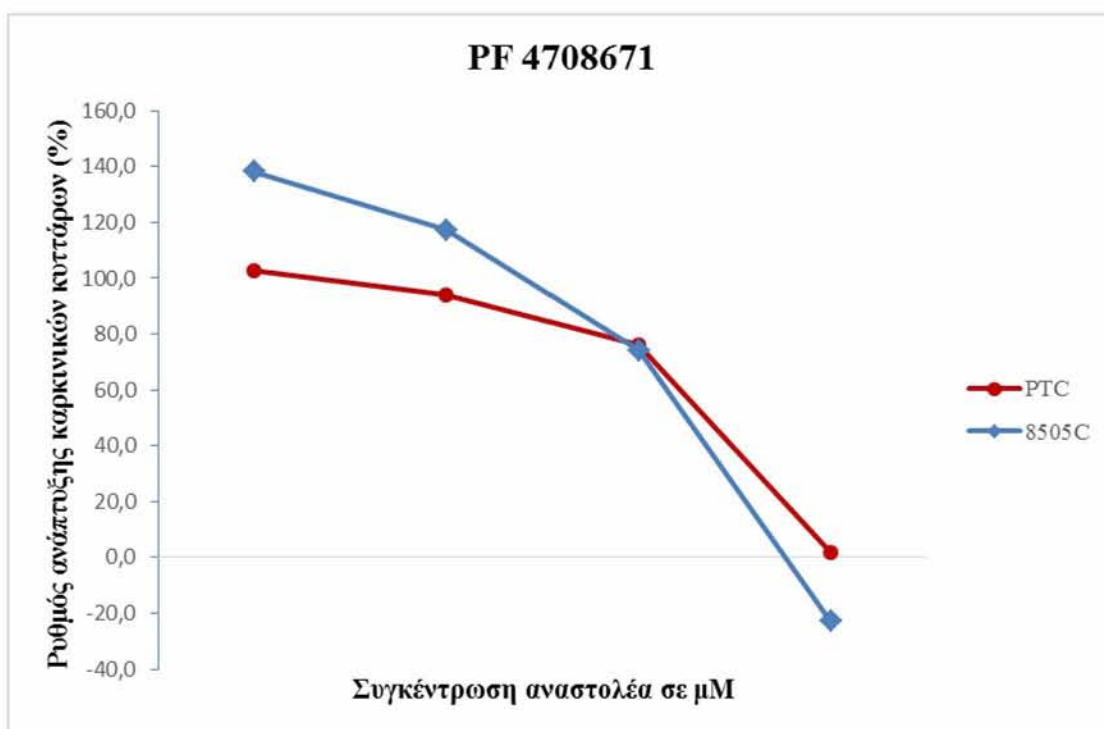
Γράφημα 3 : Καμπύλες ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών ύστερα από επώαση για 48 ώρες με τον αναστολέα Tac



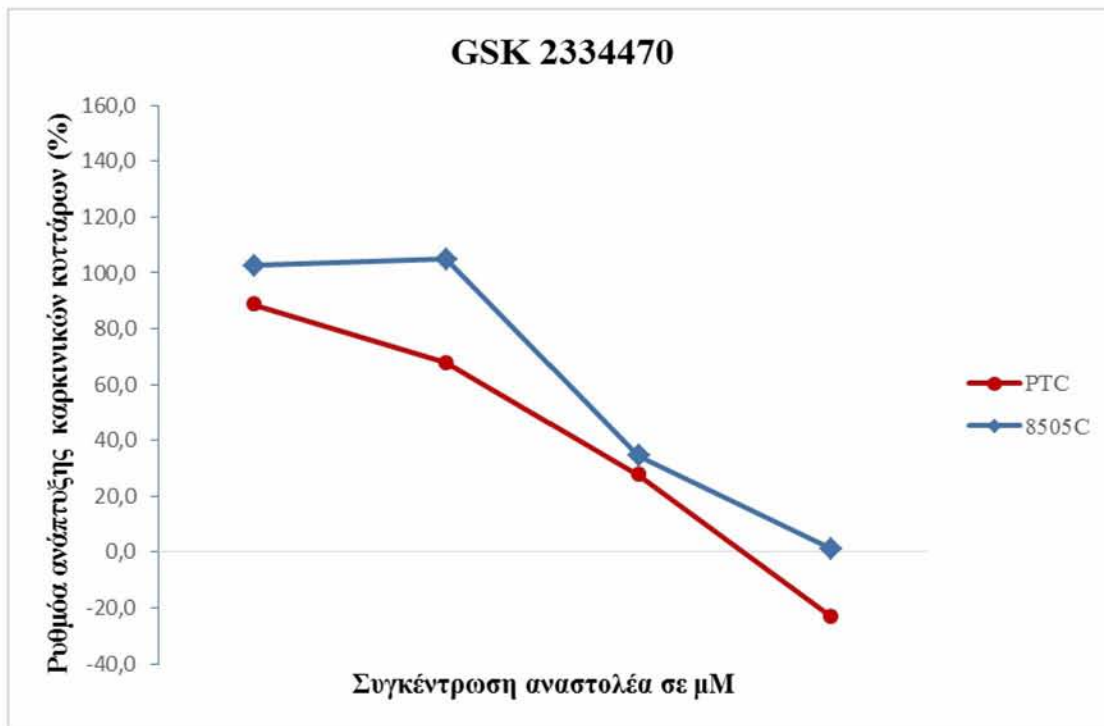
Γράφημα 4 : Καμπύλες ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών ύστερα από επώαση για 48 ώρες με τον αναστολέα FMK



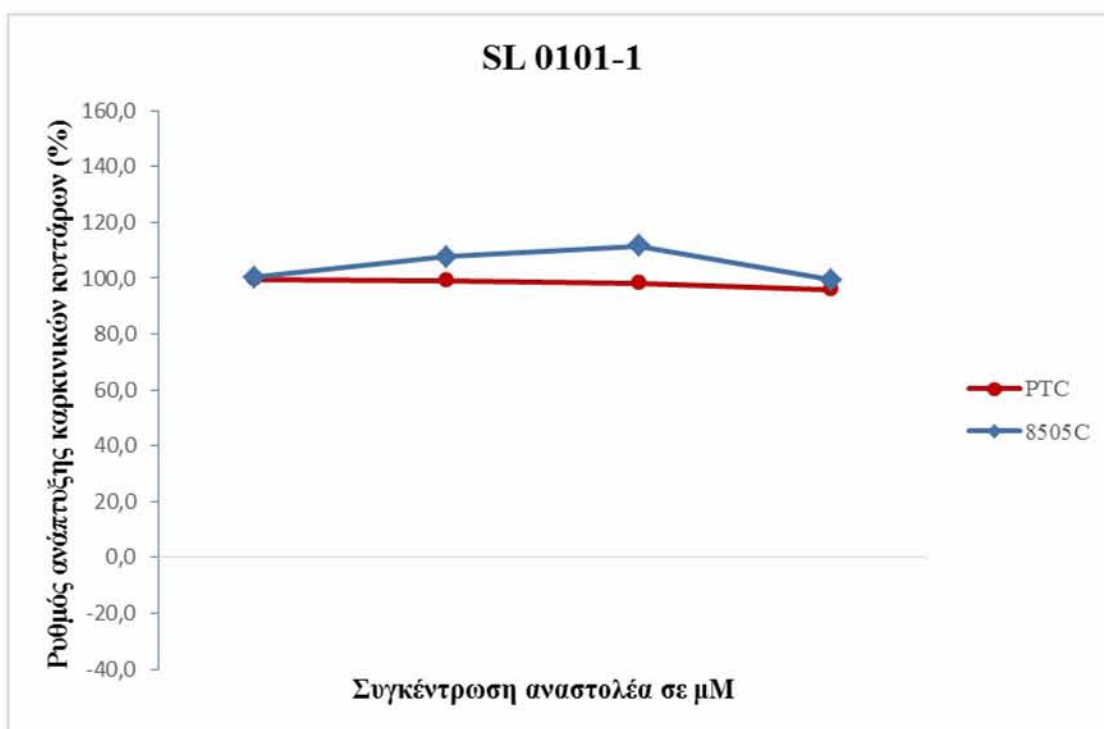
Γράφημα 5 : Καμπύλες ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών ύστερα από επώαση για 48 ώρες με τον αναστολέα BI-D1870.



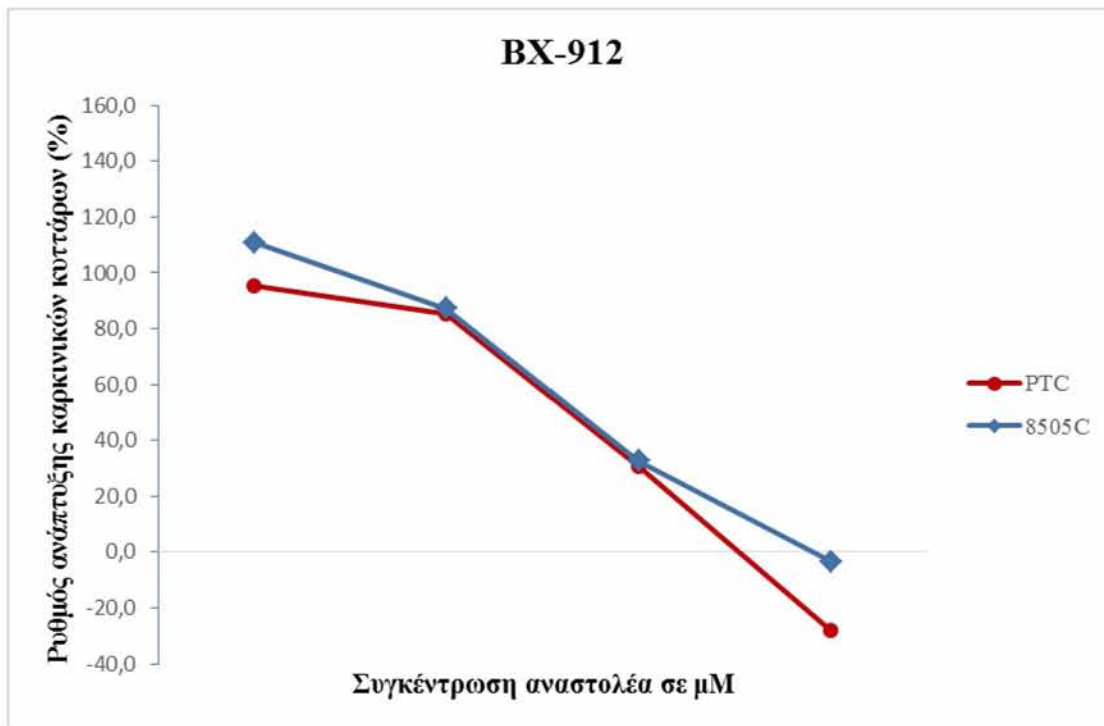
Γράφημα 6 : Καμπύλες ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών ύστερα από επώαση για 48 ώρες με τον αναστολέα PF 4708671



