

**Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Ιατρικής**

**Τομέας Παθολογίας
Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική
Διευθυντής: Καθ. Ν. Σταθάκης**

**Παθογένεση του κολο-ορθικού καρκίνου: Ο ρόλος
των αναστολέων της κυκλοοξυγενάσης, του
συστήματος ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος και
πειραματικές θεραπευτικές εφαρμογές**

**Ιωάννης Α. Βουτσαδάκης
Παθολ. Ογκολόγος**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Λάρισα 2008

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

1. Ν. Σταθάκης
Καθηγητής Παθολογίας

2. Χ. Παπανδρέου
Αν. Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας

3. Σ. Ποταμιάνος
Αν. Καθηγητής Γαστρεντερολογίας

Επταμελής εξεταστική επιτροπή

1. Ν. Σταθάκης
Καθηγητής Παθολογίας

2. Χ. Παπανδρέου
Αν. Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας

3. Σ. Ποταμιάνος
Αν. Καθηγητής Παθολογίας-Γαστρεντερολογίας

4. Α. Μανιάτης
Καθηγητής Βιοπαθολογίας- Μικροβιολογίας

5. Γ. Κουκούλης
Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής

6. Λ. Σακκάς
Αν. Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας

7. Γ. Βασιλόπουλος
Επ. Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας

Πρόλογος

Οι οδοί της μοριακής παθογένεσης του κολο-ορθικού καρκινώματος έχουν μελετηθεί διεξοδικά τα τελευταία χρόνια και έχουν αποκαλυφθεί πολλές από τις μοριακές βλάβες που οδηγούν στην ανάπτυξη της νόσου. Στις κυριότερες και συχνότερες μοριακές βλάβες στον κολο-ορθικό καρκίνο συμπεριλαμβάνονται μεταλλάξεις των γονιδίων APC (Adenomatous Polyposis Coli), k-ras, Smad4 (επίσης αποκαλούμενο DPC4 – Deleted in Pancreatic Cancer 4) και του p53. Τα γονίδια αυτά παράγουν πρωτεΐνες που είναι σημαντικοί ρυθμιστές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης και γι' αυτό η δυσλειτουργία των πρωτεϊνών αυτών παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση.

Το σύστημα ουβικουτίνης-πρωτεασώματος (UPS) αποτελεί ένα σύστημα κυτταρικής πρωτεάσης με πολλές υπο-ομάδες που ρυθμίζει τη κυτταρική συγκέντρωση δεκάδων πρωτεϊνών οι οποίες έχουν συνδεθεί προηγουμένως με μια αλυσίδα μορίων ουβικουτίνης. Μεταξύ των πρωτεϊνών που είναι υποστρώματα του πρωτεασώματος συγκαταλέγονται ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης, της αγγειογένεσης και της μεταγωγής των κυτταρικών σημάτων. Συνεπώς το σύστημα ουβικουτίνης-πρωτεασώματος παίζει σημαντικό ρόλο στην εύρυθμη λειτουργία του κυττάρου και στην καρκινογένεση. Η αναστολή του UPS είναι προϋπόθεση για την ολοκλήρωση της κυτταρικής απόπτωσης και χρησιμοποιείται ήδη στην κλινική πράξη στην θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος, όπου ο αναστολέας του πρωτεασώματος μπορτεζομίμη έχει δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Το ένζυμο κυκλοοξυγενάση-2 (Cox-2) είναι η επαγόμενη μορφή του ενζύμου που καταλύει τις μετατροπές του αραχιδονικού οξέος σε προσταγλανδίνη H₂ (PGH₂) δηλαδή την πρώτη αντίδραση της οδού παραγωγής προσταγλανδινών. Η Cox-2 επάγεται στον κολο-ορθικό καρκίνο και σε πολλές άλλες μορφές καρκινωμάτων. Αναστολή της Cox-2 από την ασπιρίνη (ακετυλσαλικυλικό οξύ – ASA) και από άλλα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (Non-steroidal Anti-Inflammatory Drugs – NSAIDs) αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κολο-ορθικών καρκινικών κυττάρων και σε επιδημιολογικές μελέτες έχει βρεθεί ότι μειώνει την εμφάνιση εντερικών πολυπόδων τόσο σε γενετικά προδιατεθειμένους πληθυσμούς όσο και στο γενικό πληθυσμό. Τα NSAIDs έχουν επίσης ανασταλτικές δράσεις στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό που δεν οφείλονται στην αναστολή της Cox-2.

Η εντατική έρευνα στη μοριακή παθογένεση του καρκίνου που λαμβάνει χώρα τις τελευταίες δεκαετίες έχει ρίξει φως σε πολλές πλευρές της καρκινογένεσης αποκαλύπτοντας τις βασικές αρχές των διαδικασιών που οδηγούν ένα φυσιολογικό κύτταρο στη μετάλλαξη του σε νεοπλασματικό. Στην πορεία της έρευνας αυτής αποκαλύφθηκε η σημασία της ακριβούς ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και της φυσιολογικής απόπτωσης για την ομοιόσταση των οργάνων, καθώς και ο καταλυτικός ρόλος της απορρύθμισης των διαδικασιών αυτών στην καρκινογένεση. Οι πρώτοι καρποί της έρευνας έχουν μεταφραστεί στην κλινική πράξη με την εισαγωγή πολλών φαρμάκων που αναστέλλουν συγκεκριμένες κυτταρικές πρωτεΐνες. Τα φάρμακα αυτά χαρακτηρίζονται στοχευμένες θεραπείες (targeted treatments στην αγγλική βιβλιογραφία) και αντιδιαστέλλονται προς τα κλασικά χημειοθεραπευτικά που, παρά το ότι και αυτά έχουν πολλές φορές συγκεκριμένους στόχους (π.χ. αναστολείς της τοποϊσομεράσης I και II, αντιμεταβολίτες, δηλητήρια του κυτταροσκελετού), δρουν ευρέως σε φυσιολογικά και παθολογικά κύτταρα του οργανισμού γιατί οι στόχοι αυτοί είναι πρωτεΐνες που επιτελούν βασικές λειτουργίες σε κάθε κύτταρο. Αντίθετα οι στοχευμένες θεραπείες αναστέλλουν στόχους με πιο στενή κατανομή ή στόχους που είναι ιδιαίτερα ενεργοποιημένοι στα καρκινικά κύτταρα.

Ένα βήμα παραπέρα στην αντι-καρκινική θεραπεία είναι ο συνδυασμός διαφόρων στοχευμένων παραγόντων είτε μεταξύ τους είτε με κλασικά χημειοθεραπευτικά. Με αυτή τη βάση εισάγουμε το συνδυασμό του αναστολέα του πρωτεασώματος μπορτεζομίμπης και του αναστολέα της Cox ασπιρίνης, η πρώτη φάση ανάπτυξης του οποίου αποτελεί το αντικείμενο της παρούσας μελέτης. Τα δύο φάρμακα είναι ειδικοί αναστολείς ενζύμων με προέχουσα σημασία στην καρκινογένεση, αλλά έχουν την ιδιαιτερότητα ότι η δράση τους είναι ευρεία διότι η μεν μπορτεζομίμπη επηρεάζει μέσω του πρωτεασώματος την τύχη δεκάδων κυτταρικών πρωτεϊνών που είναι υποστρώματα, η δε ασπιρίνη, εκτός από την αναστολή της Cox-2, υπεισέρχεται σε πολλές άλλες κυτταρικές διαδικασίες όπως η αναστολή κινασών, η αναστολή ή η ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων και ο μεταβολισμός των πολυαμινών. Με τις πλειότερες αυτές δράσεις ο συνδυασμός θα μπορούσε θεωρητικά να παρουσιάζει ισχυρή αντινεοπλασματική δράση διατηρώντας ένα ήπιο προφίλ παρενεργειών, ιδίων των στοχευμένων θεραπειών.

Η έρευνα αυτή δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς τη συμβολή του καθηγητή Παθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Νικολάου Σταθάκη και του αναπλ.

καθηγητή Παθολογίας-Ογκολογίας κ. Χρήστου Παπανδρέου που με περιέβαλαν με την εμπιστοσύνη τους και με ενέταξαν στο κλινικό και στο ερευνητικό έργο του νεοσύστατου ογκολογικού τμήματος του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Λάρισας και τους οποίους ευχαριστώ θερμά. Ευχαριστώ επίσης για τη σημαντική βοήθειά τους σε διάφορες φάσεις της εργασίας τους συνεργάτες του ογκολογικού τμήματος συναδέλφους Άννα Πατρικίδου και Κώστα Τσαπακίδη και τη βιολόγο Αριστεά Καραγιαννάκη. Τελος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον πατέρα μου για τη σημαντική του συνεισφορά στη διόρθωση και μορφοποίηση του κειμένου και την εν γένει ενθάρρυνση όλα αυτά τα χρόνια.

Σύντομογραφίες

ACF	Aberrant Crypt Foci
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AP-1	Activating Protein-1
Apaf-1	Apoptosis Activating Factor 1
APC	Adenomatous Polyposis Coli
APC/C	Anaphase Promoting Complex/ Cyclosome
ARE	Adenine/ Uracil Rich Element
ARF	Alternative Reading Frame
ARF-BP1	ARF Binding Protein 1
ASA	Acetylsalicylic acid, Aspirin
ASPP	Apoptosis Stimulating Protein of p53
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
Bcl-2	B cell lymphoma 2
BIR	Bacilovirus Inhibitor of apoptosis Repeats
βTrCP	Beta Transducin repeat Containing Protein
cAMP	Cyclic Adenine Mono-Phosphate
CBP	CREB Binding Protein
CDKs	Cyclin Dependent Kinases
C/EBP	CCAAT/ Enhancer Binding Protein
CIMP	CpG Island Methylator Phenotype
CK II	Casein Kinase II
CKS1	Cyclin Kinase Subunit 1
Cox-2	Cyclooxygenase-2
CRE	cAMP Response Element
Diablo	Direct IAP Binding protein with Low pI
DPC4	Deleted in Pancreatic Cancer 4
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
eIF4	eucaryotic Initiating Factor 4
ERK	Extracellular signal Regulated Kinases
FACL4	Fatty Acid Co-enzyme A Ligase 4
FAP	Familial Adenomatous Polyposis
FoxO	Forkhead box O

FoxP3	Forkhead box P3
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3-beta
HAUSP	Herpesvirus-associated Ubiquitin Specific Protease
hdm2	Human double minute 2
HECT	Homologous to E6-associated protein C-terminus
HIF	Hypoxia Induced Factor
hMSH2	human MutS Homologous
hMLH1	human MutL Homologous
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
HtrA2	High temperature requirement A2
IAPs	Inhibitors of Apoptosis
IBM	IAP Binding Motif
I- κ B	Inhibitor of Kappa-B
IKK	Inhibitor of Kappa-B Kinase
IL-1, -8	Interleukins 1 and 8
ILK	Integrin-linked Kinase
IRE	Interleukin-6 Regulatory Element
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
K-ras	Kirsten Rous Avian Sarcoma
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
LOH	Loss of Heterozygosity
LOX	Lipoxygenase
LRP5	Low-density lipoprotein Receptor-related Protein 5
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
Mdm2	Murine double minute 2
MHC I	Major Histocompatibility Complex I
MMP-7	Matrix Metalloproteinase 7
MMR	Mismatch Repair
MPF	Mitosis Promoting Factor
MRP4	Multidrug Resistance Protein 4
MSI	Microsatellite Instability
MTD	Maximal Tolerated Dose
mTOR	mamalian Target of Rapamycin
NAG-1	NSAID Activated Gene 1

NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
Nlk	Nemo-like kinase
NSAIDs	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs
ODC	Ornithine Decarboxylase
PARs	Protease Activated Receptors
PEST sequence	Proline Glutamic acid Serine Threonine Sequence
PI3K	PhosphoInositol-3 Kinase
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PPAR α , β/δ , γ	Peroxisome Proliferator Activated Receptors α , β/δ , γ
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PPRE	Peroxisome Proliferator Response Element
PTEN	Phosphatase and Tensin at chromosome 10
RING	Really Interesting New Gene
SCF	Skp1/ Cullin/ F-box protein
13-S-HODE	13-S-Hydroxy-Octadeca-Dienoic acid
15-S-HETE	15-S-Hydroxy-Eicosa-Tetraenoic acid
Siah-1	Seven in absentia, human homolog 1
SKP2	S phase Kinase-associated Protein 2
Smac	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
Sp1	Specificity factor 1
SSAT	Spermidine/ Spermine Acyl-Transferase
TAB2	TAK1 Binding protein 2
TAK1	TGF Activated Kinase
TCF4	T cell Factor 4
TGF β	Transforming Growth Factor beta
TGIF	TGF Inhibitory Factor
TRAF6	TNF Receptor Associated Factor 6
TTFs	Trefoil Factors
U-box	UFD2 homologous box
u-PAR	urokinase-type Plasminogen Activator Receptor
UPS	Ubiquitin Proteasome System

VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor A
VHL	Von Hippel Lindau factor
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis

Περιεχόμενα

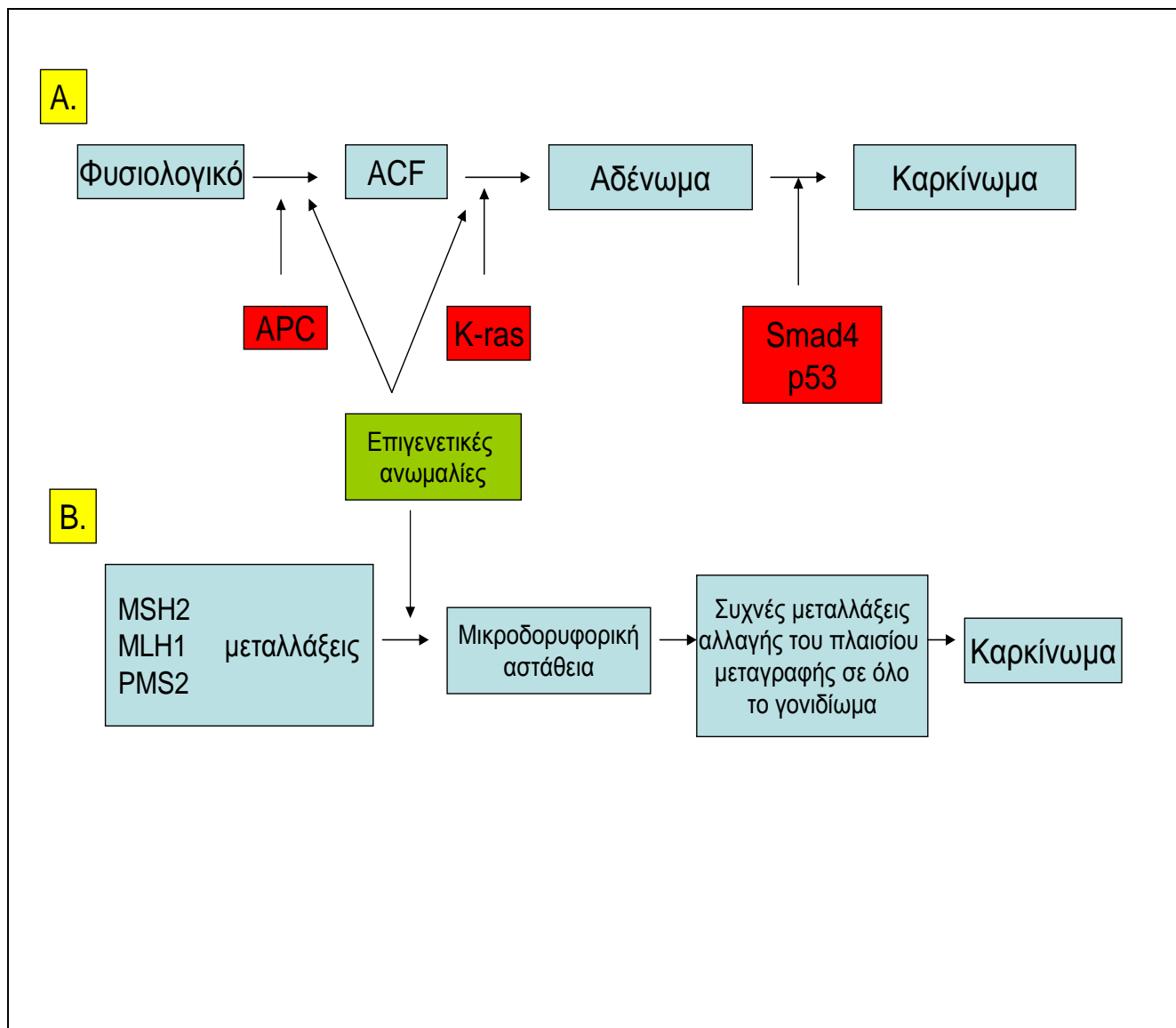
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	17
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	19
ΟΔΟΙ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΚΟΛΟ-ΟΡΘΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.....	22
Το APC και η οδός του Wnt.....	22
Οι οδοί που ξεκινούν από ενεργοποίηση του ογκογονιδίου k-ras.....	29
Η οδός TGF-β.....	32
Το p53, η ρύθμιση του και η δυσλειτουργία του στον κολο-ορθικό καρκίνο.....	36
ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΟΥΒΙΚΟΥΙΤΙΝΗΣ-ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ.....	40
Η δομή και λειτουργία του συστήματος.....	40
Το σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης.....	46
Η αναστολή του πρωτεασώματος στον κολο-ορθικό καρκίνο.....	49
Η ΚΥΚΛΟΟΞΥΓΕΝΑΣΗ-2.....	50
Η κυκλοοξυγενάση-2 (Cox-2) στον κολο-ορθικό καρκίνο.....	50
Η Cox-2 και ο μεταβολισμός των λιπιδίων στον κολο-ορθικό καρκίνο.....	56
Αντικαρκινική δράση των αναστολέων της Cox που δεν εξαρτάται από την Cox...59	59
ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ COX-2 ΣΤΟΝ ΚΟΛΟ-ΟΡΘΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ.....	64
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	69
ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Η ΥΠΟΘΕΣΗ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ.....	71
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	74
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	79
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	89
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	92
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	95
SUMMARY.....	97
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	99

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου για να μετατραπούν σε καρκινικά περνούν από μία αλληλουχία σταδίων. Ξεκινούν από το στάδιο των ανώμαλων κρυπτικών εστιών (aberrant crypt foci -ACF) και στη συνέχεια δίνουν γένεση σε αδενώματα που εξαλλάσσονται σε καρκινώματα (1). Στην πορεία προς την καρκινογένεση προστίθενται γενετικές βλάβες που χαρακτηρίζουν τη διαδικασία (2). Σε μια από τις οδούς καρκινογένεσης του παχέος εντέρου, το πρώτο βήμα αποτελούν μεταλλάξεις του γονιδίου APC στο χρωμόσωμα 5q21. Στο γονίδιο αυτό οφείλεται το κληρονομικό σύνδρομο της οικογενούς αδενωμάτωσης πολυποδίασης (FAP). Οι μεταλλάξεις του APC είναι ήδη παρούσες στο στάδιο των ACF (Εικ. 1Α). Στη συνέχεια επισυμβαίνουν μεταλλάξεις που ενεργοποιούν το ογκογονίδιο k-ras και οδηγούν στη μετάβαση προς αδένωμα ενώ η επόμενη μετάβαση από αδένωμα σε καρκίνωμα απαιτεί την απώλεια της λειτουργικότητας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων Smad4 (επίσης γνωστό ως DPC4) και p53 (3). Αυτό επιτυγχάνεται με μετάλλαξη του ενός αντιγράφου των γονιδίων και απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH – loss of heterozygosity) στο άλλο αντίγραφο τους στα χρωμοσώματα 18q και 17p αντίστοιχα. Η αλληλουχία αυτή μοριακών βλαβών προκαλεί απώλεια της κυτταρικής ομοιόστασης που έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη του νεοπλασματικού φαινοτύπου με αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αναστολή της φυσιολογικής απόπτωσης και της απόπτωσης που εξαρτάται από τις διακυτταρικές συνδέσεις (anoikis).

Σε μία άλλη οδό που οδηγεί στην κολο-ορθική καρκινογένεση μεταλλάσσονται γονίδια εμπλεκόμενα στην αποκατάσταση λαθών της σωστής αλληλουχίας των βάσεων του DNA (mismatch repair – MMR) όπως το MSH2, MLH1 και το PMS2 (Εικ. 1B). Οι μεταλλάξεις των γονιδίων αυτών προκαλούν τον κληρονομικό μη-πολυποειδικό καρκίνο του παχέος εντέρου (HNPCC – Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer). Έχουν ως χαρακτηριστικό αποτέλεσμα ένα φαινότυπο γνωστό ως μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability, MSI) στον οποίο συμβαίνουν συχνές μεταλλάξεις του DNA που έχουν ως συνέπεια την αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης (frameshift) σε περιοχές με υψηλό ποσοστό επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδίων (4,5).



Εικόνα 1:

Η αλληλουχία των μοριακών γεγονότων που οδηγούν στον κολο-ορθικό καρκίνο. Στο Α απεικονίζεται η αλληλουχία που λαμβάνει χώρα στο κληρονομικό σύνδρομο της Οικογενούς Αδενωματούδους Πολυποδίασης και στην πλειονότητα των σποραδικών περιπτώσεων. Στο Β απεικονίζονται τα γεγονότα που συμβαίνουν στο σύνδρομο του κληρονομικού μη-πολυποειδικού κολο-ορθικού καρκίνου (HNPCC) και στις περισσότερες από τις υπόλοιπες σποραδικές περιπτώσεις.

Οι μεταλλάξεις στις οποίες οφείλονται τα δύο κληρονομικά σύνδρομα, της οικογενούς αδενωματώδους πολυποδίασης και του κληρονομικού μη-πολυποειδικού καρκίνου του παχέος εντέρου είναι παρούσες στο 100% σχεδόν των σποραδικών (μη κληρονομικών) περιπτώσεων καρκίνου (περίπου 85% έχουν μετάλλαξη στο APC και 15% σε ένα από τα γονίδια που προκαλούν το HNPCC).

Εκτός από τις γενετικές βλάβες, σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του κολο-ορθικού καρκίνου παίζουν και επιγενετικές αλλαγές (6,7). Αυτές συνίστανται στη μεθυλίωση του DNA σε αλληλουχίες προαγωγέων που οδηγούν σε παύση της μεταγραφής και σε ακετυλίωση, μεθυλίωση και φωσφορυλίωση των ιστονών (6). Η μεθυλίωση του DNA λαμβάνει χώρα σε περιοχές πλούσιες στην αλληλουχία κυτιδίνης – φωσφογουανίνης (CpG) που αποκαλούνται νησίδες CpG. Οι περιπτώσεις καρκίνου του παχέος εντέρου που παρουσιάζουν εκτεταμένη μεθυλίωση νησίδων CpG ονομάζονται CIMP (CpG Island Methylator Phenotype) θετικοί. Η μεθυλίωση των νησίδων CpG παρουσιάζεται νωρίς κατά τη μετάβαση από αδένωμα σε καρκίνωμα (Εικ. 1) και σχετίζεται συχνότερα με τον φαινότυπο μικροδορυφορικής αστάθειας. Επίσης σχετίζεται με γενετικές βλάβες όπως των γονιδίων k- ras, B-raf και p53 (8).

Το σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος (UPS) θεωρήθηκε αρχικά όργανο αποδόμησης άχρηστων ή ελαττωματικών πρωτεϊνών του κυττάρου αλλά στη συνέχεια έγινε σαφές ότι το UPS αποτελεί ένα σημαντικό ρυθμιστικό σύστημα που ρυθμίζει ουσιαστικά κάθε κυτταρική λειτουργία. Η συμβολή του UPS στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης αλλά και η ανακάλυψη ότι το UPS ρυθμίζει τον σημαντικό αντι- αποπτωτικό μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ αποτέλεσε τη βάση για να διερευνηθεί η αναστολή του πρωτεασώματος ως αντινεοπλασματική θεραπεία. Ο αναστολέας του πρωτεασώματος μπορτεζομίμη (bortezomib) χρησιμοποιείται ήδη στη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος και η χρησιμότητά του σε άλλους καρκίνους όπως αυτόν του παχέος εντέρου αποτελεί αντικείμενο έρευνας.

Η κυκλοοξυγενάση-2 (Cox-2) είναι η επαγόμενη μορφή του ενζύμου της βιοσύνθεσης των προσταγλανδινών που μετατρέπει το λιπίδιο αραχιδονικό οξύ στην προσταγλανδίνη G₂ (PGG₂) και κατόπιν στην προσταγλανδίνη PGH₂ με μια ενζυμική δραστηριότητα υπεροξειδάσης και κυκλοοξυγενάσης αντίστοιχα. Ενώ το ένζυμο Cox-1 που εκτελεί την ίδια ενζυμική αντίδραση, εκφράζεται σε φυσιολογικές συνθήκες

στους περισσότερους ιστούς, η Cox-2 δεν εκφράζεται στις συνθήκες αυτές αλλά επάγεται στη φλεγμονή και σε πολλούς τύπους καρκινωμάτων.

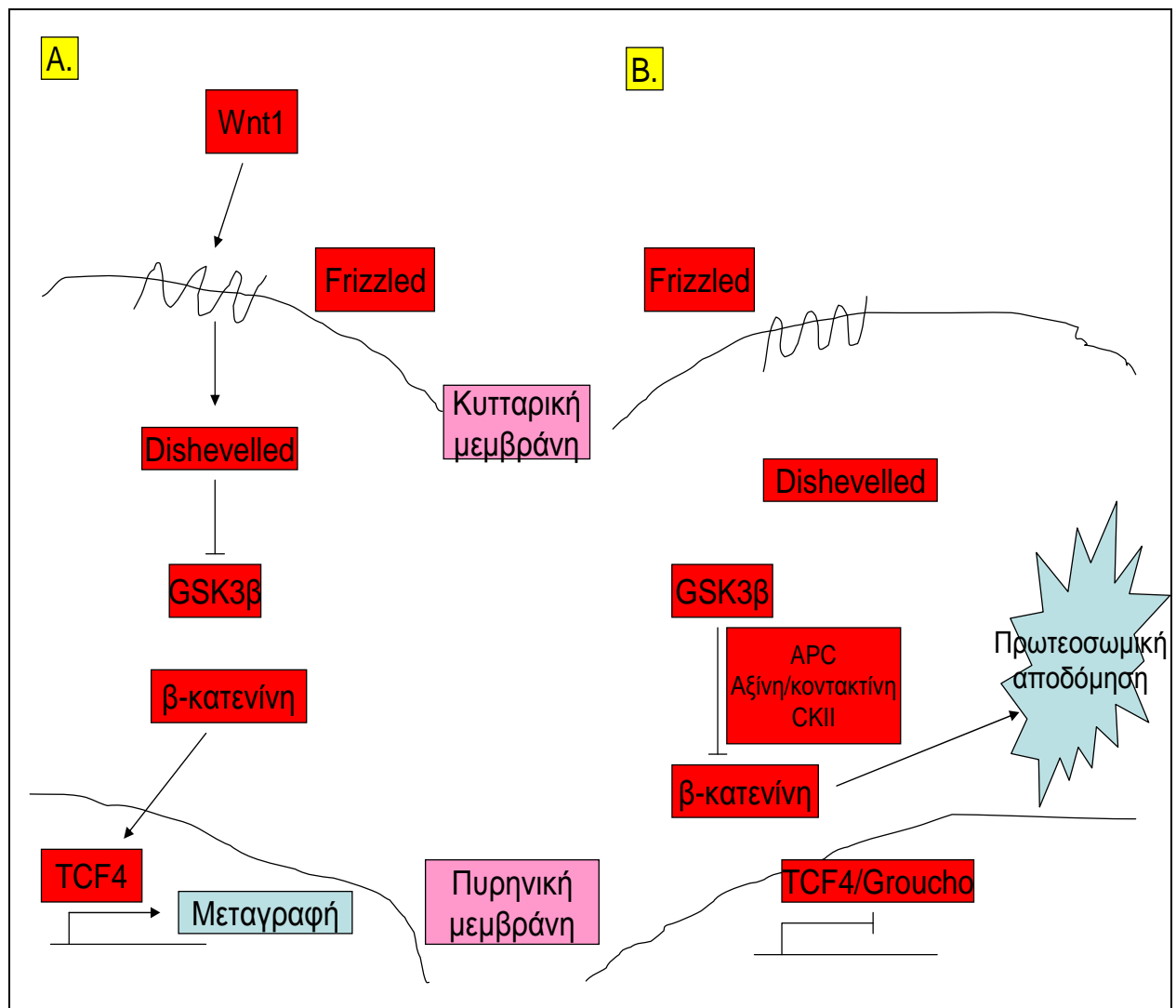
Στον κολο-ορθικό καρκίνο η έκφραση της Cox-2 αυξάνει και δεδομένα τόσο από in vitro όσο και από knock out μοντέλα σε ποντίκια πιστοποιούν ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση στο παχύ έντερο αλλά και σε άλλες εντοπίσεις (9). Επίσης σε επιδημιολογικές μελέτες τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη (NSAIDs) μειώνουν την εμφάνιση κολο-ορθικού καρκίνου σε γενετικά προδιατεθειμένους πληθυσμούς αλλά και στο γενικό πληθυσμό (10-12). Τα NSAIDs έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες μέσω της αναστολής των κυκλοοξυγενασών αλλά και με άλλους μηχανισμούς που δεν εξαρτώνται από το ένζυμο αυτό όπως αποδεικνύεται από το γεγονός της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε κύτταρα που δεν εκφράζουν την Cox. Το γεγονός βέβαια αυτό δεν μειώνει την αξία τους ως αντινεοπλασματικών φαρμάκων.

Στη συζήτηση που ακολουθεί περιγράφονται οι οδοί που εμπλέκονται συχνότερα στην παθογένεση του κολο-ορθικού καρκίνου. Στη συνέχεια περιγράφεται ο ρόλος του συστήματος ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος (UPS) και της κυκλοοξυγενάσης 2 στην κολο-ορθική καρκινογένεση. Με τη βάση αυτή προτείνεται το σκεπτικό μιας στοχευμένης συνδυασμένης χρησιμοποίησης αναστολέων του UPS και της Cox-2 στη θεραπεία του κολο-ορθικού καρκίνου.

ΟΔΟΙ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΚΟΛΟ-ΟΡΘΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Το APC και η οδός του Wnt

Η πρωτεΐνη APC (Adenomatous Polyposis Coli) είναι ρυθμιστής της οδού μεταγωγής σήματος που ξεκινάει από το Wnt. Το Wnt (το όνομα της πρωτεΐνης αυτής προέρχεται από ένα συνδυασμό του ονόματος της ομόλογης πρωτεΐνης της μύγας *Drosophila melanogaster*, wingless και της πρώτης πρωτεΐνης της ομάδας που ανακαλύφθηκε στα θηλαστικά και είχε αρχικά ονομαστεί int-1) είναι εξωκυττάριος παράγοντας που συνδέεται στην επιφάνεια του κυττάρου με τον υποδοχέα Frizzled (το όνομα προέρχεται από το φαινότυπο της *drosophila* που φέρει απενεργοποιημένο υποδοχέα) σε συνεργασία με τον συν-υποδοχέα LRP5 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5). Το ανθρώπινο γονίδιο κωδικοποιεί περίπου 20 Wnt ομόλογα γονίδια (13). Μετά τη σύνδεση με το Wnt ο Frizzled ενεργοποιεί την



Εικόνα 2:

Η οδός μεταγωγής σήματος του Wnt/ β-κατενίνης. Α. Όταν ο Wnt συνδέεται στον υποδοχέα του Frizzled, η κινάση GSK3β απενεργοποιείται και η β-κατενίνη απελευθερώνεται για να εισέλθει στον πυρήνα και να αρχίσει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων της σε συνεργασία με τον TCF4. Β. Όταν ο Wnt δεν συνδέεται στον Frizzled, η GSK3β παραμένει ενεργή και, σε συνεργασία με τον APC, την κοντακτίνη και την κινάση της καζεΐνης II φωσφορυλιώνει τη β-κατενίνη η οποία στη συνέχεια συνδέεται με ουβικουιτίνη και προωθείται για απόπτωση από το πρωτεάσωμα. Ο TCF4 παραμένει συνδεδεμένος με τον ανασταλτικό συμπάραγοντα Groucho και δεν ξεκινά μεταγραφή.

πρωτεΐνη Dishevelled η οποία σε συνεργασία με την πρωτεΐνη GBP (GSK3β Binding Protein) αναστέλλει την κινάση GSK3β (Glycogen Synthase Kinase- 3β, κινάση της

συνθάσης του γλυκογόνου -3β) (14, 15) (Εικ. 2A). Η GSK3β είναι κινάση σερίνης-θρεονίνης και αποτελεί μέρος ενός πολύ-πρωτεϊνικού συμπλόκου μαζί με το APC, την αξίνη (axin), την κοντακτίνη (conductin), την β-κατενίνη και την καζεϊνική κινάση II (casein kinase II, CK II). Η λειτουργία του APC συμβάλλει στη διατήρηση της συνοχής του συμπλόκου στο οποίο η κινάση GSK3β έρχεται σε στενή επαφή και φωσφοριλιώνει την β-κατενίνη είτε άμεσα είτε μέσω ενεργοποίησης της κινάσης CK II. Η φωσφορυλιωμένη β-κατενίνη αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη της κατηγορίας των πρωτεϊνών F box, βTrCP (β-transducin repeat Containing Protein) η οποία είναι μέρος μιας λιγκάσης της ουβικουιτίνης της ομάδας SCF και συνδέεται με ουβικουιτίνη με αποτέλεσμα να αποδομηθεί στη συνέχεια από το πρωτεάσωμα (16)(Εικ. 2B). Όταν η β-κατενίνη φέρει μετάλλαξη στη θέση 37 της αλληλουχίας της στην οποία η φυσιολογική σερίνη αντικαθίσταται από αλανίνη και έτσι δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί σε αυτή τη θέση, δεν αναγνωρίζεται από την βTrCP, δεν συνδέεται με ουβικουιτίνη και δεν αποδομείται από το πρωτεάσωμα (17). Η σύνδεση της β-κατενίνης με ουβικουιτίνη είναι αναστρέψιμη και υπάρχουν ένζυμα που επιτελούν την αντίδραση αποσύνδεσης της β-κατενίνης από την ουβικουιτίνη προλαμβάνοντας την αποδόμηση της στο πρωτεάσωμα (18).

Η ενεργοποίηση του Frizzled από το Wnt αναστέλλει την κινάση GSK3β και διατηρεί την β-κατενίνη αποφωσφορυλιωμένη. Έτσι αυτή δεν αναγνωρίζεται για σύνδεση με ουβικουιτίνη και εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου (19). Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρείται όταν υπάρχουν μεταλλάξεις του APC που εμποδίζουν τη δημιουργία του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου APC/ GSK3β/ αξίνης/ κοντακτίνης/ β-κατενίνης (20). Στον πυρήνα η β-κατενίνη αλληλεπιδρά με τον παράγοντα μεταγραφής TCF4/ LEF (T cell Factor 4/ Lymphoid Enhancer Factor). Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί στην αποσύνδεση του ανασταλτικού παράγοντα Groucho από τον TCF4. Η σύνδεση της β-κατενίνης στον TCF4 προσελκύει στο DNA τον μεταγραφικό μηχανισμό του κυττάρου για να ξεκινήσει η μεταγραφή των γονιδίων στόχων. Στα γονίδια –στόχους της β-κατενίνης/TCF4 συμπεριλαμβάνονται σημαντικοί παράγοντες για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και την δημιουργία μεταστάσεων (Πίνακας 1) (21-34).

Άλλα γονίδια όπως το ZO-1 (26) και η ephrin B (35) δεν επάγονται αλλά καταστέλλονται από την β-κατενίνη/ TCF4. Επίσης ο μεταγραφικός παράγοντας

Πίνακας 1. Γονίδια-στόχοι της οδού TCF4/ β-κατενίνης

<u>Υπόστρωμα</u>	<u>Λειτουργία</u>
Κυκλίνη D1	Ρυθμιστής των κινασών που εξαρτώνται από τις κυκλίνες (CDKs)
C-myc	Μεταγραφικός παράγοντας που προάγει τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση
Ματριλυσίνη (MMP-7)	Μεταλλοπρωτεϊνάση του μεσοκυττάρου χώρου
CD44	Μόριο κυτταρικής διασύνδεσης
Nr-CAM	Μόριο κυτταρικής διασύνδεσης
L1	Μόριο κυτταρικής διασύνδεσης
P-γλυκοπρωτεΐνη	Μεμβρανικός μεταφορέας αποβολής τοξικών ουσιών
IL-8	Κυτοκίνη
Id2	Μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας Helix-Loop-Helix (HLH)
C-jun	Υπομονάδα του μεταγραφικού παράγοντα AP-1
Fra-1	Υπομονάδα του μεταγραφικού παράγοντα AP-1
Groucho	Αναστολέας του TCF4
CBP/p300	Συμπαράγοντας μεταγραφής (Transcription co-factor)
Frizzled	Μεμβρανικός υποδοχέας του Wnt1
Akt1	Κινάση που προάγει τον πολλαπλασιασμό και την αναστολή της απόπτωσης
PPARδέλτα	Μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων
Κοντακτίνη	Πρωτεΐνη ανάλογη της αζίνης
Met	Υποδοχέας τυροσινικής κινάσης
EphB2, EphB3	Υποδοχείς επιφανείας που διαμεσολαβούν στον προσανατολισμό του κυττάρου

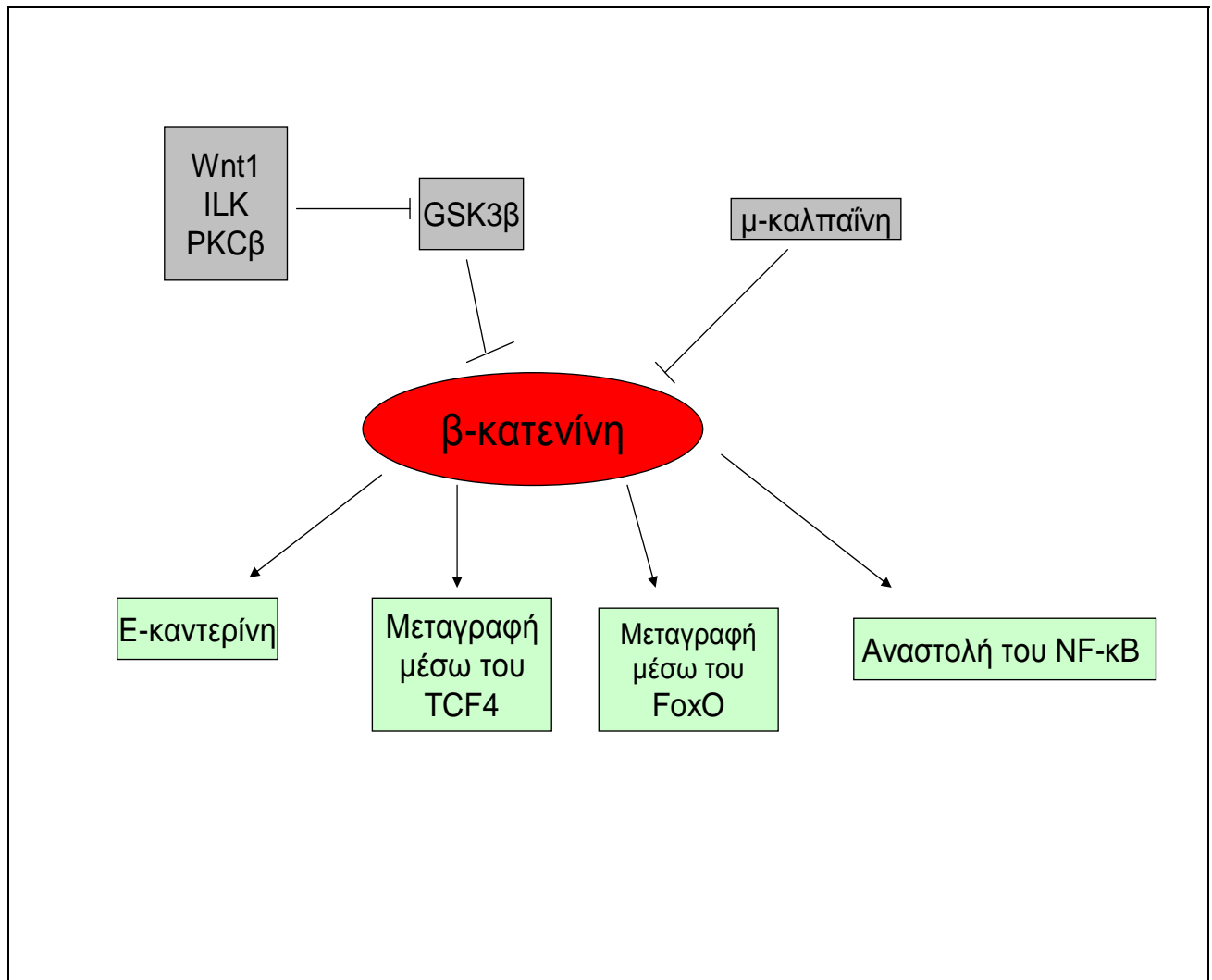
επάγει κάποια γονίδια έμμεσα χωρίς να υπεισέρχεται άμεσα στη μεταγραφή τους πιθανώς μέσω επαγωγής κάποιου άλλου μεταγραφικού παράγοντα ή μέσω σταθεροποίησης της πρωτεΐνης που παράγεται. Στην κατηγορία αυτή των έμμεσα επαγόμενων πρωτεϊνών ανήκουν η u-PAR (23) και η E3 λιγκάση της ίδιας της β-κατενίνης βTrCP (36). Στην ίδια κατηγορία μπορεί να ανήκει και η κυκλίνη D1 τουλάχιστον σε ορισμένες περιπτώσεις (37). Η β-κατενίνη επάγει επίσης την μεταγραφή γονιδίων χωρίς τη συνεργασία του παράγοντα TCF4 μέσω αλληλεπίδρασης με άλλους παράγοντες μεταγραφής όπως ο FoxO (Forkhead box O). Ένα παράδειγμα γονιδίου που επάγεται από την β-κατενίνη χωρίς την συνεργασία του TCF4 είναι του γονιδίου που κωδικοποιεί το p14^{ARF} (Alternative Reading Frame), ενεργοποιητή του p53 (38).