Γράφημα 7 : Καμπύλες ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών ύστερα από επώαση για 48 ώρες με τον αναστολέα GSK 2334470



Γράφημα 8 : Καμπύλες ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών ύστερα από επώαση για 48 ώρες με τον αναστολέα SL 0101-1



Γράφημα 9 : Καμπύλες ανάπτυξης των δύο κυτταρικών σειρών ύστερα από επώαση για 48 ώρες με τον αναστολέα BX-912

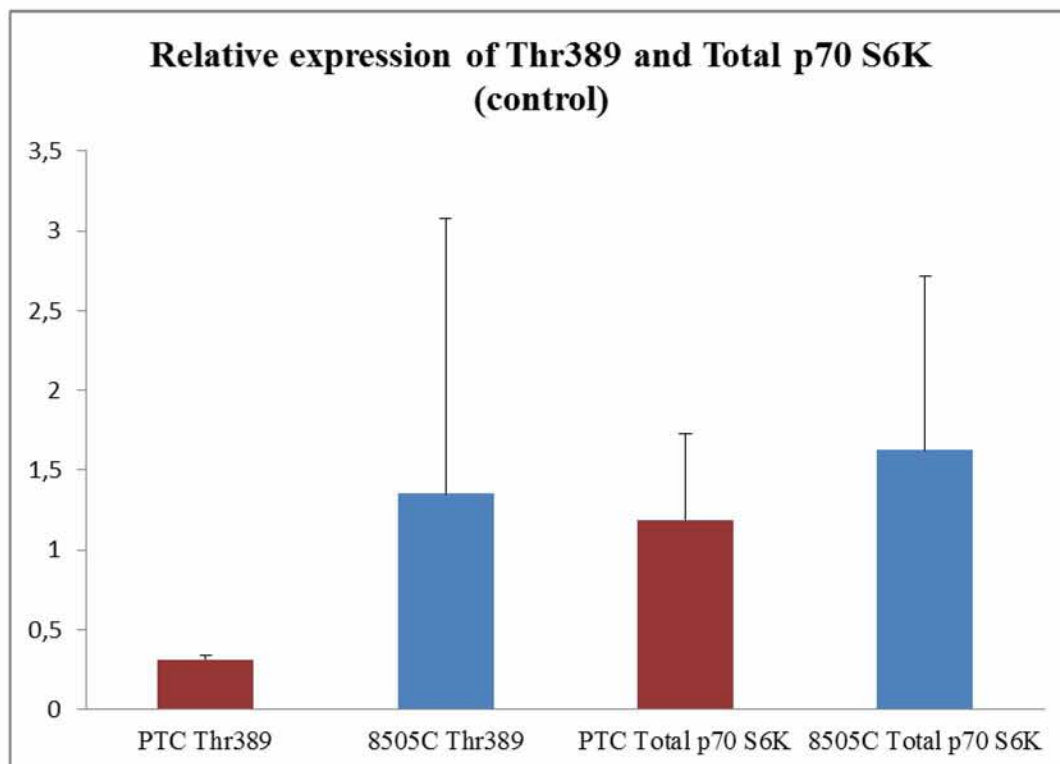
4.2. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ p70RSK ΜΕ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ

Στον Πίνακα 11 αναγράφονται αναλυτικά οι μέσες τιμές και οι τιμές των τυπικών αποκλίσεων, από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα της φωσφορυλιωμένης μορφής της p70 S6K (Thr389) και της ολικής p70 S6K (control), που προέκυψαν από την ανάλυση των δύο κυτταρικών δειγμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά την επώαση μόνο με θρεπτικό υλικό.

Στο Γράφημα 10 παρουσιάζονται οι διαγραμματικές απεικονίσεις των δύο κυτταρικών σειρών, από τις οποίες αναλύθηκαν δείγματα κυττάρων με ανοσοαποτύπωση, για τον έλεγχο της πρωτεϊνικής έκφρασης της φωσφορυλιωμένης μορφής της p70 S6K (Thr389) και της ολικής p70 S6K (control) κατά την επώαση μόνο με θρεπτικό υλικό.

Πίνακας 11 : Εμφάνιση μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα της φωσφορυλιωμένης μορφής της p70 (Thr389) και της ολικής p70 κατά την επώαση μόνο με θρεπτικό υλικό

	<u>ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ (control)</u>			
	<u>aPTC</u>		<u>8505C</u>	
	<u>Thr389</u>	<u>Total p70 S6K</u>	<u>Thr389</u>	<u>Total p70 S6K</u>
AVERAGE	0,31	1,19	1,35	1,63
STDEV	0,03	0,54	1,73	1,09



Γράφημα 10 : Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της Phospho p70 (Thr389) και της ολικής p70 S6K και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές

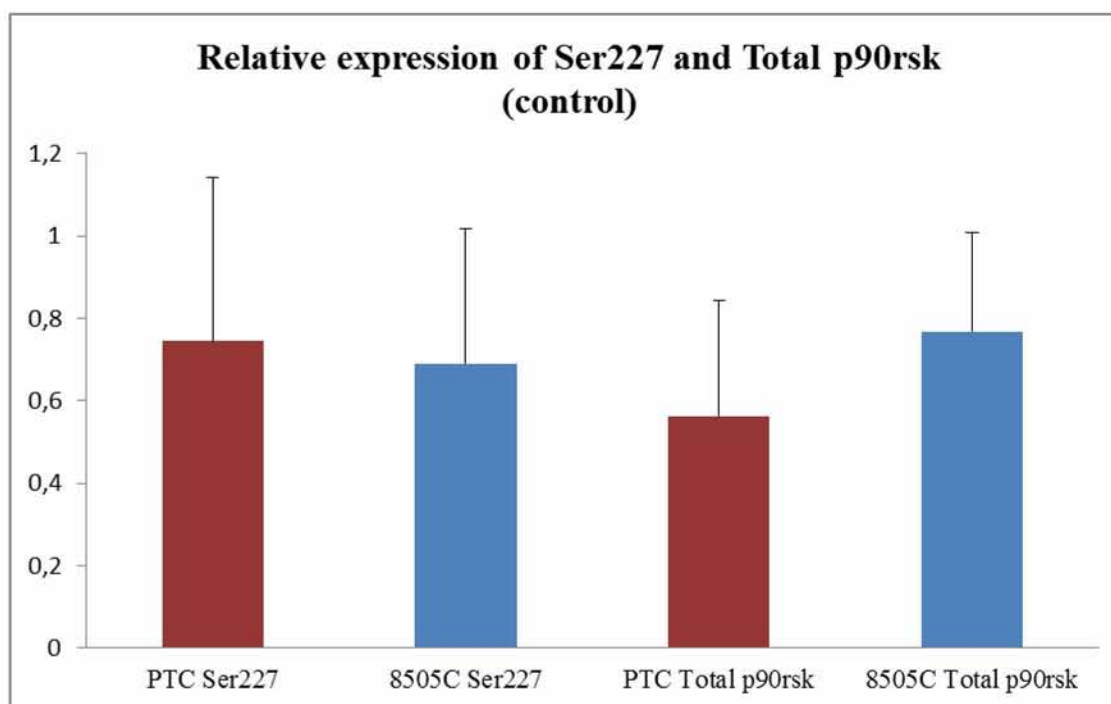
4.3. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ p90RSK ΜΕ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ

Στους Πίνακες 12, 13 αναγράφονται αναλυτικά οι μέσες τιμές και οι τιμές των τυπικών αποκλίσεων, από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα της φωσφορυλιωμένης μορφής της p90rsk (Thr577 και Ser227) και της ολικής p90rsk (control), που προέκυψαν από την ανάλυση των δύο κυτταρικών δειγμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά την επώαση μόνο με θρεπτικό υλικό.

Στα Γραφήματα 11, 12, παρουσιάζονται οι διαγραμματικές απεικονίσεις των δύο κυτταρικών σειρών, από τις οποίες αναλύθηκαν δείγματα κυττάρων με ανοσοαποτύπωση, για τον έλεγχο της πρωτεϊνικής έκφρασης της φωσφορυλιωμένης μορφής της p90rsk (Thr577 και Ser227) και της ολικής p90rsk (control) κατά την επώαση μόνο με θρεπτικό υλικό.

Πίνακας 12 : Εμφάνιση μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα της φωσφορυλιωμένης μορφής της p90 (Ser227) και της ολικής p90 κατά την επώαση μόνο με θρεπτικό υλικό

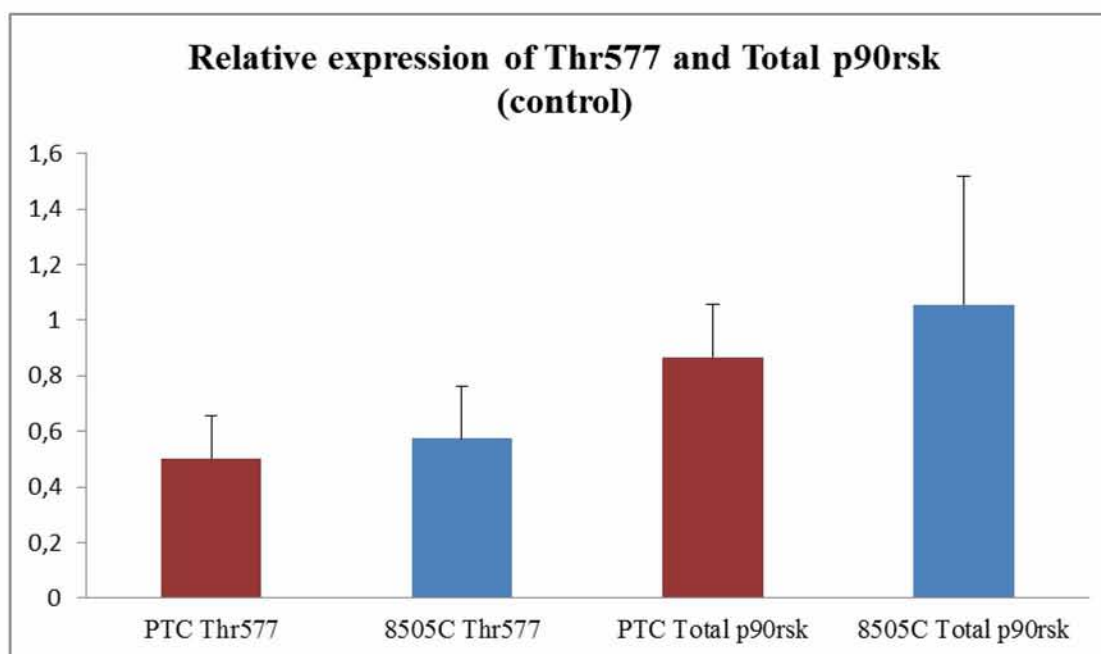
	<u>ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ (control)</u>			
	<u>aPTC</u>		<u>8505C</u>	
	<u>Ser227</u>	<u>Total p90rsk</u>	<u>Ser227</u>	<u>Total p90rsk</u>
AVERAGE	0,75	0,56	0,69	0,77
STDEV	0,40	0,28	0,33	0,24



Γράφημα 11 : Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της Phospro p90 (Ser227) και της ολικής p90rsk και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές

Πίνακας 13 : Εμφάνιση μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα της φωσφορυλιωμένης μορφής της p90 (Thr577) και της ολικής p90 κατά την επώαση μόνο με θρεπτικό υλικό

	<u>ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ (control)</u>			
	<u>aPTC</u>		<u>8505C</u>	
	<u>Thr577</u>	<u>Total p90rsk</u>	<u>Thr577</u>	<u>Total p90rsk</u>
AVERAGE	0,50	0,87	0,57	1,06
STDEV	0,15	0,19	0,19	0,46



Γράφημα 12 : Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της Phospro p90 (Thr577) και της ολικής p90rsk και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές

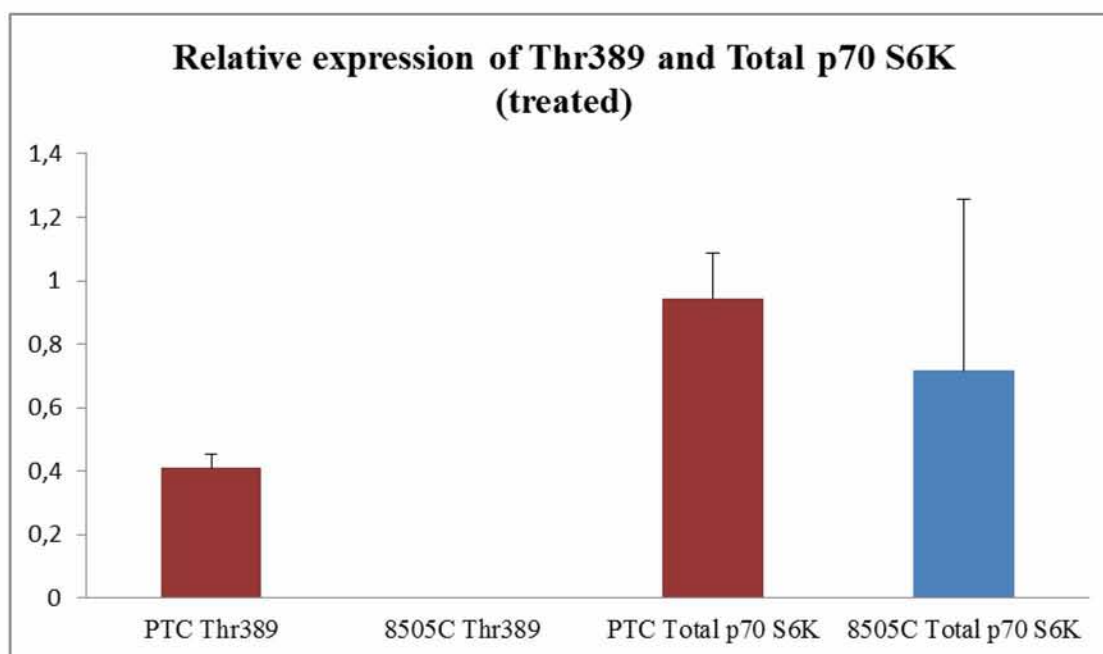
4.4. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ p90RSK ΚΑΙ ΤΗΣ p70RSK ΜΕ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ Tac

Στους Πίνακες 14, 15, 16 αναγράφονται αναλυτικά οι μέσες τιμές και οι τιμές των τυπικών αποκλίσεων, από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα της φωσφορυλιωμένης μορφής της p70 (Thr389) της p90rsk (Thr577 και Ser227) και της ολικής p70 S6K και p90rsk αντίστοιχα (treated), που προέκυψαν από την ανάλυση των δύο κυτταρικών δειγμάτων με ανοσοαποτύπωση, αφού προηγήθηκε επώαση για 4 ώρες με τον αναστολέα Tac σε συγκέντρωση 20μM.

Στα Γραφήματα 13, 14, 15 παρουσιάζονται οι διαγραμματικές απεικονίσεις των δύο κυτταρικών σειρών, από τις οποίες αναλύθηκαν δείγματα κυττάρων με ανοσοαποτύπωση, αφού προηγήθηκε επώαση για 4 ώρες με τον αναστολέα Tac σε συγκέντρωση 20μM, για τον έλεγχο της πρωτεϊνικής έκφρασης της φωσφορυλιωμένης μορφής της p70rsk (Thr389) και της p90rsk (Thr577 και Ser227) και της ολικής p70 και p90 αντίστοιχα (treated).

Πίνακας 14 : Εμφάνιση μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα της φωσφορυλιωμένης μορφής της p70 (Thr389) και της ολικής p70 ύστερα από επώαση με T-ac 20μM για 4 ώρες

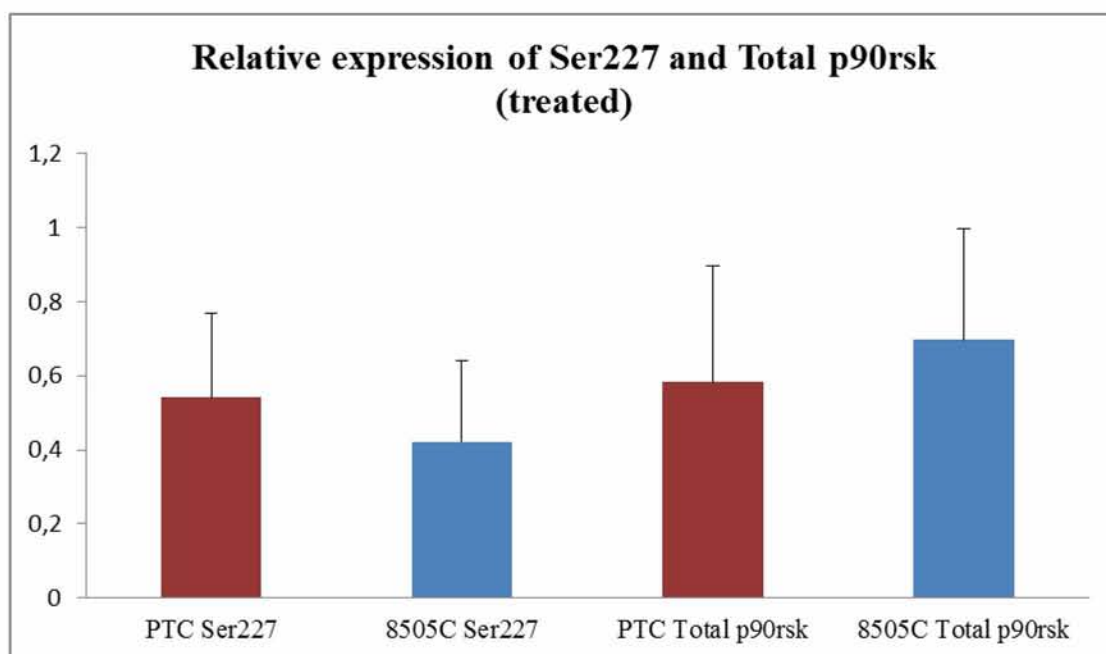
	<u>ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ (treated)</u>			
	<u>aPTC</u>		<u>8505C</u>	
	<u>Thr389</u>	<u>Total p70 S6K</u>	<u>Thr389</u>	<u>Total p70 S6K</u>
AVERAGE	0,41	0,94	0	0,72
STDEV	0,04	0,14	-	0,54



Γράφημα 13 : Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της Phospro p70 (Thr389) και της ολικής p70 S6K και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές ύστερα από επώαση με T-ac 20μM για 4 ώρες

Πίνακας 15 : Εμφάνιση μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα της φωσφορυλιωμένης μορφής της p90 (Ser227) και της ολικής p90 ύστερα από επώαση με T-ac 20μM για 4 ώρες