Το APC έχει προ-αποπτωτική δράση που είναι ανεξάρτητη από το ρόλο του ως αναστολέα της β-κατενίνης (39). Η απώλεια της δράσης αυτής μπορεί να έχει παθογενετική σημασία στις περιπτώσεις καρκινώματος του παχέος εντέρου που

φέρουν μεταλλάξεις στο APC. Για να προκαλέσει απόπτωση το APC έχει ανάγκη από λειτουργική κασπάση 8 και το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης που ξεκινά από τους υποδοχείς θανάτου (death receptors). Αναστολείς της κασπάσης 8 εμποδίζουν την απόπτωση που ξεκινά μετά από ενεργοποίηση του APC σε ένα πειραματικό σύστημα με εκχυλίσματα των αυγών του αμφίβιου *Xenopus*. Επιπλέον το APC έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά απ' ευθείας με τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (Guanine nucleotide exchange factor), Asef. Ο Asef δρα ειδικά ως ενεργοποιητής του Rac, ο οποίος εμπλέκεται στην κυτταρική κίνηση. Στον κολο-ορθικό καρκίνο με μεταλλάξεις του APC δεν υπάρχει αλληλεπίδρασή του με τον Asef και η απώλεια αυτής της αλληλεπίδρασης παίζει ρόλο στην συσσώρευση των νεοπλασματικών κυττάρων στις εντερικές κρύπτες (40).

Εκτός από τη μεταγωγή του σήματος που ξεκινά από το Wnt, η αναστολή της κινάσης GSK3β επιτελείται και από άλλες κινάσες όπως η κινάση akt (που ξεκινά από ενεργοποίηση του ογκογονιδίου Ras), ILK (Integrin-linked kinase, κινάση συνδεδεμένη με την ιντεγκρίνη) και PKCβ (Protein Kinase Cβ, πρωτεϊνική κινάση Cβ). Ως αποτέλεσμα οι κινάσες αυτές ενεργοποιούν την μεταγραφή μέσω της β-κατενίνης/ TCF4 (22, 41, 42) (Εικ. 3). Αντίθετα μια εναλλακτική ανασταλτική οδός ρύθμισης της β-κατενίνης ανεξάρτητη από το σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος διενεργείται από το σύστημα της καλπαΐνης. Η μ-καλπαΐνη μπορεί να αποδομήσει την β-κατενίνη και η αποδόμηση αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική στις περιπτώσεις κολο-ορθικού καρκίνου που παρουσιάζουν μεταλλάξεις στο APC και άρα η αποδόμηση της β-κατενίνης μέσω του πρωτεασώματος είναι προβληματική (43).

Μια πρόσθετη λειτουργία της β-κατενίνης αναφέρεται στη σύνδεση της με την E-καδερίνη (E-Cadherin) μια πρωτεΐνη των κόμβων διασύνδεσης (adherens junctions) (Εικ. 3). Οι κόμβοι διασύνδεσης είναι οι κύριες θέσεις διακυττάρων συνδέσεων και η β-κατενίνη εξυπηρετεί σ' αυτούς μια λειτουργία σύνδεσης της E-καδερίνης με την α-κατενίνη και τον κυτταροσκελετό ακτίνης. Μεταξύ των δύο λειτουργιών της β-κατενίνης, αυτήν στην οποία δρα ως μεταγραφικός παράγοντας στον πυρήνα και αυτήν στην οποία εξυπηρετεί συνδετική αποστολή στον κυτταροσκελετό, υπάρχει μια ισορροπία που ρυθμίζεται από φωσφορυλιώσεις του μορίου της. Φωσφορυλίωση της τυροσίνης στη θέση 654 του μορίου της β-κατενίνης διευκολύνει την αλληλεπίδραση της με την E-καδερίνη, ενώ η σύνδεση με την ουβικουιτίνη συμβαίνει μετά από φωσφορυλίωση στις σερίνες των θέσεων 33 και 37 και η μεταγραφική λειτουργία



Εικόνα 3:

Η ρύθμιση και οι λειτουργίες της β-κατενίνης. Η φωσφορυλίωση μέσω της κινάσης GSK3β οδηγεί σε αποδόμηση της β-κατενίνης από το πρωτεάσωμα ενώ η αποδόμησή της από τη μ-καλπαΐνη είναι ανεξάρτητη από το πρωτεάσωμα. Η GSK3β αναστέλλεται από τον Wnt και από τις κινάσες ILK και PKCβ. Η β-κατενίνη λειτουργεί ως συμπαράγοντας μεταγραφής των μεταγραφικών παραγόντων TCF4 και FoxO, ως μέρος της διακυτταρικής σύνδεσης αλληλεπιδρώντας με την E-καδερίνη και ως άμεσος αναστολέας του NF-κΒ.

διευκολύνεται όταν η β-κατενίνη δεν είναι φωσφορυλιωμένη στις παραπάνω θέσεις (44, 45).

Μια τρίτη λειτουργία της β-κατενίνης είναι η αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ μέσω απ' ευθείας αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους (46) (Σχήμα 3). Η αναστολή

του NF-κB από την β-κατενίνη μπορεί να είναι η αιτία του ότι η ενεργοποίηση του NF-κB προϋποθέτει την δράση της κινάσης GSK3β ώστε να ανασταλεί η β-κατενίνη (47).

Ενεργοποίηση της οδού της β-κατενίνης μπορεί να οφείλεται και σε άλλες βλάβες όπως μεταλλάξεις της ίδιας της β-κατενίνης (48) ή άλλων πρωτεϊνών της οδού. Οι μεταλλάξεις της β-κατενίνης παρατηρούνται συχνότερα σε μικρού μεγέθους αδενώματα σε σύγκριση με μεγαλύτερα αδενώματα και καρκινώματα, γεγονός που μπορεί να αντικατοπτρίζει το ότι μεταλλάξεις διαφορετικών πρωτεϊνών της ίδιας οδού μεταγωγής σήματος δεν είναι λειτουργικά ισοδύναμες (49).

Η ενεργοποίηση της εξαρτώμενης από τη β-κατενίνη μεταγραφής του DNA λόγω μεταλλάξεων του APC ή της ίδιας της β-κατενίνης δεν είναι λειτουργικά ισοδύναμη με τη φυσιολογική ενεργοποίηση που συμβαίνει μετά από σύνδεση του Wnt-1 στον υποδοχέα του Frizzled. Αυτό γιατί η ενεργοποίηση του Frizzled ενεργοποιεί, εκτός από την οδό που οδηγεί στην μεταγραφή μέσω της β-κατενίνης / TCF4, μια άλλη οδό που μέσω των κινάσων Tak1 και Nlk (Nemo-like kinase) φωσφορυλιώνει και αναστέλλει τον TCF4 (50) εξισορροπώντας την μεταγραφική του δραστηριότητα στις φυσιολογικές συνθήκες. Επιπλέον του TCF4, η β-κατενίνη ενεργοποιεί και έναν άλλο μεταγραφικό παράγοντα τον Fox O (Forkhead box O) που συνδέεται με την κυτταρική απάντηση στο οξειδωτικό στρες. Αυτή η ενεργοποίηση οδηγεί σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου (51, 52).

Από τις τέσσερις λειτουργίες της β-κατενίνης που συζητήθηκαν μόνο η μεταγραφή σε συνεργασία με τον TCF4 προάγει την καρκινογένεση. Οι τρεις άλλες (η αλληλεπίδραση με την E-καδερίνη, η συνεργασία στη μεταγραφή μέσω του παράγοντα Fox O και η απευθείας αναστολή του παράγοντα NF-κB) είναι ογκοκατασταλτικές μέσω παρεμπόδισης των μεταστάσεων από την σταθεροποίηση των διακυτταρικών συνδέσεων, αναστολής του κυτταρικού κύκλου μετά από οξειδωτικό στρες και αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της αγγειογένεσης που προάγονται από τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB. Επιπλέον η β-κατενίνη παρουσιάζει αντινεοπλασματικές ιδιότητες και με τον μηχανισμό της αύξησης των επιπέδων του p53. Αυτό συμβαίνει παρά το ότι ο p53 δεν είναι μεταγραφικός στόχος της β-κατενίνης και το mRNA του δεν αυξάνεται (53). Αντίθετα οφείλεται σε αναστολή της αποδόμησης του p53 από το πρωτεάσωμα καθώς οι αναστολείς του πρωτεασώματος εξουδετερώνουν την επίδραση της β-κατενίνης στον p53. Ο ενεργοποιητής του p53, ARF επάγεται από την ενεργοποιημένη

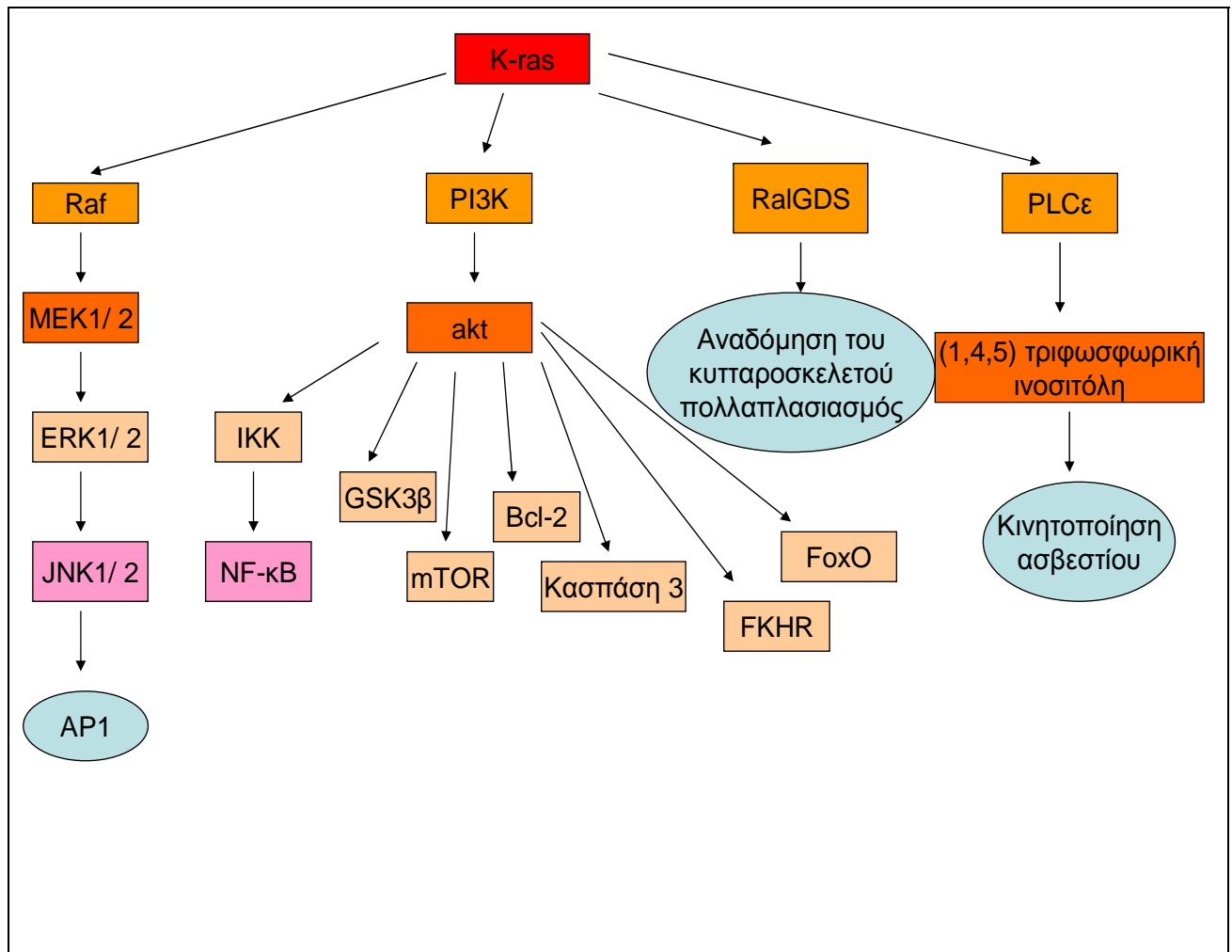
β-κατενίνη και ευθύνεται για την σταθεροποίηση του p53 (54). Το γεγονός ότι η β-κατενίνη ενέχει και ογκοκατασταλτικές ιδιότητες μπορεί να εξηγεί το δεδομένο της επάρκειας των μεταλλάξεων του APC για την έναρξη της καρκινογένεσης με δημιουργία αδενωμάτων αλλά για την πρόοδο σε καρκινώματα απαιτούνται πρόσθετες γενετικές βλάβες.

Οι οδοί που ξεκινούν από την ενεργοποίηση του ογκογονιδίου k-ras

Το ογκογονίδιο k-ras φέρει μεταλλάξεις που το ενεργοποιούν στο 50% των κολορθικών καρκινωμάτων (55, 56). Οι μεταλλάξεις αυτές συμβαίνουν κυρίως στο κωδικόνιο 12. Πολλές αλληλοσυνδεόμενες οδοί μεταγωγής σήματος εκκινούνται από το k-ras. Σε μια από αυτές το k-ras ενεργοποιεί την κινάση Raf η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τον καταρράκτη των κινασών MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) με πρώτες ενεργοποιούμενες τις κινάσεις MEK1 και 2 (57) που είναι ικανές να φωσφορυλιώσουν τόσο τυροσίνες όσο και σερίνες και θρεονίνες (κινάσες διπλής δραστηριότητας). Από τις κινάσες MEK ενεργοποιούνται οι κινάσεις ERK 1 και 2 (Extracellular- Signal Regulated Kinases 1 and 2) και JNK 1 και 2 (c-jun N- terminal kinases 1 and 2).

Ως τελικό αποτέλεσμα επέρχεται ενεργοποίηση διαφόρων παραγόντων μεταγραφής μεταξύ των οποίων και ο AP-1 (Activating Protein-1) που αποτελείται από τις πρωτεΐνες c-jun και c-fos. Ο AP-1 έχει καθοριστικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Εικ. 4). Άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούνται από τις κινάσες ERK είναι ο elk 1 και ο c-myc (58). Η ενεργοποίηση των κινασών MAPK από το k-ras ενέχεται στην επαγωγή της p-γλυκοπρωτεΐνης που οδηγεί σε αντίσταση των νεοπλασματικών κυττάρων στη δράση πολλών αντινεοπλασματικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στη κλινική πράξη (59).

Σε μια δεύτερη οδό, το k-ras ενεργοποιεί την κινάση σερίνης/ θρεονίνης PI3K (κινάση της 3- φωσφοϊνοσιτίδης). Αυτή ενεργοποιεί με τη σειρά της την κινάση akt (που ονομάζεται επίσης PKB- protein kinase B). Η akt φωσφορυλιώνει πολλά υποστρώματα μεταξύ των οποίων είναι η κινάση IKK, η ενεργοποίηση της οποίας οδηγεί τελικά σε ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB μέσω φωσφορυλίωσης και πρωτεασωμικής αποδόμησης του αναστολέα του NF-κB, I-κB.



Εικόνα 4:

Οι οδοί μεταγωγής σήματος του ογκογονιδίου k-ras. Τέσσερις κύριες οδοί ξεκινούν από το k-ras και ενεργοποιούν ή αναστέλουν μεταγραφικούς παράγοντες και άλλες πρωτεΐνες. Για την απλοποίηση του σχήματος αλληλεπιδράσεις μεταξύ των οδών αλλά και άλλες εξωγενείς ρυθμίσεις δεν απεικονίζονται.

Ο NF-κB είναι στις περισσότερες περιπτώσεις ένας ισχυρός παράγοντας προώθησης της κυτταρικής επιβίωσης λόγω του ότι μεταξύ των γονιδίων-στόχων του είναι πολλά γονίδια που αναστέλλουν την απόπτωση (Εικ. 4). Επιπλέον η κινάση akt φωσφορυλιώνει και αναστέλλει την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη bad, μέλος της οικογένειας bcl-2, καθώς και την κασπάση-9 (60). Η κινάση GSK3β είναι επίσης υπόστρωμα της akt και όταν φωσφορυλιωθεί αναστέλλεται η δράση της με

αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η β-κατενίνη όπως συζητήθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Άλλα υποστρώματα της κινάσης akt συμπεριλαμβάνουν τους παράγοντες μεταγραφής FKHR και FoxO (61), οι οποίοι όταν φωσφορυλιώνονται αναστέλλονται, την πρωτεΐνη mdm2, η οποία όταν φωσφορυλιωθεί εισέρχεται στον πυρήνα και αναστέλλει την μεταγραφική δράση του p53, και την πρωτεΐνη mTOR (mammalian target of rapamycin). Η ενεργοποίηση του mTOR από την akt κινάση διατηρεί τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4 σε λειτουργική κατάσταση αναστέλλοντας την δεσμευτική πρωτεΐνη του παράγοντα αυτού 4E- BP. Έτσι μεταφράζονται από τα αντίστοιχα mRNA τους, πρωτεΐνες όπως η κυκλίνη D, ο παράγοντας HIF και η δεκαρβοξυλάση της ορνιθίνης (62). Επίσης ο mTOR ενεργοποιεί την κινάση p70^{SGK} που είναι ακόμα ένας θετικός ρυθμιστής της μετάφρασης του mRNA. Τέλος η φωσφατάση PTEN (Phosphatase and Tensin at Chromosome 10), που είναι αναστολέας της οδού PI3K/ akt (63) είναι στόχος της akt έτσι ώστε να υπάρχει ανασταλτική αυτορύθμιση της οδού (64).

Δύο άλλοι οδοί που ξεκινούν από το ογκογονίδιο ras οδηγούν η μεν πρώτη σε ενεργοποίηση του παράγοντα RalGDS που επηρεάζει τη ρύθμιση του κυτταροσκελετού, την ενδοκυττάρωση, την εξωκυττάρωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, η δε δεύτερη σε ενεργοποίηση της φωσφολίπασης C_ε (PLC_ε). Η PLC_ε δρα μέσω παραγωγής του λιπιδίου 1, 4, 5 τριφωσφορική ινσιτόλη (Ins (1, 4, 5) P₃) και ενεργοποιεί τους υποδοχείς Ins (1, 4, 5) P₃ που ενέχονται στη μεταγωγή σήματος με χρησιμοποίηση των συγκεντρώσεων ασβεστίου (65). (Εικ. 4).

Οι δύο πρώτες οδοί του ras που περιγράφηκαν παραπάνω (Raf/ MAPK και PI3K/ akt) έχουν μελετηθεί ενδελεχώς για το ρόλο τους στην καρκινογένεση. Παρά το ότι η οδός Raf/ MAPK θεωρείται ότι παίζει κυρίως ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενώ η οδός PI3K/ akt στην αναστολή της απόπτωσης, αυτό είναι απλούστευση του τι συμβαίνει in vivo στο κύτταρο καθώς και οι δύο οδοί επηρεάζουν και τις δύο αυτές καρκινογόνες διαδικασίες, αλλά και άλλες όπως την αναστολή της apoptosis (απόπτωσης που εξαρτάται από την απώλεια των διακυτταρικών συνδέσεων) και την νεοπλασματική αγγειογένεση.

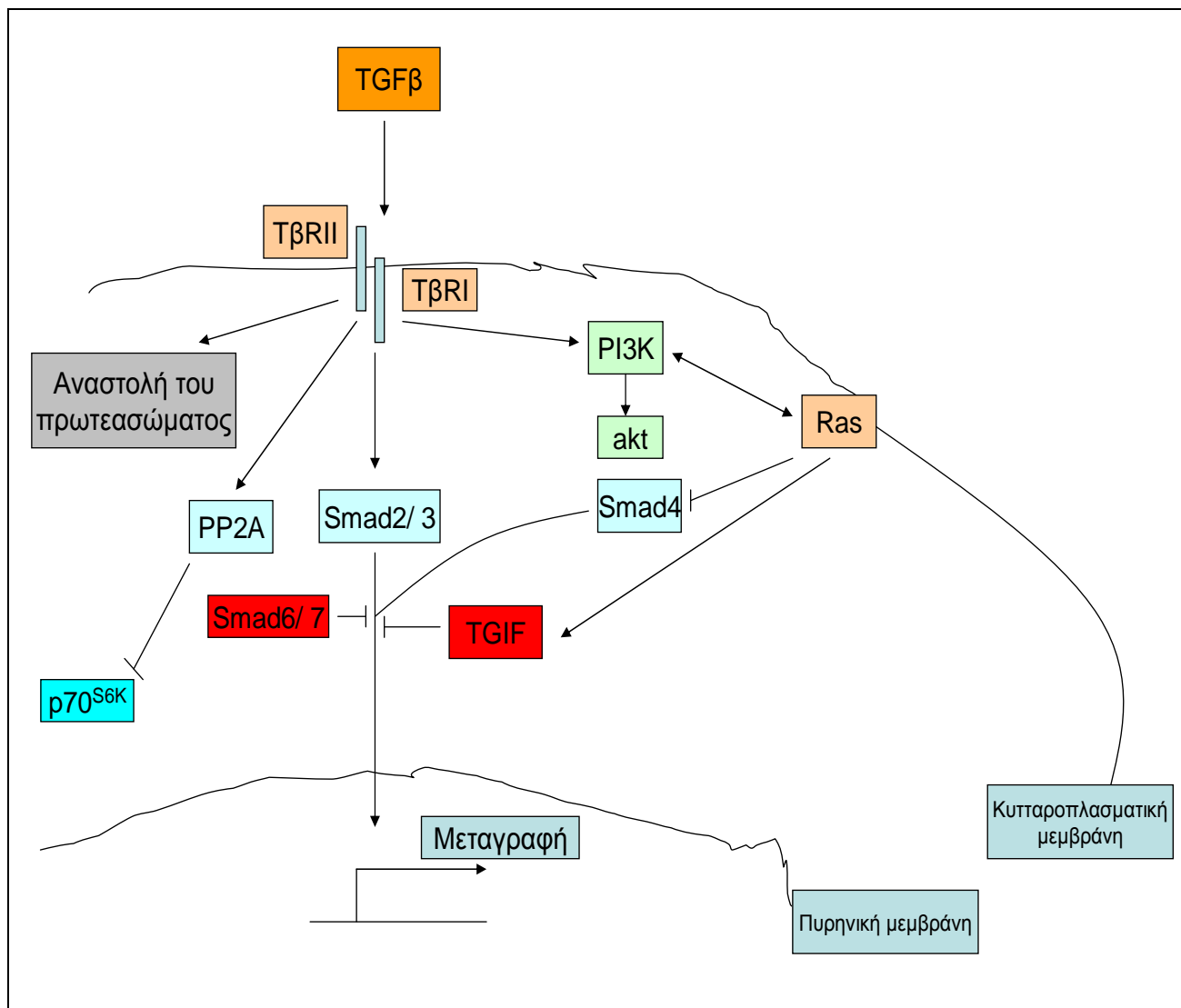
Οι οδοί που εκκινούν από το ras ογκογονίδιο αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και μπορούν να έχουν ακόμα και αντίθετα αποτελέσματα στη ρύθμιση πρωτεϊνών-στόχων· το τελικό αποτέλεσμα διαμορφώνεται από παράγοντες όπως, επιπλέον σήματα προερχόμενα από άλλες οδούς μεταγωγής αλλά και την ένταση και τη διάρκεια του κάθε σήματος. Για παράδειγμα η οδός PI3K/ akt ενεργοποιεί τον

παράγοντα NF-κB μέσω φωσφορυλίωσης και πρωτεασωμικής αποδόμησης του I-κB. Η κινάση akt φωσφορυλιώνει και αναστέλλει την κινάση GSK3β με τελικό αποτέλεσμα την συσσώρευση της β-κατενίνης. Η πρωτεΐνη αυτή εκτός από τις λειτουργίες της ως μεταγραφικού παράγοντα και ως παράγοντα σταθεροποίησης των διακυττάρων συνδέσεων μέσω αλληλεπίδρασης με τη E-καδερίνη, αλληλεπιδρά και αναστέλλει τη δράση του παράγοντα NF-κB (46). Το τελικό αποτέλεσμα των αλληλοσυγκρουόμενων αυτών σημάτων στην ενεργοποίηση του NF-κB καθορίζεται από την ένταση και τη διάρκεια του καθενός, καθώς και άλλων επιρροών που μπορεί να δρουν ταυτόχρονα ή διαδοχικά.

Σε άλλες περιπτώσεις οι οδοί που ξεκινούν από το ογκογονίδιο ras επιδρούν στη ρύθμιση μιας πρωτεΐνης – στόχου προς την ίδια κατεύθυνση. Αυτό συμβαίνει για παράδειγμα στην περίπτωση της κυκλίνης D, η οποία σταθεροποιείται όταν η κινάση GSK3β ανασταλλεί από την κινάση akt. Ταυτόχρονα η αναστολή της GSK3β οδηγεί σε ενεργοποίηση της β-κατενίνης και κατ' επέκταση σε μεταγραφή του γονιδίου της κυκλίνης D που είναι στόχος του συμπλόκου β-κατενίνης/ TCF4. Η κυκλίνη D είναι επίσης στόχος ενεργοποίησης από την κινάση ERK μέσω της οδού Ras/ Raf/ MAPK (57).

Η οδός TGF- β

Σύνδεση της πρωτεΐνης TGF-β (Transforming Growth Factor- β) στους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης TβRII και TβRI ξεκινά μια οδό μεταγωγής σήματος μέσω ενεργοποίησης των πρωτεϊνών Smad 2 και Smad 3 (αποκαλούμενες R-Smads λόγω της αλληλεπίδρασης τους με τους υποδοχείς) οι οποίες σε συνδυασμό με τον συν-ενεργοποιητή Smad4 (που λέγεται επίσης και DPC4- Deleted in Pancreatic Carcinoma 4) συνεργάζονται για την μεταγραφή γονιδίων- στόχων. Οι πρωτεΐνες Smad6 και Smad7 είναι ανασταλτικές της οδού αυτής (Εικ. 5). Επτά διαφορετικοί τύποι υποδοχέων TβRI και πέντε διαφορετικοί TβRII έχουν βρεθεί σε κύτταρα σπονδυλωτών οργανισμών και μπορούν να συνδέονται μεταξύ τους σε διάφορους συνδυασμούς (66). Η ενεργοποίηση των υποδοχέων TβRII και TβRI διευκολύνει επίσης την αλληλεπίδραση τους με την κινάση PI3K που οδηγεί σε ενεργοποίηση της κινάσης akt. Επιπλέον οι TβRII / TβRI ενεργοποιούν τη φωσφατάση PP2A, ένα



Εικόνα 5:

Η οδός μεταγωγής σήματος του TGFβ και οι αλληλεπιδράσεις της με το k-ras. Ανάλογα με την κατάσταση ενεργοποίησης του k-ras, τα αποτελέσματα της οδού του TGFβ μπορούν να μετατραπούν από ογκοκατασταλτικά σε ογκογόνα.

αναστολέα της κινάσης p70^{SGK}. Το ογκογονίδιο ras μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί από τους TβRII / TβRI είτε απευθείας ή μέσω ενεργοποίησης της κινάσης PI3K (67).

Οι οδοί TGF- β και ras συσχετίζονται και με επιπρόσθετους τρόπους. Η ενεργοποίηση της οδού MAPK/ ERK από το ras οδηγεί σε αναστολή της οδού TGF- β / Smad λόγω πρωτεοσωμικής αποδόμησης του Smad4 (68). Τρεις E₃ λιγκάσες οι Jab 1, Roc 1 και Smurf καταλύουν την αποδόμηση αυτή. Πρωτεοσωμική αποδόμηση των πρωτεϊνών Smad συμβαίνει επίσης όταν αυτές φέρουν μεταλλάξεις (69). Το ογκογονίδιο ras αναστέλλει το TGF- β και με ένα ακόμη μηχανισμό, την αναστολή της πρωτεοσωμικής αποδόμησης του αναστολέα TGIF (70) (Εικ. 5). Μια ανάδρομη συσχέτιση υπάρχει καθ' ότι η απώλεια της δραστηριότητας της Smad4 οδηγεί σε υπερ-ενεργοποίηση της οδού Ras/ ERK (71). Η ταυτόχρονη ενεργοποίηση των Smad και των οδών Ras/ MAPK και Ras/ PI3K από τον TGF- β μπορεί να εξηγήσει τα περιγραφόμενα αποτελέσματα του TGF- β τόσο στο να προάγει όσο και να αναστέλλει την καρκινογένεση. Όταν η διαμετάδοση του σήματος μέσω των Smad λειτουργεί φυσιολογικά και η οδός των MAPK/ ERK δεν είναι διεγερμένη από άλλα σήματα, υπερτερεί η ογκοκατασταλτική δράση της οδού του TGF- β . Αντίθετα όταν οι παράγοντες Smad φέρουν μεταλλάξεις που εμποδίζουν τη δράση τους, υπερτερούν οι ογκογόνες ιδιότητες μέσω του φαινομένου της μετάλλαξης από επιθηλιόμορφο σε μεσεγχυματικό ιστό (Epithelial to mesenchymal transformation) (67). Η αναλογία της πρωτεΐνης Smad 3 προς την κινάση akt έχει βρεθεί να συσχετίζεται με την τύχη του κυττάρου και ιδιαίτερα με το αν το κύτταρο θα προχωρήσει σε απόπτωση ως αποτέλεσμα του σήματος που ξεκινά από τον TGF- β (72).

Η οδός του TGF- β έχει αντίθετα αποτελέσματα από την οδό του ras/ MAPK όσον αφορά την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, και μέσω σταθεροποίησης του αναστολέα των κινασών που εξαρτώνται από τις κυκλίνες, p27 (73). Αυτή η ρύθμιση διενεργείται με αναστολή του πρωτεασώματος από τον TGF- β , καθώς ο p27 είναι υπόστρωμα του πρωτεασώματος (74). Αντίθετα η ενεργοποίηση του Ras ευοδώνει την φωσφορυλίωση του p27 στη θρεονίνη 187, γεγονός που οδηγεί στην σύνδεσή του p27 με ουβικουιτίνη μέσω της E₃ ουβικουιτίνης-λιγκάσης SKP2 και στη συνέχεια σε πρωτεοσωμική αποδόμηση. (73).

Αλληλεπίδραση των οδών TGF- β / Smad και Wnt/ β -κατενίνης υπάρχει σε πολλαπλά επίπεδα. Η πρωτεΐνη αξίνη που είναι μέρος του συμπλόκου β -κατενίνης/ GSK3 β / APC/ αξίνης αλληλεπιδρά με το Smad3 και διευκολύνει την ενεργοποίησή του. Αυτό πιθανότατα συμβαίνει διότι η αξίνη προωθεί την αλληλεπίδραση του Smad3 με τους υποδοχείς T β R (75). Σε μεταγραφικό επίπεδο έχει παρατηρηθεί μια συνέργεια των Smads με τον παράγοντα β -κατενίνης / TCF4 για την ενεργοποίηση μεταγραφής

γονιδίων- στόχων (76). Στα ποντίκια διπλή ετεροζυγοτία για το μεταλλαγμένο APC και Smad4 οδηγεί σε φαινότυπο με περισσότερους πολύποδες από ότι μετάλλαξη στο APC μόνο (77). Επιπλέον οι δύο οδοί αλληλεπιδρούν και έμμεσα, παραδείγματος χάρη μέσω αλληλεπιδράσεων και των δύο με σήματα και ξεκινούν από ενεργοποίηση του ογκογονιδίου Ras.

Μία ταξινόμηση που έχει προταθεί για τα γονίδια στόχους της οδού του TGF-β τα κατατάσσει σε τρεις κατηγορίες (78,79). Το Smad είναι ο κύριος θετικός ρυθμιστής της οδού και επάγει την πρώτη κατηγορία των γονιδίων- στόχων που ονομάζονται πρώιμα επαγόμενα. Ο παράγοντας ERK υποβοηθά αυτή την επαγωγή ενώ ο Smad 2 την εμποδίζει. Οι δύο άλλες κατηγορίες γονιδίων- στόχων του TGF-β επηρεάζονται αργότερα από τα πρώιμα επαγόμενα γονίδια και γι' αυτό ονομάζονται ενδιάμεσα επαγόμενα και ενδιάμεσα καταστέλλόμενα γονίδια. Τα ενδιάμεσα επαγόμενα ρυθμίζονται θετικά από το Smad3 και καταστέλλονται από το ERK και το Smad2 ενώ τα ενδιάμεσα καταστέλλόμενα καταστέλλονται και από τους 3 παράγοντες. Επιπλέον πολυπλοκότητα προστίθεται στο σύστημα του TGF-β από το γεγονός ότι περίπου 4000 γονίδια (το 10% του υπολογιζόμενου αριθμού γονιδίων του ανθρώπινου γονιδιώματος) επηρεάζονται μετά από ενεργοποίηση του TGF-β (78). Μεταξύ των γονιδίων αυτών είναι οι αναστολείς των εξαρτώμενων από τις κυκλίνες κινασών p15^{INK4B}, p21^{CIP1}, p27^{KIP} και οι κασπάσες των οποίων η έκφραση επάγεται και ο μεταγραφικός παράγοντας c-myc που καταστέλλεται. Παρά ταύτα το μοντέλο δεν καλύπτει όλες τις περιπτώσεις γονιδίων που επηρεάζονται από τις οδούς του TGF-β και το Ras. Για παράδειγμα η έκφραση του ενζύμου φουρίνη, μιας κονβερτάσης που εμπλέκεται στην εξωκυττάρωση πρωτεϊνών από το κύτταρο, όπως του ίδιου του TGF-β ρυθμίζεται θετικά τόσο από το Smad2 όσο και από τις κινάσεις p42/p44 MAPK (80). Η συνεργασία των οδών TGF-β/Smad και Ras-MAPK/PI3k είναι σύνθετη και ποικίλει στους διάφορους τύπους κυττάρων.

Πολλές πρωτεΐνες της οδού του TGF-β φέρουν μεταλλάξεις στον κολο-ορθικό καρκίνο. Μεταλλάξεις του Smad4 είναι όψιμα μοριακά γεγονότα στην κολο-ορθική καρκινογένεση και παρατηρούνται στο 20% των περιπτώσεων (81). Ο υποδοχέας TβRII είναι ποιο συχνά μεταλλαγμένος σε περιπτώσεις με φαινότυπο μικροδορυφορικής αστάθειας λόγω της παρουσίας μιας αλληλουχίας πολυαδενίνης στο γονίδιό του, που παράγει τα λάθη στην αντιγραφή (82). Αντίθετα σε περιπτώσεις με φαινότυπο μικροδορυφορικής σταθερότητας (microsatellite stable) οι μεταλλάξεις

του TβRII είναι λιγότερο συχνές (83). Μεταλλάξεις του Smad2 είναι επίσης σπάνιες (σε περίπου 6% των περιπτώσεων του κολο-ορθικού καρκίνου στον άνθρωπο) (84).

Το p53, η ρύθμισή του και η δυσλειτουργία του στον κολοορθικό καρκίνο

Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 ανακαλύφθηκε πριν από 25 και πλέον χρόνια και παραμένει μία από τις περισσότερο μελετώμενες πρωτεΐνες στην έρευνα του καρκίνου. Καινούργια στοιχεία προκύπτουν συνεχώς που διευκρινίζουν την πολύπλοκη ρύθμιση του p53. Ο p53 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης όπως γίνεται φανερό και από τα γονίδια-στόχους του (Πίνακας 2) (85-88).

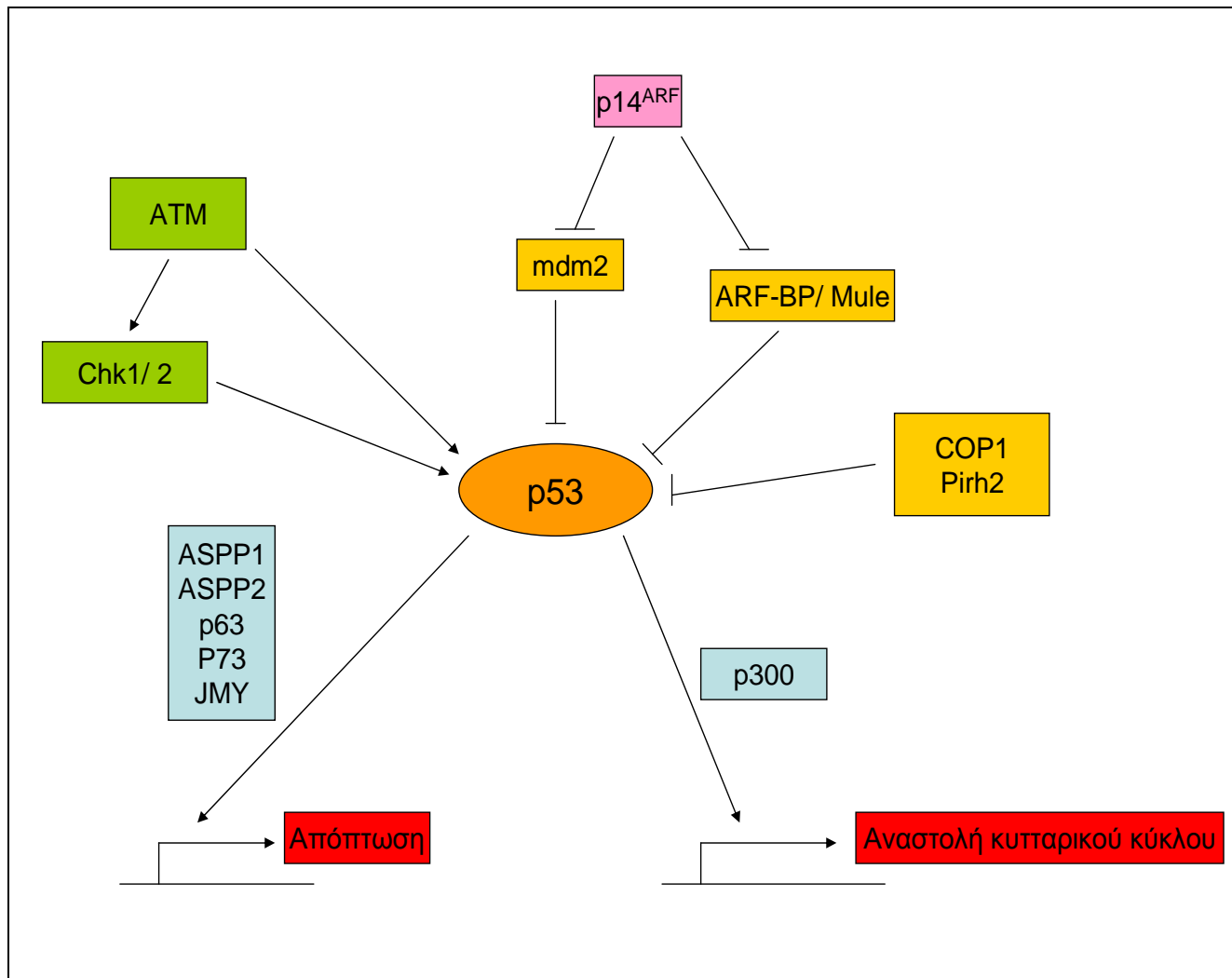
Η μεταγραφική λειτουργία του p53 ρυθμίζεται με μηχανισμούς που έχουν ως κεντρικό παράγοντα τον αναστολέα mdm2 (murine double minute 2, που αναφέρεται και ως hdm2 στον άνθρωπο) ο οποίος είναι μια E3 λιγκάση της ουβικουιτίνης και οδηγεί σε πρωτεασωματική αποδόμηση του p53. Ο mdm2 αναστέλλεται από την πρωτεΐνη p14^{ARF} (p19 στο ποντίκι) η οποία κωδικοποιείται από ένα γονίδιο στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 9 (9p) στον ίδιο γονιδιακό τόπο και με την ίδια γονιδιακή αλληλουχία αλλά με άλλο πλαίσιο ανάγνωσης με το γονίδιο που κωδικοποιεί τον αναστολέα της κινάσης που εξαρτάται από τις κυκλίνες p16^{INKA} (γι' αυτό και η ονομασία ARF Alternative Reading Frame). Η p14^{ARF} ως αναστολέας του mdm2 ρυθμίζει θετικά σταθεροποιώντας το p53 (Εικ. 6). Επιπρόσθετα από τον mdm2 ο p53 συνδέεται με την ουβικουιτίνη με τη μεσολάβηση τριών άλλων E3 λιγκασών των COP1, Pirh2 και ARF-BP1/Mule (89-93).