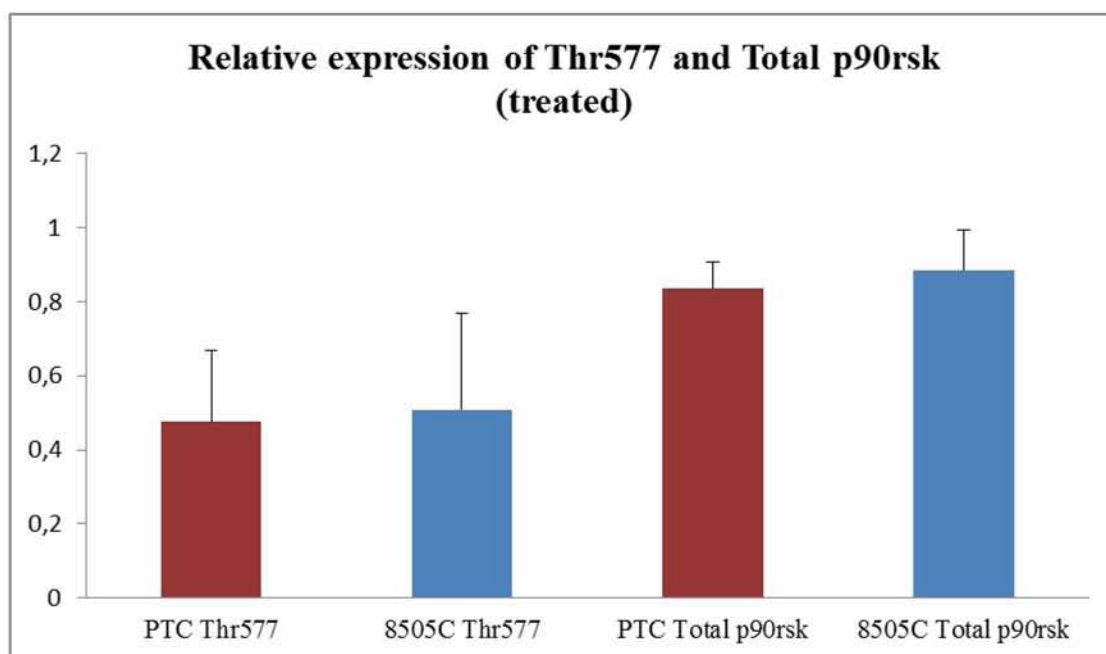
	<u>ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ (treated)</u>			
	<u>aPTC</u>		<u>8505C</u>	
	<u>Ser227</u>	<u>Total p90rsk</u>	<u>Ser227</u>	<u>Total p90rsk</u>
AVERAGE	0,54	0,58	0,42	0,70
STDEV	0,23	0,31	0,22	0,30



Γράφημα 14 : Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της Phospro p90 (Ser227) και της ολικής p90rsk και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές ύστερα από επώαση με T-ac 20μM για 4 ώρες

Πίνακας 16 : Εμφάνιση μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα της φωσφορυλιωμένης μορφής της p90 (Thr577) και της ολικής p90 ύστερα από επώαση με T-ac 20μM για 4 ώρες

	<u>ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ (treated)</u>			
	<u>aPTC</u>		<u>8505C</u>	
	<u>Thr577</u>	<u>Total p90rsk</u>	<u>Thr577</u>	<u>Total p90rsk</u>
AVERAGE	0,48	0,84	0,51	0,89
STDEV	0,19	0,07	0,26	0,11



Γράφημα 15 : Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της Phospro p90 (Thr577) και της ολικής p90rsk και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές ύστερα από επώαση με T-ac 20μM για 4 ώρες

4.5. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΗ ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η p70 δεν εμφανίζει μεγάλες διαφορές μεταξύ της ολικής και της φωσφορυλιωμένης μορφής στα controls της κυτταρικής σειράς 8505C σε αντίθεση με την κυτταρική σειρά aPTC. Στα aPTC η διαφορά μεταξύ control – treated είναι μικρή σε αντίθεση με την κυτταρική σειρά 8505C, όπου η διαφορά είναι πολύ μεγάλη και αυτό φαίνεται κυρίως στα treated όπου η φωσφορυλιωμένη μορφή δεν εκφράζεται σε αντίθεση με τα control. Μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων οι μεγαλύτερες διαφορές εντοπίζονται μεταξύ των controls. Επίσης μεγάλες διαφορές εμφανίζονται στα treated και των δύο κυτταρικών σειρών όπου η εκφραστικότητα των πρωτεϊνών μειώνεται (Γράφημα 16).

Στην p90 η έκφραση της Thr577 στα control και στα treated στις δύο κυτταρικές σειρές είναι παρόμοια, με εμφάνιση ελάχιστης μείωσης στα treated. Ακριβώς με τον ίδιο τρόπο συμπεριφέρεται και η ολική πρωτεΐνη (Γράφημα 17).

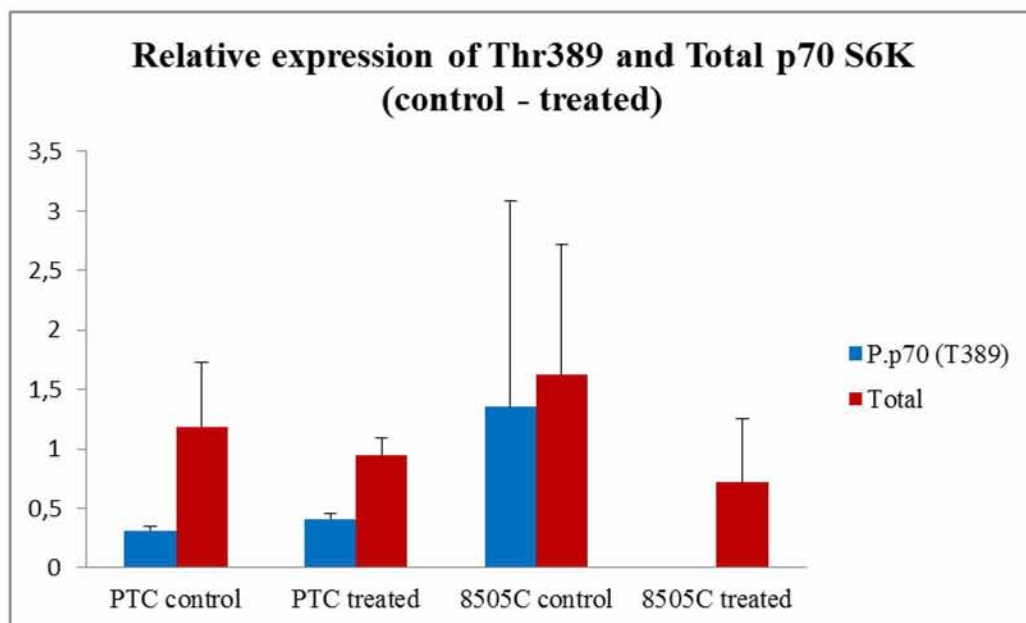
Αντίθετα παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στη Ser 227. Στα treated φαίνεται να μειώνεται η έκφρασή της σε αντίθεση με τα control που είναι πιο αυξημένη και στις δύο κυτταρικές σειρές. Αντίστοιχη συμπεριφορά παρατηρείται και στην total. Μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών, μικρότερες διαφορές παρατηρούνται μεταξύ control και treated στα aPTC σε αντίθεση με τα 8505C όπου η διαφορά είναι πολύ μεγαλύτερη και ειδικά στη Ser227 μετά την επώση με T-ac 20μM για 4 ώρες (Γράφημα 18).

Στα Γραφήματα 16, 17, 18 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά όλες οι διαγραμματικές απεικονίσεις των δύο κυτταρικών σειρών, ύστερα από επώση με τον αναστολέα T-ac σε συγκέντρωση 20μM για 4 ώρες (treated) και χωρίς επώση (control).

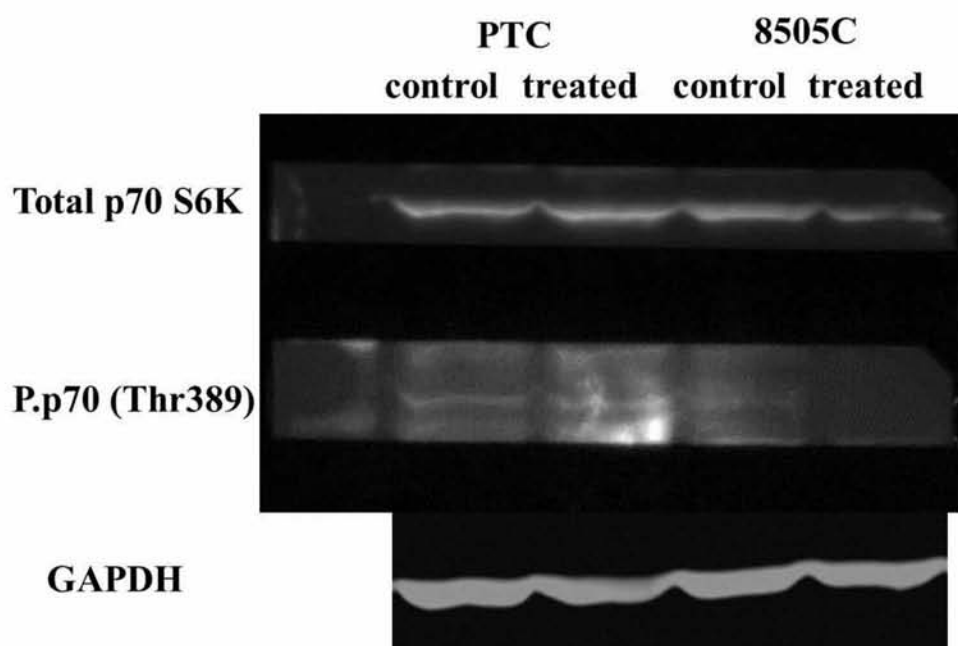
Στον Πίνακα 17 φαίνεται η ποσοστιαία μεταβολή της κάθε φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης συγκριτικά προς την αντίστοιχη ολική πρωτεΐνη.