Το p53 φωσφορυλιώνεται μέσω της δράσης διαφόρων κινασών σε υπολείμματα σερίνης και θρεονίνης του μορίου του. Η φωσφορυλίωση αυτή είναι προϋπόθεση για τη μεταγραφική του ενεργοποίηση. Όταν υπάρχει βλάβη στο DNA η κινάση ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον p53 τόσο άμεσα όσο και έμμεσα μέσω ενεργοποίησης των κινασών Chk1 και 2. Άλλοι ενεργοποιητές του p53 είναι οι κινάσες GSK3β, p38 και JNK (94).

Πίνακας 2. Παραδείγματα γονιδίων-στόχων του p53

Bad, Bax, PUMA, Noxa	Μέλη της οικογένειας του bcl-2 που προάγουν την απόπτωση
Fas, DR4, DR5	Υποδοχείς θανάτου (Death receptors)
PIDD	Πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τις κασπάσες
p21	Αναστολέας των κινασών που εξαρτώνται από τις κυκλίνες (CDKs)
14-3-3σ, Gadd45	Ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου
Siah1, mdm2	E3 λιγκάσες

Μια άλλη ρύθμιση στη λειτουργία του p53 λαμβάνει χώρα στο επίπεδο της σύνδεσης των συνεργατικών παραγόντων (co-factors) της μεταγραφής. Οι συμπαράγοντες αυτοί συνδέονται με το συνδεδεμένο στο DNA p53 ανάλογα με τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που αυτός έχει υποστεί. Δεδομένου ότι οι τροποποιήσεις εξαρτώνται από το ερέθισμα που προκάλεσε την ενεργοποίηση του p53, τα διάφορα αυτά ερεθίσματα (π.χ υπεριώδης φως, ογκογόνες μεταλλάξεις)



Εικόνα 6:

Η ρύθμιση και λειτουργία του p53. Οι E3 λιγκάσες mdm2, ARF-BP/ Mule, COP1 και Pirh2 αναστέλλουν το p53 συνδέοντας το με ουβικουιτίνη ώστε να αποδομηθεί στο πρωτεάσωμα. Η πρωτεΐνη p14^{ARF} αναστέλλει τόσο την mdm2 λιγκάση, όσο και την ARF-BP/ Mule. Οι κινάσες ATM και Chk1 και 2 ενεργοποιούν το p53. Ανάλογα με τους συμπαράγοντες που προσελκύονται κατά την ενεργοποίηση του p53 το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση ή παύση του κυτταρικού κύκλου.

οδηγούν στη μεταγραφή διαφορετικών γονιδίων. Τουλάχιστον σε ένα ποσοστό, η τελική απόφαση για το αν ένα κύτταρο υποστεί απόπτωση ή αναστολή του κυτταρικού κύκλου μετά από ενεργοποίηση του p53, εξαρτάται από τους συμπαράγοντες που συνδέονται μαζί του. Σύνδεση των συμπαράγοντων της οικογενείας του ASPP (Apoptosis Stimulating Protein of p53), ASPP1 και ASPP2/Bbr καθώς και των συμπαράγοντων p63, p73 και JMΥ προάγει την επαγωγή γονιδίων που οδηγούν σε απόπτωση. Αντίθετα σύνδεση του συμπαράγοτα p300 οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου (95). Το ογκογονίδιο c-myc παίζει επίσης ρόλο στην απόφαση για την τύχη του κυττάρου μετά από ενεργοποίηση του p53. Όταν είναι ταυτόχρονα ενεργοποιημένο, ματαιώνεται η αναστολή του κυτταρικού κύκλου ωθώντας σε μαζική απόπτωση. Ο p53 συνδέεται στο DNA ως τετραμερές στη συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία RRRC (A/T)(T/A) GYYY (όπου R είναι πουρίνη και Y πυριμιδίνη) μέσω του κεντρικού τομέα του μορίου του (αμινοξέα 102-292). Τρεις λυσίνες του καρβοξυτελικού τομέα του p53 εμπλέκονται σε μη ειδική σύνδεση του p53 με το DNA αλλά αυτή η σύνδεση προλαμβάνεται όταν οι λυσίνες είναι ακετυλιωμένες, γεγονός που υποβοηθείται από τον συμπαρόγοντα p300, ο οποίος κατ'αυτό τον τρόπο προάγει τη σύνδεση του p53 στην προαναφερθείσα ειδική αλληλουχία. Επιπλέον ο p300 προάγει τη σύνδεση του συνδεδεμένου με ένα μόριο ουβικουιτίνης p53 (μετά τη δράση του mdm2) με πρόσθετα μόρια της και στη συνέχεια την πρωτεασωμική αποδόμησή του.

Εκτός από επαγωγή γονιδίων, η ενεργοποίηση του p53 μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα και καταστολή της μεταγραφής. Στα γονίδια που καταστέλλονται από το p53 ανήκουν το bcl-2, το bcl-x1 και η σουρβιβίνη.

Ιδιαίτερης σημασίας για τον κολο-ορθικό καρκίνο είναι το γεγονός ότι ο p53 ρυθμίζει τη σταθεροποίηση της β-κατενίνης μέσω του γονιδίου- στόχου του Siah-1 (96). Ο Siah-1 είναι μια E3 λιγκάση που συνδέει την β-κατενίνη με ουβικουιτίνη με μια διαδικασία που εμπλέκει το APC αλλά είναι ανεξάρτητη από την GSK3β κινάση. Η σύνδεση με ουβικουιτίνη που γίνεται μέσω του Siah-1 συνδέει τον p53 με την κυτταρική απάντηση στην υποξία καθ'ότι ένζυμα που περιέχουν τομέα υδροξυλίωσης προλίνης (PHD Prolyl Hydroxylating domain) και υδροξυλιώνουν τον μεταγραφικό παράγοντα HIF ώστε να επιτραπεί η αλληλεπίδρασή του με την πρωτεΐνη VHL, είναι υποστρώματα του Siah-1 (97).

Μεταλλάξεις του p53 στον κολο-ορθικό καρκίνο παρατηρούνται στις μισές περίπου περιπτώσεις όπως αποκαλύπτεται με μελέτες που εξετάζουν την αλληλουχία του p53 ή την σταθερότητά του ανοσοϊστοχημικά (η σταθεροποίηση του p53 είναι ένδειξη ότι φέρει μετάλλαξη που αναστέλλει τη φυσιολογική του ανακύκλωση λόγω της αδυναμίας του να δράσει ως μεταγραφικός παράγοντας και να μεταγράψει τον mdm2) (98).

Η πλειονότητα των μεταλλάξεων του p53 (γύρω στο 95%) συμβαίνει στην περιοχή σύνδεσης του μορίου του με το DNA και τα τρία τέταρτα είναι μονήρεις αλλαγές νουκλεοτιδίου. Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει την ανάγκη τόσο της απώλειας της μεταγραφικής λειτουργίας του παράγοντα όσο και της παρουσίας της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης που παρεμβάλλεται στη φυσιολογική λειτουργία του μη μεταλλαγμένου p53 που είναι προϊόν του άλλου αλληλίου. Μεταλλάξεις που έχουν ως αποτέλεσμα απώλεια μέρους του p53 ή και ολική απώλειά του παρουσιάζουν το μειονέκτημα από την πλευρά της ογκογένεσης ότι δεν παρεμβάλλονται στη λειτουργία του φυσιολογικού αλληλίου. Το φυσιολογικό αλληλίο σταθεροποιείται λόγω της παρουσίας της μεταλλαγμένης μορφής που εμποδίζει την λειτουργία του και την μεταγραφή του mdm2 και έτσι μπορεί να διατηρεί κάποιο χαμηλό αλλά σημαντικό για την μεταγραφή γονιδίων-στόχων επίπεδο λειτουργίας εωσότου απώλεια της ετεροζυγωτίας στο γονιδιακό του τόπο οδηγήσει σε ολική απώλεια της δράσης του. Αυτό είναι όψιμο γεγονός στην κολο-ορθική καρκινογένεση και συμβαίνει μετά τη μετάβαση από αδένωμα σε καρκίνωμα (99).

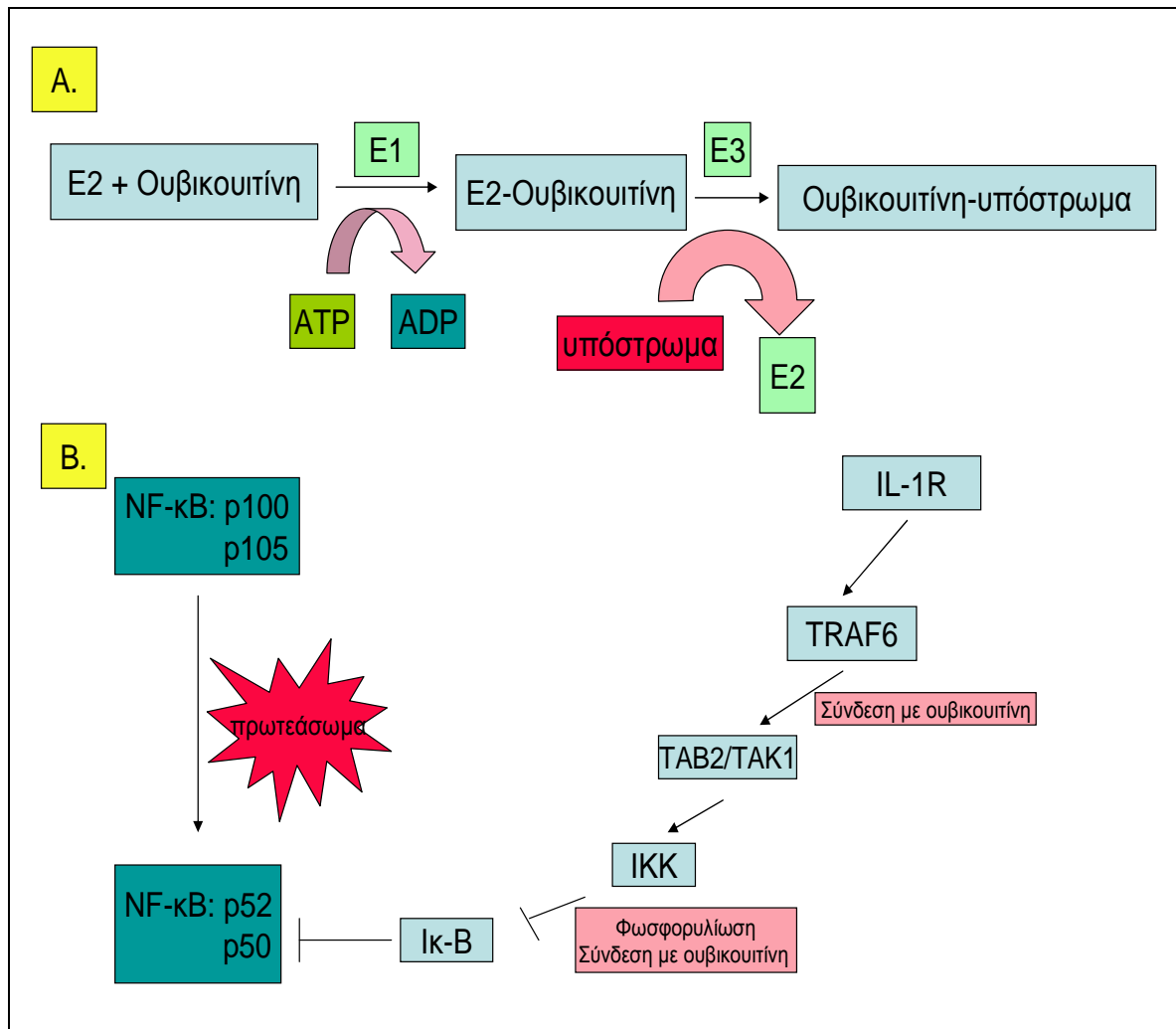
ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΟΥΒΙΚΟΥΙΤΙΝΗΣ-ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ

Η δομή και η λειτουργία του συστήματος

Η ουβικουιτίνη είναι μία πρωτεΐνη με 76 αμινοξέα. Αρχικά έγινε γνωστή με την ιδιότητά της να συνδέεται με πρωτεΐνες που είχαν μη φυσιολογική τριτοταγή δομή μορίου και οι οποίες, μετά από αυτή τη σύνδεση οδηγούνται στο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο του πρωτεασώματος για αποδόμηση. Σύντομα αποκαλύφθηκε ότι το πρωτεάσωμα δεν εξυπηρετούσε μόνο αυτή τη λειτουργία αποδόμησης ελαττωματικών πρωτεϊνών αλλά είναι κύριος ρυθμιστής πολλών κυτταρικών λειτουργιών αποδομώντας και φυσιολογικές πρωτεΐνες (100). Στις λειτουργίες που ρυθμίζονται από το σύστημα ουβικουιτίνης πρωτεασώματος (Ubiquitin-Proteasome

System-UPS) συμπεριλαμβάνονται η μεταγραφή, ο κυτταρικός κύκλος, η απόπτωση, η αποκατάσταση βλαβών DNA, η παρουσίαση αντιγόνων μέσω του MHC I και η απάντηση στο stress (101). Μια σειρά ενζύμων συμμετέχουν στην επιτέλεση της σύνδεσης εκατοντάδων πρωτεϊνών με την ουβικουιτίνη ώστε να αναγνωριστούν στη συνέχεια από το πρωτεάσωμα και να αποδομηθούν. Η σύνδεση μιας πρωτεΐνης με την ουβικουιτίνη επιτελείται σε 3 στάδια που καταλύονται από τρεις κατηγορίες ενζύμων (102). Η πρώτη κατηγορία είναι τα ένζυμα που ενεργοποιούν την ουβικουιτίνη (αποκαλούμενα και E1) τα οποία χρησιμοποιώντας ενέργεια από την αποδόμηση του ATP συνδέονται μέσω μιας κυστεΐνης με την ουβικουιτίνη και την ενεργοποιούν (Εικ. 7Α). Στη συνέχεια η ουβικουιτίνη μεταφέρεται σε μια κυστεΐνη ενός ενζύμου της κατηγορίας E2 (Ubiquitin Conjugating enzyme). Στο τρίτο στάδιο της διαδικασίας, η συνδεδεμένη ουβικουιτίνη μεταφέρεται με την βοήθεια ενός ενζύμου με δράση λιγκάσης της ουβικουιτίνης (αποκαλούμενο και E3) στην πρωτεΐνη στόχο. Στην αντίδραση αυτή συνδέεται η ε-αμίνη μιας λυσίνης του μορίου της πρωτεΐνης στόχου με την καρβοξυτελική γλυκίνη της ουβικουιτίνης. Επιπλέον μόρια ουβικουιτίνης μπορούν να συνδεθούν στο παραπάνω σύμπλεγμα μέσω υπολλειμάτων λυσίνης του μορίου της ουβικουιτίνης, συνήθως το K48. (103). Η σύνδεση της ουβικουιτίνης με πρωτεΐνες- στόχους μέσω άλλων λυσινών του μορίου της όπως η K29 και η K63 δεν αποτελούν μήνυμα αναγνώρισης από το πρωτεάσωμα για αποδόμηση αλλά εμπλέκονται σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες όπως η επιδιόρθωση του DNA και η ενδοκυττάρωση μεμβρανικών πρωτεϊνών (104, 105). Μια αλυσίδα από τουλάχιστον 4 μόρια ουβικουιτίνης χρειάζεται ώστε η πρωτεΐνη στόχος να αναγνωριστεί και να αποδομηθεί από το πρωτεάσωμα. Η επιμήκυνση της αλυσίδας των ουβικουιτινών υποβοηθείται σε μερικές περιπτώσεις από ένα τέταρτο τύπο ενζύμων που ονομάζονται E4 (106). Μια πλειάδα ενζύμων παίρνουν μέρος στην διαδικασία σύνδεσης με ουβικουιτίνη. Υπάρχουν τουλάχιστον 50 διαφορετικά ένζυμα τύπου E2 (107) και πολλά E3 που ανήκουν σε τρεις οικογένειες: Αυτά που φέρουν τομείς HECT (Homologous to E6-associated protein C-terminus), αυτά με τομείς RING (Really Interesting New Gene) και αυτά που περιέχουν τομείς τύπου U-box (Τομέας που είχε περιγραφεί αρχικά στο E4 ένζυμο UFD2 στους μύκητες) (107).

Η αντίστροφη αντίδραση αποσύνδεσης από την ουβικουιτίνη καταλύεται επίσης από ειδικά αποσυνδεδετικά ένζυμα. Υπάρχουν πάνω από 70 τέτοια ένζυμα στα ανθρώπινα κύτταρα (105, 108). Για παράδειγμα το αποσυνδεδετικό ένζυμο στην περίπτωση της β-κατενίνης ονομάζεται Fyn (18). Ένα άλλο παράδειγμα είναι το



Εικόνα 7:

A. Η γενική αλληλουχία των ενζυμικών αντιδράσεων της σύνδεσης μιας πρωτεΐνης-υποστρώματος του πρωτεασώματος με την ουβικουιτίνη.

B. Η ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB από το σύστημα ουβικουιτίνης – πρωτεασώματος. Μερική αποδόμηση από το πρωτεάσωμα των πρόδρομων, ανενεργών μορφών του NF-κB, p100 και p105 οδηγεί στην παραγωγή των ενεργών παραγόντων p52 και p50. Φωσφορυλίωση του αναστολέα I-κB από την κινάση IKK προκαλεί τη σύνδεσή του με ουβικουιτίνη και πρωτεασωμική αποδόμηση. Η σύνδεση με ουβικουιτίνη του παράγοντα TRAF6 μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1, IL-1R, ευνοεί την αλληλεπίδραση με την κινάση TAK1 (και τον συμπαράγοντα TAB2) που ενεργοποιεί την κινάση IKK με τελικό αποτέλεσμα και πάλι την ενεργοποίηση του NF-κB.

ένζυμο HAUSP (Herpesvirus-associated ubiquitin specific protease) το οποίο αποσυνδέει τον p53 από την ουβικουιτίνη (109). Υπο-ομάδες που δρουν ως αποσυνδεδετικά ένζυμα της ουβικουιτίνης υπάρχουν ενσωματωμένες στο σύμπλοκο του πρωτεασώματος (110, 111). Αυτές βοηθούν στην ανακύκλωση της ουβικουιτίνης μετά την αναγνώριση της πρωτεΐνης στόχου από το πρωτεάσωμα και την προώθησή της προς αποδόμηση.

Η συνολική πολυπρωτεϊνική δομή του πρωτεασώματος ονομάζεται 26S και έχει μοριακό βάρος 2,5 MDa και κυλινδρικό σχήμα. Αποτελείται από δύο λειτουργικές υπο-ομάδες. Και τα δύο άκρα του 26S κυλίνδρου καλύπτονται από 19S ρυθμιστικές υπο-ομάδες που λειτουργούν ως αναγνωριστική υπο-ομάδα της συνδεδεμένης με την ουβικουιτίνη πρωτεΐνης την οποία στη συνέχεια αποσυνδέει από την ουβικουιτίνη και ξεδιπλώνει. Η λειτουργία αποδίπλωσης επιτελείται από ένα δακτύλιο 6 πρωτεϊνών που ονομάζονται AAA+ (ATPases associated with various cellular activities) που χρησιμοποιούν ενέργεια από την αποδόμηση ATP (112). Στη συνέχεια η πρωτεΐνη περνά στο κεντρικό τμήμα του 26S πρωτεασώματος που αποτελεί τον καταλυτικό 20S πυρήνα του συμπλόκου αποτελούμενο από δύο επταμερείς α υπο-ομάδες και δύο επταμερείς β υπο-ομάδες και οι δύο σε δακτυλιοειδή σχηματισμό. Οι β υπο-ομάδες βρίσκονται πιο κεντρικά και οι δύο δακτύλιοι που αποτελούνται από τις α υπο-ομάδες πιο περιφερικά στον κύλινδρο του 20S πρωτεασώματος (113). Στα ευκαρυωτικά κύτταρα κάθε υπο-ομάδα των α και β επταμερών δακτυλίων κωδικοποιείται από διαφορετικό γονίδιο κατά τρόπο ώστε να υπάρχουν 14 γονίδια με δύο αντίγραφα το καθένα σε κάθε κύτταρο. Το 20S πρωτεάσωμα έχει τρεις καταλυτικές δραστηριότητες, τύπου χυμοτρυψίνης, τύπου τρυψίνης και τύπου κασπάσης (πεπτιδυλική-γλουταμυλική) (114). Οι β υπο-ομάδες β5, β2 και β1 εμπεριέχουν τις δραστηριότητες αυτές αντίστοιχα (115). Η σημασία της κάθε ενζυμικής δραστηριότητας ποικίλει ανάλογα με τη φύση της πρωτεΐνης-υποστρώματος (116).

Στα υποστρώματα του πρωτεασώματος συγκαταλέγονται παράγοντες μεταγραφής, ρυθμιστές παραγόντων μεταγραφής, κινάσες, φωσφατάσες, αναστολείς κινασών και άλλες πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στην κυτταρική αύξηση, την απόπτωση και την ομοιόσταση (πίνακας 3) (20, 61, 90, 117-140).

Παράδειγμα πρωτεΐνης που ρυθμίζεται από το σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος είναι ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB (Εικ. 7B). Ο NF-κB είναι στην πραγματικότητα μια οικογένεια πρωτεϊνών στην οποία ανήκουν οι Rel-A (p65),

Πίνακας 3. Παραδείγματα πρωτεϊνών-υποστρωμάτων του πρωτεασώματος

<u>Πρωτεΐνη-υπόστρωμα</u>	<u>Λειτουργία</u>
c-myc	Παράγοντας μεταγραφής
C-jun, c-fos, fra-1	Υπομονάδες του μεταγραφικού παράγοντα AP-1
p53	Παράγοντας μεταγραφής
p73	Ομόλογο του p53
ASPP2/53BP2	Συμπαράγοντας του p53
β-κατενίνη	Παράγοντας μεταγραφής και ρυθμιστής του κυτταρικού σκελετού
γ-κατενίνη	Ομόλογο της β-κατενίνης με ρόλο στις διακυτταρικές συνδέσεις και τα δεσμοσωμάτια
Iκ-Ba	Αναστολέας του NF-κΒ
Smad4	Ρυθμιστής της διαμετάδοσης σήματος από τον TGFβ
p27	Αναστολέας των Cdk κινασών
HIF1	Παράγοντας μεταγραφής εμπλεκόμενος στην κυτταρική απάντηση στην υποξεία
PP2A	Φωσφατάση σερίνης /θρεονίνης
Emi1	Αναστολέας του APC (Anaphase promoting complex)
MATa2	Καταστολέας της μεταγραφής
EGFR, PDGFR	Υποδοχείς τυροσινικής κινάσης
Bax, Bik, Bim	Προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας του bcl-2
Mcl-1	Αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας του bcl-2
Επιθηλιακός διάυλος Na ⁺	Ρυθμιστής της συγκέντρωσης Na ⁺ που είναι μεταλλαγμένος στην κυστική ίνωση
Cdc25	Φωσφατάση που ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο
Κυκλίνη E, Κυκλίνη D, CDK4	Κυκλίνες και κινάση που τις ρυθμίζει
Τοπαιομεράσες I και II	Ένζυμα που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA και αποτελούν στόχους αντι-νεοπλασματικών φαρμάκων
Σταθμίνη	Ρυθμιστής του πολυμερισμού των μικροσωληναρίων του κυτταροσκελετού
APC	Ρυθμιστής της β-κατενίνης
Προλύλ-υδροξυλάσες 1 και 3	Ένζυμα που υδροξυλιώνουν τον μεταγραφικό παράγοντα HIF
Δεκαρβοξυλάση της ορνιθίνης	Ένζυμο της βιοσύνθεσης των πολυαμινών
Rpn4	Πρωτεΐνη, μέρος του πρωτεασώματος
ERK3	Κινάση της οδού των MAPK
Akt	Κινάση που προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την απόπτωση
Twist	Μεταγραφικός παραγοντας της οικογένειας bHLH (basic helix-loop-helix)
DCC	Διαμεμβρανικός υποδοχέας της νετρίνης
PIN2/TRF1	Ρυθμιστής του μήκους των τελομερειών και του κυτταρικού κύκλου
Υποδοχέας της 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης	Υποδοχέας του ενδοπλασματικού δικτύου που ρυθμίζει τις συγκεντρώσεις Ca ⁺⁺
FoxO	Παράγοντας μεταγραφής, ρυθμιστής της β-κατενίνης
ERα	Παράγοντας μεταγραφής του τύπου των πυρηνικών υποδοχέων
RhoA	GTP-άση

Rel-B, C-Rel, p50 και p52 και οι οποίες συνδέονται στο DNA ως διμερή (141). Ο αναστολέας I-κΒ συνδέεται στον NF-κΒ, και τον διατηρεί μεταγραφικά ανενεργό. Σήματα που ενεργοποιούν τον NF-κΒ ενεργοποιούν την κινάση IKK η οποία φωσφορυλιώνει τον αναστολέα I-κΒ. Η φωσφορυλίωση οδηγεί σε σύνδεση του I-κΒ με ουβικουιτίνη με τη μεσολάβηση της E3 λιγκάσης βTrCP έτσι ώστε ο αναστολέας αποδομείται στο πρωτεάσωμα και ο NF-κΒ απελευθερώνεται για να εκτελέσει την μεταγραφική του λειτουργία.

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας του NF-κB αποτελούν παράδειγμα και ενός άλλου μηχανισμού ρύθμισης από το πρωτεάσωμα, της διάτμησης μιας πρωτεΐνης προκειμένου να παραχθεί η ενεργός μορφή της. Με αυτό το μηχανισμό το πρωτεάσωμα παράγει από τις πρωτεΐνες p100 και p105 τους ώριμους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας του NF-κB p52 και p50 αντίστοιχα. Παρά το ότι δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως πως το πρωτεάσωμα κατορθώνει να αποδομήσει μόνο μερικώς μια πρωτεΐνη στα πλαίσια της ρύθμισής της, τα περισσότερα δεδομένα συγκλίνουν προς την υπόθεση ότι στις περιπτώσεις μερικής αποδόμησης η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης στόχου επιτρέπει μόνο τη μερική είσοδό της στον κύλινδρο του πρωτεασώματος (142, 143).

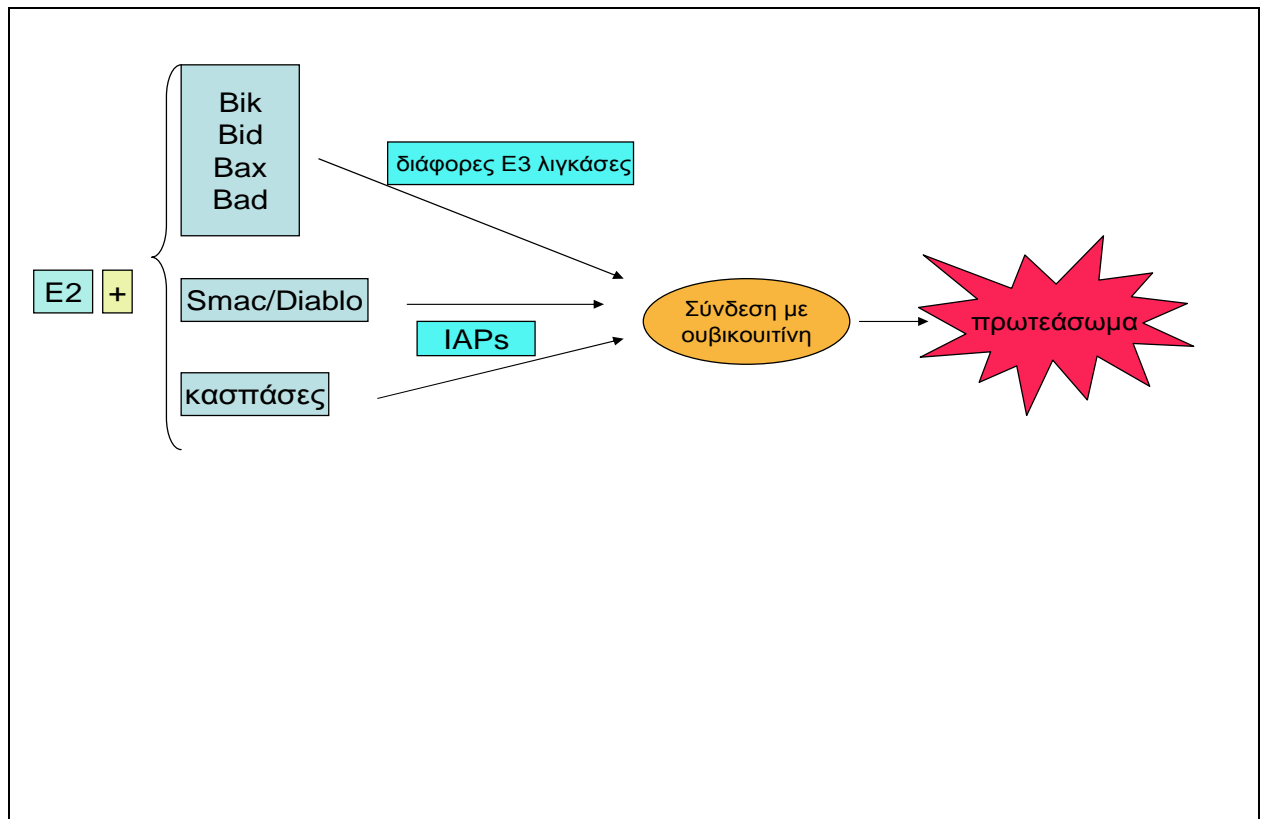
Ο NF-κB ρυθμίζεται από το σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος και μέσω ακόμα ενός μηχανισμού που προϋποθέτει τη σύνδεση με ουβικουιτίνη της πρωτεΐνης TRAF6 (TNFR-associated Factor 6), ενός παράγοντα που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του υποδοχέα IL-1R μετά τη σύνδεση με την ιντερλευκίνη-1 (IL-1). Μετά τη σύνδεση με ουβικουιτίνη ο TRAF6 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη TAB2 (TAK1 binding protein 2) και την κινάση TAK1 (TGFβ activated kinase 1). Αυτό οδηγεί σε ενεργοποίηση της TAK1 η οποία φωσφορυλιώνει την κινάση IKK ώστε αυτή να φωσφορυλιώσει με τη σειρά της τον αναστολέα I-κB (144). Η σύνδεση με ουβικουιτίνη τόσο της β-κατενίνης όσο και του I-κB που οδηγεί σε ενεργοποίηση του NF-κB διενεργείται μέσω της ίδιας E3 λιγκάσης, της βTrCP (145). Η οδός Wnt/TCF4 αυξάνει τα επίπεδα της βTrCP με ένα μηχανισμό που δεν εξαρτάται από αυξημένη μεταγραφή της αλλά από σταθεροποίηση του μορίου της και μειωμένη αποδόμηση (36). Η δράση αυτή ευνοεί την αποδόμηση της ίδιας της β-κατενίνης αλλά ταυτόχρονα μπορεί να ευνοεί και την ενεργοποίηση του NF-κB και να εξηγεί την αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του παράγοντα αυτού στον κολο-ορθικό καρκίνο (146, 147). Επιπλέον τόσο η β-κατενίνη όσο και ο I-κB είναι υποστρώματα της πρωτεόλυσης από την πρωτεάση μ-καλπαΐνη (148). Η πρωτεόλυση του I-κB από την μ-καλπαΐνη εξαρτάται από την αλληλουχία PEST (προλίνη-γλουταμικό-σερίνη-θρεονίνη) που παρουσιάζει το μόριο του I-κB. Σε συνθήκες αυξημένων συγκεντρώσεων της β-κατενίνης όπως στον κολο-ορθικό καρκίνο με μετάλλαξη στο APC μπορεί να περιορίζεται η αποδόμηση του I-κB από την μ-καλπαΐνη λόγω κορεσμού της.

Το σύστημα ουβικουιτίνης- πρωτεασώματος στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης

Το σύστημα ουβικουιτίνης- πρωτεασώματος παίζει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση. Αυτός ο ρόλος αναμένεται από τη λίστα των πρωτεϊνών-υποστρωμάτων του η οποία περιέχει πολλούς κεντρικούς ρυθμιστές των λειτουργιών αυτών (Πίνακας 3).

Όσον αφορά στην απόπτωση, έχουν περιγραφεί δύο διακριτές οδοί που οδηγούν σ' αυτή και ονομάζονται εξωγενής και ενδογενής (149). Η εξωγενής οδός ξεκινά από τους υποδοχείς θανάτου (death receptors) της κυτταρικής μεμβράνης οι οποίοι, όταν διεγερθούν συνδέονται και ενεργοποιούν μια πρώτη σειρά πρωτεολυτικών ενζύμων της κατηγορίας των κασπασών και κύρια την κασπάση-8 και οι οποίες ενεργοποιούν με τη σειρά τους μία δεύτερη ομάδα εκτελεστικών κασπασών με κύριους εκπροσώπους τις κασπάσες-3 και -7 (150).

Η ενδογενής οδός της απόπτωσης ενεργοποιείται από μιτοχονδριακά σήματα που οδηγούν σε απελευθέρωση των πρωτεϊνών κυτόχρωμα C (cytochrome C), apaf-1 και Smac/Diablo στο κυτταρόπλασμα. Η απελευθέρωση των πρωτεϊνών αυτών οδηγεί σε εξουδετέρωση των αναστολέων της απόπτωσης IAPs με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 η οποία ενεργοποιεί στη συνέχεια τις ίδιες εκτελεστικές κασπάσες με την εξωγενή οδό. Υπάρχει δηλαδή μια σύγκλιση των δύο οδών της απόπτωσης στο τελικό τους στάδιο. Οι εκτελεστικές κασπάσες πρωτεολύουν μια πλειάδα κυτταρικών πρωτεϊνών οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο. Το σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος υπεισέρχεται στη ρύθμιση πολλών από τις κύριες πρωτεΐνες του μηχανισμού της απόπτωσης. Οι πρωτεΐνες της bcl-2 οικογένειας, Bax, Bad, Bid και Bik όπως επίσης και ο Smac/ Diablo και οι αναστολείς της απόπτωσης IAPs είναι υποστρώματα του πρωτεασώματος (Εικ. 8). Όλα τα μέλη της οικογένειας των IAPs περιέχουν τομείς BIR (Bacilovirus Inhibitor of apoptosis Repeats) γεγονός που αποτελεί προϋπόθεση για την κατάταξη μιας πρωτεΐνης στους IAPs (151). Οι τομείς BIR αντιπροσωπεύουν αλληλουχίες περίπου 65 αμινοξέων πλουσίων σε κυστεΐνες οι οποίες μεσολαβούν στην αλληλεπίδραση των IAPs με τις κασπάσες που οδηγεί σε αναστολή τους. Οι IAPs περιέχουν επίσης τομείς τύπου RING οι οποίοι επιτρέπουν αλληλεπίδραση με E2 ένζυμα σύζευξης με την ουβικουιτίνη, μια ιδιότητα που χαρακτηρίζει την E3 ενζυμική δραστηριότητα λιγκάσης



Εικόνα 8:

Ο ρόλος του πρωτεασώματος στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Τα μέλη της bcl-2 οικογένειας Bax, Bad, Bid και Bik είναι υποστρώματα του πρωτεασώματος όπως και οι κασπάσες και ο παράγοντας Smac/Diablo. Στις δύο τελευταίες περιπτώσεις οι αναστολείς της απόπτωσης IAPs παίζουν το ρόλο E3 λιγκάσης.

των IAPs (152, 153). Μέσω αυτής της E3 ενζυμικής δραστηριότητας οι IAPs αναστέλλουν τη δράση του Smac/ Diablo και οδηγούν σε αποδόμησή του. Ταυτόχρονα οι IAPs συνδέονται με ουβικουιτίνη και ακολουθεί αυτό-εξουδετέρωση και πρωτεασωμική αποδόμησή τους. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ IAPs και Smac/ Diablo και IAPs με κασπάσες γίνονται μέσω τομέων BIR από την πλευρά των IAPs και μέσω ενός τομέα αποκαλούμενου IBM (IAP- binding motif) με 4 αμινοξέα του Smac/ Diablo και ενός ομολόγου τομέα στην περίπτωση των κασπασών (154, 155). Οι IAPs με αυτό τον τρόπο αποτελούν ένα μηχανισμό ασφαλείας που εξουδετερώνει

την τυχαία διαρροή μορίων του Smac/ Diablo (156) και άλλων επαγωγέων της απόπτωσης όπως ο AIF (Apoptosis Inducing Factor) και ο HtrA2/ Omi από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα που θα οδηγούσε σε έναρξη απόπτωσης χωρίς να υπάρχει το φυσιολογικό σήμα είτε από την εξωγενή είτε από την ενδογενή οδό (155, 157). Όταν αυτά τα σήματα παρουσιάζονται, ο μηχανισμός ασφαλείας των IAPs εξουδετερώνεται (158). Ένα ακόμα μόριο που συνδέεται και αναστέλλει τους IAPs εκτός από τον Smac/ Diablo και τον HtrA2/Omi είναι ο παράγοντας επιμήκυνσης GSPT1/ eRF. Η πρωτεΐνη αυτή αποδεσμεύεται από την αρχική της θέση στα συνδεδεμένα με το ενδοπλασματικό δίκτυο μικροσώματα και συνδέεται στο κυτταρόπλασμα με τους IAPs αναστέλλοντας την αλληλεπίδρασή τους με τις κασπάσες (159). Η αλληλεπίδραση των IAPs με τον GSPT1/ eRF συνδέει την απόπτωση με την μετάφραση του RNA.

Υπάρχει επίσης μια αντίστροφη σχέση μεταξύ κασπασών και πρωτεασώματος κατά την οποία στη διαδικασία της απόπτωσης η ενεργοποίηση των κασπασών απενεργοποιεί το πρωτεάσωμα (160, 161). Ιδιαίτερα οι δράσεις χυμοτρυψίνης και πεπτιδουλ-γλουταμυλ-πρωτεάσης του πρωτεασώματος επηρεάζονται λόγω αποδόμησης των υποομάδων Rpt5 και Rpn10 που εμπλέκονται στην αναγνώριση του υποστρώματος και της υπομονάδας Rpn 2 που υπεισέρχεται στη διατήρηση της συνοχής του 19S πρωτεασώματος (160, 161). Το γεγονός ότι οι ενεργοποιημένες εκτελεστικές κασπάσες αποδομούν στοιχεία του πρωτεασώματος με αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης του μπορεί να τεκμηριώσει τον σημαντικό ρόλο που παίζει το πρωτεάσωμα στην κυτταρική επιβίωση ο οποίος πρέπει να εξουδετερωθεί ώστε να προχωρήσει η απόπτωση (162). Αυτό συμβαίνει παρά το ότι το πρωτεάσωμα αποδομεί επίσης τα μέλη της οικογένειας των IAPs, XIAP και cIAP1 που αναστέλλουν την απόπτωση (163).

Τόσο ο p53 όσο και ο συμπαράγοντάς του ASPP2/ 53BP2 είναι υποστρώματα του πρωτεασώματος (119) και λόγω του σημαντικού ρόλου τους στην απόπτωση, η αποδόμησή τους είναι ένας ακόμα ρυθμιστικός μηχανισμός του συστήματος ουβικουιτίνης – πρωτεασώματος στη λειτουργία αυτή (164, 165).

Ο ρόλος του συστήματος ουβικουιτίνης- πρωτεασώματος στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου είναι επίσης σημαντικός (166). Δύο τύποι E3 λιγκασών, η APC/C (Anaphase Promoting Complex/ Cyclosome) και αυτές της κατηγορίας SCF (Skp1/

Cullin/ F- box Protein) εμπλέκονται στη ρύθμιση αυτή (167). Στη μιτωτική μετάφαση οι σύστοιχες χρωματίδες παραμένουν συνδεδεμένες στο κεντρομερίδιο έως ότου όλες συνδεθούν στο κεντρόσωμα μέσω των μικροσωληναρίων της μιτωτικής ατράκτου. Όταν ολοκληρωθεί αυτή η σύνδεση στο τέλος της μετάφασης η E3 λιγκάση APC/C που μέχρι τότε παρέμενε ανενεργή, ενεργοποιείται και συνδέει με ουβικουιτίνη την πρωτεΐνη σκειουρίνη, η οποία προωθείται για πρωτεασωματική αποδόμηση. Η σκειουρίνη είναι αναστολέας της πρωτεάσης σεπαράσης η οποία μετά την αποδόμηση της σκειουρίνης, αφήνεται να πρωτεολύσει τις πρωτεΐνες κοεζίνες που κρατούν συνδεδεμένες τις αδελφές χρωματίδες. Έτσι η κάθε χρωματίδα του ζεύγους έλκεται στους αντίθετους πόλους της μιτωτικής ατράκτου και ξεκινά η ανάφαση (168). Η κυκλίνη B που είναι από τους κύριους ρυθμιστές της μίτωσης και αποτελεί με την cdc2 τον παράγοντα που προωθεί τη μίτωση (MPF – Mitosis Promoting Factor) είναι επίσης υπόστρωμα σύνδεσης με την ουβικουιτίνη της APC/C λιγκάσης (169). Ο MPF φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την μίτωση ώστε το κύτταρο να περάσει από την ενδιάμεση φάση G2 στη μίτωση. Όταν η μίτωση περατούται η κυκλίνη B συνδέεται με ουβικουιτίνη από την APC/C, αποδομείται από το πρωτεάσωμα και το κύτταρο εξέρχεται από τη μίτωση στην ενδιάμεση φάση G1.

Η αναστολή του πρωτεασώματος στον κολο-ορθικό καρκίνο

Όπως έγινε φανερό από τις παραπάνω συζητήσεις οι κύριοι ρυθμιστές των μοριακών οδών που εμπλέκονται στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου (β-κατενίνη, Smad 4, p53 και NF-κB) ρυθμίζονται με τη σειρά τους από το σύστημα ουβικουιτίνης – πρωτεασώματος. Φαρμακευτική (ή άλλη) αναστολή του πρωτεασώματος αναμένεται να έχει αντικαρκινική δράση αναστέλλοντας την αποδόμηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων Smad4 και p53 και αναστέλλοντας τη δράση του NF-κB που δρα αντι-αποπτωτικά και προάγει την αντίσταση σε κοινά αντικαρκινικά φάρμακα. Αντίθετα αναστολή της αποδόμησης της αντι-αποπτωτικής β-κατενίνης ήδη λαμβάνει χώρα στους περισσότερους κολοορθικούς καρκίνους ανεξάρτητα από την αναστολή του πρωτεασώματος, λόγω μεταλλάξεων στο APC. Επιπλέον η αύξηση των επιπέδων της β-κατενίνης μπορεί να έχει και αντικαρκινικά αποτελέσματα μέσω μη-μεταγραφικών μηχανισμών όπως συζητήθηκε στο αντίστοιχο κεφάλαιο. Παρά το γεγονός ότι το πρωτεάσωμα έχει υποστρώματα στα οποία περιλαμβάνονται τόσο αντι-αποπτωτικές όσο και προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες, η δυσλειτουργία του ή η αναστολή του

αναμένεται να επηρεάσει σημαντικά την κυτταρική ομοιόσταση και να ωθήσει προς την απόπτωση ιδιαίτερα ασταθή κύτταρα όπως τα καρκινικά που έχουν εντονότερο μεταβολισμό από τα φυσιολογικά και κατά συνέπεια γρηγορότερη ανακύκλωση πρωτεϊνών. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται και από την αναστολή του πρωτεασώματος από τις εκτελεστικές κασπάσες (160, 161).

Ο αναστολέας των κινασών που εξαρτώνται από τις κυκλίνες p27 είναι κύριος ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου και υπόστρωμα του πρωτεασώματος. Έχει βρεθεί ότι ο p27 καταστέλλεται στον κολο-ορθικό καρκίνο λόγω αυξημένης πρωτεασωμικής δραστηριότητας (170). Δείγματα μεταστατικών κολο-ορθικών όγκων επιδεικνύουν χαμηλότερη ανοσοϊστοχημική θετικότητα για το p27 από ότι οι αντίστοιχοι πρωτοπαθείς όγκοι των ιδίων ασθενών (171). Η E3 λιγκάση της ουβικουιτίνης SKP2 (S phase kinase- associated protein 2) και ο συμπαράγοντας CKS1 (Cyclin kinase subunit 1) που επιτελούν την σύνδεση του p27 με ουβικουιτίνη ώστε αυτό να αποδομηθεί στη συνέχεια από το πρωτεάσωμα υπερεκφράζονται σε λιγότερο διαφοροποιημένους κολο-ορθικούς καρκίνους (172, 173). Τα επίπεδα τους συσχετίζονται με πτωχότερη πρόγνωση σε σχέση με όγκους που εκφράζουν χαμηλότερα επίπεδα αυτών των E3 λιγκασών. Οι κολο-ορθικοί καρκίνοι δείχνουν εκτός από αυξημένη έκφραση του NF-κB και αύξηση της έκφρασης της κινάσης IKKα (174) υπογραμμίζοντας το ρόλο του πρωτεασώματος στην υπερέκφραση του παράγοντα NF-κB. Με βάση τα παραδείγματα αυτά η αναστολή του πρωτεασώματος έχει τη δυνατότητα να συμβάλλει στην καταστολή της κολο-ορθικής καρκινογένεσης (175).

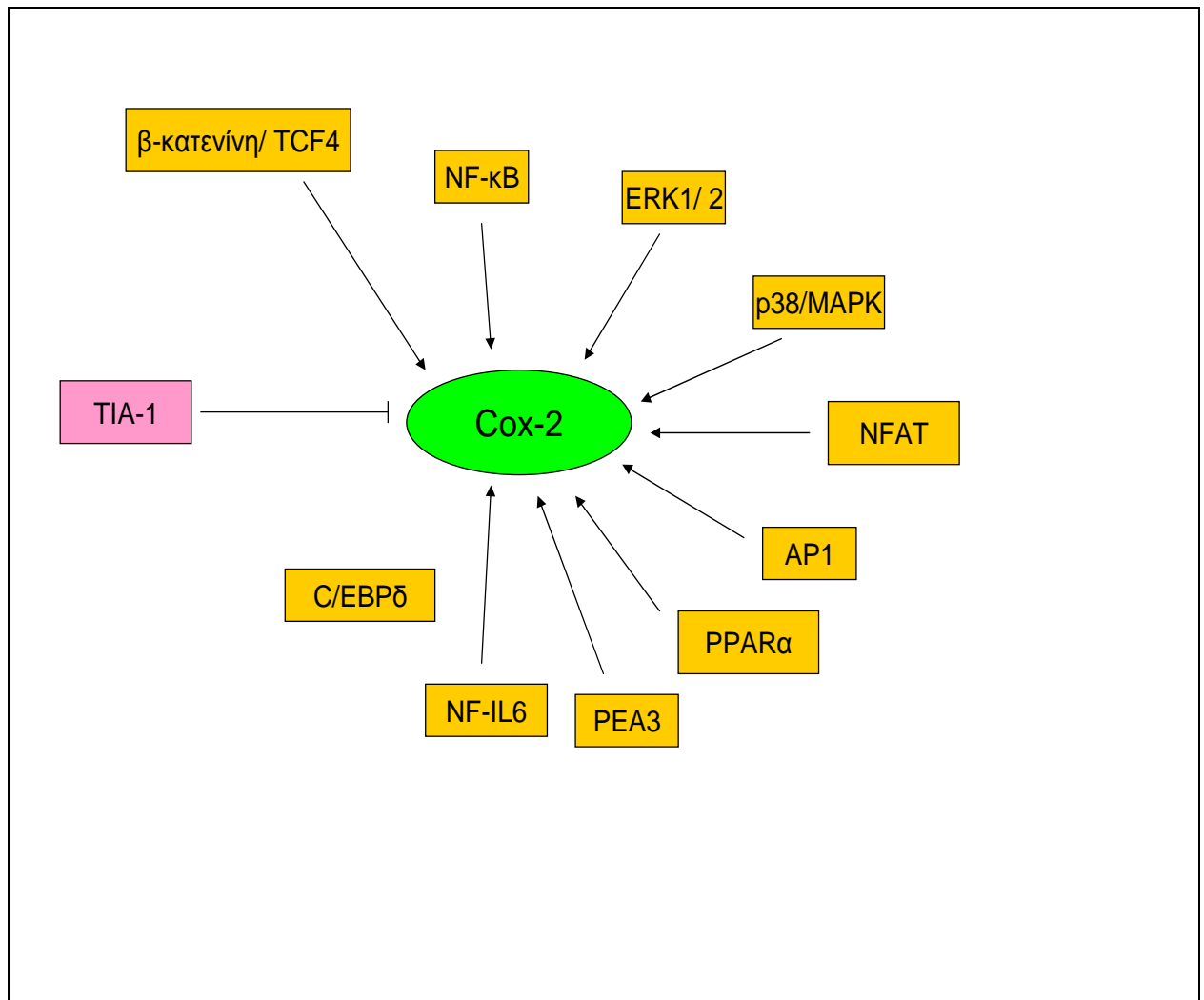
Η ΚΥΚΛΟ-ΟΞΥΓΕΝΑΣΗ-2

Η κυκλο-οξυγενάση 2 (Cox -2) στον κολο-ορθικό καρκίνο

Η σημασία του ενζύμου της κυκλο-οξυγενάσης 2 (Cox-2 ή προσταγλανδίνη ενδοπεροξειδάση Η συνθάση 2) στην παθογένεση του κολο-ορθικού καρκίνου έγινε φανερή με τυχαίο τρόπο όταν βρέθηκε ότι ασθενείς με οικογενή πολυποδίαση που έπαιρναν μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα είχαν υποχώρηση των πολυπόδων τους σε σχέση με μη χρήστες των φαρμάκων αυτών (176). Η Cox-2 υπερεκφράζεται στην πλειονότητα των κολο-ορθικών καρκίνων αλλά και σε καρκίνους άλλων

εντοπίσεων όπως κεφαλής και τραχήλου, μαστού, τραχήλου μήτρας, ουροδόχου κύστης, στομάχου και αλλού (177). Η Cox-2 υπερ-εκφράζεται στον κολο-ορθικό καρκίνο και σε άλλα ζώα (178). Το γονίδιο της Cox-2 είναι μεταγραφικός στόχος της β-κατενίνης/ TCF 4, του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, όπως και μεταγραφικών προγραμμάτων που ξεκινούν μετά από ενεργοποίηση του ογκογονιδίου k-ras (179-182) (Εικ. 9). Η συνεργασία των κινασών ERK1 και 2 και p38/MAPK και του NF-κB απαιτείται για τη μεταγραφή της Cox-2 από τους ενεργοποιημένους από πρωτεάσες υποδοχείς PARs (183) όπως επίσης και για την επαγωγή της Cox-2 από την ιντερφερόνη γ (184) και εξωγενή καρκινογόνα (185) σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Ο NF-κB και η p38/MAPK κινάση αλλά όχι η ERK1 και 2 υπεισέρχονται στην επαγωγή της Cox-2 από την ιντερλευκίνη-1β (186). Ο μεταγραφικός παράγοντας AP1 ενεργοποιεί τη μεταγραφή της Cox-2 και η αναστολή του καταστέλλει την έκφραση της Cox-2 (187). Μια αλληλουχία ρυθμιζόμενη από την ιντερλευκίνη 6 (IL-6 Regulatory Element) η οποία συνδέει τον μεταγραφικό παράγοντα NF-IL6 και μια άλλη ρυθμιζόμενη από το cAMP (cAMP Response Element – CRE) υπάρχουν στον προαγωγέα του γονιδίου της Cox-2. Η αλληλουχία για τον NF-IL6 είναι σημαντική για την επαγωγή της Cox-2 από τον μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας Ets, PEA3 (188). Επίσης ο προαγωγέας της Cox-2 φέρει αλληλουχίες για τον παράγοντα NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) και για τον PPARα (Peroxisome Proliferator Activated Receptor α) (189-191). Η αλληλουχία που συνδέει τον PPARα ονομάζεται PPRE (Peroxisome Proliferator Response Element) και αξίζει να σημειωθεί ότι δεν απαντά στον παράγοντα της ίδιας οικογένειας PPARγ (191). Μετά τη μεταγραφή το mRNA της Cox-2 ρυθμίζεται από τον καταστολέα της μετάφρασης TIA-1 (192,193). Ο TIA-1 συνδέεται στο mRNA της Cox-2 μέσω μιας αλληλουχίας πλούσιας σε αδενίνες και ουρακίλες (AU – rich element – ARE) που αυτό φέρει στο μη μεταφραζόμενο 3' άκρο του (3' - untranslated region-3-UTR) και καταστέλλει την μετάφραση.

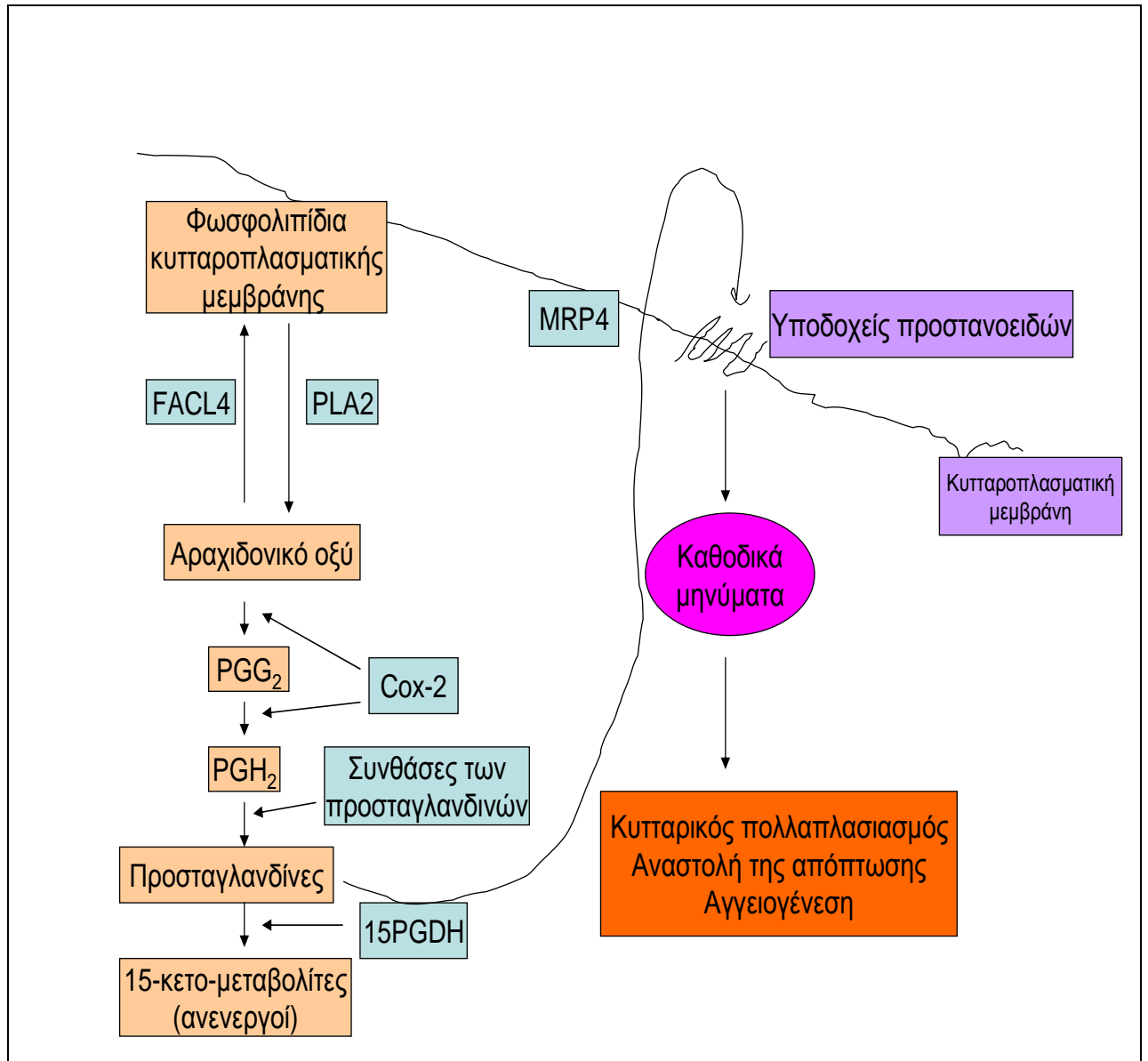
Η Cox-2 είναι επαγόμενη μορφή του ενζύμου που καταλύει μέσω δράσης κυκλο-οξυγενάσης και ενδοπεροξειδάσης, τη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος (5, 8, 11, 14 -είκοσι-τετραεν-ικο οξύ) σε προσταγλανδίνη G₂ (PGG₂) και PGH₂ η οποία τελικά μετατρέπεται στις προσταγλανδίνες PGE₂, PGD₂, PGF₂, PGI₂ και TXA₂ μέσω της δράσης των ειδικών συνθασών των προσταγλανδινών (194) (Εικ. 10). Οι



Εικόνα 9:

Η ρύθμιση της έκφρασης της Cox-2. Εικονίζονται οι παράγοντες μεταγραφής και οι οδοί που ρυθμίζουν την Cox-2. Επίσης, απεικονίζεται η αναστολή μετάφρασης του mRNA της Cox -2 από τον αναστολέα της μετάφρασης TIA-1.

προσταγλανδίνες μεταφέρονται εκτός του κυττάρου από τον μεμβρανικό μεταφορέα MRP4 (Multidrug Resistance Protein 4) (195) και συνδέονται με τους αντίστοιχους υποδοχείς τους στο ίδιο το κύτταρο ή σε γειτονικά κύτταρα δρώντας δηλαδή με ένα αυτοκρινικό και παρακρινικό τρόπο. Η δράση των προσταγλανδινών οδηγεί σε



Εικόνα 10:

Η παραγωγή και δράση των προσταγλανδινών. Τα φωσφολιπίδια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης κινητοποιούνται από την φωσφολιπάση A2 για την παραγωγή ελεύθερου αραχιδονικού οξέος που είναι το υπόστρωμα της κυκλοοξυγενάσης 2 (Cox-2). Η Cox-2 με δύο διαδοχικές αντιδράσεις μετατρέπει το αραχιδονικό οξύ σε PGG₂ που είναι το υπόστρωμα των ειδικών συνθασών των διαφόρων προσταγλανδινών. Η Cox-2, εκτός από την δράση της στο αραχιδονικό οξύ, επιρρεάζει και άλλες πρωτεΐνες της οδού όπως την 15PGDH και τον μεταφορέα MRP4.

κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αναστολή της απόπτωσης και αγγειογένεση (196, 197). Οι υποδοχείς των προσταγλανδινών ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των υποδοχέων τύπου ροδοψίνης και έχουν επτά διαμεμβρανικούς τομείς (198). Συστηματική δράση των προσταγλανδινών δεν υφίσταται καθώς οι μικρές ποσότητες που εισέρχονται στην κυκλοφορία απενεργοποιούνται γρήγορα ενζυματικά κατά το πρώτο πέρασμα τους από τους πνεύμονες (199). Υπάρχουν τέσσερις διαφορετικοί υποδοχείς για την προσταγλανδίνη PGE₂ που ονομάζονται EP1 έως 4, και μεταδίδουν το μήνυμά τους ενδοκυττάρια μέσω κινητοποίησης του ασβεστίου και μέσω του cAMP. Επιπλέον ο υποδοχέας EP4 ενεργοποιεί την οδό PI3K/akt (200). Η ενεργοποίηση της PI3K κινάσης από τον EP4 γίνεται μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα του επιδερμοειδούς παράγοντα EGFR και οδηγεί σε ενεργοποίηση της κινάσης akt (201, 202). Ο μεταγραφικός παράγοντας PPARβ/δ ενεργοποιείται στη συνέχεια από την akt. Για το λόγο αυτό ποντίκια APC^{Min} (που φέρουν πολύποδες εντέρου λόγω απενεργοποίησης του APC) επιδεικνύουν λιγότερους πολύποδες μετά από ενεργοποίηση της οδού της προσταγλανδίνης PGE₂, όταν ταυτόχρονα ο παράγοντας PPAR β/δ είναι απενεργοποιημένος (203). Ο ρόλος, πάντως, του PPAR β/δ στην κολο-ορθική καρκινογένεση είναι αμφισβητούμενος καθώς άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι αυτός έχει ογκοκατασταλτικές ιδιότητες (204, 205). Μετά από σύνδεση της προσταγλανδίνης PGE₂, οι υποδοχείς EP ενεργοποιούν την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Gas, η οποία αλληλεπιδρά με την αξίνη. Η σύνδεση Gas/ αξίνης εμποδίζει την τελευταία να εκτελέσει τη ρυθμιστική λειτουργία της ως μέλος του συμπλόκου με την β-κατενίνη, το APC και την GSK3β κινάση. Έτσι η β-κατενίνη δεν μπορεί συνδεθεί με ουβικουτίνη και προχωρεί σε είσοδο στον πυρήνα για την έναρξη μεταγραφής (206, 207). Κατ' αυτόν τον τρόπο επαναλαμβάνεται ένας επανατροφοδοτούμενος κύκλος στο καρκινικό κύτταρο καθώς η αυξημένη δραστηριότητα β-κατενίνης οδηγεί σε περαιτέρω ενεργοποίηση του υποδοχέα EGFR (208).

Ένας πρόσθετος μηχανισμός μέσω του οποίου η προσταγλανδίνη PGE₂ που παράγεται από τα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου προωθεί την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων είναι με την επιρροή της στο ανοσοποιητικό σύστημα (209). Προάγει την λειτουργία των ρυθμιστικών CD4⁺/CD25⁺ T λεμφοκυττάρων που έχουν τη δυνατότητα να καταστέλλουν τα ειδικά κυτταροτοξικά κατά του όγκου T κύτταρα. Η αύξηση της λειτουργίας των CD4⁺/CD25⁺ T λεμφοκυττάρων συνοδεύεται από

αύξηση της έκφρασης του ειδικού δείκτη που τα χαρακτηρίζει του Foxp3. Σε ένα in vivo μοντέλο σε ποντίκια οι αναστολές της Cox -2 αναστρέφουν αυτές τις δράσεις της PGE₂ στο ανοσοποιητικό (210).

Η σημασία της μεταγωγής σήματος που ξεκινά από τον υποδοχέα της PGE₂ προσταγλανδίνης EP1 έχει περιγραφεί σε ένα μοντέλο ποντικίου knock-out για αυτόν τον υποδοχέα όπου παρατηρήθηκε μείωση κατά 60% των ανώμαλων κρυπτικών εστιών ACF μετά από έκθεση ποντικών στο αζοξυμεθάνιο σε σύγκριση με τους μάρτυρες (211). Αντιθέτως ποντικοί knock-out για τον υποδοχέα EP3 δεν επέδειξαν μείωση των ανώμαλων κρυπτικών εστιών.

Τα άλλα προστανοειδή PGD₂, PGF₂, PGI₂ (προστακυκλίνη) και TXA₂ (θρομβοξάνη) έχουν έναν μεμβρανικό υποδοχέα το καθένα που ονομάζεται DP, FP, IP και TP αντίστοιχα. Ο υποδοχέας της θρομβοξάνης TP μεσολαβεί στη δράση των πεπτιδίων των επονομαζόμενων trefoil (TTFs). Αυτά είναι μια ομάδα τριών ανθεκτικών στα οξέα, στη θέρμανση και στις πρωτεάσες πεπτιδίων που εκκρίνονται στο γαστρεντερικό σωλήνα σε φλεγμονώδεις καταστάσεις και οδηγούν σε επούλωση των εντερικών ελκών και τραυμάτων (212). Τα πεπτίδια TTFs επάγουν τη δράση της Cox-2 μέσω της οδού της φωσφολιπάσης C με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή θρομβοξάνης TXA₂. Η TXA₂ συνδέεται με τον υποδοχέα της TP ο οποίος σε συνεργασία με τις G-πρωτεΐνες Gaq, Ga12 και Ga13 ευνοεί την μεταστατική ικανότητα του κυττάρου μέσω αυξημένης ικανότητας διήθησης ιστών (213). Η διήθηση ιστών και το μεταστατικό δυναμικό που προάγεται από τις G-πρωτεΐνες Ga12 και Ga13 έχει σχέση με τη δυνατότητά τους να αλληλεπιδρούν με τον κυτταροπλασματικό τομέα της E-καδερίνης και να προκαλούν αποσύνδεση της β-κατενίνης. Στο κύτταρο του κολο-ορθικού καρκίνου που φέρει μεταλλαγμένο APC η ελεύθερη κυτταροπλασματική β-κατενίνη δεν αποδομείται αλλά εισέρχεται στον πυρήνα για μεταγραφική δράση. Οι αλληλεπιδράσεις της Cox-2 με την TXA₂ είναι μεταξύ των συνδετικών κρίκων της φλεγμονής με την καρκινογένεση στο παχύ έντερο.

Η συγκέντρωση των προσταγλανδινών είναι αυξημένη στον κολο-ορθικό καρκίνο γιατί εκτός από την ενεργοποίηση της Cox-2, παρατηρείται και μειωμένη έκφραση του ενζύμου δεϋδρογενάσης της 15 υδροξυπροσταγλανδίνης (15PGDH). Αυτό το ένζυμο οξυδώνει την 15-S ομάδα υδροξυλίου των προσταγλανδινών σε ανενεργούς

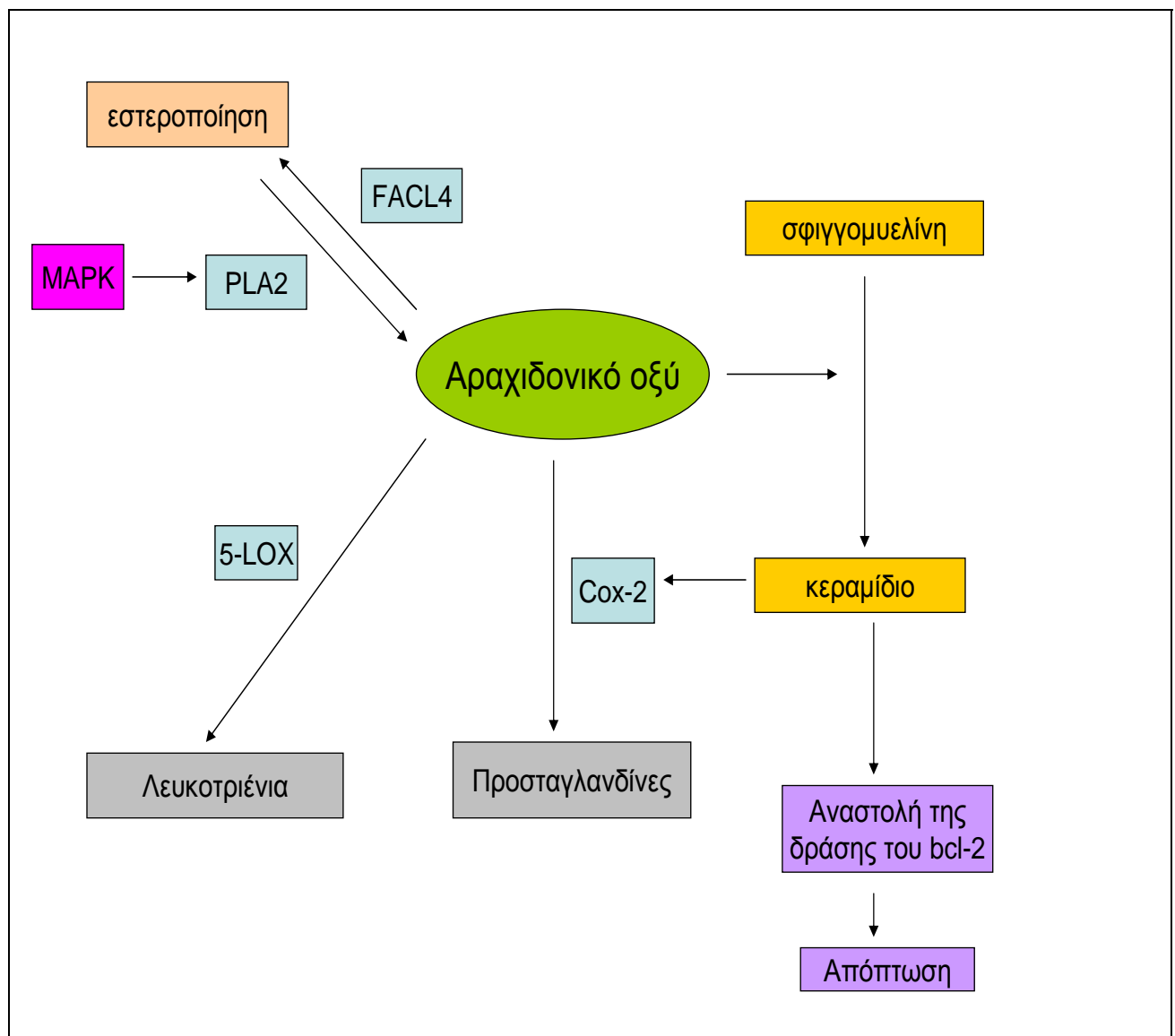
15-κέτο μεταβολίτες και έχει βρεθεί να έχει μειωμένη έκφραση σε κυτταρικές σειρές κολο-ορθικού καρκίνου, σε αδενώματα των ποντικών APC και σε ιστολογικά δείγματα ανθρωπίνων κολο-ορθικών καρκινωμάτων σε σύγκριση με το γειτονικό φυσιολογικό επιθήλιο (214). Η 15PGDH είναι, φυσιολογικά, ένα γονίδιο επαγόμενο από τον TGF- β και γι' αυτό η δυσλειτουργία της οδού του παράγοντα αυτού στον κολο-ορθικό καρκίνο οδηγεί σε μειωμένη έκφραση της 15PGDH (215).

Όπως αναφέρθηκε το γονίδιο του Cox-2 ρυθμίζεται από πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες (Εικ. 9). Το γεγονός όμως ότι βρίσκεται ενεργοποιημένο ακόμα και σε πρώιμα στάδια της κολο-ορθικής καρκινογένεσης και υπερ-εκφράζεται σε πολλές κυτταρικές σειρές με μεταλλάξεις στο APC, συνηγορεί για τη μεγάλη σημασία της οδού Wnt/ β -κατενίνης/ TCF 4 στη ρύθμισή του. Η κυκλοοξυγενάση 1 (Cox-1), η μη επαγόμενη μορφή του ενζύμου που εκτελεί την ίδια μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε PGH₂ με την Cox-2 έχει υψηλή ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων και στην τριτοταγή δομή με την Cox-2 αλλά η ρύθμιση της έκφρασης της διαφέρει σημαντικά (216). Η Cox-1 παίζει ρόλο στη δημιουργία μικρών πολυπόδων κάτω από 1mm σε μοντέλα εντερικής πολυποδίασης ποντικών αλλά στους μεγαλύτερους πολύποδες επάγεται η Cox-2 (217). Αυτό προφανώς αντικατοπτρίζει το γεγονός ότι το επίπεδο παραγωγής προσταγλανδινών και χρησιμοποίησης του αραχιδονικού οξέος που είναι ικανό να προωθήσει τη δημιουργία μικρών πολυπόδων επιτυγχάνεται με τη δράση της Cox-1 ενώ αντίθετα για μεγαλύτερα μεγέθη πολυπόδων απαιτείται η μεγαλύτερη δράση της επαγόμενης Cox-2.

Η Cox-2 και ο μεταβολισμός των λιπιδίων στον κολο-ορθικό καρκίνο

Η Cox-2 χρησιμοποιεί το αραχιδονικό οξύ ως υπόστρωμα. Η χρησιμοποίηση του αραχιδονικού οξέος από την Cox-2 οδηγεί σε μείωση των επιπέδων του και κατά συνέπεια σε μείωση των επιπέδων του προ-αποπτωτικού λιπιδίου κεραμιδίου που ευνοεί την αύξηση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2 αναστέλλοντας την απόπτωση με ένα πρόσθετο μηχανισμό (218). Παρόμοιο αποτέλεσμα παρατηρείται με τη δράση του ενζύμου λιγκάση του συνενζύμου Α των λιπαρών οξέων 4 (Fatty Acid CoA Ligase 4 -FACL4) που ενεργοποιεί το ελεύθερο αραχιδονικό οξύ συνδέοντάς το με το συνένζυμο Α ώστε να εστεροποιηθεί μειώνοντας κατ' αυτό τον τρόπο τα

κυτταροπλασματικά του επίπεδα (Εικ. 11) (219, 220). Ο προ-αποπτωτικός ρόλος του αραχιδονικού οξέος στο νεοπλασματικό κύτταρο υπογραμμίζεται από το γεγονός ότι



Εικόνα 11:

Το αραχιδονικό οξύ και τα κύρια ένζυμα παραγωγής και καταβολισμού του. Η αύξηση του αραχιδονικού οξέος ενεργοποιεί την παραγωγή του λιπιδίου κεραμιδίου που ευνοεί την απόπτωση ενώ η μείωση των επιπέδων του αραχιδονικού οξέος με τη δράση των ενζύμων FACL4, Cox-2 και LOX εξουδετερώνει αυτό το αποτέλεσμα.

το ένζυμο FACL4 υπερεκφράζεται στο κολο-ορθικό καρκίνωμα (221) και σε άλλα καρκινώματα (222).

Το μη εστεροποιημένο αραχιδονικό οξύ ευνοεί την παραγωγή του προ-αποπτωτικού κεραμιδίου ενεργοποιώντας την υδρόλυση της σφιγγομυελίνης (223). Το κεραμίδιο, εκτός από την προώθηση της απόπτωσης, επάγει την έκφραση της Cox-2 (224) ως μέρος ενός ομοιοστατικού μηχανισμού που χρησιμοποιεί το αραχιδονικό οξύ.

Μια οδός που μειώνει το αραχιδονικό οξύ είναι τελεολογικά σημαντική για το νεοπλασματικό κολο-ορθικό κύτταρο γιατί το ελεύθερο αραχιδονικό οξύ αυξάνεται λόγω ενεργοποίησης του ενζύμου φωσφολιπάση A2 (PLA2) που εκτελεί την αντίστροφη προς το FACL 4 αντίδραση. Η PLA2 ενεργοποιείται στο καρκινικό κύτταρο από την ενεργοποιημένη MAPK κινάση (225, 226). Η αναστολή της Cox -2 προσφέρει τη δυνατότητα να ανασταλεί η παραγωγή προσταγλανδινών αλλά και να αυξηθεί η συγκέντρωση του μη-εστεροποιημένου αραχιδονικού οξέος, αμφότερα κυτταρικά γεγονότα που προάγουν την απόπτωση. Παρά ταύτα η απενεργοποίηση της PLA2 σε ποντίκια με μετάλλαξη στο APC μειώνει το μέγεθος (227) και τον αριθμό (228) των πολυπόδων του εντέρου παρά το ότι μειώνει το ελεύθερο αραχιδονικό οξύ. Αυτό είναι ένα αποτέλεσμα παρόμοιο με ότι παρατηρείται σε ποντίκια που έχουν απενεργοποιημένα το APC και το Cox-2 (229) και υπογραμμίζει τη σημασία των προσταγλανδινών στην κολο-ορθική καρκινογένεση. Ο αποπτωτικός ρόλος του αραχιδονικού οξέος δεν πρέπει να αγνοείται, πάντως. Τα αυξημένα επίπεδά του που παρατηρούνται όταν η PLA2 είναι ενεργοποιημένη και η Cox-2 απενεργοποιημένη ευνοούν την διάνοιξη των μιτοχονδριακών πόρων και την απελευθέρωση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα (230). Φαινότυπος υψηλής έκφρασης Cox-2 και χαμηλής κυτταροπλασματικής PLA2 έχει βρεθεί ανοσοϊστοχημικά σε ασθενείς υψηλού κινδύνου (231).

Τα ένζυμα τύπου λιπο-οξυγενάσης (LOX) παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος καθώς και του συγγενούς λιπαρού οξέος που προσλαμβάνεται από τη διαίτα, του λινολεϊκού οξέος. Το ένζυμο 15-LOX-1 μεταβολίζει κυρίως το λινολεϊκό οξύ και το 13-S-υδροξυ-οκταδεκα-διενοϊκό οξύ (13-S-HODE) ενώ η 15-LOX-2 μεταβολίζει το αραχιδονικό οξύ και το 15-S-υδροξυ – εικοσα-τετρα-εν-οϊκό οξύ (15-S-HETE) (232). Άλλες λιπο-οξυγενάσες που μεταβολίζουν το αραχιδονικό οξύ συμπεριλαμβάνουν τις 12-S-LOX, 12-R-LOX, 8-

LOX και 5-LOX. Η τελευταία είναι το πρώτο ένζυμο της οδού που οδηγεί στην παραγωγή των λευκοτριενίων. Πρόσθετες λιπο-οξυγενάσες υπάρχουν και μπορεί να παίζουν ρόλο στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος (233). Λόγω του ρόλου τους στο μεταβολισμό αυτό οι λιπο-οξυγενάσες υπεισέρχονται στις διαδικασίες της καρκινογένεσης. Η 15-LOX-1 ανευρίσκεται υπερεκφραζόμενη στον κολο-ορθικό καρκίνο (235, 236). Άλλοι ερευνητές, όμως, έχουν βρει μείωση της έκφρασης του ενζύμου στον κολο-ορθικό καρκίνο σε ένα άλλο πειραματικό σύστημα (237). Η 5-LOX που παράγει λευκοτριένια προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (238, 239) και η συνδυασμένη φαρμακευτική αναστολή της 5-LOX και της Cox-2 από φάρμακα που βρίσκονται σε φάση ανάπτυξης έχει δείξει δραστικότητα εντονότερη από αυτή που επιτυγχάνεται με την αναστολή κάθε ενζύμου ξεχωριστά (240).

Αντικαρκινική δράση των αναστολέων της Cox που δεν εξαρτάται από την Cox

Η ασπιρίνη, τα μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη (NSAIDs) και οι νεότεροι ειδικοί αναστολείς της Cox-2 καταστέλλουν την κολο-ορθική καρκινογένεση αναστέλλοντας την Cox-2 και τη σύνθεση προσταγλανδινών. Με βάση αυτή την ιδιότητα έχουν προταθεί ως παράγοντες πρόληψης και θεραπείας του καρκίνου (241, 242). Σε πολλές περιπτώσεις όμως τα φάρμακα αυτά αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και προάγουν την απόπτωση ακόμα και σε κύτταρα που δεν εκφράζουν την Cox-2 (243-246). Αυτό προϋποθέτει ότι και άλλοι επιπλέον μηχανισμοί διαμεσολαβούν για τα αποτελέσματα αυτά. Μερικοί από τους μηχανισμούς αυτούς έχουν αποκαλυφθεί και αφορούν διάφορες κυτταρικές οδούς. Κάποιοι είναι ειδικοί για μεμονομένα φάρμακα και άλλοι ισχύουν για τα περισσότερα από τα φάρμακα της κατηγορίας (Πίνακας 4).