Στο Γράφημα 19 παρουσιάζεται η διαγραμματική απεικόνιση του λόγου της έκφρασης της κάθε φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης προς την αντίστοιχη ολική πρωτεΐνη και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές, aPTC και 8505C, ύστερα από επώση με T-ac 20μM για 4 ώρες (treated) και χωρίς επώση (control).

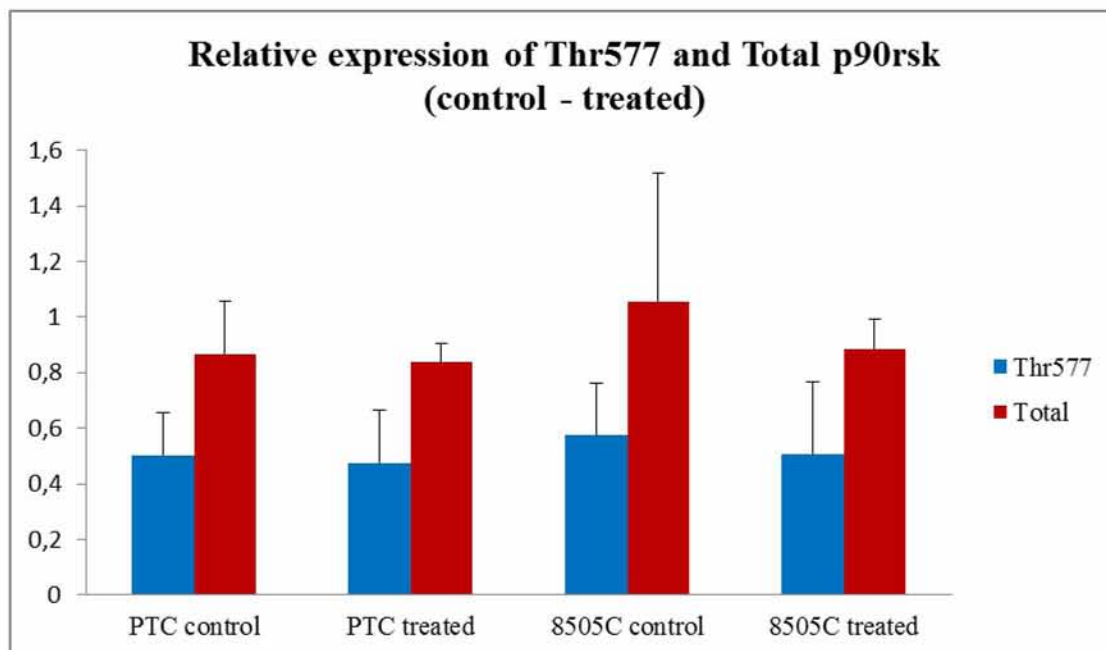
Στις Εικόνες 23, 24, 25 εμφανίζεται η έκφραση των ανοσοαποτυπωμένων πρωτεϊνών της φωσφορυλιωμένης μορφής της p70rsk (Thr389) και της p90rsk (Ser227, Thr577) και των αντίστοιχων ολικών πρωτεϊνών όπως και του GAPDH και για τις δύο θυρεοειδικές καρκινικές κυτταρικές σειρές. Στις εικόνες φαίνεται η έκφραση των πρωτεϊνών μετά από επώση με τον αναστολέα T-ac σε συγκέντρωση 20μM (treated) αλλά και μετά από επώση μόνο με θρεπτικό υλικό (control).



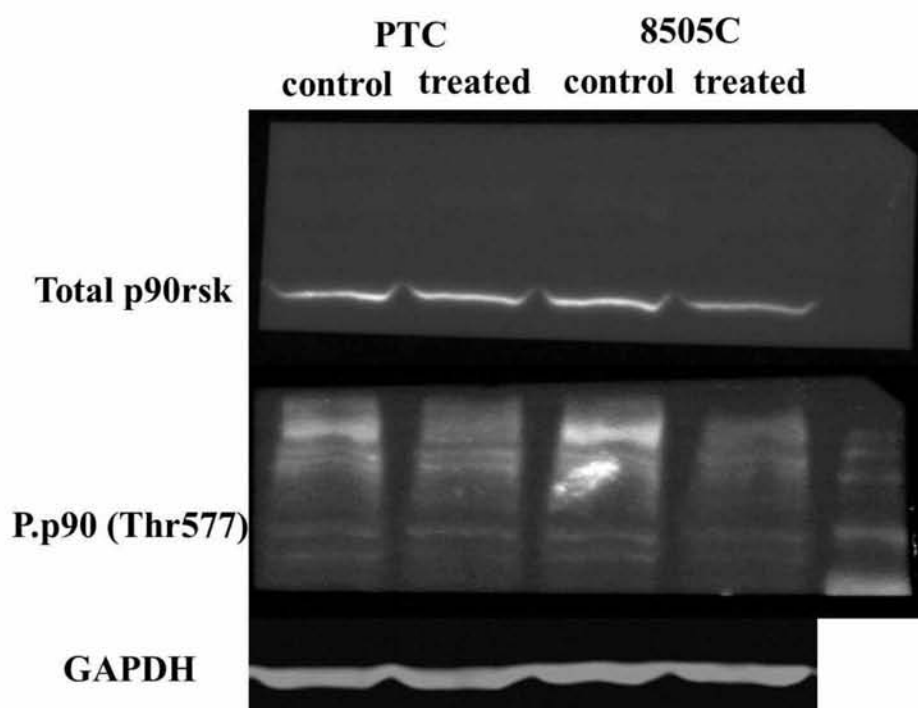
Γράφημα 16 : Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της Phospho p70 (Thr389) και της ολικής p70 S6K και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές ύστερα από επώαση με T-ac 20μM για 4 ώρες και χωρίς επώαση (treated - control)



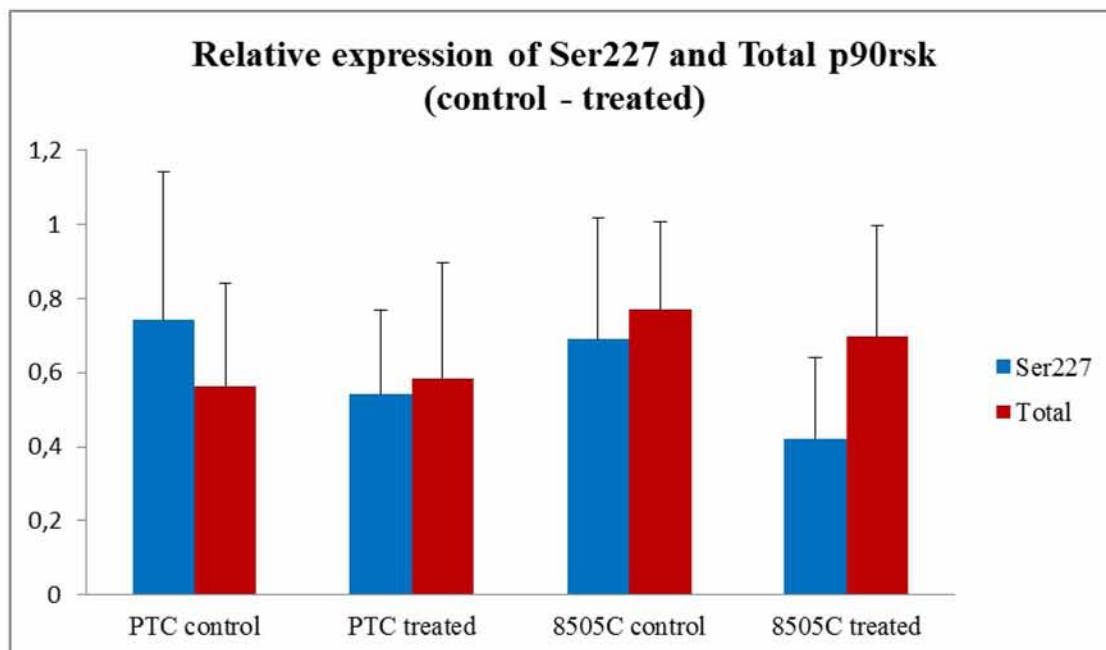
Εικόνα 23 : έκφραση των ανοσοαποτυπωμένων πρωτεϊνών της φωσφορυλιωμένης μορφής της p70rsk (Thr389), της ολικής p70 S6K και του GAPDH, για τις δύο θυρεοειδικές καρκινικές κυτταρικές σειρές (aPTC, 8505C), μετά από επώαση με τον αναστολέα T-ac σε συγκέντρωση 20μM (treated) αλλά και μετά από επώαση μόνο με θρεπτικό υλικό (control). Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα



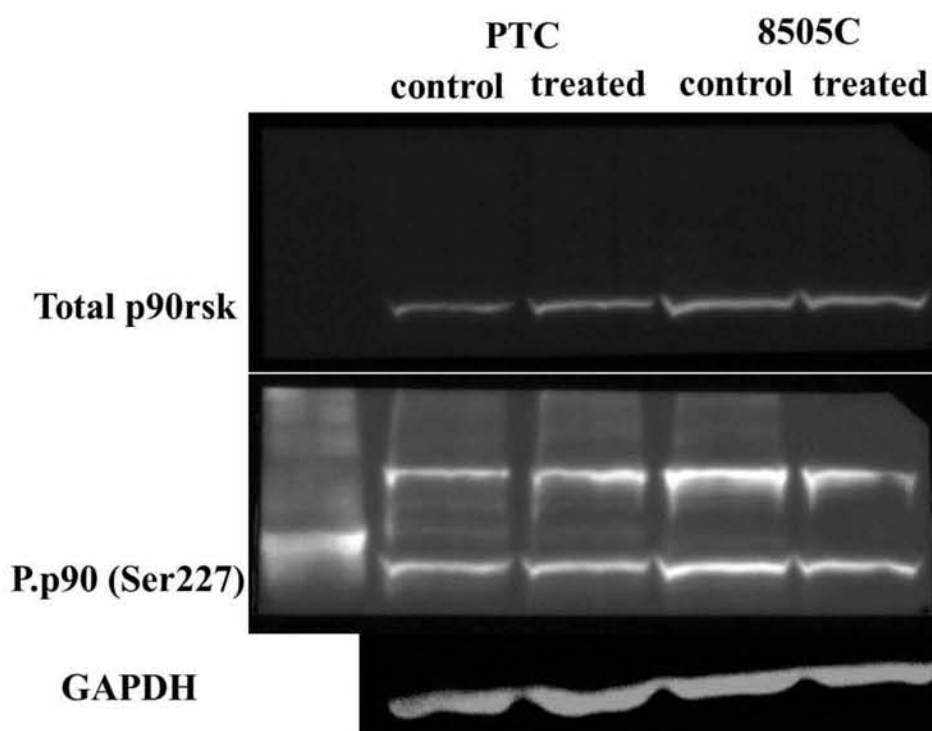
Γράφημα 17 : Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της Phospro p90 (Thr577) και της ολικής p90rsk και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές ύστερα από επώαση με T-ac 20μM για 4 ώρες και χωρίς επώαση (treated - control)