Ένας πρώτος μηχανισμός μέσω του οποίου η ασπιρίνη καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό χωρίς τη μεσολάβηση της Cox είναι η άμεση αναστολή της κινάσης

Πίνακας 4. Αντι-νεοπλασματικές δράσεις των αναστολέων της Cox ανεξάρτητες από την Cox

- Αναστολή της IKK
- Ενεργοποίηση της ακυλ-τρανσφεράσης της σπερμιδίνης/ σπερμίνης (SSAT)
- Ενεργοποίηση του PPAR γ
- Ενεργοποίηση της 15-LOX-1
- Μείωση των επιπέδων της cPLA2
- Επαγωγή του NAG-1
- Αναστολή των κινασών ERK 1/ 2
- Ενεργοποίηση του Rac1
- Αποδόμηση της β -κατενίνης
- Αναστολή της MRP4
- Αύξηση του VHL
- Αύξηση της αποδόμησης των μεταγραφικών παραγόντων Sp1 and Sp4

IKK (247). Αυτή η αναστολή καταστέλλει τη δράση του NF- κ B προλαμβάνοντας τη φωσφορυλίωση του I- κ B. Επιπλέον όπως αναφέρθηκε τα NSAIDs αναστέλλουν την IKK μέσω ενός Cox-εξαρτώμενου τρόπου αναστέλλοντας την παραγωγή της προσταγλανδίνης PGE₂ που ενεργοποιεί τον υποδοχέα της EP4 και κατ' επέκταση την οδό P13K/ akt.

Ένας άλλος μηχανισμός μέσω του οποίου οι αναστολείς της Cox ευνοούν την απόπτωση ανεξάρτητα από την Cox είναι η επαγωγή του ενζύμου ακυλ-τρανσφεράση της σπερμιδίνης / σπερμίνης (spermidine / spermine acyl-transferase-SSAT) που είναι το κύριο ένζυμο που καταβολίζει τις ογκογόνες πολυαμίνες (248). Οι ενδογενείς πολυαμίνες σπερμιδίνη και σπερμίνη προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό επάγοντας τους παράγοντες c-myc, c-fos και c-jun (249) καθώς και πολλές πρωτεϊνικές κινάσες (248). Τουλάχιστον εν μέρει η δράση των πολυαμινών επιτελείται με άμεση αλληλεπίδραση τους με το DNA (250). Αντίθετα μείωση των επιπέδων των πολυαμινών από ένα ειδικό αναστολέα της σύνθεσης τους την αδιφλουορομεθυλορνηθίνη οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου (251) και αύξηση του mRNA του μεταγραφικού παράγοντα junD καθώς και της δράσης του

παράγοντα αυτού (252). Ο junD είναι μέλος του συμπλέγματος του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 αλλά σε αντίθεση με τα άλλα μέλη c-jun και JunB ευνοεί την αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Έτσι η επαγωγή της SSAT που μετατρέπει την σπερμιδίνη και τη σπερμίνη στα ανενεργά N-ακετυλ-παράγωγά τους από την ασπιρίνη, την σουλινδάκη σουλφόνη και άλλα NSAIDs ευνοεί την απόπτωση των κολο-ορθικών καρκινικών κυττάρων (253- 255). Στην επαγωγή της SSAT από τη σουλινδάκη μεσολαβεί ο μεταγραφικός παράγοντας PPAR γ ο οποίος συνδέεται με τη σουλινδάκη (253). Το γονίδιο της SSAT φέρει στον προαγωγέα του δύο αλληλουχίες PPRE (PPAR Response Elements), μια εκ των οποίων είναι απαραίτητη για την σύνδεση με τον PPAR γ (256). Πολλά άλλα NSAIDs όπως η ινδομεθακίνη, η ιμπουπροφαίνη και το φλουφεναμικό οξύ είναι επίσης συνδέτες και ενεργοποιητές του PPAR γ (257). Αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κολο-ορθικών κυττάρων άμεσα (258) αλλά και έμμεσα μέσω καταστολής της αγγειογένεσης (259).

Η επαγωγή του ενζύμου 15-LOX-1 αποτελεί ακόμα ένα μηχανισμό δια του οποίου οι αναστολείς της Cox έχουν ογκοκατασταλτικές ιδιότητες ανεξάρτητες από την Cox. Αυτό το ένζυμο μετατρέπει το λινολεϊκό οξύ, λιπίδιο της διαίτας, σε 13-S-HODE (233). Το 13-S-HODE αυξάνεται σε κύτταρα κολο-ορθικού καρκίνου μετά από έκθεσή τους στα NSAIDs. Η απόπτωση που ακολουθεί μετά από αυτή την έκθεση αναστέλλεται όταν η 15-LOX-1 αναστέλλεται επίσης (235, 236). Εκτός από την Cox-2 και την 15-LOX-1 ένα τρίτο ένζυμο που εμπλέκεται στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος, η κυτταροπλασματική PLA2, επηρεάζεται από τα NSAIDs. Τα επίπεδα του mRNA του ενζύμου αυτού μειώνονται μετά από έκθεση στην ασπιρίνη κυττάρων κολο-ορθικού καρκίνου που είτε εκφράζουν είτε δεν εκφράζουν την Cox-2 (260). Παράλληλα μειώνονται και τα επίπεδα της προσταγλανδίνης PGE₂ στα κύτταρα αυτά.

Έκθεση κολο-ορθικών κυττάρων σε αναστολείς της Cox -2 επάγει την έκφραση του μέλους της οικογένειας του TGF- β , NAG-1 (NSAID Activated Gene ονομαζόμενο επίσης PTGF β , PLAB, PDF, MIC-1 ή HP00269). Η επαγωγή αυτή οδηγεί σε απόπτωση (261, 262). Διαμόλυνση των κυττάρων με πλασμίδιο που περιέχει τον NAG-1 οδηγεί επίσης σε απόπτωση. Ο NAG-1 είναι μεταγραφικός στόχος του p53

(263, 264) αλλά η επάγωγή του από τα NSAIDs είναι ανεξάρτητη από το p53 και επίσης δεν σχετίζεται με την ισχύ της αναστολής της Cox-2 (261).

Η σουλινδάκη και άλλα NSAIDs αναστέλλουν την φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των κινασών ERK1 και 2 οδηγώντας σε αναστολή της φωσφορυλίωσης του προ-αποπτωτικού μέλους της οικογένειας του bcl-2 Bad και σε αναστολή της αντι-αποπτωτικής δράσης των ERK κινασών (265). Παρά το ότι αυτή η δράση των NSAIDs μπορεί να εξαρτάται και από την αναστολή της Cox-2 λόγω της αναστολής της ενεργοποίησης του υποδοχέα EGFR από την προσταγλανδίνη PGE₂, έχει παρατηρηθεί τόσο σε κύτταρα που εκφράζουν Cox-2 όσο και σε αυτά που δεν εκφράζουν το ένζυμο (266) και γι' αυτό πρέπει να θεωρηθεί ότι αποτελεί, τουλάχιστον εν μέρει ένα μηχανισμό που δεν εξαρτάται από την αναστολή της Cox-2.

Η Rac1 είναι μέλος της οικογένειας Rho των μικρών GTPασών που σχετίζονται με το Ras και επάγεται μετά από έκθεση κολο-ορθικών καρκινικών κυττάρων στην ασπιρίνη (262). Η Rac1 παίζει ρόλο στη διαφοροποίηση του επιθηλίου του παχέος εντέρου και εκφράζεται από τα επιθηλιακά κύτταρα των κορυφών των εντερικών θηλών.

Αποδόμηση της β-κατενίνης παρατηρείται μετά από έκθεση καλλιιεργειών κολο-ορθικών κυττάρων στα NSAIDs (267) όπως και *in vivo* σε ποντίκια Min (με μετάλλαξη στο APC) και αντιπροσωπεύει ακόμα ένα ανεξάρτητο από την αναστολή της Cox-2 μηχανισμό προώθησης της απόπτωσης από τα φάρμακα αυτά. Η αποδόμηση της β-κατενίνης είναι ανεξάρτητη από το APC και έχει παρατηρηθεί στην κυτταρική σειρά SW480 που φέρει μεταλλαγμένο APC και στα δύο αλλήλια. Σε ένα άλλο πειραματικό σύστημα βρέθηκε αναστολή της εξαρτώμενης από τη β-κατενίνη μετάφρασης αλλά και ταυτόχρονα αύξηση της φωσφορυλίωσης της (269).

Οι προσταγλανδίνες χρειάζεται να μεταφερθούν εκτός του παραγωγού κυττάρου για να συνδεθούν με τον μεμβρανικό τους υποδοχέα και να διεκπεραιώσουν τις δράσεις τους. Η μεταφορά επιτελείται από την πρωτεΐνη MRP4 (195). Πολλά NSAIDs έχουν βρεθεί να παρεμποδίζουν την μεταφορά των προσταγλανδινών εκτός του κυττάρου (270), γεγονός που ενδυναμώνει περαιτέρω την μείωση της παραγωγής προσταγλανδινών από την αναστολή της Cox-2. Η ισχύς της αναστολής της MRP4 ποικίλει ανάλογα με το NSAID. Η ινδομεθακίνη, η ιμπουπροφένη και η κετοπροφένη

είναι πιο ισχυροί αναστολείς ενώ η δικλοφενάκη και ο ειδικός αναστολέας της Cox -2 σελεκοξίμπη είναι πολύ λιγότερο δραστικές (195).

Η έκθεση κυτταρικών σειρών κολο-ορθικού καρκίνου στην ασπιρίνη προκαλεί αύξηση της έκφρασης των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης των λανθασμένων βάσεων του DNA (MMR Mismatch Repair) hMLH, hPMS2, και MSH6 ανεξάρτητα από την αναστολή της Cox. Η αύξηση της έκφρασης αυτής οδηγεί σε απόπτωση αλλά το ίδιο συμβαίνει επίσης σε κύτταρα που δεν εκφράζουν τις MMR πρωτεΐνες μετά από έκθεση στην ασπιρίνη (271), γεγονός που σημαίνει ότι οι MMR πρωτεΐνες παίζουν μικρό ρόλο στην απόπτωση.

Αύξηση της αγγειογένεσης και επαγωγή του VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor A) παρατηρείται σε διάφορους νεοπλασματικούς ιστούς που επιδεικνύουν αύξηση της έκφρασης της Cox-2 και υπάρχει αναλογία στα επίπεδα των δύο αυτών πρωτεϊνών (272, 273). Αν η αναλογία αυτή υποδηλώνει αιτιολογική σχέση, οι αναστολείς της Cox -2 μπορεί να μειώνουν την αγγειογένεση με ένα μηχανισμό εξαρτώμενο από την Cox-2. Επιπλέον τουλάχιστον δύο μηχανισμοί αντι-αγγειογένεσης ανεξάρτητοι από την Cox -2 έχουν περιγραφεί. Η ινδομεθακίνη και ο ειδικός αναστολέας της Cox-2 NS-398 (N- [2- (κυκλο-εξυλοξυ)-4-νιτροφενυλ] μεθαν-σουλφοναμίδη) αυξάνουν τα επίπεδα της πρωτεΐνης VHL (Von Hippel Lindau Factor) και αναστέλλουν την μείωση των επιπέδων της που προκαλείται από την υποξία. Ως αποτέλεσμα, ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1a και το γονίδιο-στόχος του VEGF παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα ακόμα και σε υποξικές συνθήκες και η αγγειογένεση μειώνεται (274, 275). Ένας άλλος μηχανισμός αναστολής της αγγειογένεσης από τα NSAIDs επιτελείται μέσω επίτασης της αποδόμησης των μεταγραφικών παραγόντων Sp1 και Sp4, που υπεισέρχονται στην μεταγραφή του VEGF (276). Τα μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων Sp (Specificity proteins) ξεκινούν την μεταγραφική τους δράση από περιοχές προαγωγέων πλούσιες σε αλληλουχίες γουανίνης /κυστεΐνης που υπάρχουν εκτός από τον VEGF στους προαγωγείς του p27, της κυκλίνης D, του TGF α και του E2F1 (277).

ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΑΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ COX-2 ΣΤΟΝ ΚΟΛΟ-ΟΡΘΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ

Οι μεταλλάξεις του APC στην πλειονότητα των κολο-ορθικών καρκίνων οδηγούν σε απώλεια της ρύθμισης της μεταγραφικής λειτουργίας της β-κατενίνης και αυξημένη έκφραση της Cox-2 ήδη από την πρόιμη φάση της κολο-ορθικής καρκινογένεσης. Η υπερ-έκφραση της Cox-2 παρατηρείται και στους καρκίνους πολλών άλλων εντοπίσεων γεγονός που καταμαρτυρεί την σημασία της στην καρκινογένεση. Η δράση της Cox-2 οδηγεί στην παραγωγή προσταγλανδινών με ιδιότητες που συμβάλλουν στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την αναστολή της απόπτωσης. Επιπλέον η δράση της Cox-2 καταναλώνει το αραχιδονικό οξύ, λιπίδιο που προωθεί την απόπτωση ευνοώντας την παραγωγή κεραμιδίου από τη σφιγγομυελίνη (219).

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB έχει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό, την αναστολή της απόπτωσης των κυττάρων και την χημειοαντοχή. Ο παράγοντας αυτός βρίσκεται ενεργοποιημένος στα κολο-ορθικά καρκινικά κύτταρα (147). Η συνδυασμένη αναστολή του πρωτεασώματος και της Cox-2 με αντίστοιχους φαρμακευτικούς αναστολείς έχει τη δυνατότητα να μειώσει ή να αναστείλει τη δράση του NF-κB σε πολλά επίπεδα. Η αναστολή του πρωτεασώματος έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του αναστολέα I-κB που είναι υπόστρωμα του πρωτεασώματος. Επίσης σταθεροποιεί την β-κατενίνη η οποία μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με τον NF-κB αναστέλλει τη δράση του (47). Οι αναστολείς της Cox αναστέλλουν άμεσα την κινάση IKK, δράση που συμβάλλει στα αντι-νεοπλασματικά τους αποτελέσματα που δεν εξαρτώνται από την αναστολή της Cox (247). Επίσης, οι αναστολείς της Cox, αναστέλλοντας την παραγωγή της προσταγλανδίνης PGE₂ παρεμποδίζουν μια από τις οδούς που οδηγούν σε ενεργοποίηση των κινασών PI3K και akt. Η akt είναι κινάση που ενεργοποιεί την IKK κινάση και γι'αυτό αναστολή της αναστέλλει τον NF-κB. Με όλους αυτούς τους μηχανισμούς είναι πιθανό ότι η συνδυασμένη αναστολή του πρωτεασώματος και της Cox-2 θα οδηγήσει σε σημαντική παρεμπόδιση της δράσης του NF-κB σε πολλαπλά σημεία.

Συνέργεια της συνδυασμένης αναστολής της Cox-2 και του πρωτεασώματος συμβαίνει και όσον αφορά τη σταθεροποίηση του αναστολέα των εξαρτώμενων από τις κυκλίνες κινασών (CDKs), του p27. Μειωμένη φωσφορυλίωση του p27 ως αποτέλεσμα μειωμένης δραστηριότητας της κινάσης akt από μειωμένη παραγωγή

προσταγλανδίνης PGE₂ λόγω της αναστολής της Cox-2 συνδυάζεται με αναστολή της πρωτεασωμικής αποδόμησης ακόμα και του μικρού ποσοστού του p27 που έχει υποστεί φωσφορυλίωση και σύνδεση με την ουβικουΐνη.

Η αναστολή του πρωτεασώματος διεγείρει την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος από το κύτταρο (278) ενώ παρεμποδίζει την ενδοκυττάρια παραγωγή του (279). Η αναστολή αυτή προκαλεί επίσης αύξηση των επιπέδων της Cox-2 και διέγερση της παραγωγής της προσταγλανδίνης PGE₂ (280). Η αύξηση της Cox-2 δεν οφείλεται σε μειωμένη αποδόμηση αλλά σε αυξημένη παραγωγή προερχόμενη από αυξημένη μεταγραφή του γονιδίου της από τον μεταγραφικό παράγοντα C/EBP δ (CCAAT/Enhancer-Binding protein δ) (281). Η σύνδεση του C/EBP δ στον προαγωγέα της Cox-2 διευκολύνει και τη σύνδεση του συμπαράγοντα CBP (CREB-Binding Protein) και οδηγεί σε ακετυλίωση των ιστονών H3 και H4 ευνοώντας την μεταγραφή. Αύξηση της σύνδεσης του C/EBP δ στο DNA και της μεταγραφής της Cox-2 μετά από αναστολή του πρωτεασώματος εξαρτάται από τις κινάσες p38, p13K και PKC και αναστολή της κινάσης JNK (282). Με αυτή τη δράση στον προαγωγέα της Cox-2, η αναστολή του πρωτεασώματος αναμένεται να αναστέλλει την απόπτωση σε κύτταρα που η Cox-2 είναι ενεργή με περαιτέρω ενίσχυση της δράσης της και γι' αυτό μπορεί να μην είναι η καλύτερη στρατηγική στη θεραπεία του κολο-ορθικού καρκίνου, όπως άλλωστε, έδειξε και η πρώτη κλινική δοκιμή της μπορτεζομίμπης με αρνητικά αποτελέσματα (283) που είχε και το πρόσθετο μειονέκτημα ότι οι δόσεις της μπορτεζομίμπης που χρησιμοποιήθηκαν απέτυχαν να έχουν σταθερά επίπεδα στο αίμα που να αναστέλλουν το πρωτεάσωμα. Αντίθετα μια παράλληλη φαρμακευτική αναστολή της Cox-2 θα έχει τη δυνατότητα να προλάβει την αύξηση της παραγωγής των προσταγλανδινών και δίνει πρόσθετη αιτιολογική βάση στη χρησιμοποίηση του συνδυασμού.

Ένα άλλο ανεπιθύμητο μοριακό αποτέλεσμα της αναστολής του πρωτεασώματος στη θεραπεία του κολο-ορθικού καρκίνου, η αύξηση των πολυαμινών που αυξάνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, προλαμβάνεται από τους αναστολείς της Cox-2. Τα επίπεδα των πολύ-αμινών όπως και της δεκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης (ODC), του κύριου ενζύμου παραγωγής τους από την ορνιθίνη, είναι αυξημένα σε κύτταρα κολο-ορθικού καρκίνου και στον εντερικό βλεννογόνο ποντικών Min (248, 285). Η ODC είναι γονίδιο-στόχος του μεταγραφικού παράγοντα c-myc και το γεγονός αυτό εξηγεί

την θετική ρύθμιση της σε κύτταρα που φέρουν μεταλλάξεις του APC (255) και ενεργοποιημένο ογκογονίδιο k-ras (286). Η ODC είναι επίσης υπόστρωμα του πρωτεασώματος και η φαρμακευτική αναστολή του τελευταίου μπορεί να αυξήσει επιπλέον τα επίπεδα της στα κολο-ορθικά κύτταρα με τελικό αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή πολυαμινών. Αυτό το ανεπιθύμητο αποτέλεσμα μπορεί να προληφθεί με την παράλληλη επαγωγή του ενζύμου SSAT από τους αναστολείς της Cox-2 όπως συζητήθηκε στο κεφάλαιο των ανεξάρτητων από την Cox-2 αντικαρκινικών δράσεων των αναστολέων της (287).

Ως αποτέλεσμα της συνεργασίας τους σε πολλαπλά επίπεδα για την αναστολή του πολλαπλασιασμού και την προώθηση της απόπτωσης των κυττάρων, η συνδυασμένη αναστολή της Cox-2 και του πρωτεασώματος αντιπροσωπεύει ένα ελπιδοφόρο συνδυασμό προς εκμετάλλευση στη θεραπεία του κολο-ορθικού καρκίνου. Η γενικότερη ιδέα του συνδυασμού στοχευμένων θεραπειών δεν είναι καινούργια και έχει προταθεί τα τελευταία χρόνια με διάφορους συνδυασμούς των όλο και αυξανόμενων φαρμάκων. Έχουν διερευνηθεί συνδυασμοί των NSAIDs (288, 291) και της μπορτεζομίμπης (292, 293) με διάφορους άλλους φαρμακευτικούς παράγοντες. Λόγω του γεγονότος ότι η αναστολή του πρωτεασώματος έχει ένα ευρύ φάσμα αποτελεσμάτων που εκκινούν από το ευρύ φάσμα πρωτεϊνών-υποστρωμάτων του, κάποιες από τις οδούς που επηρεάζονται από την αναστολή του μπορεί να προωθούν αντί να καταστέλλουν την καρκινογένεση. Στις περιπτώσεις αυτές παράλληλη αναστολή της Cox-2 βοηθά στον περιορισμό αυτών των αποτελεσμάτων και επιτρέπει την μεταβολή της ισορροπίας προς την καταστολή της καρκινογένεσης. Η συνδυασμένη θεραπεία έχει το πλεονέκτημα ότι επιτρέπει τη χρήση χαμηλότερων δόσεων του κάθε φαρμάκου που μπορεί να γίνουν εφικτές στην κλινική πράξη. Η μέγιστη ανεκτή δόση (MTD- Maximal Tolerated Dose) της μπορτεζομίμπης, παραδείγματος χάρη, επιτυγχάνει αναστολή της δραστηριότητας του πρωτεασώματος σε ποσοστό 40 με 70% σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα της, αφήνοντας ένα ποσοστό 60 με 30% υπολειπόμενης δραστηριότητας (294-297). Από την άλλη μεριά στις δόσεις που χρησιμοποιούνται για αντιφλεγμονώδη και αναλγητική θεραπεία, η ασπιρίνη και τα άλλα NSAIDs παρουσιάζουν ένα ποσοστό μη αμελητέων και σε κάποιες περιπτώσεις επικίνδυνων ακόμα και για τη ζωή του ασθενούς, ανεπιθύμητων ενεργειών, κυρίως από το γαστρεντερικό σύστημα. Γι' αυτό μια αύξηση της δόσης του στα πλαίσια της αντικαρκινικής θεραπείας θα ήταν δύσκολη. Αντίθετα ο

συνδυασμός των αναστολέων του πρωτεασώματος και της Cox-2 σε δόσεις παρόμοιες με αυτές που χρησιμοποιούνται τώρα ως μονοθεραπεία θα απέφυγε την αύξηση των ανεπιθύμητων αποτελεσμάτων ενώ θα εκμεταλλευόταν τις αντινεοπλασματικές δράσεις του κάθε φαρμάκου. Σε προκλινικά μοντέλα *in vitro* ο συνδυασμός αναστολέων του πρωτεασώματος λακτασυστίνης και των αναστολέων της Cox ασπιρίνης ή σουλινδάκης ενδυναμώνουν τα αποτελέσματα του κάθε φαρμάκου ξεχωριστά σε κυτταρικές σειρές κολο-ορθικού καρκίνου (298-300). Επιπλέον ο συνδυασμός της μπορτεζομίμπης με τη σουλινδάκη ενισχύει τα ογκοκατασταλτικά αποτελέσματα του κάθε φαρμάκου μόνου του σε ποντίκια που φέρουν ανθρώπινους κολο-ορθικούς όγκους (299). Περαιτέρω μελέτες όπως αυτή που περιγράφεται στο ειδικό μέρος θα προσδιορίσουν καλύτερα τους συνδυασμούς και τους μηχανισμούς δράσης των αναστολέων του πρωτεασώματος και της Cox-2 ώστε να προωθηθούν στην κλινική πράξη για τη βελτίωση της θεραπείας των ασθενών με κολο-ορθικό καρκίνο.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Η ΥΠΟΘΕΣΗ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ

Η πειραματική αυτή εργασία έχει ως σκοπό την μελέτη των αναστολέων της Cox-2 όπως η ασπιρίνη (ακετυλ-σαλικυλικό οξύ, ASA) και της αναστολής του πρωτεασώματος μέσω της μπορτεζομίμπης (Bortezomib) σε κύτταρα κολο-ορθικού καρκίνου. Ζητά να διευκρινήσει συγκεκριμένα αν η συνδυασμένη χρήση αναστολέων της Cox-2 και του πρωτεασώματος με την ταυτόχρονη έκθεση των κυττάρων αυτών στην ασπιρίνη και την μπορτεζομίμπη έχει επιπρόσθετο όφελος στην αναστολή του πολλαπλασιασμού τους και την απόπτωση από αυτό που προσφέρει κάθε φάρμακο ξεχωριστά. Ένας δεύτερος σκοπός της μελέτης αυτής είναι η διερεύνηση των μηχανισμών στο μοριακό επίπεδο με τους οποίους τα φάρμακα αυτά και ο συνδυασμός τους αναστέλλουν τα κολο-ορθικά κύτταρα.

Το έναυσμα για τη μελέτη αυτή έδωσε αφ' ενός η γενικότερη τάση στη σύγχρονη θεραπευτική της ογκολογίας για τη χρησιμοποίηση νέων φαρμάκων στοχευμένης δράσης, προϊόν της έρευνας στη μοριακή καρκινογένεση, και αφ' ετέρου η συνειδητοποίηση ότι η μεμονωμένη στόχευση μίας γενετικής βλάβης στο καρκινικό κύτταρο, εκτός από τις σπάνιες περιπτώσεις στις οποίες το καρκινικό κύτταρο εξαρτάται πλήρως από τη βλάβη αυτή, δίνει πενιχρά αποτελέσματα. Κατά συνέπεια συνδυασμοί των θεραπειών μοριακής στόχευσης είτε με κλασσικά χημειοθεραπευτικά είτε με άλλες στοχευμένες θεραπείες είναι μία πιο ελπιδοφόρα στρατηγική.

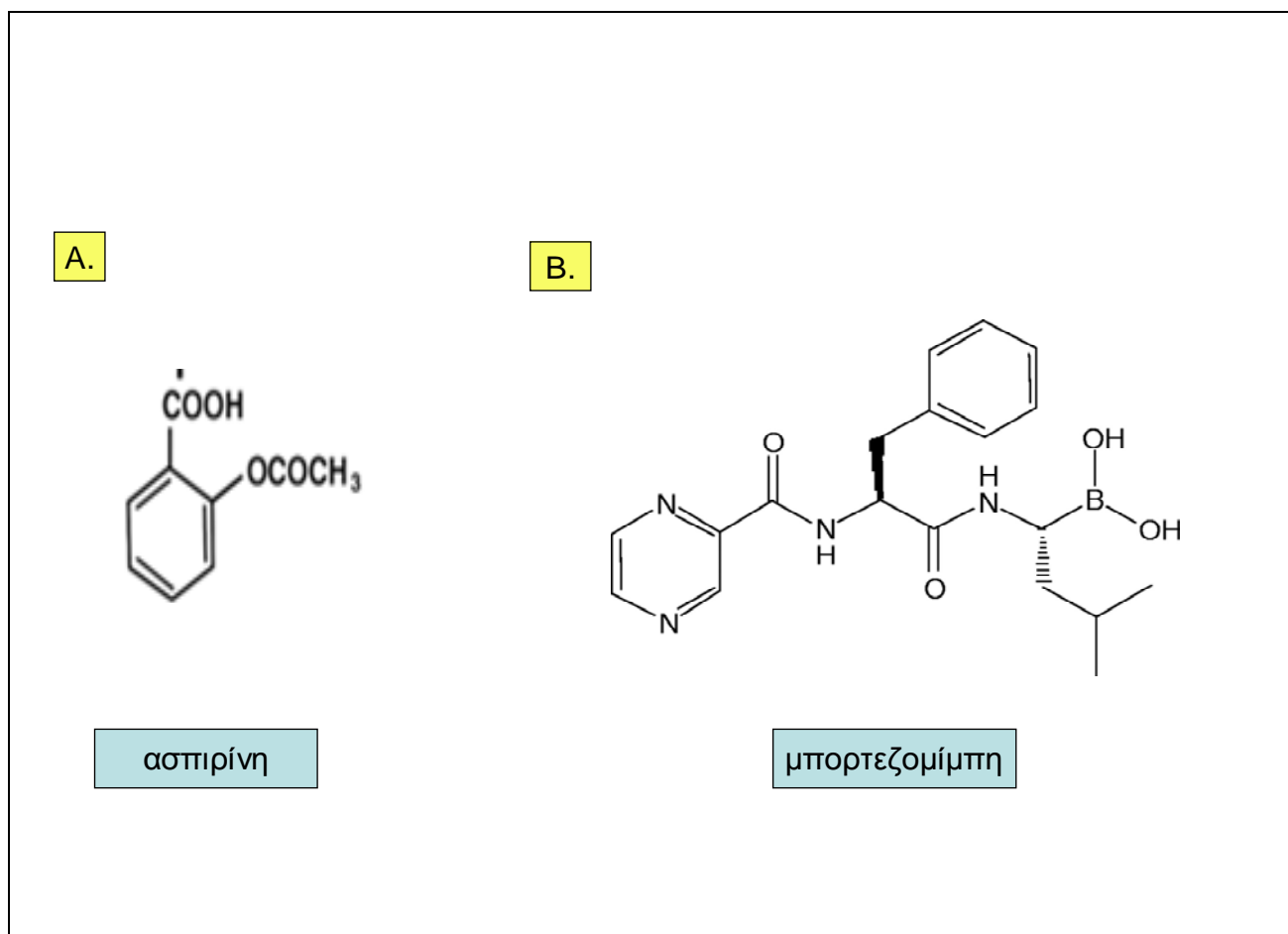
Το σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος σχετίζεται άμεσα με την εύρυθμη λειτουργία του κυττάρου και ρυθμίζει με πολλούς τρόπους τον κυτταρικό θάνατο με απόπτωση (152, 158, 162). Αναστολή του πρωτεασώματος συμβαίνει μετά από την ενεργοποίηση των κασπασών κατά την αποπτωτική διαδικασία (160, 161, 301). Φαρμακευτική αναστολή του πρωτεασώματος με την μπορτεζομίμπη χρησιμοποιείται στην κλινική ογκολογία για τη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος (302). Παρά ταύτα, στους συμπαγείς όγκους η αναστολή του πρωτεασώματος έχει δώσει λιγότερο εντυπωσιακά αποτελέσματα (294, 296), γεγονός που ισχύει και στον κολο-ορθικό καρκίνο (283). Έτσι, για την βελτίωση των αποτελεσμάτων, μελετάται ο συνδυασμός της αναστολής του πρωτεασώματος με άλλες στοχευμένες θεραπείες (303, 304). Ειδικά στον κολο-ορθικό καρκίνο οι αναστολείς της κυκλοοξυγενάσης αποτελούν ένα καλό υποψήφιο συνδυασμού με την μπορτεζομίμπη τόσο γιατί παρουσιάζουν

σημαντικές αντινεοπλασματικές δράσεις σε προκλινικά μοντέλα αλλά και στον άνθρωπο (10, 11, 176) όσο και γιατί μπορούν να αντιροπούν στο μοριακό επίπεδο επιδράσεις της αναστολής του πρωτεασώματος που θεωρητικά θα ήταν δυνατό να ευνοούν αντί να αναστέλλουν την καρκινογένεση (Βλέπε και συζήτηση του συνδυασμού στο γενικό μέρος). Ο συνδυασμός έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον και άλλων ερευνητών παγκοσμίως και μετά την έναρξη της παρούσας εργασίας το 2004, έχουν δημοσιευτεί εργασίες με την παράλληλη χρήση αναστολέων της Cox-2 και του πρωτεασώματος σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα (298, 299).

Η ασπιρίνη (Εικ. 12Α) είναι το παλαιότερο μη-στερινοειδές αντιφλεγμονώδες, χρησιμοποιούμενο για πάνω από ένα αιώνα και με καλά τεκμηριωμένη ασφάλεια ακόμα και σε μακροχρόνια χρήση (305). Για το λόγο αυτό και με τη σκέψη πάντα στη μετάφραση των αποτελεσμάτων από τα *in vitro* μοντέλα στην κλινική πράξη, η ασπιρίνη προτιμήθηκε για την παρούσα μελέτη από τους νεότερους ειδικούς αναστολείς της Cox-2 (κοξίμπες) που παρουσιάζουν ανεπιθύμητες ενέργειες από το καρδιαγγειακό σύστημα και η μακροχρόνια ασφάλειά τους είναι λιγότερο τεκμηριωμένη (306-308).

Η μπορτεζομίμη (γνωστή επίσης και ως PS-341) είναι ο πρώτος και ο μόνος, προς το παρόν, αναστολέας του πρωτεασώματος που χρησιμοποιείται κλινικά. Είναι πεπτιδίο που ανήκει στις πεπτιδύλ-αλδεΐδες και είναι παράγωγο του βορονικού οξέος (N-πυραζιν-καρβονυλ-L-φαινυλαλανίνη-L-λευκίνη βορονικό οξύ, Εικ. 12Β). Η ομάδα αυτή παραγώγων, σε αντίθεση με άλλες πεπτιδύλ-αλδεΐδες όπως η λιουπεπτίνη και η παπαΐνη, είναι ειδικοί αναστολείς του πρωτεασώματος. Αναστέλλει ειδικά την ενζυμική δραστηριότητα χυμοτρυψίνης του πρωτεασώματος ενώ δεν επηρεάζει άλλα σημαντικά ένζυμα του κυττάρου όπως η τρυψίνη, η θρομβίνη, η χυμοτρυψίνη, η καθεψίνη Β, η ελαστάση και οι καλπαΐνες I και II (309, 310).

Η μπορτεζομίμη βρέθηκε να έχει δραστηριότητα έναντι πολλών κυτταρικών σειρών που περιλαμβάνονται στη διερευνητική ομάδα (screening panel) των 60 κυτταρικών σειρών του αμερικανικού NCI (National Cancer Institute) και επελέγη για περαιτέρω ανάπτυξη. Φαρμακοκινητικές μελέτες έδειξαν ότι η συγκέντρωση της μπορτεζομίμης ακολουθεί μία κλασική διφασική μείωση μετά από χορήγηση μίας δόσης. Δεν εισέρχεται στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ή τον φραγμό αίματος-όρχεων ενώ ο καταβολισμός της γίνεται με οξειδωτική αφαίρεση του βορονικού οξέος,



Εικόνα 12

Οι μοριακές δομές της ασπιρίνης και της μπορτεζομίμης.

υδροξυλίωση των αποβοριομένων παραγώγων και ηπατική και νεφρική απέκκριση. Δόσεις 1,04 ως 1,38 mg/m² οδηγούν σε πρωτεασωμική αναστολή μεταξύ 60-70% της αρχικής. Συγκεντρώσεις στο πλάσμα γύρω στα 300-400 ng/ml έχουν σαν αποτέλεσμα πρωτεασωμική αναστολή της τάξης του 70-80% ενώ το ποσοστό πέφτει στο 20% με συγκεντρώσεις 10 ng/ml (310).

Στα πειράματα που περιγράφονται χρησιμοποιήθηκαν τρεις από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες κυτταρικές σειρές κολο-ορθικού καρκίνου, η HCT116, η HT-29 και η CaCo2. Οι κυτταρικές σειρές HT-29 και CaCo2 φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο

APC, που βρίσκεται μεταλλαγμένο και ανενεργό στην μεγάλη πλειονότητα των κολο-ορθικών καρκίνων στον άνθρωπο. Επίσης μεταλλαγμένο είναι και το p53 στις κυτταρικές αυτές σειρές (311) ενώ η β-κατενίνη είναι φυσιολογική στη σειρά HT-29 και μεταλλαγμένη στην CaCo2 (Πίνακας 5). Στην κυτταρική σειρά HCT116 η β-κατενίνη φέρει μετάλλαξη που την ενεργοποιεί (48) ενώ το APC και το p53 είναι φυσιολογικά (312). Επιπλέον και το K-ras φέρει ενεργοποιητική μετάλλαξη στο ένα αλληλίο του στα κύτταρα HCT116. Η Cox-2 δεν εκφράζεται στα HCT116 ενώ στα HT-29 εκφράζεται αλλά η ενεργότητά της ως προς την παραγωγή PGE₂ είναι μειωμένη όπως θα συζητηθεί παρακάτω (313, 314). Τα κύτταρα CaCo2 εκφράζουν Cox-2 με φυσιολογική ενεργότητα. Τα κύτταρα HCT116 φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο MLH1 και γι' αυτό παρουσιάζουν φαινότυπο μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI). Αντιθέτως τα HT-29 και τα CaCo2 είναι φυσιολογικά ως προς τα γονίδια της αποκατάστασης λαθών στην αλληλουχία βάσεων του DNA (MMR-Mismatch Repair) (315, 316). Συνολικά θα μπορούσε να λεχθεί ότι τα κύτταρα HT-29 και τα CaCo2 προσομοιάζουν με το 85% των ανθρώπινων κολο-ορθικών καρκινωμάτων που φέρουν μεταλλάξεις στο APC αλλά παρουσιάζουν μικροδορυφορική σταθερότητα ενώ τα κύτταρα HCT116 προσομοιάζουν με το υπόλοιπο 15% των καρκινωμάτων που δεν φέρουν μεταλλάξεις στο APC αλλά παρουσιάζουν φαινότυπο MSI.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Καλλιέργεια κυττάρων και αντιδραστήρια

Οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές κολο-ορθικού καρκίνου HCT116, HT-29 και CaCo2 αποκτήθηκαν από την Ευρωπαϊκή Συλλογή Κυτταρικών Καλλιεργειών ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, U.K.) και καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικό υλικό RPMI1640 (Euroclone, Pero, Italy) με 10% βόιου εμβρυϊκού ορού (FBS) και 1% πενικιλίνη/ στρεπτομυκίνη στους 37° C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Για τα πειράματα που περιγράφονται χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που βρίσκονταν σε πυκνότητα 30 με 50% σε φλάσκες καλλιέργειας 75 ml. Κύτταρα καλλιεργούμενα χωρίς φάρμακα χρησίμευσαν ως μάρτυρες ενώ η ασπιρίνη (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 3mM για 48 ώρες και η μπορτεζομίμη (Janssen-Cilag Pharmaceutica, Beerse, Belgium) στα 333

Πίνακας 5. Σύγκριση μοριακών βλαβών κυτταρικών σειρών κολο-ορθικού καρκίνου

	<u>HCT116</u>	<u>HT-29</u>	<u>CaCo2</u>
Cox-2	δεν εκφράζεται	εκφράζεται	εκφράζεται
APC	φυσιολογικό	μεταλλαγμένο	μεταλλαγμένο
β-κατενίνη	μεταλλαγμένη	φυσιολογική	μεταλλαγμένη
P53	φυσιολογικό	μεταλλαγμένο	μεταλλαγμένο
K-ras	μεταλλαγμένο	φυσιολογικό	φυσιολογικό
MLH1	μεταλλαγμένο	φυσιολογικό	φυσιολογικό

nM για 1 ώρα και στη συνέχεια, σε ορισμένα πειράματα, στα 10 nM για 47 ώρες. Για τα πειράματα συνδυασμένης έκθεσης και τα δύο φάρμακα τέθηκαν ταυτόχρονα στις καλλιέργειες των κυττάρων.

Δοκιμασία Μεθυλ-τριαζολυλ-τετραζολίου (MTT)

Κύτταρα των δύο κυτταρικών σειρών τέθηκαν σε τρυβλία 96 θέσεων (96 well plates) με πυκνότητα 10×10^3 κύτταρα ανά θέση και αφέθηκαν να προσκολληθούν για 24 ώρες στους 37° C. Στη συνέχεια εκτέθηκαν στην ασπιρίνη, την μπορτεζομίμη ή το συνδυασμό τους για τον κατάλληλο χρόνο. Μετά από 48 ώρες, 10 μl του

αντιδραστηρίου MTT (R&D Systems, Abington, U.K.) προστέθηκαν σε κάθε θέση και τα τρυβλία επωάστηκαν για ακόμα 4 ώρες στους 37° C. Τελικά 100 μl του αντιδραστηρίου ανίχνευσης MTT (R&D Systems) προστέθηκαν σε κάθε θέση και τα τρυβλία επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου προστατευμένα από το φως για 16 ώρες. Οι μετρήσεις της απορρόφησης του φωτός έγιναν σε συσκευή πολλαπλών μετρήσεων 1420 Victor (Wallac, Turku, Finland) σε μήκος κύματος 570 nM με μήκος κύματος αναφοράς τα 650 nM. Οι μέσες τιμές πολλών πειραμάτων παρουσιάζονται στα αποτελέσματα.