Εικόνα 24 : έκφραση των ανοσοαποτυπωμένων πρωτεϊνών της φωσφορυλιωμένης μορφής της p90rsk (Thr577), της ολικής p90rsk και του GAPDH, για τις δύο θυρεοειδικές καρκινικές κυτταρικές σειρές (aPTC, 8505C), μετά από επώαση με τον αναστολέα T-ac σε συγκέντρωση 20μM (treated) αλλά και μετά από επώαση μόνο με θρεπτικό υλικό (control). Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα



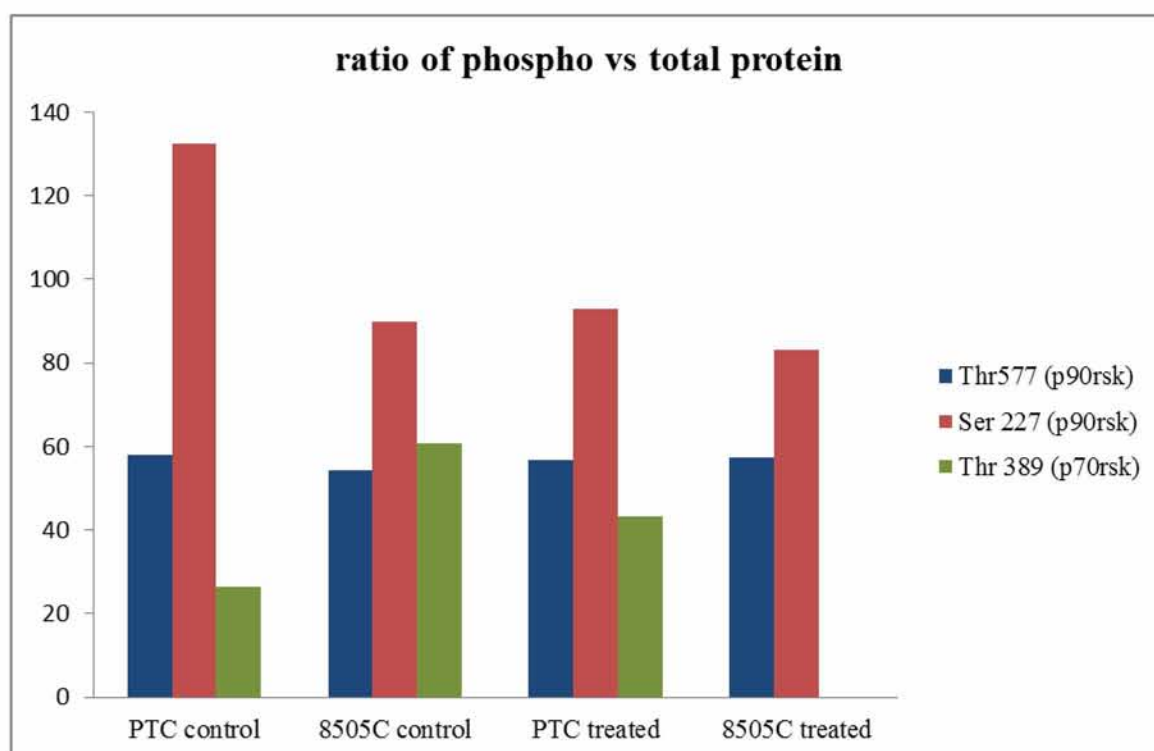
Γράφημα 18 : Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της Phospro p90 (Ser227) και της ολικής p90rsk και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές ύστερα από επώαση με T-ac 20μM για 4 ώρες και χωρίς επώαση (treated - control)



Εικόνα 25 : έκφραση των ανοσοαποτυπωμένων πρωτεϊνών της φωσφορυλιωμένης μορφής της p90rsk (Ser227), της ολικής p90rsk και του GAPDH, για τις δύο θυρεοειδικές καρκινικές κυτταρικές σειρές (aPTC, 8505C), μετά από επώαση με τον αναστολέα T-ac σε συγκέντρωση 20μM (treated) αλλά και μετά από επώαση μόνο με θρεπτικό υλικό (control). Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα

Πίνακας 17 : Ποσοστιαία μεταβολή της κάθε φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης συγκριτικά προς την αντίστοιχη ολική πρωτεΐνη και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές ύστερα από επώαση με T-ac 20μM για 4 ώρες και χωρίς επώαση (treated - control)

	<u>% CHANGE PHOSPHO VS TOTAL PROTEIN</u>			
	<u>PTC control</u>	<u>PTC treated</u>	<u>8505C control</u>	<u>8505C treated</u>
Thr577 (p90rsk)	58,04	56,76	54,32	57,39
Ser 227 (p90rsk)	132,35	92,84	89,83	83,20
Thr 389 (p70rsk)	26,37	43,31	60,63	0



Γράφημα 19 : Διαγραμματική απεικόνιση του λόγου της έκφρασης της κάθε φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης προς την αντίστοιχη ολική πρωτεΐνη και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές ύστερα από επώαση με T-ac 20μM για 4 ώρες και χωρίς επώαση (treated - control)

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφραση και ο ρόλος των S6 κινασών στις θυρεοειδικές καρκινικές κυτταρικές σειρές aPTC και 8505C και η *in vitro* αντικαρκινική δράση διαφόρων αναστολέων της λειτουργίας αυτών των κινασών, εξετάζοντας την κυτταροτοξική και αντιπολλαπλασιαστική τους ικανότητα.

Τιμές GI50 κάτω από το όριο των 10 μ M ώστε να θεωρηθεί σημαντική η δράση τους και για τις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές εμφάνισαν οι αναστολείς BX-912, GSK2334470 και T-ac, ενώ ο BI-D1870 εμφάνισε τιμή GI50 κάτω από το όριο των 10 μ M μόνο για την κυτταρική σειρά PTC (Πίνακας 9).

Οι αναστολείς FMK (Γράφημα 5) και SL 0101-1 (Γράφημα 8) φαίνεται να είναι αδρανείς και στις δυο θυρεοειδικές καρκινικές κυτταρικές σειρές. Ο SL 0101-1 πιθανώς να μην εμφανίζει δραστικότητα λόγω της φτωχής βιολογικής σταθερότητας που εμφανίζει *in vitro* επειδή περιέχει ομάδες ακετυλίου που μπορούν να διασπαστούν από εστεράσες [71]. Ο αναστολέας FMK αποτρέπει την ενεργοποίηση της N-τερματικής περιοχής της RSK κινάσης από την C-τερματική περιοχή της κινάσης, αλλά δεν επηρεάζει την δραστικότητα της N-τερματικής περιοχής. Ίσως αυτός να είναι ο λόγος για τον οποίο οι δραστικές μορφές της RSK2 δεν αναστέλλονται *in vitro* από τον FMK [9]. Ο FMK δεν θα αναστείλει την RSK αν η N-τερματική περιοχή της κινάσης ενεργοποιηθεί με έναν μηχανισμό που είναι ανεξάρτητος από την C-τερματική περιοχή [8, 93].

Ήπια αντιπολλαπλασιαστική δράση εμφάνισε ο αναστολέας PF 4708671 (Γράφημα 7) και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές. Σύμφωνα με την έρευνα των Qiu ZX et al. [80] ο αναστολέας PF-4708671 μπορεί να αναστέλλει σημαντικά την ενεργοποίηση της p70S6K στα καρκινικά κύτταρα και μπορεί να εισχωρήσει στα καρκινικά κύτταρα και να επηρεάσει τον κυτταρικό κύκλο αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Ο BI-D1870 (Γράφημα 3) στην παρούσα μελέτη εμφάνισε διαφορά στη δράση του μεταξύ των δύο καρκινικών κυτταρικών σειρών που τείνει να είναι σημαντική. Τα αποτελέσματα στην μελέτη των Sarkota GP et al. [85] υποδεικνύουν ότι ο BI-D1870 είναι ένας πολύ εξειδικευμένος αναστολέας της RSK, ο οποίος δρα ως ανταγωνιστικός αναστολέας του ATP της N-τερματικής περιοχής της AGC κινάσης της RSK.

Ο BX-912 (Γράφημα 4) και ο GSK 2334470 (Γράφημα 6) φαίνεται να έχουν αξιόλογη δράση και παρόμοια δραστικότητα και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές, καθώς και οι δύο αναστέλουν την PDK1. Η PDK1 είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση των AGC κινασών, συμπεριλαμβανομένου της PKC, S6K και SGK. Έτσι φαίνεται ότι η αναστολή της

PDK1 κατέχει σημαντικό ρόλο στον ρυθμό ανάπτυξης της καμπύλης των καρκινικών κυττάρων.

Η πιο δραστική ουσία και για τις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές φαίνεται να είναι ο Tac, ο οποίος εμφάνισε την καλύτερη αντιπολλαπλασιαστική δράση σε σύγκριση με όλους τους αναστολείς, καθώς είχε τις χαμηλότερες τιμές GI50 (Πίνακας 9).

Η παράμετρος LC50, η οποία αντιπροσωπεύει την κυτταροτοξική δράση των ουσιών δεν φαίνεται να έχει σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των δύο καρκινικών κυτταρικών σειρών.

Η επώαση των κυττάρων με 20μM Tac για 4 ώρες οδήγησε σε πολύ μικρή μείωση της έκφρασης της ολικής πρωτεΐνης p90 και των φωσφορυλιωμένων καταλοίπων της RSK2, Ser227 (Γράφημα 18) και Thr577 (Γράφημα 17), σε αντίθεση με την έκφραση που έμφανισαν τα κύτταρα που επώαστηκαν μόνον με θρεπτικό μέσο.

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι η δράση του Tac φαίνεται να μειώνει την έκφραση του φωσφορυλιωμένου καταλοίπου Ser227 ενώ δε φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του καταλοίπου Thr577 της RSK2 κινάσης. Αυτό μπορεί να συμβαίνει διότι ο αναστολέας μπορεί να παρεμποδίζει τη δέσμευση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) στην κινάση, με αποτέλεσμα να μην λειτουργεί σωστά το ένζυμο, δηλαδή να μη δεσμεύει ATP, το οποίο λειτουργεί ως δότης φωσφορικής ομάδας για την φωσφορυλίωση του υποστρώματος [31].

Αξιοσημείωτα φαίνεται να είναι τα αποτελέσματα της πρωτεΐνης p70 S6K, όπου παρατηρούνται μεγαλύτερες διαφορές μεταξύ των δύο καρκινικών κυτταρικών σειρών ύστερα από επώαση με 20μM Tac για 4 ώρες. Συγκεκριμένα στην καρκινική κυτταρική σειρά 8505C παρατηρείται σημαντική μείωση των επιπέδων της ολικής πρωτεΐνης p70 αλλά και του φωσφορυλιωμένου καταλοίπου της S6K, Thr389, ύστερα από επώαση με Tac. Αντίθετα στην καρκινική κυτταρική σειρά aPTC παρατηρείται μείωση της έκφρασης της ολικής πρωτεΐνης p70 αλλά αύξηση του φωσφορυλιωμένου καταλοίπου της S6K, Thr389 (Γράφημα 16).

Ο αναστολέας Tac επηρεάζει μόνον το N-τερματικό άκρο της κινάσης (NTKD) και ο μηχανισμός δράσης του έχει μελετηθεί εκτενέστερα στο παρελθόν μέσω της διδακτορικής διατριβής της Χρυσήϊδας Τσιμπλούλη [31].

Καταλήγοντας απ' όλα τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι είναι πολύ πιθανό να υπάρχει κάποιος ιδιαίτερος ρόλος των S6 κινασών στον καρκίνο του θυρεοειδούς και ότι η αναστολή της λειτουργίας τους να είναι ιδιαίτερης σημασίας για την εξέλιξη της νόσου. Η μελέτη του ρόλου των S6K σε περισσότερες θυρεοειδικές καρκινικές σειρές και η επίδραση των αναστολέων κάτω από διάφορες συνθήκες θα μπορούσε να δώσει περισσότερες

πληροφορίες για το ρόλο τους και την πιθανή στόχευση τους σαν μια νέα στρατηγική για την θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου.

Παράλληλα και σε συνδυασμό με το ρόλο των mTOR συμπλόκων στον καρκίνο του θυρεοειδούς θα είχε ίσως ενδιαφέρον να γίνει συνδυαστική χορήγηση επιλεγμένων αναστολέων του μονοπατιού mTOR και της S6K ώστε να ελέγξουμε συνδυαστικά τη δράση τους σε καρκινικές κυτταρικές σειρές *in vitro* αλλά και να μελετηθεί η *in vivo* δράση τους σε ζωικά πρότυπα, ώστε να έχουμε μια πρώτη απόδειξη για τη χρησιμότητα τους προς νέες βελτιωμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις για τη συγκεκριμένη νόσο.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alessi DR, Kozlowski MT, Weng QP, Morrice N, Avruch J, 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro, *Curr. Biol.* (1998) 8: 69–81
2. Bjorbaek C, Zhao Y and Moller DE, Divergent Functional Roles for p90rsk Kinase Domains, (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 18848 – 18852
3. Burgering BM, Coffey PJ, Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction, *Nature* (1995) 376: 599–602
4. Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH, Sabatini DM, RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (1998) 95:1432–7
5. Cano E and Mahadevan LC, Parallel signal processing among mammalian MAPKs, (1995), *Trends Biochem. Sci.*, 20, 117 – 122
6. Carman KM Ip & Alice ST Wong, Exploiting p70 S6 kinase as a target for ovarian Cancer, *Expert Opin. Ther. Targets* (2012) 16(6):619-630.
7. Chung J, Grammer TC, Lemon KP, Kazlauskas A, Blenis J, PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase, (1994) *Nature*. 370 (6484): 71–75
8. Cohen, M. S., Hadjivassiliou, H. and Taunton, J. (2007) A clickable inhibitor reveals context-dependent autoactivation of p90 RSK. *Nat. Chem. Biol.* 3, 156–160
9. Cohen, M. S., Zhang, C., Shokat, K. M. and Taunton, J. (2005) Structural bioinformatics-based design of selective, irreversible kinase inhibitors. *Science* 308, 1318–1321
10. Currie RA, Walker KS, Gray A, Deak M, Casamayor A, Downes CP, Cohen P, Alessi DR, Lucocq J, Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, *Biochem. J.* (1999) 337: 575–83
11. Dalby KN, Morrice N, Caudwell FB, Avruch J, Cohen P, Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90rsk that are inducible by MAPK, *J Biol Chem.* (1998) Jan 16;273(3):1496-505

12. Dayan CM, Interpretation of thyroid function tests, (2001), *Lancet*. 357 (9256): 619–24
13. «Defining Cancer». *National Cancer Institute*. 10 June 2014
14. Dhillon A.S., S. Hagan, O. Rath, W. Kolch MAP kinase signalling pathways in cancer, *Oncogene* 26 (2007) 3279–3290
15. Dimitrios Moraitis, Maria Karanikou, Chryssa Liakou, Konstantinos Dimas, George Tzimas, Sofia Tseleni-Balafouta, Efstratios Patsouris, George Z. Rassidakis, Maria A. Kouvaraki, SIN1, a critical component of the mTOR-Rictor complex, is overexpressed and associated with AKT activation in medullary and aggressive papillary thyroid carcinomas, 2014, *Surgery*, 156:1542-9
16. Doehn U, Hauge C, Frank SR, Jensen CJ, Duda K, Nielsen JV, Cohen MS, Johansen JV, Winther BR, Lund LR, Winther O, Taunton J, Hansen SH, Frödin M, RSK is a principal effector of the RAS-ERK pathway for eliciting a coordinate promotile/invasive gene program and phenotype in epithelial cells, *Mol Cell* (2009) 35:511–22
17. Hanahan D, Weinberg RA, The hallmarks of cancer, *Cell*. (2000) Jan 7;100(1):57-70
18. Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg, Hallmarks of Cancer: The Next Generation..., (2011) *Cell*. Volume 144, Issue 5, p646–674
19. Dufner A, Thomas G, Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation, *Exp. Cell Res.* (1999) 253: 100–9
20. Eun Kyung Kim, Eui-Ju Choi, Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases, *Biochimica et Biophysica Acta* 1802 (2010) 396–405
21. Fang JY, and Richardson BC, The MAPK signalling and colorectal cancer, (2005) *Lancet Oncol.*, May, 6, 5, 322-327
22. Fehrenbach Herring, Illustrated Anatomy of the Head and Neck, (2012) *Elsevier* p. 158
23. Filonenko VV, Tytarenko R, Azatjan SK, Savinska LO, Gaydar YA, Gout IT, Usenko VS, Lyzogubov VV, Immunohistochemical analysis of S6K1 and S6K2 localization in human breast tumors, *Exp. Oncol.* 26 (2004) 294–299
24. Fisher TL and Blenis J, Evidence for two catalytically active kinase domains in pp90rsk, (1996) *Mol. Cell. Biol.*, 16, 1212 – 1219
25. Grove JR, Banerjee P, Balasubramanyam A, Coffey PJ, Price DJ, Avruch J, Woodgett JR, Cloning and expression of two human p70 S6 kinase polypeptides

- differing only at their amino termini, (1991) *Molecular and Cellular Biology*. 11 (11): 5541–50
26. <http://ergo.berkeley.edu/be115/protean3.pdf>
 27. <http://ergo.berkeley.edu/be115/transblot.pdf>
 28. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/RPS6KA3#>
 29. <http://omim.org/entry/300075>
 30. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>
 31. <http://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/27506#page/1/mode/2up>
 32. <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/thyroid>
 33. <http://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis>
 34. <http://www.cancer.gov/types/thyroid>
 35. <http://www.cancer.gov/types/thyroid/hp/thyroid-treatment-pdq#link/14>
 36. <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2016/>
 37. <http://www.cancer.org/cancer/thyroidcancer/detailedguide/thyroid-cancer-what-is-thyroid-cancer>
 38. <http://www.cdc.gov/nchs/fastats/leading-causes-of-death.htm>
 39. <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/00/slides/3621s1d/sld036.htm>
 40. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RPS6KB1>
 41. http://www.malacards.org/card/mitral_valve_disease
 42. http://www.malacards.org/card/tuberous_sclerosis
 43. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6198>
 44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=6195>
 45. <http://www.nhs.uk/Conditions/Cancer/Pages/Symptoms.aspx>
 46. <http://www.phosphosite.org/proteinAction?id=890&showAllSites=true>
 47. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23227?ICID=search-23227>
 48. <http://www.thyroid.org/thyroid-cancer/>
 49. <http://www.uvitec.co.uk/>
 50. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> «Cancer Fact sheet N°297» *World Health Organization*. February 2014
 51. Ismail H.M., O. Myronova, Y. Tsuchiya, A. Niewiarowski, I. Tsaneva, I. Gout, Identification of the general transcription factor Yin Yang 1 as a novel and specific binding partner for S6 kinase 2, *Cell Signal*.2013 May;25(5):1054-63.