Δοκιμασία βιωσιμότητας κυττάρων με τον αποκλεισμό του κυανού του τρυπανίου (Trypan blue)

Κύτταρα των δύο κυτταρικών σειρών καλλιεργούμενα με την παρουσία ασπιρίνης, μπορτεζομίμπης, του συνδυασμού τους ή χωρίς φάρμακα ως μάρτυρες εκτέθηκαν για 10 λεπτά στο κυανό του τρυπανίου και μετρήθηκαν με τη βοήθεια αιματοκυτταρομέτρου (Neubauer Improved, Brand, Weilheim, Germany) σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τόσο προσκολλημένα στις καλλιεργητικές φλάσκες όσο και αποκολλημένα στο καλλιεργητικό υλικό. Τουλάχιστον 200 κύτταρα μετρήθηκαν σε κάθε συνθήκη για την εύρεση του ποσοστού των κυττάρων που απέκλειαν τη χρωστική (βίωση).

Δοκιμασία κατακερματισμού του DNA

Κύτταρα λύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα Τρις-υδροχλωρίου, με 400 mM χλωριούχο νάτριο, 2 mM νατριούχου αιθυλέν-διαμινο-τετρα-οξικό οξύ (EDTA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) και pH 8,2 με προσθήκη πρωτεϊνάσης K (Proteinase K, Sigma-Aldrich), RNAσης (Invitrogen, Carlsbad, CA), και 3% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Το DNA απομονώθηκε με φυγοκέντρηση σε φαινόλη /χλωροφόρμιο και καθίζηση σε αιθανόλη. Ίσες ποσότητες DNA ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αгарόζης περιέχουσα βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma-aldrich) και φωτογραφήθηκαν σε υπεριώδες φως.

Δοκιμασία δραστικότητας κυκλοοξυγενάσης

Η δραστικότητα της κυκλοοξυγενάσης μετρήθηκε με φωτομετρική μέθοδο χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια της εταιρείας Cayman (Ann Arbor, MI). Σύμφωνα με το πρωτόκολο του κατασκευαστή τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με τη βοήθεια συσκευής αποκόλλησης (cell scraper) και χωρίς τη χρήση τρυψίνης και φυγοκεντρήθηκαν στα 1200g στους 4°C για 10 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων ομογενοποιήθηκε σε κρύο ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 0,1 M Τρις-υδροχλώριο σε pH 7,8 και 1 mM EDTA, και φυγοκεντρήθηκε στα 10.000g στους 4° C για 15 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντριση το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε άμεσα στη δοκιμασία ή αποθηκεύτηκε στους -20°C για μελλοντική χρήση. Για τη δοκιμασία δραστικότητας κυκλοοξυγενάσης, 10 μl του ομογενοποιημένου κυτταρικού διαλύματος τέθηκαν σε τρυβλίο 96 θέσεων με 150 μl ρυθμιστικού διαλύματος και 10 μl αίμης. Για κάθε πειραματική θέση υπήρχε αντίστοιχος μάρτυρας όπου το ομογενοποιημένο κυτταρικό διάλυμα είχε τοποθετηθεί προηγουμένως σε υδατόλουτρο στους 100°C για 5 λεπτά για την εξουδετέρωση της κυκλοοξυγενάσης. Το τρυβλίο 96 θέσεων αναδεύτηκε προσεκτικά για λίγα δευτερόλεπτα και επώαστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια 20 μl χρωμογόνου υποστρώματος και αραχιδονικού οξέος προστέθηκε σε κάθε θέση. Το τρυβλίο αναδεύτηκε και πάλι προσεκτικά για λίγα δευτερόλεπτα και επώαστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μετρήσεις έγιναν σε συσκευή 1420 Victor (Wallac, Turku, Finland) σε μήκος κύματος 590 nm.

Δοκιμασία πρωτεασωμικής δραστικότητας

Η πρωτεασωμική δραστικότητα μετρήθηκε με φθοριομετρική μέθοδο χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια της εταιρείας Chemicon International (Temecula, CA). Τα δείγματα προς ανάλυση προήλθαν από 600.000 κύτταρα καλλιεργούμενα με ή χωρίς τα δύο φάρμακα. Τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν σε 1 ml παγωμένο νερό και φυγοκεντρήθηκαν στα 12.000g. Το υπερκείμενο υπεβλήθη σε τρεις κύκλους ταχείας ψύξης και επαναθέρμανσης και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στα 12.000g για 45 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι τη χρήση του στη δοκιμασία. Η δοκιμασία πρωτεασωμικής

δραστηκότητας εκτελέστηκε σε τρυβλίο 96 θέσεων σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Σε κάθε θέση δείγματος προς ανάλυση τέθηκαν 10μl συμπυκνωμένου (10x) ρυθμιστικού διαλύματος (παρεχόμενου με το kit), 10 μl του πρωτεασωμικού υποστρώματος LLVY-AMC (Λευκίνη-λευκίνη-βαλίνη-τυροσίνη-7-αμινο-4-μεθύλ-κουμαρίνη), 20μl του προς ανάλυση δείγματος και 60 μl αποσταγμένου ύδατος. Ο συνολικός όγκος ήταν 100 μl. Στις θέσεις-μάρτυρες με υπόστρωμα αντί για δείγμα τέθηκαν 20 μl επιπλέον αποσταγμένου ύδατος ώστε να συμπληρώνεται και πάλι ο συνολικός όγκος των 100 μl ενώ στις θέσεις-μάρτυρες χωρίς υπόστρωμα τέθηκαν 90μl αποσταγμένου ύδατος αντί για δείγμα και υπόστρωμα ώστε να συμπληρώνεται ο συνολικός όγκος των 100 μl. Τα τρυβλία επώαστηκαν για μία ώρα στους 37°C. Οι μετρήσεις έγιναν σε συσκευή 1420 Victor (Wallac, Turku, Finland) σε μήκος κύματος 380 nM. Οι τελικές τιμές υπολογίστηκαν μετά από αφαίρεση των τιμών των μαρτύρων με και χωρίς υπόστρωμα και η πρωτεασωμική δραστηκότητα προσδιορίστηκε με τη βοήθεια προκατασκευασμένου διαγράμματος φθορισμού-πρωτεασωμικής δραστηκότητας.

Απομόνωση πρωτεϊνών και western blotting

Κύτταρα HCT116, HT-29 και CaCo2 καλλιεργούμενα με ή χωρίς ασπιρίνη και μπορτεζομίμη συλλέκθηκαν και ξεπλύθηκαν σε PBS (Phosphate-buffered Saline). Τα κυτταρικά ιζήματα διαλύθηκαν σε διάλυμα λύσης με 10 mM τρις-υδροχλωρίου, 50 mM EDTA, 150 mM χλωριούχου νατρίου, 10% γλυκερίνης, 1% Triton X-100 και τους αναστολείς πρωτεασών λιουπεπτίνη, απροτινίνη και PMSF (φαινυλ-μεθυλ-σουλφονυλ-φθόριο). Οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνικών δειγμάτων προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Bradford (Biorad, Hercules, CA). 50 μg πρωτεϊνικών δειγμάτων ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη 10% SDS-πολυακρυλαμιδίου. Από τη γέλη οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες western blotting με τη βοήθεια συσκευής μεταφοράς (Biorad). Στη συνέχεια οι μεμβράνες επώαστηκαν σε PBS/Tween με 5% μη-λιπαρό γάλα σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα. Ακολούθησε ξέπλυμα με PBS/Tween τρεις φορές από 5 λεπτά η κάθε φορά. Μετά οι μεμβράνες επώαστηκαν με το πρωτοταγές αντίσωμα στους 4°C για 16 ώρες με ελαφρά ανάδευση. Τα πρωτοταγή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: Ακτίνη (sc-8432, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), p21 (sc-817), p27 (sc-1641), akt1 (sc-5298), NF-κB

(sc-8008), p53 (sc-126), κυκλίνη D (sc-8396), Bad (sc-8044), Bax (sc-7480). Κατόπιν οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν τρεις φορές και επώαστηκαν με το δευτεροταγές αντίσωμα GAM (Goat anti-mouse, Santa Cruz Biotechnology) για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με ελαφρά ανάδευση. Ακολούθησε νέο τριπλό ξέπλυμα. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών έγινε με το σύστημα της χημειοφωταύγειας από την εταιρεία Biorad. Τα πειράματα που παρουσιάζονται επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές με παρόμοια αποτελέσματα.

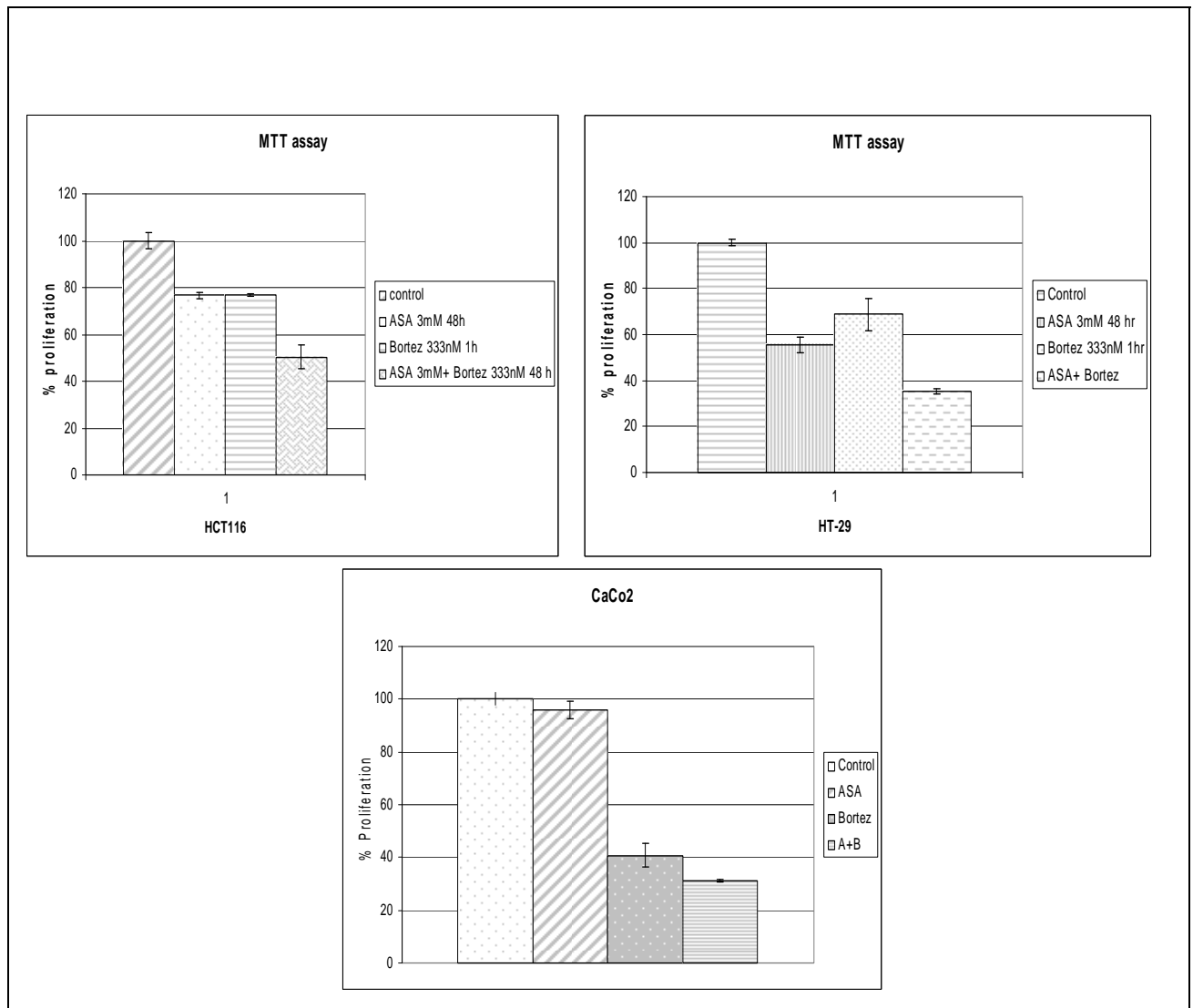
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο συνδυασμός ασπιρίνης και μπορτεζομίμπης μειώνει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων των κολο-ορθικών σειρών

Σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες και τα κύτταρα που επώαστηκαν μόνο με ασπιρίνη ή μόνο με μπορτεζομίμπη, τόσο τα κύτταρα HCT116 όσο και τα κύτταρα HT-29 και CaCo2 που εκτέθηκαν στο συνδυασμό τους επέδειξαν μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό όπως αναδεικνύεται με τη δοκιμασία MTT (Εικ. 13). Επίσης παρουσίασαν μειωμένη επιβίωση όπως αναδεικνύεται από την ικανότητά τους να αποκλείουν το κυανό του τρυπανίου (Εικ. 14), από τη δοκιμασία κατακερματισμού του DNA (Εικ. 15) και από την δημιουργία του θραύσματος των 85 kDa της PARP (Poly-ADP-ribose Polymerase) κατά τη διάρκεια της απόπτωσης (Εικ. 15).

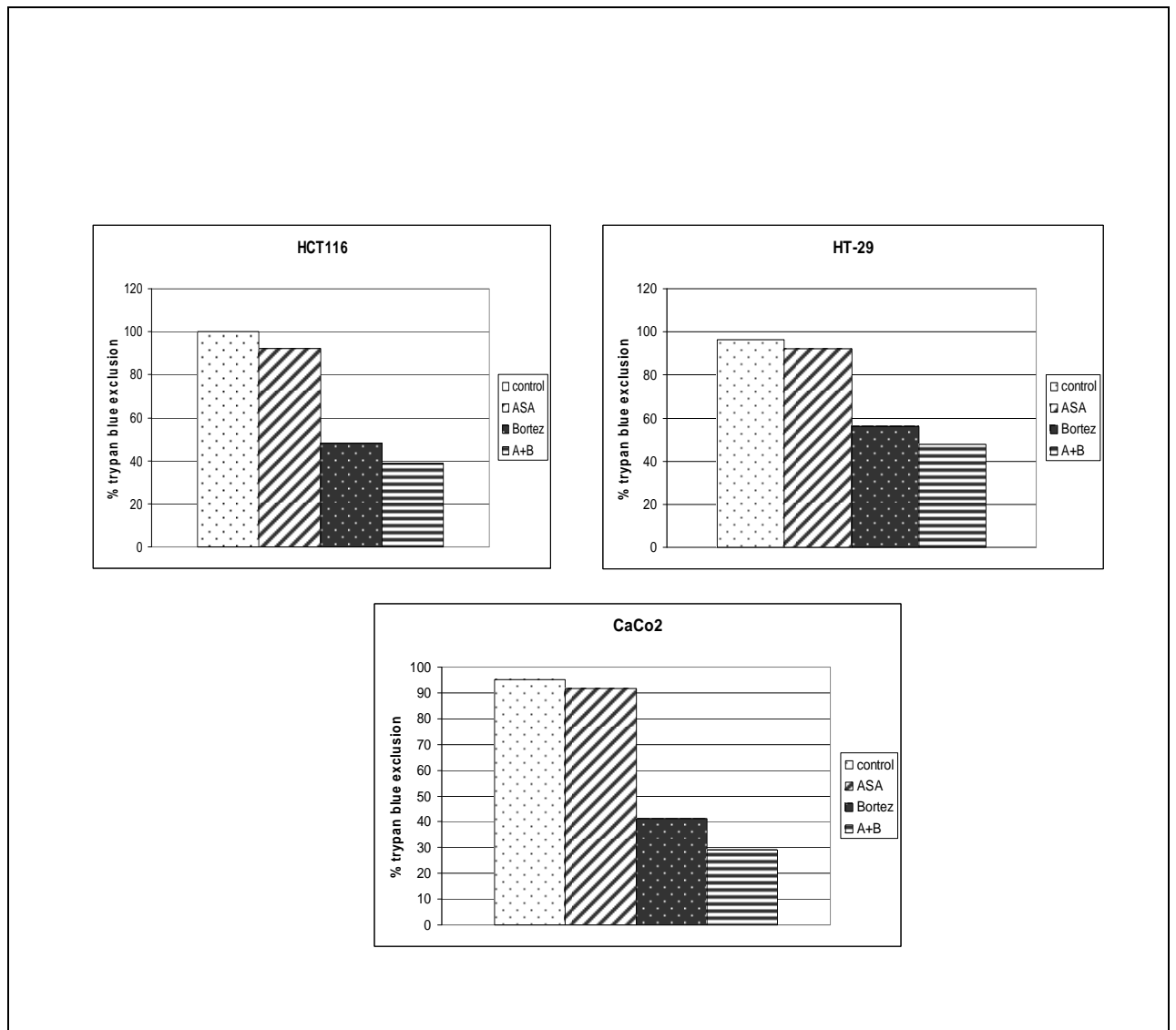
Η συνέργεια της ασπιρίνης στα ανασταλτικά αποτελέσματα της μπορτεζομίμπης είναι ανεξάρτητη από την Cox στις κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές CaCo2 και HT-29 εκφράζουν την Cox-2 ενώ η σειρά HCT116 δεν εκφράζει το ένζυμο. Παρά ταύτα στα κύτταρα HT-29 η Cox-2 φαίνεται να είναι ανενεργή όπως αποδεικνύεται με τη βοήθεια φωτομετρικής δοκιμασίας δραστηριότητας της Cox-2 στην οποία οι κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη



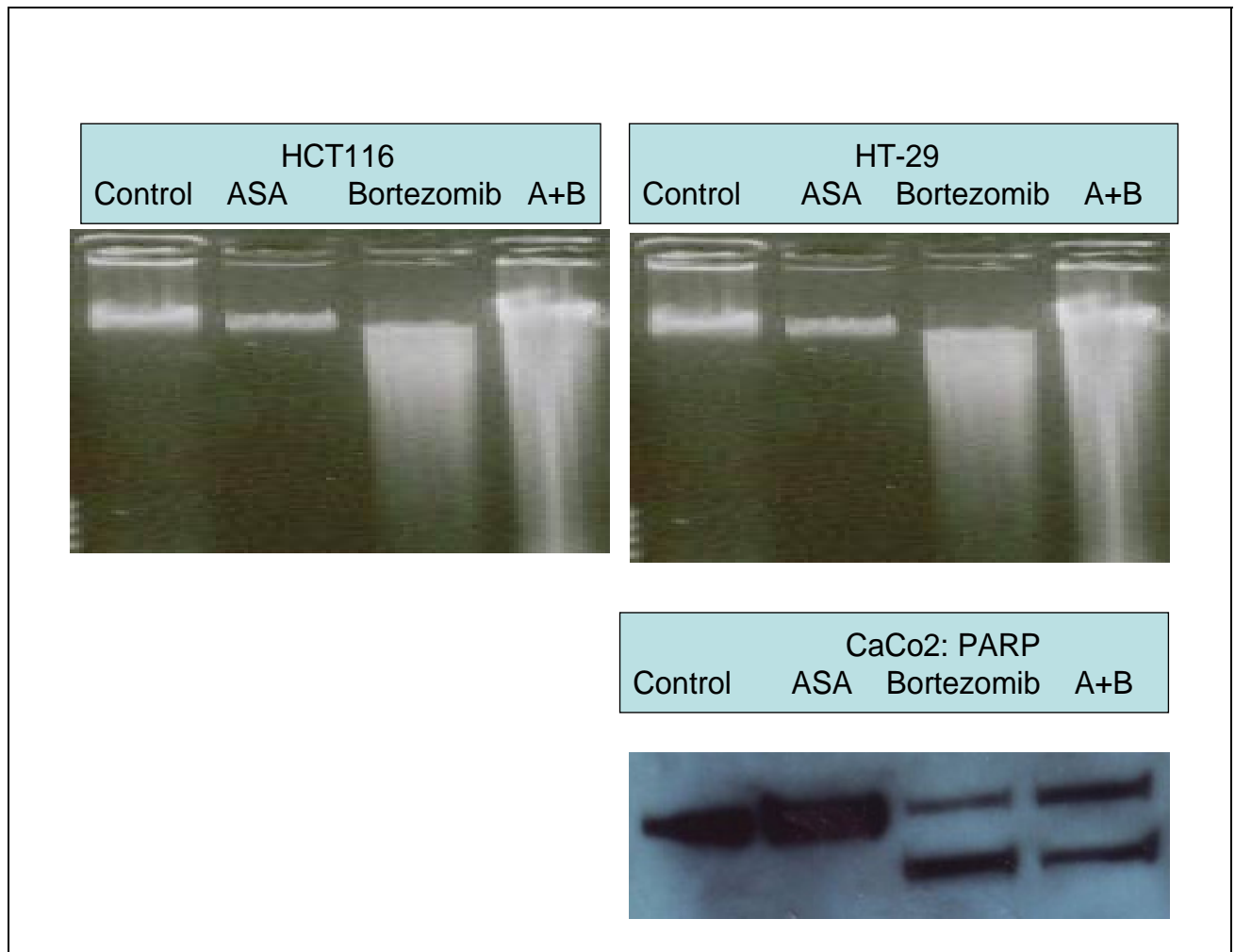
Εικόνα 13

Η συνεργασία της ασπιρίνης και της μπορτεζομίμπης στη μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HCT116 (πάνω αριστερά), HT-29 (πάνω δεξιά) και CaCo2 (κάτω) όπως αναδεικνύεται με τη δοκιμασία μεθυλ-τριαζολύλ-τετραζολίου (MTT). Η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων των δύο κυτταρικών σειρών ήταν 10×10^3 κύτταρα ανά θέση. Οι μετρήσεις της απορρόφησης του φωτός έγιναν σε μία συσκευή πολλαπλών μετρήσεων σε μήκος κύματος 570 nM με μήκος κύματος αναφοράς τα 650 nM. Στα κύτταρα HCT116 το κάθε φάρμακο ξεχωριστά αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό κατά 20% σε σχέση με τους μάρτυρες ενώ ο συνδυασμός αυξάνει το ποσοστό αυτό στο 50%. Στα κύτταρα HT-29 η ασπιρίνη και η μπορτεζομίμπη ξεχωριστά αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό κατά περίπου 45% και 30% αντίστοιχως ενώ ο συνδυασμός αυξάνει αυτό το ποσοστό στο 65%. Στα κύτταρα CaCo2 τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 5%, 60% και 70%.



Εικόνα 14

Η συνεργασία της ασπιρίνης και της μπορτεζομίμπης στην αύξηση της απόπτωσης των κυττάρων HCT116 (πάνω αριστερά), HT-29 (πάνω δεξιά) και CaCo2 (κάτω) όπως αναδεικνύεται με τη δοκιμασία αποκλεισμού του κυανού του τρυπανίου. Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τόσο προσκολλημένα στις καλλιεργητικές φλάσκες όσο και αποκολλημένα εντός του καλλιεργητικού υλικού. Τουλάχιστον 200 κύτταρα μετρήθηκαν σε κάθε συνθήκη. Η ασπιρίνη προκαλεί απόπτωση της τάξης του 10% στα κύτταρα HCT116. Η μπορτεζομίμπη προκαλεί απόπτωση σε περίπου 50% των κυττάρων που αυξάνεται στο 60% με το συνδυασμό. Στα κύτταρα HT-29 τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 5%, 45% και 55% και στα κύτταρα CaCo2 είναι 5%, 55% και 70%.

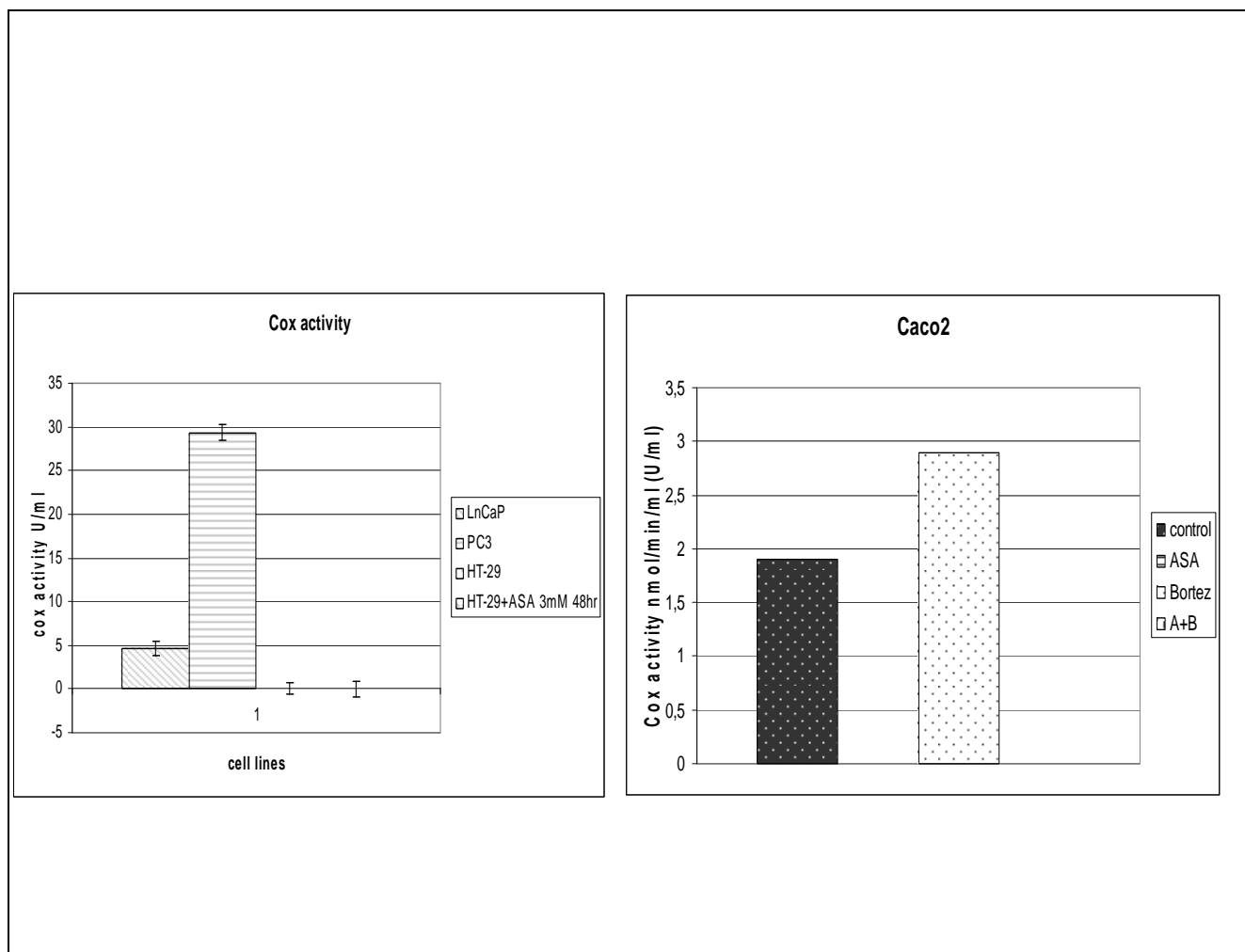


Εικόνα 15

Η συνεργασία της ασπιρίνης και της μπορτεζομίμπης στην αύξηση της απόπτωσης των κυττάρων HCT116 (πάνω αριστερά) και HT-29 (πάνω δεξιά) όπως αναδεικνύεται με τη δοκιμασία κατακερματισμού του DNA. Το DNA απομονώθηκε με τη μέθοδο της φυγοκέντρησης σε φαινόλη/χλωροφόρμιο και καθίζησης σε αιθανόλη. Ίσες ποσότητες DNA ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης περιέχουσα βρομιούχο αιθίδιο και φωτογραφήθηκαν σε υπεριώδες φως. Όπως δεικνύεται και με τη μέθοδο του αποκλεισμού του κυανού του τρυπανίου σημαντική απόπτωση στις δύο κυτταρικές σειρές παρατηρείται μετά την έκθεση στην μπορτεζομίμπη ή στον συνδυασμό ασπιρίνης και μπορτεζομίμπης. Κάτω δεικνύεται η απόπτωση με τον κερματισμό της PARP στα κύτταρα CaCo2.

LnCaP και PC3 χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες. Οι σειρές αυτές παρουσιάζουν χαμηλή και υψηλή δραστικότητα της Cox-2 αντίστοιχα (Εικ. 16 αριστερά).

Η λειτουργική ανεπάρκεια της Cox-2 στα κύτταρα HT-29 έχει δειχθεί και από άλλους ερευνητές που βρήκαν απουσία παραγωγής προσταγλανδίνης PGE₂ σε πειράματα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (313). Στα κύτταρα CaCo2, η προσθήκη ασπιρίνης καταστέλλει πλήρως την Cox-2 ενώ αντίθετα η μπορτεζομίμη αυξάνει την δραστικότητα του ενζύμου στα κύτταρα αυτά. Η ταυτόχρονη έκθεση των κυττάρων και στην ασπιρίνη είναι ικανή όμως να διατηρήσει το ένζυμο κατασταλαμένο (Εικ. 16 δεξιά)

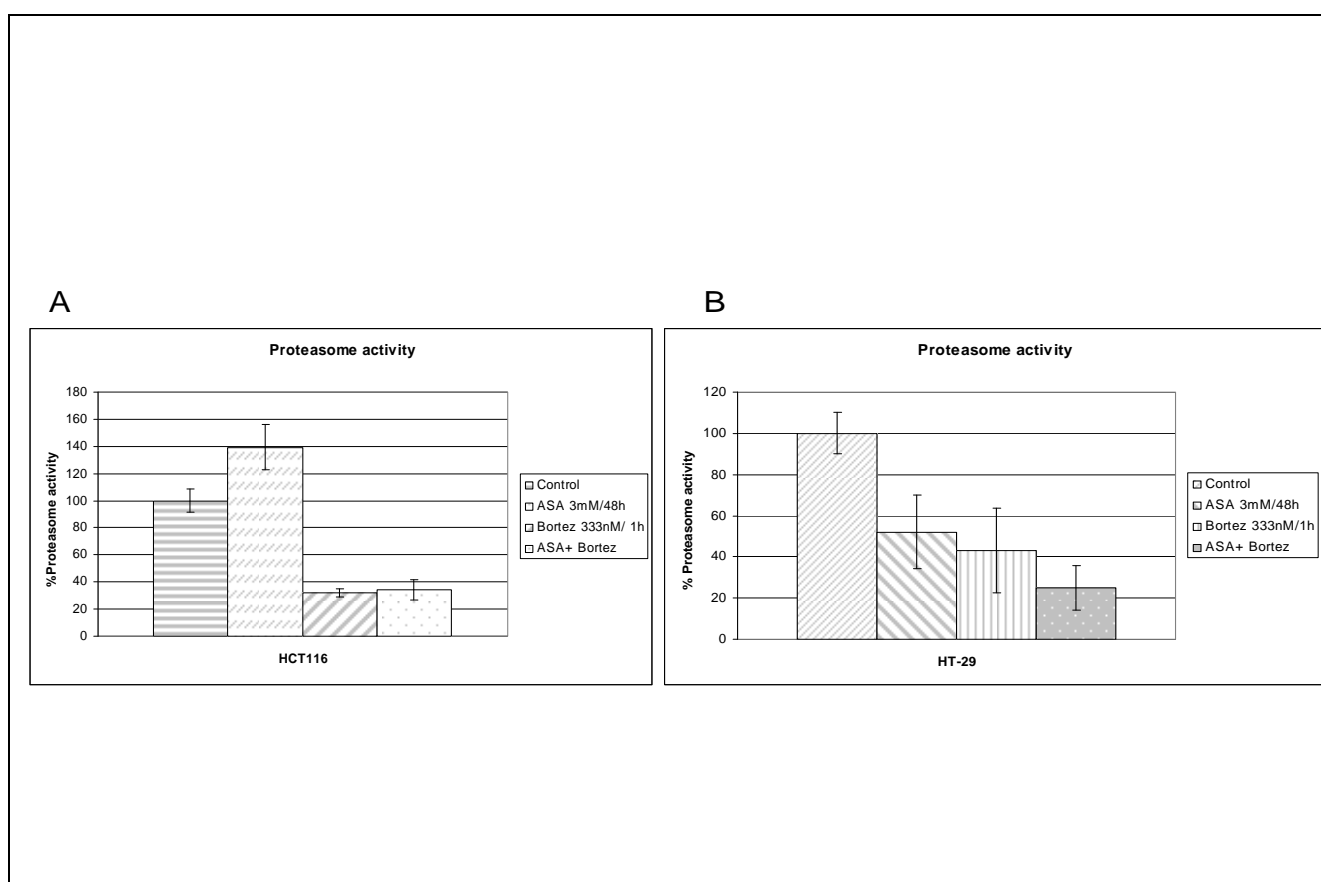


Εικόνα 16

Απουσία ενζυμικής δραστικότητας της Cox-2 στην κυτταρική σειρά HT-29 παρά το ότι αυτή εκφράζει το ένζυμο (απιστερά). Οι κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη LnCaP και PC3 χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες. Δεξιά απεικονίζεται η ενζυμική δραστικότητα της Cox-2 στην σειρά CaCo2 με ή χωρίς τα δύο φάρμακα.

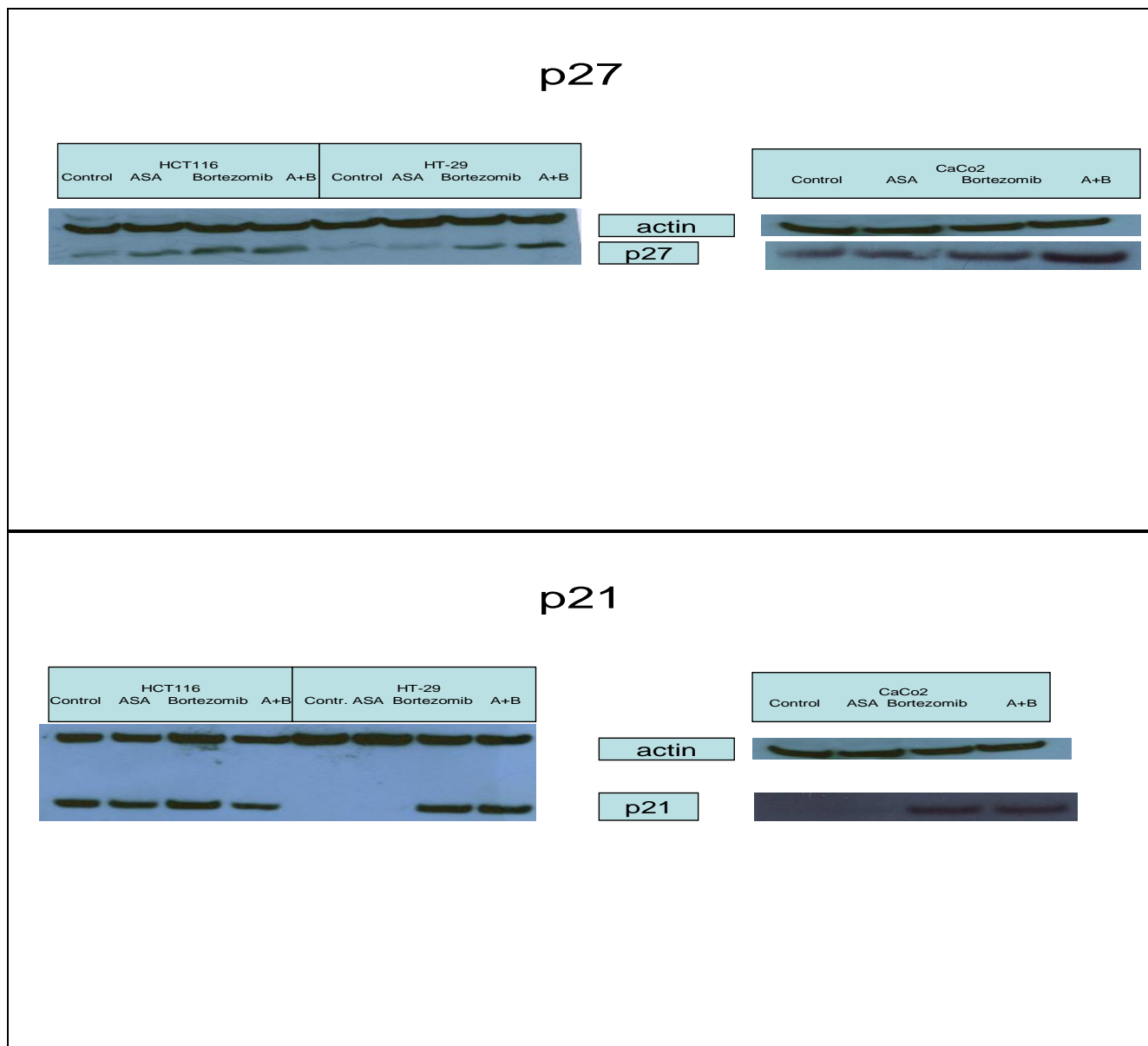
Το πρωτεάσωμα αναστέλλεται σε παρόμοιο βαθμό από την μπορτεζομίμη και το συνδυασμό ασπιρίνης / μπορτεζομίμης

Κύτταρα HCT116 που εκτέθηκαν σε 333 nM μπορτεζομίμης για μία ώρα και στο συνδυασμό της ίδιας συγκέντρωσης μπορτεζομίμης για το ίδιο χρονικό διάστημα και σε ασπιρίνη 3 mM για 48 ώρες επέδειξαν μείωση της πρωτεασωματικής δραστηριότητας κατά 70% σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες που δεν είχαν εκτεθεί στα φάρμακα (Εικ. 17Α). Στην κυτταρική σειρά HT-29 ο συνδυασμός των δύο



Εικόνα 17

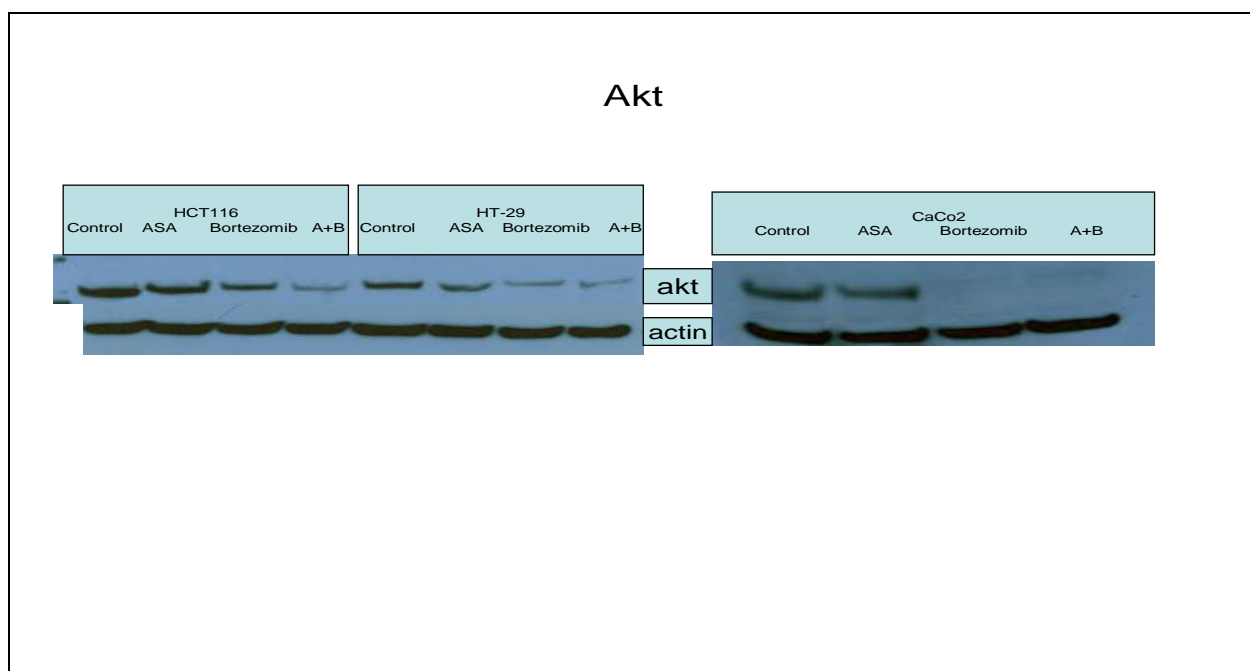
Δοκιμασία πρωτεασωματικής δραστηριότητας στα κύτταρα HCT116 (αριστερά) και HT-29 (δεξιά) με φθοριμετρική μέθοδο. Δείγματα προς ανάλυση από τις δύο κυτταρικές σειρές καλλιεργούμενες με ή χωρίς τα δύο φάρμακα υποβλήθηκαν στη δοκιμασία σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στις μεθόδους. Η πρωτεασωματική δραστηριότητα μειώνεται στο 25 με 40% της αρχικής με την μπορτεζομίμη και διατηρείται χαμηλή με το συνδυασμό. Η ασπιρίνη αυξάνει την πρωτεασωματική δραστηριότητα στα κύτταρα HCT116 και τη μειώνει στα HT-29.