52. Isotani S, Hara K, Tokunaga C, Inoue H, Avruch J, Yonezawa K, J, Immunopurified mammalian target of rapamycin phosphorylates and activates p70 S6 kinase alpha in vitro, *Biol. Chem.* (1999) 274:34 493–8
53. Jensen CJ, Buch MB, Krag TO, Hemmings BA, Gammeltoft S, Frödin M, 90-kDa ribosomal S6 kinase is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, *J Biol Chem.* (1999) Sep 17;274(38):27168-76
54. Jones SW, Erikson E, Blenis J, Maller JL and Erikson RL, A *Xenopus* ribosomal protein S6 kinase has two apparent kinase domains that are each similar to distinct protein kinases, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 3377 – 3381
55. Kandel ES, Hay N, The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB, *Exp. Cell Res.* (1999) 253: 210–29
56. Kang S, Elf S, Lythgoe K, Hitosugi T, Taunton J, Zhou W, Xiong L, Wang D, Muller S, Fan S, Sun SY, Marcus AI, Gu TL, Polakiewicz RD, Chen ZG, Khuri FR, Shin DM, Chen J, p90 ribosomal S6 kinase 2 promotes invasion and metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma cells, *J Clin Invest* (2010) 120:1165–77.
57. Hanks SK, Hunter T, Protein kinases. 6. The eukaryotic protein-kinase superfamily - kinase (catalytic), domain-structure and classification, , *FASEB J* (1995) 9:576-96
58. Karin M and Hunter T, Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus, (1995). *Curr. Biol.*, 5, 747 – 757
59. Laemmli U.K., 1970, *Nature*, 227: 680-685
60. Lara R, Mauri FA, Taylor H, Derua R, Shia A, Gray C, Nicols A, Shiner RJ, Schofield E, Bates PA, Waelkens E, Dallman M, Lamb J, Zicha D, Downward J, Seckl MJ, Pardo OE, An siRNA screen identifies RSK1 as a key modulator of lung cancer metastasis, *Oncogene* (2011) 30:3513–21
61. Lawrence H. Kushi, Colleen Doyle, Marji McCullough, Cheryl L. Rock, Wendy Demark-Wahnefried, Elisa V. Bandera, Susan Gapstur, Alpa V. Patel, Kimberly Andrews, Ted Gansler and The American Cancer Society 2010 Nutrition and Physical Activity Guidelines Advisory Committee American Cancer Society guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention. Reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, Volume 62, Issue 1, January/February 2012, Pages 30–67

62. Leise A Berven and Michael F Crouch, Cellular function of p70S6K: A role in regulating cell motility, *Immunology and Cell Biology* (2000) 78, 447–451
63. V. Lyzogubov, Y. Khozhaenko, V. Usenko, S. Antonjuk, G. Ovcharenko, I. Tikhonkova, V. Filonenko, Immunohistochemical analysis of Ki-67, PCNA and S6K1/2 expression in human breast cancer, *Exp. Oncol.* 27 (2005) 141–144
64. B.Magnuson, B. Ekim, D.C. Fingar, Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks, *Biochem. J.* 441 (2012) 1–21
65. Maria A. Kouvaraki, Chrysoula Liakou, Adriani Paraschi, Konstantinos Dimas, Efstratios Patsouris, Sofia Tseleni-Balafouta, George Z. Rassidakis, Dimitrios Moraitis, Activation of mTOR signaling in medullary and aggressive papillary thyroid carcinomas, 2011, *Surgery*, 150:1258-65
66. Marshall CJ, MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase, *Curr Opin Genet Dev*, (1994) Feb;4(1):82-9
67. Mary C. Phelan, Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture, *Current Protocols in Cell Biology* (1998) 1.1.1-1.1.10
68. J.A. McCubrey, M.M. Lahair, R.A. Franklin, Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways, *Antioxid Redox Signal.* 8 (2006) 1775–1789
69. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA, Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance, *Biochim Biophys Acta.* (2007) Aug;1773(8):1263-1284
70. Mérienne K, Jacquot S, Zeniou M, Pannetier S, Sassone-Corsi P, Hanauer A, Activation of RSK by UV-light: phosphorylation dynamics and involvement of the MAPK pathway, *Oncogene.* (2000) Aug 31;19(37):4221-9
71. Michael K. Hilinski †, Roman M. Mrozowski, David E. Clark, Deborah A. Lannigan, Analogs of the RSK inhibitor SL0101: Optimization of in vitro biological stability, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22 (2012) 3244–3247
72. Negri E, Dal Maso L, Ron E, La Vecchia C, Mark SD, Preston-Martin S, McTiernan A, Kolonel L, Yoshimoto Y, Jin F, Wingren G, Rosaria Galanti M, Hardell L, Glatte E, Lund E, Levi F, Linos D, Braga C, Franceschi S, A pooled

- analysis of case-control studies of thyroid cancer, II. Menstrual and reproductive factors, (1999) *Cancer Causes Control*, 10, 143-155
73. Parkin DM, Boyd L, Walker LC, The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010, *Br J Cancer* (2011) 6;105 Suppl 2:S77-81
74. Philip J. Papst, Hirotaka Sugiyama, Masayuki Nagasawa, Joseph J. Lucas, James L. Maller, Naohiro Terada, J, Cdc2-cyclin B phosphorylates p70, S6 kinase on Ser411 at mitosis, *Biol. Chem.*, (1998) 273: 15 077–84
75. Philip Skehan, Ritsa Storeng, Dominic Scudiero, Anne Monks, James McMahon, David Vistica, Jonathan T. Warren, Heidi Bokesch, Susan Kenney, Michael R. Boyd, New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening, *Journal of the National Cancer Institute*, 1990, Vol. 82, No. 13
76. Pouyssegur J and Lenormand P, Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signaling, (2003) *Eur J Biochem.*, 270, 3291-3299
77. Mukhopadhyay NK, Price DJ, Kyriakis JM, Pelech S, Sanghera J, Avruch J, An array of insulin-activated, proline-directed serine/threonine protein kinases phosphorylate the p70 S6 kinase, *J. Biol. Chem.* (1992) 267: 3325–35
78. Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, Thomas G, Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1, *Science* (1998) 279: 707–10
79. Pullen N, Thomas G, The modular phosphorylation and activation of p70s6k, *FEBS Lett.* (1997) Jun 23;410(1):78-82
80. Qiu ZX, Sun RF, Mo XM, Li WM, The p70S6K Specific Inhibitor PF-4708671 Impedes Non-Small Cell Lung Cancer Growth, *PLoS One.* 2016 Jan 15;11(1):e0147185
81. Robinson MJ and Cobb MH, Mitogen-activated protein kinase pathways, (1997) *Curr Opin Cell Biol*, 9, 180-186
82. Romain Lara, Michael J. Seckl, and Olivier E. Pardo, The p90 RSK Family Members: Common Functions and Isoform Specificity, 2013, *Cancer Res* (2013) 73:5301-5308
83. Romanelli A, Martin KA, Toker A, Blenis J, p70 S6 kinase is regulated by protein kinase Czeta and participates in a phosphoinositide 3-kinase-regulated signalling complex, *Mol. Cell, Biol.* (1999) 19: 2921–8

84. Saitoh M, Pullen N, Brennan P, Cantrell D, Dennis PB, Thomas G, Regulation of an activated S6 kinase 1 variant reveals a novel mammalian target of rapamycin phosphorylation site, *J Biol Chem.* (2002) May 31;277(22):20104-12
85. Sapkota GP, Cummings L, Newell FS, Armstrong C, Bain J, Frodin M, Grauert M, Hoffmann M, Schnapp G, Steegmaier M, Cohen P, Alessi DR, BI-D1870 is a specific inhibitor of the p90 RSK (ribosomal S6 kinase) isoforms in vitro and in vivo, *Biochem J.* 2007 Jan 1;401(1):29-38
86. Savinska LO, Lyzogubov VV, Usenko VS, Ovcharenko GV, Gorbenko ON, Rodnin MV, Vudmaska MI, Pogribniy PV, Kyyamova RG, Panasyuk GG, Nemazanyy IO, Malets MS, Palchevskyy SS, Gout IT, Filonenko VV, Immunohistochemical analysis of S6K1 and S6K2 expression in human breast tumors, *Eksp. Onkol.* 26 (2004) 24–30
87. Seger R, Krebs EG, The MAPK signaling cascade, *FASEB J.* 1995 Jun;9(9):726-35
88. Smith JA, Poteet-Smith CE, Malarkey K, Sturgill TW, Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK in vivo, (1999) *J Biol Chem* 274, 2893-8
89. Sutherland C, Campbell DG and Cohen P, Identification of insulin-stimulated protein kinase - 1 as the rabbit equivalent of rskmo-2. Identification of two threonines phosphorylated during activation by mitogen –activated protein kinase, (1993) *J. Biochem.*, 212, 581 – 588
90. Takashiito, Toshio Seyama, Yuzo Hayashi, Tomonori Hayashi, Kiyohiko Dohi, Terumi Mizuno, Keisuke S. Iwamoto, Naohiro Tsuyama, Norinakamura And Mitoshi Akiyama, Establishment of two human thyroid carcinoma cell lines (8305C, 8505C) bearing p53 gene mutations, *International Journal Of Oncology* 4: 583-586, 1994
91. S. Torii, T. Yamamoto, Y. Tsuchiya, E. Nishida, ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer, *Cancer Sci.* 97 (2006) 697–702
92. World Cancer Report 2014, *World Health Organization*, (2014) Chapter 1.1
93. Zaru, R., Ronkina, N., Gaestel, M., Arthur, J. S. C. and Watts, C. (2007) The MAP kinase-activated Rsk controls an acute Toll-like receptor signalling response in dendritic cells and is activated via two distinct pathways, *Nat. Immunol.* 8, 1227–1235

94. Zhao Y, Bjorbaek C, Weremowicz S, Morton CC and Moller DE, SK3 encodes a novel pp90^{sk} isoform with a unique N-terminal sequence: growth factor-stimulated kinase function and nuclear translocation, (1995) *Mol. Cell. Biol.*, 15, 4353 - 4363