Εικόνα 18

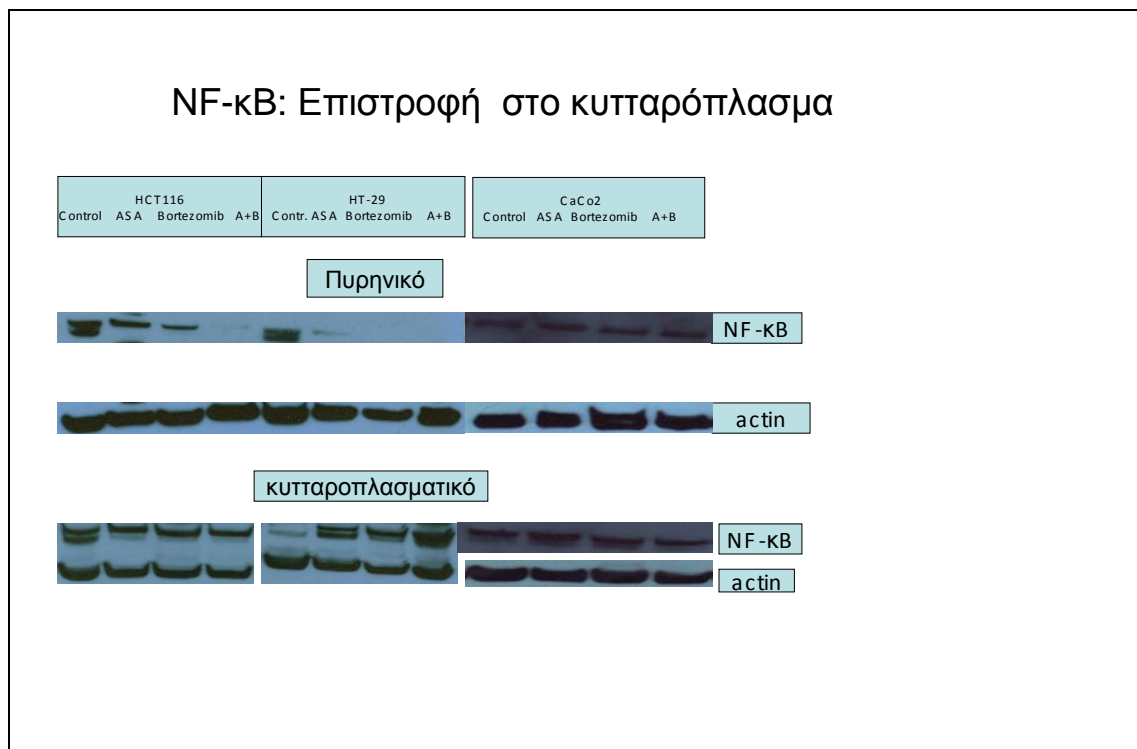
Ανάλυση western blotting πρωτεϊνικών δειγμάτων κυττάρων HCT116 (αριστερή τετράδα), HT-29 (μέση τετράδα) και CaCo2 (δεξιά τετράδα) με αντισώματα κατά των πρωτεϊνών p27 (πάνω) και p21 (κάτω). Η σειρά των φαρμάκων σε κάθε τετράδα είναι: πρώτη θέση χωρίς φάρμακα, δεύτερη θέση ασπιρίνη 3 mM για 48 ώρες, τρίτη θέση μπορτεζομίμη 333 nM για μία ώρα και στη συνέχεια 10 nM για 47 ώρες, και τέταρτη θέση ο συνδυασμός ασπιρίνης και μπορτεζομίμης στις ίδιες συγκεντρώσεις για τα ίδια χρονικά διαστήματα. Το p21 επάγεται στις δύο κυτταρικές σειρές HT-29 και CaCo2 από την μπορτεζομίμη και από το συνδυασμό. Στα κύτταρα HCT116 εκφράζεται και σε βασικές συνθήκες. Παρομοίως και το p27 επάγεται από τη μπορτεζομίμη και ακόμα περισσότερο στις κυτταρικές σειρές HT-29 και CaCo2 από το συνδυασμό.

φαρμάκων έδειξε μία μικρή αύξηση της πρωτεασωμικής αναστολής σε σχέση με την μπορτεζομίμη μόνη της (Εικ. 17B). Αξιοσημείωτη είναι η επίδραση της ασπιρίνης στην πρωτεασωμική δραστηριότητα στις δύο κυτταρικές σειρές που στα κύτταρα HCT116 αυξάνεται ενώ στα κύτταρα HT-29 αναστέλλεται (Εικ. 17A και B).



Εικόνα 19

Ανάλυση western blotting πρωτεϊνικών δειγμάτων κυττάρων HCT116 (αριστερή τετράδα) HT-29 (μέση τετράδα) και CaCo2 (δεξιά τετράδα) με αντισώματα κατά της πρωτεΐνης Akt. Η σειρά των φαρμάκων σε κάθε τετράδα είναι: πρώτη θέση χωρίς φάρμακα, δεύτερη θέση ασπιρίνη 3 mM για 48 ώρες, τρίτη θέση μπορτεζομίμη 333 nM για μία ώρα και στη συνέχεια 10 nM για 47 ώρες, και τέταρτη θέση ο συνδυασμός ασπιρίνης και μπορτεζομίμης στις ίδιες συγκεντρώσεις για τα ίδια χρονικά διαστήματα. Η Akt καταστέλλεται από την μπορτεζομίμη και το συνδυασμό και στις τρεις κυτταρικές σειρές αλλά σε διαφορετικό βαθμό.



Εικόνα 20

Ανάλυση western blotting πρωτεϊνικών δειγμάτων κυττάρων HCT116 (αριστερά), HT-29 (μέσο) και CaCo2 (δεξιά) με αντισώματα κατά της πρωτεΐνης NF-κB. Κλασματοποιημένα πυρηνικά πρωτεϊνικά δείγματα απεικονίζονται πάνω και κυτταροπλασματικά κάτω. Η σειρά των φαρμάκων σε κάθε τετράδα είναι: πρώτη θέση χωρίς φάρμακα, δεύτερη θέση ασπιρίνη 3 mM για 48 ώρες, τρίτη θέση μπορτεζομίμη 333 nM για μία ώρα και στη συνέχεια 10 nM για 47 ώρες, και τέταρτη θέση ο συνδυασμός ασπιρίνης και μπορτεζομίμης στις ίδιες συγκεντρώσεις για τα ίδια χρονικά διαστήματα. Τόσο στα κύτταρα HCT116 όσο και στα HT-29 τα δύο φάρμακα και ο συνδυασμός τους προάγουν την κατακράτηση του NF-κB στο κυτταρόπλασμα. Στα κύτταρα CaCo2 δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή στην κατανομή του NF-κB.

Η έκφραση των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου p21 και p27 αυξάνεται από την μπορτεζομίμη και το συνδυασμό της με την ασπιρίνη

Ο αναστολέας των CDKs p27 επάγεται στις τρεις κυτταρικές σειρές από την μπορτεζομίμη και σε ακόμα μεγαλύτερο βαθμό στα κύτταρα HT-29 και CaCo2 από το συνδυασμό της με την ασπιρίνη (Εικ. 18 πάνω). Ο αναστολέας των CDKs p21 επάγεται επίσης στα κύτταρα HT-29 και CaCo2 από την μπορτεζομίμη και το

συνδυασμό της με την ασπιρίνη (Εικ. 18 κάτω). Τα κύτταρα HCT116, που φέρουν μη μεταλλαγμένο p53, εκφράζουν το p21 σε βασικές συνθήκες και η έκφρασή του δεν τροποποιείται σημαντικά με την έκθεση των κυττάρων στα δύο φάρμακα (Εικ. 18 κάτω).

Η έκφραση της κινάσης akt1 μειώνεται από το συνδυασμό ασπιρίνης και μπορτεζομίμπης στις τρεις κυτταρικές σειρές

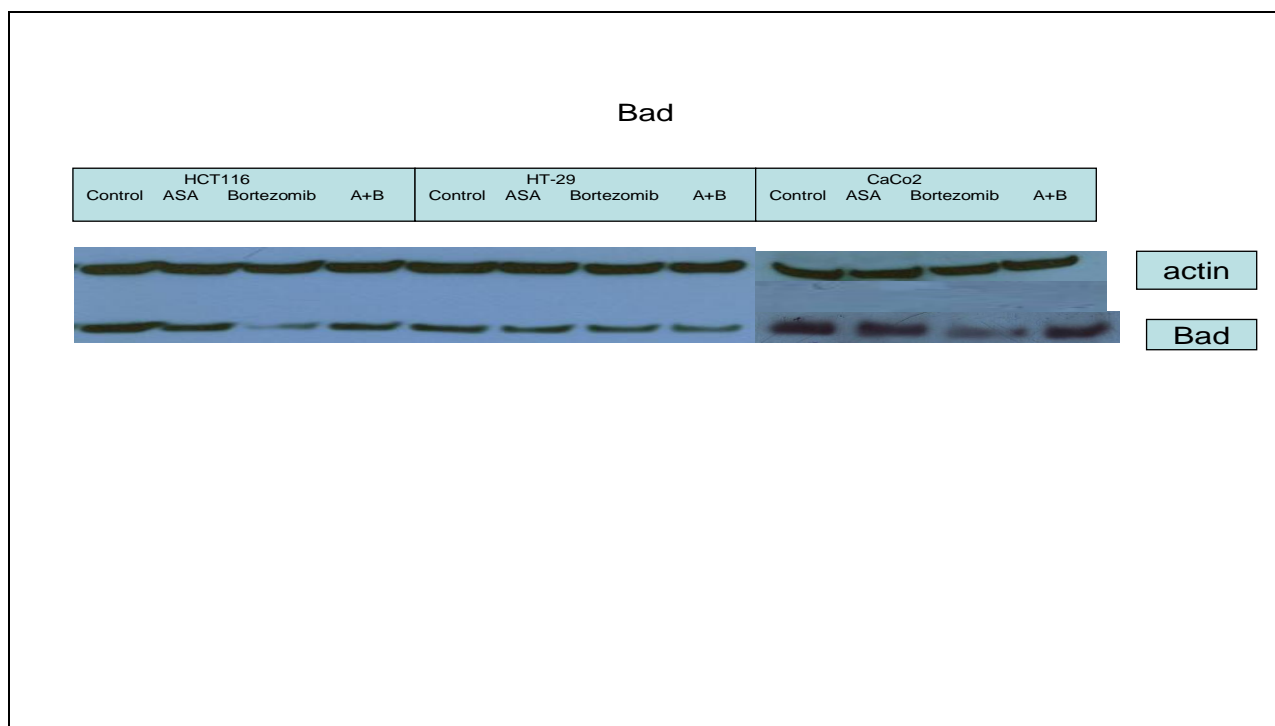
Η έκφραση της κινάσης akt1 μειώνεται με την έκθεση των τριών κυτταρικών σειρών στο συνδυασμό της μπορτεζομίμπης με την ασπιρίνη (Εικ. 19). Η μπορτεζομίμπη μόνη της επιτυγχάνει καταστολή της akt1 στα κύτταρα CaCo2 αλλά λιγότερο στην HT-29 και ακόμα λιγότερο στην σειρά HCT116 (Εικ. 19).

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα με την έκθεση των κυτταρικών σειρών HCT116 και HT-29 στα δύο φάρμακα

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB κατακρατείται στο κυτταρόπλασμα με την έκθεση των κυττάρων HCT116 και HT-29 στο συνδυασμό ασπιρίνης και μπορτεζομίμπης. Στα κύτταρα HT-29 το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρείται και με το κάθε φάρμακο μόνο του ενώ στα HCT116 παρατηρείται μόνο μερική μείωση της πυρηνικής κατανομής του αντι-αποπτωτικού αυτού μεταγραφικού παράγοντα (Εικ. 20). Στα κύτταρα CaCo2 τα δύο φάρμακα δεν επιτυγχάνουν αξιόλογη μεταβολή της κυτταρικής κατανομής του NF-κB.

Αναστροφή της μεταβολής της έκφρασης της πρωτεΐνης Bad με το συνδυασμό ασπιρίνης και μπορτεζομίμπης στις κυτταρικές σειρές HCT116 και CaCo2

Πειράματα western blotting για την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη της Bcl-2 οικογένειας, Bad ανέδειξαν ότι η μπορτεζομίμπη καταστέλει την έκφρασή της στα κύτταρα HCT116 και CaCo2. Η επιπλέον έκθεση των κυττάρων αυτών και στην ασπιρίνη



Εικόνα 21

Ανάλυση western blotting πρωτεϊνικών δειγμάτων κυττάρων HCT116 (αριστερή τετράδα) HT-29 (μέση τετράδα) και CaCo2 (δεξιά τετράδα) με αντισώματα κατά της πρωτεΐνης Bad. Η σειρά των φαρμάκων σε κάθε τετράδα είναι: πρώτη θέση χωρίς φάρμακα, δεύτερη θέση ασπιρίνη 3 mM για 48 ώρες, τρίτη θέση μπορτεζομίμη 333 nM για μία ώρα και στη συνέχεια 10 nM για 47 ώρες, και τέταρτη θέση ο συνδυασμός ασπιρίνης και μπορτεζομίμης στις ίδιες συγκεντρώσεις για τα ίδια χρονικά διαστήματα. Στα κύτταρα HCT116 και CaCo2 η μπορτεζομίμη καταστέλλει την Bad αλλά η προσθήκη της ασπιρίνης αναστρέφει αυτήν την καταστολή. Στα κύτταρα HT-29 δεν παρατηρείται αξιόλογη αλλαγή της Bad.

είναι ικανή όμως να αναστρέψει την μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης Bad (Εικ. 21). Στα κύτταρα HT-29 δεν υπάρχει σημαντική μεταβολή της Bad με τα φάρμακα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως έχουμε αναλύσει στο γενικό μέρος, επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι αναστολείς της Cox-2 μειώνουν την επίπτωση του κολο-ορθικού καρκίνου σε χρήστες των φαρμάκων αυτών σε σχέση με άτομα που δεν κάνουν χρήση (10, 11, 181, 241). Η αντι-νεοπλασματική δραστηριότητα των NSAIDs έχει επιβεβαιωθεί σε *in*

vitro και *in vivo* μοντέλα (176, 275). Τα NSAIDs έχουν επιδείξει αντι-νεοπλασματική δράση και σε κύτταρα που δεν εκφράζουν την Cox-2 (243-246). Διάφοροι μηχανισμοί εμπλέκονται στην ανεξάρτητη από την Cox-2 αυτή δράση, όπως συζητήθηκε στο γενικό μέρος (247, 267, 317).

Στην παρούσα πειραματική μελέτη τεκμηριώνεται ότι η ασπιρίνη και η μπορτεζομίμη συνεργάζονται για την μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την επαγωγή της απόπτωσης σε τρεις κυτταρικές σειρές κολο-ορθικού καρκίνου εκ των οποίων η μία (HCT116) δεν εκφράζει την Cox-2, η δεύτερη (HT-29) την εκφράζει αλλά η πρωτεΐνη παρουσιάζει χαμηλή ή μηδενική δραστηριότητα και μόνο η τρίτη (CaCo2) εκφράζει ενεργό ένζυμο. Απουσία ενζυμικής δραστηριότητας της Cox-2 στα κύτταρα HT-29 έχει βρεθεί και από άλλους ερευνητές που, χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC, High-Pressure Liquid Chromatography), έδειξαν απουσία παραγωγής προσταγλανδίνης PGE₂. Οι ερευνητές αυτοί έδειξαν, επίσης, ότι η διαμόλυνση των κυττάρων HCT116 (χωρίς ενδογενή Cox-2) με πλασμίδιο που περιέχει Cox-2 προερχόμενη από τα HT-29 οδηγεί σε παραγωγή PGE₂, γεγονός που αποδεικνύει ότι η Cox-2 των HT-29 δεν είναι ενδογενώς ελλατωματική αλλά ότι κάποιος παράγοντας στο ενδοκυττάριο περιβάλλον των κυττάρων αυτών μπορεί να την αναστέλλει (313). Αντίθετα άλλοι ερευνητές, χρησιμοποιώντας μία ανταγωνιστική ανοσοενζυματική μέθοδο (competitive enzyme immunoassay), έδειξαν παραγωγή PGE₂ στο καλλιεργητικό υλικό των κυττάρων HT-29 (314,318). Συνεπώς το ερώτημα της δραστηριότητας της Cox-2 στα κύτταρα HT-29 παραμένει αμφιλεγόμενο και πιθανώς εξαρτάται σε κάποιο βαθμό από τις ακριβείς συνθήκες των πειραμάτων. Συνολικά τα αποτελέσματα στις τρεις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη δείχνουν ότι στα μεν κύτταρα HCT116 διαμεσολαβούν μηχανισμοί καθαρά ανεξάρτητοι από την Cox-2 για τη δράση της ασπιρίνης, στα δε κύτταρα HT-29 και CaCo2 δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο η δράση αυτή να είναι μερικώς τουλάχιστον ανεξάρτητη από την Cox-2. Η σημασία των πλειότροπων δράσεων των NSAIDs για τα αντι-νεοπλασματικά τους αποτελέσματα υπογραμμίζεται περαιτέρω από το ότι, τουλάχιστον στα κύτταρα HCT116, η έκθεση στην ασπιρίνη επάγει το γονίδιο της Cox-2 και την παραγωγή PGE₂ (αδημοσίευτα προκαταρκτικά μας αποτελέσματα), έτσι ώστε άλλοι μηχανισμοί πρέπει να διαμεσολαβούν για την παρατηρούμενη αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών. Το ίδιο

ισχύει και με την έκθεση των κυττάρων CaCo2 στην μπορτεζομίμη όπου η δραστικότητα της Cox-2 αυξάνεται (Εικ. 16).

Η κινάση akt ενεργοποιείται σε οδό μεταγωγής σήματος που ξεκινά από το πρωτοογκογονίδιο k-ras και γι' αυτό παίζει ιδιαίτερο ρόλο στις περιπτώσεις κολο-ορθικού καρκίνου που φέρουν ενεργοποιημένο το ογκογονίδιο αυτό. Στις τρεις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν η κινάση akt παρουσιάζει μειωμένη έκφραση μετά από έκθεση στην μπορτεζομίμη ή τον συνδυασμό της με την ασπιρίνη. Αυτό φαίνεται αρχικά παράδοξο γιατί η akt είναι υπόστρωμα του πρωτεασώματος (134), αλλά μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι θετικοί ρυθμιστές της κινάσης είναι επίσης πρωτεασωμικά υποστρώματα. Επιπλέον, η φωσφατάση PTEN, που είναι αναστολέας της akt, είναι υπόστρωμα του πρωτεασώματος (319) και η σταθεροποίησή της από την αναστολή του πρωτεασώματος, αναμένεται να οδηγεί σε αναστολή της akt. Η καταστολή της akt συμβάλλει στην αναστολή του πολλαπλασιασμού και την προαγωγή της απόπτωσης από την ασπιρίνη και την μπορτεζομίμη στα κολο-ορθικά κύτταρα μέσω της καταστολής αντι-αποπτωτικών στόχων που βρίσκονται παρακάτω στις οδούς που εκκινούνται από την akt, όπως η κινάση IKK, η E3 λιγκάση του p53, mdm2, το μέλος της Bcl-2 οικογένειας Bad και η κασπάση 9 (60, 64). Πράγματι ανευρέθηκε παρακράτηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στο κυτταρόπλασμα στις δύο από τις κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε αναστολή της κινάσης IKK. Η απουσία μεταβολής της κυτταρικής κατανομής του NF-κB στην τρίτη κυτταρική σειρά, τα κύτταρα CaCo2 μπορεί να οφείλεται στη σύνθετη ρύθμιση του μεταγραφικού αυτού παράγοντα. Για παράδειγμα, η β-κατενίνη φέρει μετάλλαξη στα κύτταρα CaCo2, γεγονός που μπορεί να την εμποδίζει να αλληλεπιδράσει άμεσα και να αναστείλει τον NF-κB (46). Έτσι εξουδετερώνεται η αναστολή του NF-κB που θα υπήρχε στα κύτταρα αυτά από την σταθεροποίηση της β-κατενίνης λόγω συνυπάρχουσας μετάλλαξης του APC.

Η επαγωγή του αναστολέα των εξαρτώμενων από τις κυκλίνες κινασών (CDKs) p27 συμβάλλει στα παρατηρούμενα ανασταλτικά αποτελέσματα της μπορτεζομίμης και του συνδυασμού της με την ασπιρίνη στις τρεις κυτταρικές σειρές HCT116, HT-29 και CaCo2. Όσον αφορά τον CDK αναστολέα p21, επαγωγή από τα φάρμακα παρατηρείται στα κύτταρα HT-29 και CaCo2 που δεν εκφράζουν τον αναστολέα σε βασικές συνθήκες καλλιέργειας καθότι φέρουν μεταλλαγμένο τον μεταγραφικό παράγοντα p53 που είναι κύριος ρυθμιστής του p21. Αντίθετα τα κύτταρα HCT116 φέρουν φυσιολογικό p53, εκφράζουν το p21 σε βασικές συνθήκες καλλιέργειας και η

έκφρασή του δεν τροποποιείται με την έκθεση στα φάρμακα. Ο p21 και ο p27 είναι υποστρώματα του πρωτεασώματος και η αύξησή τους με την έκθεση στον αναστολέα του πρωτεασώματος μπορτεζομίμη πιθανά οφείλεται σε αναστολή της αποδόμησής τους. Μία επιπρόσθετη επαγωγή του p27 που παρατηρείται από την ασπιρίνη κατά τη συνδυασμένη έκθεση στα δύο φάρμακα σε σχέση με την έκθεση μόνο στην μπορτεζομίμη στα κύτταρα HT-29 και CaCo2 μπορεί να οφείλεται σε κάποιο μηχανισμό εξαρτώμενο από την αναστολή του πρωτεασώματος καθώς η έκθεση στην ασπιρίνη μόνη της δεν είναι ικανή να επηρεάσει την έκφραση του αναστολέα των CDKs. Είναι αξιοσημείωτο σχετικά ότι σε ένα άλλο πειραματικό σύστημα, η ασπιρίνη βρέθηκε να αναστέλλει την λειτουργία του πρωτεασώματος (320).

Το p27 παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόοδο του κολο-ορθικού καρκίνου και έχει βρεθεί να καταστέλλεται σε περιπτώσεις επιθετικών κολο-ορθικών καρκινωμάτων στον άνθρωπο (171) και σε μεταστατικά καρκινώματα σε σχέση με την πρωτοπαθή εστία (173). Κατά συνέπεια, η επαγωγή του p27 και, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, του p21 μπορεί να είναι σε θέση να αναστρέψει την επιθετικότητα αυτή και να είναι δείκτης αποτελεσματικότητας της θεραπευτικής προσέγγισης.

Το προ-αποπτωτικό μέλος της Bcl-2 οικογένειας, Bad διερευνήθηκε για το ρόλο του στην πρόκληση απόπτωσης μετά την έκθεση των τριών κυτταρικών σειρών στην ασπιρίνη και την μπορτεζομίμη. Η πρωτεΐνη Bad αλληλεπιδρά με μία άλλη πρωτεΐνη μέλος της Bcl-2 οικογένειας, την Bax για την επιτέλεση της κυτταρικής απόπτωσης. Η Bax χρειάζεται να πολυμεριστεί και να εισέλθει στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη προκειμένου να επιτελέσει την αποπτωτική του δράση μέσω της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα. Αυτό συμβαίνει μετά από την ενεργοποίηση του Bax από τα μέλη της Bcl-2 οικογένειας που φέρουν μόνο τομείς BH3 (Bcl-2 Homology 3) μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται το Bad, το Bid και το Bik (321). Η μείωση της έκφρασης του Bad με την έκθεση των κυτταρικών σειρών HCT116 και CaCo2 στην μπορτεζομίμη μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα ανεπιθύμητο μοριακό γεγονός που να προάγει την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων αλλά αναστρέφεται στις δύο κυτταρικές σειρές από την ταυτόχρονη δράση της ασπιρίνης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την πειραματική αυτή μελέτη της ασπιρίνης και της μπορτεζομίμης στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές κολο-ορθικού καρκίνου HCT116, HT-29 και CaCo2 μπορούν να εξαχθούν τα εξής συμπεράσματα:

1. Ο συνδυασμός των δύο φαρμάκων αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και προάγει την απόπτωση των τριών κυτταρικών σειρών σε βαθμό μεγαλύτερο από ότι το κάθε φάρμακο ξεχωριστά.
2. Η αναστολή από την ασπιρίνη είναι ανεξάρτητη από την Cox-2 στα κύτταρα HCT116 γιατί αυτά δεν εκφράζουν το ένζυμο και στα κύτταρα HT-29 γιατί το ένζυμο αν και εκφράζεται φαίνεται να είναι ανενεργό. Ο ρόλος των ανεξάρτητων από την Cox-2 αντι-καρκινικών μηχανισμών της ασπιρίνης στα κύτταρα CaCo2 που εκφράζουν ενεργό ένζυμο είναι προς διερεύνηση.
3. Κοινοί μηχανισμοί της ανασταλτικής δράσης του συνδυασμού των δύο φαρμάκων στις τρεις κυτταρικές σειρές είναι η επαγωγή των αναστολέων των CDKs p21 και p27 και η μείωση της αντι-αποπτωτικής κινάσης akt.
4. Άλλοι μηχανισμοί δράσης του συνδυασμού ασπιρίνης και μπορτεζομίμης είναι ιδιαίτεροι σε κάθε κυτταρική σειρά και περιλαμβάνουν στις σειρές HCT116 και HT-29 την κατακράτηση του αντι-αποπτωτικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στο κυτταρόπλασμα όπου είναι μεταγραφικά ανενεργός και στις σειρές HCT116 και CaCo2 την αναστροφή της μειωμένης από την μπορτεζομίμη έκφρασης του προ-αποπτωτικού μέλους της οικογένειας του bcl-2, Bad .

Το σύνολο των περιγραφέντων πειραμάτων της παρούσας μελέτης υποστηρίζει την αποτελεσματικότητα του συνδυασμού των αναστολέων της Cox-2 και του πρωτεασώματος στον κολο-ορθικό καρκίνο και μπορεί να αποτελέσει τη βάση περαιτέρω ανάπτυξης του συνδυασμού στη νεοπλασία αυτή.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Οι θεραπείες στόχευσης, αποτέλεσμα της συνεχώς αυξανόμενης κατανόησης της διαδικασίας της καρκινογένεσης, εισέρχονται στην κλινική πράξη και χρησιμοποιούνται σήμερα είτε ως μονοθεραπείες είτε ως μέρος συνδυασμένης θεραπείας με κλασσικά χημειοθεραπευτικά. Η χρησιμοποίηση συνδυασμών στοχευμένων θεραπειών έχει αρχίσει επίσης να διερευνάται. Ένας τέτοιος συνδυασμός είναι αυτός των αναστολέων του πρωτεασώματος με τους αναστολείς της κυκλοοξυγενάσης-2 που αποτελεί το αντικείμενο της πειραματικής αυτής εργασίας.

Υλικά και μέθοδοι: Οι σειρές ανθρώπινου κολο-ορθικού καρκίνου HCT116, HT-29 και CaCo2 καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικό υλικό RPMI1640 με την παρουσία ή χωρίς της ασπιρίνης και της μπορτεζομίμης. Για τη μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμασίες MTT, αποκλεισμού του κυανού του τρυπανίου και κατακερματισμού του DNA. Η δραστηριότητα της Cox-2 και του πρωτεασώματος μετρήθηκαν με χρωματομετρική και φθοριομετρική μέθοδο αντίστοιχα. Η έκφραση διάφορων πρωτεϊνών σημαντικών για τη δράση των φαρμάκων προσδιορίστηκε με western blotting.

Αποτελέσματα: Ο συνδυασμός της ασπιρίνης και της μπορτεζομίμης αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και προάγει την απόπτωση των τριών κυτταρικών σειρών περισσότερο από ότι το κάθε φάρμακο ξεχωριστά. Η αναστολή των κυτταρικών σειρών από την ασπιρίνη είναι ανεξάρτητη από την Cox-2 στα κύτταρα HCT116 γιατί αυτά δεν εκφράζουν το ένζυμο και στα κύτταρα HT-29 γιατί το ένζυμο αν και εκφράζεται φαίνεται να είναι ανενεργό. Στα κύτταρα CaCo2 που εκφράζουν ένζυμικά ενεργή Cox-2 είναι πιθανό ότι τόσο Cox-2 –εξαρτώμενοι όσο και ανεξάρτητοι μηχανισμοί παίζουν ρόλο στη δράση του συνδυασμού ασπιρίνης και μπορτεζομίμης. Ο συνδυασμός των δύο φαρμάκων επάγει τους αναστολείς των CDKs p21 και p27 και καταστέλλει την κινάση akt στις τρεις κυτταρικές σειρές. Άλλα αποτελέσματα της δράσης του συνδυασμού ασπιρίνης και μπορτεζομίμης αφορούν στις κυτταρικές σειρές HCT116 και HT-29 την κατακράτηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ στο κυτταρόπλασμα, και στις σειρές HCT116 και CaCo2 την αναστροφή της μειωμένης από την μπορτεζομίμη έκφρασης του προ-αποπτωτικού μέλους της bcl-2 οικογένειας, Bad.

Συμπέρασμα: Η συνδυασμένη έκθεση κυττάρων κολο-ορθικού καρκίνου στους αναστολείς της Cox-2 και του πρωτεασώματος αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών, προάγει την απόπτωση και αποτελεί ένα ελπιδοφόρο θεραπευτικό συνδυασμό προς περαιτέρω ανάπτυξη.

Summary

Background: Cyclooxygenase-2 (Cox-2) is an important enzyme in colorectal carcinogenesis and Cox inhibitors such as aspirin (acetylsalicylic acid, ASA) have shown both Cox-2 dependent and independent anti-neoplastic activities in diverse models. The Ubiquitin-Proteasome system (UPS) is a multi-unit protease system that regulates the abundance and function of a growing number of cell proteins and its inhibition results in cancer cell growth inhibition and apoptosis and is already exploited in the clinic with the use of proteasome inhibitor bortezomib in multiple myeloma.

Materials and methods: Human colorectal cancer cells lines HCT116, HT-29 and CaCo2 growing in RPMI1640 medium in the presence or absence of ASA and bortezomib were used in the experiments. MTT assay, trypan blue exclusion and DNA fragmentation were the assays used for the measurement of cell proliferation and apoptosis after drug exposure. Cox and proteasome activity were measured with a colorimetric and a fluorimetric method respectively. The expression of proteins at base line and after drug exposure was determined by western blotting.

Results: Bortezomib together with aspirin inhibit the growth of colorectal cancer cell lines HCT116, HT-29 and CaCo2 more than each drug alone. In both HCT116 and HT-29 cell lines ASA inhibitory effects are Cox-2 independent because HCT116 cells do not express the enzyme while in HT-29 cells Cox-2 has no activity as shown by a Cox activity assay. In CaCo2 cells that express enzymatically active Cox-2 the extent of Cox-2-dependent and independent mechanisms in mediating anti-neoplastic activity of the drug combination remains to be determined. Cell cycle inhibitors p21 and p27 are induced in the three cell lines by bortezomib and the combination treatment. akt1 kinase is down-regulated in all three lines by the same treatments. Transcription factor NF- κ B is retained in the cytoplasm by drug treatment in cell lines HCT116 and HT-29, a fact that may play a role in their pro-apoptotic activity. Pro-apoptotic bcl-2 family member, bad is down-regulated in cell lines HCT116 and CaCo2 by bortezomib treatment, a neoplasia-promoting event that is reversed by combination treatment.

Conclusion: The combination of bortezomib and ASA co-operates to decrease proliferation and induce apoptosis in three human colorectal cell lines with different

genetic lesions. These effects are at least in some cases Cox-2 independent and involve common and diverse mechanisms in the three lines.

Key words: colorectal cancer, cyclooxygenase-2, proteasome, aspirin, bortezomib, cell lines, HT-29, HCT116, CaCo2

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Fodde R, Smits R, Clevers H.** APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nature Rev Cancer* 2001; 1: 55-67
2. **Fearon ER, Vogelstein B.** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67
3. **Hisamuddin IM, Yang VW.** Molecular genetics of colorectal cancer: An overview. *Cur Colorectal Cancer Rep.* 2006; 2: 53-9
4. **Lynch HT, de la Chapelle A.** Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2003 ; 348 : 919-32
5. **Loeb LA.** A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.* 2001; 61: 3230-9
6. **Kondo Y, Issa J-PJ.** Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2004; 23: 29-39
7. **Shen L, Issa J-PJ.** Epigenetics in colorectal cancer. *Curr Opin Gastroenterol.* 2002; 18: 68-73
8. **Ogino S, Cantor M, Kawasaki T, Brahmandam M, Kirkner GJ, Weisenberger DJ, Campan M, Laird PW, Loda M, Fuchs CS.** CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. *Gut* 2006; 55: 1000-6
9. **Liu CH, Chang S-H, Narko K, Trifan OC, Wu M-T, Smith E, Haudenschild C, Lane TF, Hla T.** Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem.* 2001; 276: 18563-9
10. **Sandler RS, Halabi S, Baron JA, Budinger S, Paskett E, Keresztes R, Petrelli N, Pipas JM, Karp DD, Loprinzi CL, Steinbach G, Schilsky R.** A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenoma in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348: 883-90
11. **Baron JA, Cole BF, Sandler RS, Haile RW, Ahnen D, Bresalier R, McKeown-Eyssen G, Summers RW, Rothstein R, Burke CA, Snover DC, Church TR, Allen JI, Beach M, Beck GJ, Bond JH, Byers T, Greenberg ER, Mandel JS, Marcon N, Mott LA, Pearson L, Saibil F, van Stolk RU.** A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med.* 2003; 348: 891-9

12. **Imperiale TF.** Aspirin and the prevention of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348: 879-80
13. **Clevers H.** Wnt breakers in colon cancer. *Cancer Cell* 2004; 5: 5-6
14. **Doble BW, Woodgett JR.** GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci.* 2003; 116: 1175-86
15. **Ilyas M.** Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development. *J Pathol.* 2005; 205: 130-44
16. **Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R.** Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 1997; 16: 3797-804
17. **Easwaran V, Song V, Polakis P, Byers S.** The ubiquitin-proteasome pathway and serine kinase activity modulate adenomatous polyposis coli protein-mediated regulation of β -catenin-lymphocyte enhancer-binding factor signalling. *J Biol Chem.* 1999; 274: 16641-5
18. **Taya S, Yamamoto T, Kanai-Azuma M, Wood SA, Kaibuchi K.** The deubiquitinating enzyme Fam interacts with and stabilizes beta-catenin. *Genes Cells* 1999; 4: 757-67
19. **Li H, Pamukcu R, Thompson WJ.** β -catenin signaling. Therapeutic strategies in oncology. *Cancer Biol Therapy* 2002; 1: 621-5
20. **Choi J, Park SY, Costantini F, Jho E-h, Joo C-K.** Adenomatous polyposis coli is down-regulated by the ubiquitin-proteasome pathway in a process facilitated by axin. *J Biol Chem.* 2004; 279: 49188-98
21. **Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A.** The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 5522-7
22. **Wong NACS, Pignatelli M.** β -catenin-A linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol.* 2002; 160: 389-401
23. **Howe LR, Subbaramaiah K, Chung WJ, Dannenberg AJ, Brown AMC.** Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in Wnt-1-transformed mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 1999; 59: 1572-7
24. **Levy L, Neuveut C, Renard CA, Charneau P, Branchereau S, Gauthier F, Van Nhieu JT, Cherqui D, Petit-Bertron AF, Mathieu D, Buendia MA.** Transcriptional activation of interleukin-8 by beta-catenin-Tcf4. *J Biol Chem.* 2002; 277: 42386-93

25. **Rockman SP, Currie SA, Ciavarella M, Vincan E, Dow C, Thomas RJS, Phillips WA.** Id2 is a target of the β -catenin/ T cell factor pathway in colon carcinoma. *J Biol Chem.* 2001; 276: 45113-9
26. **Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C.** Target genes of β -catenin/ T cell-factor/ lymphoid-enhancer-factor signalling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 1603-8
27. **Willert J, Epping M, Pollack JR, Brown PO, Nusse R.** A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC Dev Biol.* 2002; 2: 8
28. **Dihlmann S, Kloor M, Fallsehr C, von Knebel Doeberitz M.** Regulation of AKT1 expression by beta-catenin/Tcf/Lef signaling in colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1503-12
29. **He T-C, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW.** PPAR δ is an APC-regulated target of Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 1999; 99: 335-45
30. **Conacci-Sorrell ME, Ben-Yedidia T, Shtutman M, Feinstein E, Einat P, Ben-Ze'ev A.** Nr-CAM is a target gene of the β -catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis. *Genes Dev.* 2002; 16: 2058-72
31. **Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, Schneider A, Altevogt P, Brabletz T, Ben-Ze'ev A.** L1, a novel target of β -catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J Cell Biol.* 2005; 168: 633-42
32. **Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, van de Wetering M, Clevers H, Schlag PH, Birchmeier W, Behrens J.** Negative feedback loop of wnt signaling through upregulation of conductin/ axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol.* 2002; 22: 1184-93
33. **Boon EMJ, van der Neut R, van de Wetering M, Clevers H, Pals ST.** Wnt signaling regulates expression of the receptor tyrosine kinase Met in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2002; 62: 5126-8
34. **Battle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T, Clevers H.** β -catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ Ephrin B. *Cell.* 2002; 111: 251-63

35. **van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau N, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Batlle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H.** The β -catenin/ TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*. 2002; 111: 241-50
36. **Spiegelman VS, Slaga TJ, Pagano M, Minamoto T, Ronai Z, Fuchs SY.** Wnt/ β -catenin signalling induces the expression and activity of β TrCP ubiquitin ligase receptor. *Mol Cell* 2000; 5: 877-82
37. **Sansom OJ, Reed KR, van de Wetering M, Muncan V, Winton DJ, Clevers H, Clarke AR.** Cyclin D1 is not an immediate target of β -catenin following Apc loss in the intestine. *J Biol Chem*. 2005; 280: 28463-7
38. **Shtutman M, Zhurinsky J, Oren M, Levina E, Ben-Ze'ev A.** PML is a target gene of β -catenin and plakoglobin, and coactivates β -catenin-mediated transcription. *Cancer Res*. 2002; 62: 5947-54
39. **Steigerwald K, Behbehani GK, Combs KA, Barton MC, Groden J.** The APC tumor suppressor promotes transcription-independent apoptosis in vitro. *Mol Cancer Res*. 2005; 3: 78-89
40. **Kawasaki Y, Senda T, Ishidate T, Koyama R, Morishita T, Iwayama Y, Higuchi O, Akiyama T.** Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science* 2000; 289: 1194-7
41. **Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N.** The promise and perils of Wnt signalling through β -catenin. *Science* 2002; 296: 1644-6
42. **Murray NR, Davidson LA, Chapkin RS, Gustafson WC, Schattenberg DG, Fields AP.** Overexpression of protein kinase C β_{II} induces colonic hyperproliferation and increased sensitivity to colon carcinogenesis. *J Cell Biol*. 1999; 145: 699-711
43. **Benetti R, Copetti T, Dell'Orso S, Melloni E, Brancolini C, Monte M, Schneider C.** The calpain-system involved in the constitutive regulation of β -catenin signalling functions. *J Biol Chem*. 2005; 280: 22070-80
44. **Roura S, Miravet S, Piedra J, García de Herreros A, Duñach M.** Regulation of E-cadherin/catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 1999; 274: 36734-40

45. **Sadot E, Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Shnizer D, Lando Z, Zharhary D, Kam Z, Ben-Ze'ev A, Geiger B.** Regulation of S33/S37 phosphorylated β -catenin in normal and transformed cells. *J Cell Sci.* 2002; 115: 2771-80
46. **Deng J, Miller SA, Wang H-Y, Xia W, Wen Y, Zhou BP, Li Y, Lin S-Y, Hung M-C.** β -catenin interacts with and inhibits NF- κ B in human colon and breast cancer. *Cancer Cell* 2002; 2: 323-34
47. **Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR.** Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF- κ B activation. *Nature* 2000; 406: 86-90
48. **Ilyas M, Tomlinson IPM, Rowan A, Pignatelli M, Bodmer WF.** β -catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 10330-4
49. **Samowitz WS, Powers MD, Spirio LN, Nollet F, van Roy F, Slattery ML.** β -catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas. *Cancer Res.* 1999; 59: 1442-4
50. **Smit L, Baas A, Kuipers J, Korswagen H, van de Wetering M, Clevers H.** Wnt activates the Tak1/Nemo-like kinase pathway. *J Biol Chem.* 2004; 279: 17232-40
51. **Essers MAG, de Vries-Smits LMM, Barker N, Polderman PE, Burgering BMT, Korswagen HC.** Functional interaction between β -catenin and FOXO in oxidative stress signalling. *Science* 2005; 308: 1181-4
52. **Bowerman B.** Oxidative stress and cancer: A β -catenin convergence. *Science* 2005; 308: 1119-20
53. **Damalas A, Ben-Ze'ev A, Simcha I, Shtutman M, Martinez Leal JF, Zhurinsky J, Geiger B, Oren M.** Excess β -catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53. *EMBO J.* 1999; 18: 3054-63
54. **Damalas A, Kahan S, Shtutman M, Ben-Ze'ev A, Oren M.** Deregulated β -catenin induces a p53- and ARF-dependent growth arrest and cooperates with Ras in transformation. *EMBO J.* 2001; 20: 4912-22
55. **Andreyev HJN, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA, for the RASCAL Group.** Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90: 675-84
56. **Bos JL.** Ras oncogene in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989; 49: 4682-9

57. **Kerkhoff E, Rapp UR.** Cell cycle targets of Ras/Raf signalling. *Oncogene* 1998; 17(11 Reviews): 1457-62
58. **Fang JY, Richardson BC.** The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 2005; 6: 322-7
59. **Fujita T, Washio K, Takabatake D, Takahashi H, Yoshitomi S, Tsukuda K, Ishibe Y, Ogasawara Y, Doihara H, Shimizu N.** Proteasome inhibitors can alter the signaling pathways and attenuate the P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Int J Cancer* 2005; 117: 670-82
60. **Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franken TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC.** Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998; 282: 1318-21
61. **Aoki M, Jiang H, Vogt PK.** Proteasomal degradation of the FoxO1 transcriptional regulator in cells transformed by the P3k and Akt oncoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 13613-7
62. **Thomas GV.** mTOR and cancer: reason for dancing at the crossroads? *Cur Opin Genet Dev* 2006; 16: 78-84
63. **Cantley LC, Neel BG.** New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/ AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 4240-5
64. **Vivanco I, Sawyers CL.** The phosphatidylinositol 3-kinase-akt pathway in human cancer. *Nature Rev Cancer* 2002; 2: 489-501
65. **Cullen PJ, Lockyer PJ.** Integration of calcium and Ras signalling. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3: 339-48
66. **Attisano L, Wrana JL.** Signal transduction by the TGF- β superfamily. *Science* 2002; 296: 1646-7
67. **Wakefield LM, Roberts AB.** TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Cur Opin Genet Dev.* 2002; 12: 22-9
68. **Saha D, Datta PK, Beauchamp RD.** Oncogenic Ras represses Transforming Growth Factor- β signalling by degrading tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem.* 2001; 276: 29531-7
69. **Xu J, Attisano L.** Mutations in the tumor suppressors Smad2 and Smad4 inactivate transforming growth factor β signalling by targeting Smads to the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 4820-5

70. **Lo RS, Wotton D, Massagué J.** Epidermal growth factor signaling via Ras controls the Smad transcriptional co-repressor TGIF. *EMBO J.* 2001; 20: 128-6
71. **Iglesias M, Frontelo P, Gamallo C, Quintanilla M.** Blockade of Smad4 in transformed keratinocytes containing a Ras oncogene leads to hyperactivation of the Ras-dependent Erk signalling pathway associated with progression to undifferentiated carcinomas. *Oncogene* 2000; 19: 4134-45
72. **Elliott RL, Blobe GC.** Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 2078-93
73. **Schepers H, Wierenga ATJ, Eggen BJL, Vellenga E.** Oncogenic Ras blocks transforming growth factor- β -induced cell-cycle arrest by degradation of p27 through a MEK/Erk/SKP2-dependent pathway. *Exp Hematol.* 2005; 33: 747-57
74. **Tadlock L, Yamagiwa Y, Hawker J, Marienfeld C, Patel T.** Transforming growth factor- β inhibition of proteasomal activity: a potential mechanism of growth arrest. *Am J Cell Physiol.* 2003; 285: C277-85
75. **Furuhashi M, Yagi K, Yamamoto H, Furukawa Y, Shimada S, Nakamura Y, Kikuchi A, Miyazono K, Kato M.** Axin facilitates Smad3 activation in the transforming growth factor β signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 2001; 21: 5132-41
76. **Labbé E, Letamendia A, Attiasano L.** Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/ T cell-specific factor mediates cooperative signalling by the transforming growth factor-beta and wnt pathways. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 8358-63
77. **Takaku K, Oshima M, Miyoshi H, Matsui M, Seldin MF, Taketo MM.** Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both DPC4 (Smad4) and Apc genes. *Cell* 1998; 92:645-56
78. **Zavadil J, Bitzer M, Liang D, Yang Y-C, Massimi A, Kneitz S, Piek E, Böttlinger EP.** Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor- β . *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 6686-91
79. **Yang Y-C, Piek E, Zavadil J, Liang D, Xie D, Heyer J, Pavlidis P, Kucherlapati R, Roberts AB, Böttlinger EP.** Hierarchical model of gene regulation by transforming growth factor- β . *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 10269-74
80. **Blanchette F, Rivard N, Rudd P, Grondin F, Attiasano L, Dubois CM.** Cross talk between p42/p44 MAP Kinase and Smad pathways in transforming growth factor- β 1-induced furin gene transactivation. *J Biol Chem.* 2001; 276: 33986-94

81. **Miyaki M, Iijima T, Konishi M, Sakai K, Ishii A, Yasuno M, Hishima T, Koike M, Shitara N, Iwama T, Utsunomiya J, Kuroki T, Mori T.** Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* 1999; 18: 3098-103
82. **Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B.** Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1995; 55: 5548-50
83. **Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE, Rajput A, Thiagalingam S, Lutterbaugh JD, Neumann A, Brattain MG, Chang J, Kim SJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Willson JK.** Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res.* 1999; 59: 320-4
84. **Eppert K, Scherer SW, Ozelik H, Pirone R, Hoodless P, Kim H, Tsui LC, Bapat B, Gallinger S, Andrulis IL, Thomsen GH, Wrana JL, Attisano L.** MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 1996; 86: 543-52
85. **Yu J, Zhang L.** The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Com.* 2005; 331: 851-8
86. **Yu J, Zhang L, Hwang PM, Rago C, Kinzler KW, Vogelstein B.** Identification and classification of p53-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 14517-22
87. **Roperch J-P, Lethrone F, Prieur S, Piouffre L, Israeli D, Tulynder M, Nemani M, Pasturaud P, Gendron M-C, Dausset J, Oren M, Amson RB, Telerman A.** SIAH-1 promotes apoptosis and tumor suppression through a network involving the regulation of protein folding, unfolding, and trafficking: Identification of common effectors with p53 and p21^{Waf1}. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 8070-3
88. **Amson RB, Nemani M, Roperch JP, Israeli D, Bougueleret L, LeGall I, Medhioub M, Linares-Cruz G, Lethrosne F, Pasturaud P, Piouffre L, Prieur S, Susini L, Alvaro V, Millasseau P, Guidicelli C, Bui H, Massart C, Cazes L, Dufour F, Bruzzoni-Giovanelli H, Owadi H, Hennion C, Charpak G, Dausset J, Calvo F, Oren M, Cohen D, Telerman A.** Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in p53-induced apoptosis: activation of the vertebrate homologue of the drosophila seven in absentia gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 3953-7

89. **Chen D, Kon N, Li M, Zhang W, Qin J, Gu W.** ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* 2005; 121: 1071-83
90. **Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X.** Mule ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* 2005; 121: 1085-95
91. **Leng RP, Lin Y, Ma W, Wu H, Lemmers B, Chung S, Parant JM, Lozano G, Hakem R, Benchimol S.** Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell* 2003; 112: 779-91
92. **Dornan D, Wertz I, Shimizu H, Arnott D, Frantz GD, Dowd P, O'Rourke K, Koeppen H, Dixit VM.** The ubiquitin ligase COP is a critical negative regulator of p53. *Nature* 2004; 429: 86-92
93. **Shmueli A, Oren M.** Life, death, and ubiquitin: Taming the mule. *Cell* 2005; 121: 963-5
94. **Kohn KW, Pommier Y.** Molecular interaction map of the p53 and mdm2 logic elements, which control the off-on switch of p53 in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Com.* 2005; 331: 816-27
95. **Coutts AS, La Thangue NB.** The p53 response: Emerging levels of co-factor complexity. *Biochem Biophys Res Com.* 2005; 331: 778-85
96. **Liu J, Stevens J, Rote CA, Yost HJ, Hu Y, Neufeld KL, White RL, Matsunami N.** Siah-1 mediates a novel β -catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol Cell* 2001; 7: 927-36
97. **Nakayama K, Ronai Z.** Siah new players in the cellular response to hypoxia. *Cell Cycle* 2004; 3: 1345-7
98. **Iacopetta B.** TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat.* 2003; 21: 271-6
99. **Jänne PA, Mayer RJ.** Chemoprevention of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2000; 342: 1960-8
100. **Wolf DH, Hilt W, Sommer T.** Death gives birth to life: the essential role of the ubiquitin-proteasome system in biology. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1695: 1-2
101. **Hoeller D, Hecker C-M, Dikic I.** Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. *Nature Rev Cancer* 2006; 6: 776-88
102. **Miller J, Gordon C.** The regulation of proteasome degradation by multi-ubiquitin chain binding proteins. *FEBS Lett.* 2005; 579: 3224-30
103. **Mani A, Gelmann EP.** The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 4776-89

104. **Jiang J, Ballinger CA, Wu Y, Dai Q, Cyr DM, Hohfeld J, Patterson C.** CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem.* 2001; 276: 42938-44
105. **Pickart CM.** Back to the future with ubiquitin. *Cell* 2004; 116: 181-90
106. **Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ.** Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6: 599-609
107. **Cyr DM, Höhfeld J, Patterson C.** Protein quality control; U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold. *Trends Biochem Sci.* 2002; 27: 368-75
108. **Amerik AY, Hochstrasser M.** Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1695: 189-207
109. **Li M, Chen D, Shiloh A, Luo J, Nikolaev AY, Qin J, Gu W.** Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* 2002; 416: 648-53
110. **Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR 3rd, Koonin EV, Deshaies RJ.** Role of Rpn11 metalloprotease motif in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 2002; 298: 611-5
111. **Yao T, Cohen RE.** A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Nature* 2002; 419: 403-7
112. **Hanson PI, Whiteheart SW.** AAA+ proteins: have engine, will work. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6: 519-29
113. **DeMartino GN, Slaughter CA.** The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J Biol Chem.* 1999; 274; 22123-6
114. **Almond JB, Cohen GM.** The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2002; 16: 433-43
115. **Wolf DH, Hilt W.** The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1695: 19-31
116. **Kisselev AF, Callard A, Goldberg AL.** Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem.* 2006; 281: 8582-90
117. **Vial E, Marshall CJ.** Elevated ERK-MAP kinase activity protects the FOS family member FRA-1 against proteasomal degradation in colon carcinoma cells. *J Cell Science* 2003; 116: 4957-63
118. **Asher G, Tsvetkov P, Kahana C, Shaul Y.** A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. *Genes Dev.* 2005; 19: 316-21

119. **Zhu Z, Ramos J, Kampa K, Adimoolam S, Sirisawad M, Yu Z, Chen D, Naumovski L, Lopez CD.** Control of ASPP2^{53BP2L} protein levels by proteasomal degradation modulates p53 apoptotic function. *J Biol Chem.* 2005; 280: 34473-80
120. **Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A.** Plakoglobin and β -catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *J Cell Science* 2000; 113: 3127-39
121. **Alvarez-Castelao B, Castano JG.** Mechanism of direct degradation of I κ B α by 20S proteasome. *FEBS Lett.* 2005; 579: 4797-802
122. **Dupont S, Zacchigna L, Cordenonsi M, Soligo S, Adorno M, Rugge M, Piccolo S.** Germ-layer specification and control of cell growth by Ectoderm, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell* 2005; 121: 87-99
123. **Mori S, Keiji T, Omura S, Saito Y.** Degradation process of ligand-stimulated Platelet-derived growth factor β -receptor involves ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *J Biol Chem.* 1995; 270: 29447-52
124. **Li B, Dou QP.** Bax degradation by the ubiquitin/ proteasome-dependent pathway: Involvement in tumor survival and progression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 3850-5
125. **Zhu H, Zhang L, Dong F, Guo W, Wu S, Teraishi F, Davis JJ, Chiao PJ, Fang B.** Bik/NBK accumulation correlates with apoptosis-induction by bortezomib (PS-341, Velcade) and other proteasome inhibitors. *Oncogene* 2005; 24: 4993-9
126. **Nikrad M, Johnson T, Puthalalath H, Coultas L, Adams J, Kraft AS.** The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes cells to killing by death receptor ligand TRAIL via BH3-only proteins Bik and Bim. *Mol Cancer Ther.* 2005; 4: 443-9
127. **Tao G-Z, Rott LS, Lowe AW, Omary MB.** Hyposmotic stress induces cell growth arrest via proteasome activation and cyclin/ cyclin-dependent kinase degradation. *J Biol Chem.* 2002; 277: 19295-303
128. **Desai SD, Li T-K, Rodriguez-Bauman A, Rubin EH, Liu LF.** Ubiquitin/ 26S proteasome-mediated degradation of topoisomerase I as a resistance mechanism to camptothecin in tumor cells. *Cancer Res.* 2001; 61: 5926-32
129. **Ogiso Y, Tomida A, Lei S, Omura S, Tsuruo T.** Proteasome inhibition circumvents solid tumor resistance to topoisomerase II-directed drugs. *Cancer Res.* 2000; 60: 2429-34
130. **Liu Z, Lu H, Shi H, Du Y, Yu J, Gu S, Chen X, Liu KJ, Hu CA.** PUMA overexpression induces reactive oxygen species generation and proteasome-mediated stathmin degradation in colorectal cancer cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 1647-54

131. **Nakayama K, Frew IJ, Hagensen M, Skals M, Habelhah H, Bhoumik A, Kadoya T, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Frappell PB, Bowtell DD, Ronai Z.** Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1 α abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell* 2004; 117: 941-52
132. **Glickman MH, Raveh D.** Proteasome plasticity. *FEBS Lett.* 2005; 579: 3214-23
133. **Mikalsen T, Johannesen M, Moens U.** Sequence- and position-dependent tagging protects extracellular-regulated kinase 3 protein from 26S proteasome-mediated degradation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37: 2513-20
134. **Adachi M, Katsumura KR, Fujii K, Kobayashi S, Aoki H, Matsuzaki M.** Proteasome-dependent decrease in Akt by growth factors in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 2003; 554: 77-80
135. **Demontis S, Rigo C, Piccinin S, Mizzau M, Sonogo M, Fabris M, Brancolini C, Maestro R.** Twist is substrate for caspase cleavage and proteasome-mediated degradation. *Cell Death Differ.* 2006; 13: 335-45
136. **Hu G, Zhang S, Vidal M, La Baer J, Xu T, Fearon ER.** Mammalian homologs of seven in absentia regulate DCC via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 1997; 11: 2701-14
137. **Lee TH, Perrem K, Harper JW, Lu KP, Zhou XZ.** The F-box protein FBX4 targets PIN2/TRF1 for ubiquitin-mediated degradation and regulates telomere maintenance. *J Biol Chem.* 2006; 281: 759-68
138. **Bhanumathy CD, Nakao SK, Joseph SK.** Mechanism of proteasomal degradation of inositol trisphosphate receptors in CHO-K1 cells. *J Biol Chem.* 2006; 281: 3722-30
139. **Qin C, Burghardt R, Smith R, Wormke M, Stewart J, Safe S.** Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ agonists induce proteasome-dependent degradation of cyclin D1 and Estrogen Receptor α in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.* 2003; 63: 958-64
140. **Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y, Wrana JL.** Regulation of the polarity protein Par6 by TGF β receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* 2005; 307: 1603-9
141. **Chen ZJ.** Ubiquitin signalling in the NF- κ B pathway. *Nature Cell Biol.* 2005; 7: 758-65

142. **Fong A, Shao-Cong S.** Genetic evidence for the essential role of β -Transducin repeat-containing protein in the inducible processing of NF- κ B2/p100. *J Biol Chem.* 2002; 277: 22111-4
143. **Lang V, Janzen J, Zvi Fischer G, Soneji Y, Beinke S, Salmeron A, Allen H, Hay RT, Ben-Neriah Y, Ley SC.** β TrCP-mediated proteolysis of NF- κ B1 p105 requires phosphorylation of p105 serines 927 and 932. *Mol Cell Biol.* 2003; 23: 402-13
144. **Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZL.** TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001; 412: 346-51
145. **Ougolkov A, Zhang B, Yamashita K, Bilim V, Mai M, Fuchs SY, Minamoto T.** Associations among β -TrCP, an E3 ubiquitin ligase receptor, β -catenin, and NF- κ B in colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96: 1161-70
146. **Lind DS, Hochwald SN, Malaty J, Rekkas S, Hebig P, Mishra G, Moldawer LL, Copeland EM 3rd, Mackay S.** Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery* 2001; 130: 363-9
147. **Yu H-G, Yu L-L, Yang Y, Luo H-S, Yu J-P, Meier JJ, Schrader H, Bastian A, Schmidt WE, Schmitz F.** Increased expression of RelA/ Nuclear factor- κ B protein correlates with colorectal tumorigenesis. *Oncol.* 2003; 65: 37-45
148. **Shumway SD, Maki M, Miyamoto S.** The PEST domain of I κ B α is necessary and sufficient for in vitro degradation by μ -calpain. *J Biol Chem.* 1999; 274: 30874-81
149. **Reed JC.** Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol.* 2000; 157: 1415-30
150. **Voutsadakis IA.** Apoptosis and the pathogenesis of lymphoma. *Acta Oncol.* 2000; 39: 151-6
151. **Vaux DL, Silke J.** IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6: 287-97
152. **Ni T, Li W, Zou F.** The ubiquitin ligase ability of IAPs regulates apoptosis. *IUBMB Life* 2005; 57: 779-85
153. **Yang Y, Yu X.** Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. *FASEB J.* 2003; 17: 790-9
154. **Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Srinivasula SM, Alnemri ES, Fairman R, Shi Y.** Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell* 2003; 11: 519-27

155. **Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee R-A, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri ES.** A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 2001; 410: 112-16
156. **MacFarlane M, Merrison W, Bratton SB, Cohen GM.** Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J Biol Chem.* 2002; 277: 36611-6
157. **Vaux DL, Silke J.** HtrA2/Omi, a sheep in wolf's clothing. *Cell* 2003; 115: 251-3
158. **Tansey WP.** Death, destruction, and the proteasome. *N Engl J Med.* 2004; 351: 393-4
159. **Hegde R, Srinivasula SM, Datta P, Madesh M, Wassell R, Zhang ZJ, Cheong NE, Nejme J, Fernandes-Alnemri T, Hoshino S, Alnemri ES.** The polypeptide chain-releasing factor GSPT1/eRF3 is proteolytically processed into an IAP-binding protein. *J Biol Chem.* 2003; 278: 38699-706
160. **Sun X-M, Butterworth M, MacFarlane M, Dubiel W, Ciechanover A, Cohen GM.** Caspase activation inhibits proteasome function during apoptosis. *Mol Cell* 2004; 14: 81-93
161. **Adrain C, Creagh EM, Cullen SP, Martin SJ.** Caspase-dependent inactivation of proteasome function during programmed cell death in drosophila and man. *J Biol Chem.* 2004; 279: 36923-30
162. **Friedman J, Xue D.** To live or die by the sword: The regulation of apoptosis by the proteasome. *Dev Cell* 2004; 7: 460-1
163. **Silke J, Kratina T, Chu D, Ekert PG, Day CL, Pakusch M, Huang DCS, Vaux DL.** Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 16182-7
164. **Chen F, Chang D, Goh M, Klivanov SA, Ljungman M.** Role of p53 in cell cycle regulation and apoptosis following exposure to proteasome inhibitors. *Cell Growth Diff.* 2000; 11: 239-46
165. **Ravizza R, Gariboldi MB, Passarelli L, Monti E.** Role of the p53/p21 system in the response of human colon carcinoma cells to doxorubicin. *BMC Cancer* 2004; 4: 92
166. **Castro A, Vigneron S, Lorca T, Labbé J-C.** La mitose sous surveillance . *Med Sci.* 2003 ; 19 : 309-17

167. **Vodermaier HC.** APC/C and SCF: Controlling each other and the cell cycle. *Cur Biol.* 2004; 14: R787-96
168. **Kops GJPL, Weaver BAA, Cleveland DW.** On the road to cancer: Aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nature Rev Cancer* 2005; 5: 773-85
169. **Jackson PK.** Linking tumor suppression, DNA damage and the anaphase-promoting complex. *Trends Cell Biol.* 2004; 14: 331-4
170. **Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M.** Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nature Med.* 1997; 3: 231-4
171. **Thomas GV, Szigeti K, Murphy M, Draetta G, Pagano M, Loda M.** Down-regulation of p27 is associated with development of colorectal adenocarcinoma metastases. *Am J Pathol.* 1998; 153: 681-7
172. **Shapira M, Ben-Izhak O, Linn S, Futerman B, Minkov I, Hershko DD.** The prognostic impact of the ubiquitin ligase subunits Skp2 and Cks1 in colorectal carcinoma. *Cancer* 2005; 103: 1336-46
173. **Hershko DD, Shapira M.** Prognostic role of p27^{Kip1} deregulation in colorectal cancer. *Cancer* 2006; 107: 668-75
174. **Charalambous MP, Maihöfner C, Bhambra U, Lightfoot T, Gooderham NJ, and the Colorectal Cancer Study Group.** Upregulation of cyclooxygenase-2 is accompanied by increased expression of nuclear factor- κ B and I κ B kinase- α in human colorectal cancer epithelial cells. *Br J Cancer* 2003; 88: 1598-604
175. **Hochwald SN, Lind DS, Malaty J, Copeland EM 3rd, Moldawer LL, MacKay SL.** Antineoplastic therapy in colorectal cancer through proteasome inhibition. *Am Surg.* 2003; 69: 15-23
176. **Gupta RA, DuBois RN.** Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nature Rev Cancer* 2001; 1: 11-21
177. **Koki AT, Masferrer JL.** Celecoxib: A specific COX-2 inhibitor with anticancer properties. *Cancer Control* 2002; 9: 28-35
178. **McEntee MF, Cates JM, Neilsen N.** Cyclooxygenase-2 expression in spontaneous intestinal neoplasia of domestic dogs. *Vet Pathol.* 2001; 39: 428-36
179. **Araki Y, Okamura S, Perwez Hussain S, Nagashima M, He P, Shiseki M, Miura K, Harris CC.** Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and Ras pathways. *Cancer Res.* 2003; 63: 728-34

180. **Chun K-S, Surh Y-J.** Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68: 1089-100
181. **Brown JR, DuBois RN.** COX-2: A molecular target for colorectal cancer prevention. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 2840-55
182. **Castellone MD, Teramoto H, Gutkind JS.** Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer chemoprevention: the beta-catenin connection. *Cancer Res* 2006; 66: 11085-8
183. **Syeda F, Grosjean J, Houlston RA, Keogh RJ, Carter T, Paleolog E, Wheeler-Jones CPD.** Cyclooxygenase-2 induction and prostacyclin release by protease-activated receptors in endothelial cells requires co-operation between mitogen-activated protein kinase and NF- κ B pathways. *J Biol Chem.* 2006; 281: 11792-804
184. **Matsuura H, Sakaue M, Subbaramaiah K, Kamitani H, Eling TE, Dannenberg AJ, Tanabe T, Inoue H, Arata J, Jetten AM.** Regulation of Cyclooxygenase-2 by interferon γ and transforming growth factor α in normal human epidermal keratinocytes and squamous carcinoma cells. *J Biol Chem.* 1999; 274: 29138-48
185. **Yan Z, Subbaramaiah K, Camilli T, Zhang F, Tanabe T, McCaffrey TA, Dannenberg AJ, Weksler BB.** Benzo[α]pyrene induces the transcription of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2000; 275: 4949-55
186. **Duque J, Díaz-Muñoz MD, Fresno M, Iñiguez MA.** Up-regulation of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 β in colon carcinoma cells. *Cell Signalling* 2006; 18: 1262-9
187. **Yamaguchi K, Lantowski A, Dannenberg AJ, Subbaramaiah K.** Histone deacetylase inhibitors suppress the induction of c-Jun and its target genes including Cox-2. *J Biol Chem.* 2005; 280: 32569-77
188. **Howe LR, Crawford HC, Subbaramaiah K, Hassell JA, Dannenberg AJ, Brown AMC.** PEA3 is up-regulated in response to Wnt1 and activates the expression of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* 2001; 276: 20108-15
189. **Duque J, Fresno M, Iñiguez MA.** Expression and function of the Nuclear Factor of Activated T cells in colon carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2005; 280: 8686-93
190. **Meade EA, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM.** Peroxisome Proliferators enhance Cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem.* 1999; 274: 8328-34

191. **Lefebvre A-M, Chen I, Desreumaux P, Najib J, Fruchart JC, Geboes K, Briggs M, Heyman R, Auwerx J.** Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APC^{Min}/+ mice. *Nat Med.* 1998; 4: 1053-7
192. **Dixon DA, Balch GC, Kedersha N, Anderson P, Zimmerman GA, Beauchamp RD, Prescott SM.** Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the translational silencer TIA-1. *J Exp Med.* 2003; 198: 475-81
193. **Dixon DA, Kaplan CD, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM.** Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. *J Biol Chem.* 2000; 275: 11750-7
194. **Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL.** Prostaglandin endoperoxide H synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem.* 1996; 271: 33157-60
195. **Warner TD, Mitchell JA.** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibiting prostanoid efflux: As easy as ABC? *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 9108-10
196. **Cutler NS, Graves-Deal R, LaFleur BJ, Gao Z, Boman BM, Whitehead RH, Terry E, Morrow JD, Coffey RJ.** Stromal production of prostacyclin confers an antiapoptotic effect to colonic epithelial cells. *Cancer Res.* 2003; 63: 1748-51
197. **Ko SC, Chapple KS, Hawcroft G, Coletta PL, Markham AF, Hull MA.** Paracrine cyclooxygenase-2-mediated signalling by macrophages promotes tumorigenic progression of intestinal epithelial cells. *Oncogene* 2002; 21: 7175-86
198. **Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F.** Prostanoid receptors: Structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 1999; 79: 1193-226
199. **Narumiya S, FitzGerald GA.** Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest.* 2001; 108: 25-30
200. **Sheng H, Shao J, Washington MK, DuBois RN.** Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2001; 276: 18075-81
201. **Buchanan FG, Wang D, Bargiacchi F, DuBois RN.** Prostaglandin E2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 2003; 278: 35451-7
202. **Pai R, Soreghan B, Szabo I, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS.** Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: A novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med.* 2002; 8: 289-93
203. **Wang D, Wang H, Shi Q, Katkuri S, Walhi W, Desvergne B, Das SK, Dey SK, DuBois RN.** Prostaglandin E₂ promotes colorectal adenoma growth via

transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor δ . *Cancer Cell* 2004; 6: 285-95

204. **Harman FS, Nicol CJ, Marin HE, Ward JM, Gonzalez FJ, Peters JM.** Peroxisome proliferator-activated receptor- δ attenuates colon carcinogenesis. *Nat Med.* 2004; 10: 481-3

205. **Burdick AD, Kim DJ, Peraza MA, Gonzalez FJ, Peters JM.** The role of peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ in epithelial cell growth and differentiation. *Cell Signaling* 2006; 18: 9-20

206. **Castellone MD, Teramoto H, Williams BO, Druey KM, Gutkind JS.** Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signalling axis. *Science* 2005; 310: 1504-10

207. **Clevers H.** Colon cancer- Understanding how NSAIDs work. *N Engl J Med.* 2006; 354: 761-3

208. **Moran AE, Hunt DH, Javid SH, Redston M, Carothers AM, Bertagnoli MM.** Apc deficiency is associated with increased Egfr activity in the intestinal enterocytes and adenomas of C57BL/6J-Min/+ mice. *J Biol Chem.* 2004; 279: 43261-72

209. **Beyer M, Schultze JL.** Regulatory T cells in cancer. *Blood* 2006; 108: 804-11

210. **Sharma S, Yang SC, Zhu L, Reckamp K, Gardner B, Baratelli F, Huang M, Batra RK, Dubinett SM.** Tumor cyclooxygenase 2/prostaglandin E2 dependent promotion of FOXP3 expression and CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Res.* 2005; 65: 5211-20

211. **Watanabe K, Kawamori T, Nakatsugi S, Ohta T, Ohuchida S, Yamamoto H, Maruyama T, Kondo K, Ushikubi F, Narumiya S, Sugimura T, Wakabayashi K.** Role of the prostaglandin E receptor subtype EP₁ in colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 1999; 59: 5093-6

212. **Tran CP, Cook GA, Yeomans ND, Thim L, Giraud AS.** Trefoil peptide TFF2 (spasmolytic polypeptide) potently accelerates healing and reduces inflammation in a rat model of colitis. *Gut* 1999; 44: 636-42

213. **Rodrigues S, Nguyen Q-D, Faivre S, Bruyneel E, Thim L, Westley B, May F, Flatau G, Mareel M, Gespach C, Emami S.** Activation of cellular invasion by trefoil peptides and src is mediated by cyclooxygenase-2 and thromboxane A2 receptor-dependent signaling pathways. *FASEB J.* 2001; 15: 1517-28

214. **Backlund MG, Mann JR, Holla VR, Buchanan FG, Tai H-H, Musiek ES, Milne GL, Katkuri S, DuBois RN.** 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer. *J Biol Chem.* 2005; 280: 3217-23
215. **Yan M, Rerko RM, Platzer P, Dawson D, Willis J, Tong M, Lawrence E, Lutterbaugh J, Lu S, Willson JKV, Luo G, Hensold J, Tai H-H, Wilson K, Markowitz SD.** 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase, a COX-2 oncogene antagonist, is a TGF- β -induced suppressor of human gastrointestinal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 17468-73
216. **FitzGerald GA, Loll P.** COX in a crystal ball: current status and future promise of prostaglandin research. *J Clin Invest.* 2001; 107: 1335-7
217. **Takeda H, Sonoshita M, Oshima H, Sugihara K, Chulada PC, Langenbach R, Oshima M, Taketo MM.** Cooperation of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in intestinal polyposis. *Cancer Res.* 2003; 63: 4872-7
218. **Scorrano L, Penzo D, Petronilli V, Pagano F, Bernardi P.** Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem.* 2001; 276: 12035-40
219. **Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM.** Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 11280-5
220. **Brash AR.** Arachidonic acid as a bioactive molecule. *J Clin Invest.* 2001; 107: 1339-45
221. **Cao Y, Dave KB, Doan TP, Prescott SM.** Fatty acid CoA ligase 4 is up-regulated in colon adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2001; 61: 8429-34
222. **Sung YK, Hwang SY, Park MK, Bae HI, Kim WH, Kim J-C, Kim M.** Fatty acid-CoA ligase 4 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2003; 94: 421-4
223. **Jayadev S, Hayter HL, Andrieu N, Gamard CJ, Liu B, Balu R, Hayakawa M, Ito F, Hannun YA.** Phospholipase A2 is necessary for Tumor Necrosis Factor α -induced ceramide generation in L929 cells. *J Biol Chem.* 1997; 272: 17196-203
224. **Subbaramaiah K, Chung WJ, Dannenberg AJ.** Ceramide regulates the transcription of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* 1998; 273:32943-9
225. **Hirabayashi T, Murayama T, Shimizu T.** Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A₂. *Biol Pharm Bull.* 2004; 27: 1168-73

226. **Taketo MM, Sonoshita M.** Phospholipase A₂ and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1585: 72-6
227. **Takaku K, Sonoshita M, Sasaki N, Uozumi N, Doi Y, Shimizu T, Taketo MM.** Suppression of intestinal polyposis in Apc (delta 716) knockout mice by an additional mutation in the cytosolic phospholipase A(2) gene. *J Biol Chem.* 2000; 275: 34013-6
228. **Hong KH, Bonventre JC, O'Leary E, Bonventre JV, Lander ES.** Deletion of cytosolic phospholipase A₂ suppresses Apc^{Min} -induced tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 3935-9
229. **Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM.** Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2(Cox-2). *Cell* 1996; 87: 803-9
230. **Penzo D, Petronilli V, Angelin A, Cusan C, Colonna R, Scorrano L, Pagano F, Prato M, Di Lisa F, Bernardi P.** Arachidonic acid released by phospholipase A₂ activation triggers Ca²⁺ -dependent apoptosis through the mitochondrial pathway. *J Biol Chem.* 2004; 279: 25219-25
231. **Dong M, Johnson M, Rezaie A, Ilsley JN, Nakanishi M, Sanders MM, Forouhar F, Levine J, Montrose DC, Giardina C, Rosenberg DW.** Cytoplasmic phospholipase A2 levels correlate with apoptosis in human colon tumorigenesis. *Clin Cancer Res.* 2005; 15: 2265-71
232. **Brash AR.** Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem.* 1999; 274: 23679-82
233. **Shurequi I, Lippman SM.** Lipoxygenase modulation to reverse carcinogenesis. *Cancer Res.* 2001; 61: 6307-12
234. **Ikawa H, Kamitani H, Calvo BF, Foley JF, Eling TE.** Expression of 15-lipoxygenase-1 in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1999; 59: 360-6
235. **Shureiqi I, Chen D, Lee JJ, Yang P, Newman RA, Brenner DE, Lotan R, Fischer SM, Lippman SM.** 15-LOX-1: a novel molecular target of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92: 1136-42
236. **Shureiqi I, Chen D, Lotan R, Yang P, Newman RA, Fischer SM, Lippman SM.** 15-Lipoxygenase-1 mediates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced

apoptosis independently of cyclooxygenase-2 in colon cancer cells. *Cancer Res.* 2000; 60: 6846-50

237. **Shureiqi I, Wojno KJ, Poore JA, Reddy RG, Moussalli MJ, Spindler SA, Greenson JK, Normolle D, Hasan AAK, Lawrence TS, Brenner DE.** Decreased 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid levels and 15-lipoxygenase-1 expression in human colon cancers. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1985-95

238. **Ghosh J, Myers CE.** Arachidonic acid stimulates prostate cancer cell growth: Critical role of 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Acta* 1997; 235: 418-23

239. **Ghosh J, Myers CE.** Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proc Natl Cancer Inst.* 1998; 95: 13182-7

240. **Charlier C, Michaux C.** Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as anew strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur J Med Chem.* 2003; 38: 645-59

241. **Thun MJ, Henley SJ, Patrono C.** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: Mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94: 252-66

242. **Ulrich CM, Bigler J, Potter JD.** Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. *Nature Rev Cancer* 2006; 6: 130-40

243. **Grösch S, Tegeder I, Niederberger E, Bräutigam L, Geisslinger G.** COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J.* 2001; 15: 2742-4

244. **Yu H-G, Huang J-A, Yang Y-N, Huang H, Luo H-S, Yu J-P, Meier JJ, Schrader H, Bastian A, Schmidt WE, Schmitz F.** The effects of acetylsalicylic acid on proliferation, apoptosis, and invasion of cyclooxygenase-2 negative colon cancer cells. *Eur J Clin Invest.* 2002; 32: 838-46

245. **Smith M-L, Hawcroft G, Hull MA.** The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells: evidence of different mechanisms of action. *Eur J Cancer* 2000; 36: 664-74

246. **Yin H, Xu H, Zhao Y, Yang W, Cheng J, Zhou Y.** Cyclooxygenase-independent effects of aspirin on HT-29 human colon cancer cells, revealed by oligonucleotide microarrays. *Biotechnol Lett.* 2006; 28: 1263-70

247. **Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB.** The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* 1998; 396: 77-80
248. **Seiler N, Raul F.** Polyamines and apoptosis. *J Cell Mol Med.* 2005; 9: 623-42
249. **Patel AR, Wang JY.** Polyamines modulate transcription but not posttranscription of c-myc and c-jun in IEC-6 cells. *Am J Physiol (Cell Physiol).* 1997; 273: C1020-9
250. **D'Agostino L, Di Luccia A.** Polyamines interact with DNA as molecular aggregates. *Eur J Biochem.* 2002; 269: 4317-25
251. **Ray RM, McCormack SA, Johnson LR.** Polyamine depletion arrests growth of IEC-6 and Caco-2 cells by different mechanisms. *Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol).* 2001; 281: G37-G43
252. **Patel AR, Wang J-Y.** Polyamine depletion is associated with an increase in JunD/AP-1 activity in small intestinal crypt cells. *Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol).* 1999; 276: G441-50
253. **Babbar N, Ignatenko NA, Casero Jr RA, Gerner EW.** Cyclooxygenase-independent induction of apoptosis by sulindac sulfone is mediated by polyamines in colon cancer. *J Biol Chem.* 2003; 278: 47762-75
254. **Turchanowa L, Dauletbaev N, Milovic V, Stein J.** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs stimulate spermidine/spermine acetyltransferase and deplete polyamine content in colon cancer cells. *Eur J Clin Invest.* 2001; 31: 887-93
255. **Martinez ME, O'Brien TG, Fultz KE, Babbar N, Yerushalmi H, Qu N, Guo Y, Boorman D, Einspahr J, Alberts DS, Gerner EW.** Pronounced reduction in adenoma recurrence associated with aspirin use and a polymorphism in the ornithine decarboxylase gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 7859-64
256. **Ignatenko NA, Babbar N, Mehta D, Casero Jr RA, Gerner EW.** Suppression of polyamine catabolism by activated K-ras in human colon cancer cells. *Mol Carcinogenesis* 2004; 39: 91-102
257. **Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA.** Peroxisome Proliferator-activated receptors α and γ are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem.* 1997; 272: 3406-10
258. **Tsujie M, Nakamori S, Okami J, Hayashi N, Hiraoka N, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Monden M.** Thiazolidinediones inhibit growth of gastrointestinal, biliary, and pancreatic adenocarcinoma cells through activation of the

peroxisome proliferator-activated receptor γ /retinoid X receptor α pathway. *Experimental Cell Res.* 2003; 289: 143-51

259. **Panigrahy D, Huang S, Kieran MW, Kaipainen A.** PPAR γ as a therapeutic target for tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer Biol Therapy* 2005; 4: 687-93

260. **Yu H-G, Huang J-A, Yang Y-N, Luo H-S, Yu J-P, Meier JJ, Schrader H, Bastian A, Schmidt WE, Schmitz F.** Inhibition of cytosolic phospholipase A₂ mRNA expression: a novel mechanism for acetylsalicylic acid-mediated growth inhibition and apoptosis in colon cancer cells. *Reg Peptides* 2003; 114: 101-7

261. **Baek SJ, Kim K-S, Nixon JB, Wilson LC, Eling TE.** Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF- β superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities. *Mol Pharmacol.* 2001; 59: 901-8

262. **Hardwick JCH, van Santen M, van den Brink GR, van Deventer SJH, Peppelenbosch MP.** DNA array analysis of the effects of aspirin on colon cancer cells: involvement of Rac1. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1293-8

263. **Li PX, Wong J, Ayed A, Ngo D, Brade AM, Arrowsmith C, Austin RC, Klamut HJ.** Placental TGF- β is a downstream mediator of the growth arrest and apoptotic response of tumor cells to DNA damage and p53 overexpression. *J Biol Chem.* 2000; 275: 20127-35

264. **Tan M, Wang Y, Guan K, Sun Y.** PTGF-beta, a type beta transforming growth factor (TGF-beta) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumor cell growth via TGF-beta signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 109-14

265. **Rice PL, Washington M, Schleman S, Beard KS, Driggers LJ, Ahnen DJ.** Sulindac sulphate inhibits epidermal growth factor-induced phosphorylation of extracellular-regulated kinase 1/2 and Bad in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 2003; 63: 616-20

266. **Rice PL, Goldberg RJ, Ray EC, Driggers LJ, Ahnen DJ.** Inhibition of extracellular signal-regulated kinase1/2 phosphorylation and induction of apoptosis by sulindac metabolites. *Cancer Res.* 2001; 61: 1541-7

267. **Rice PL, Kelloff J, Sullivan H, Driggers LJ, Beard KS, Kuwada S, Piazza G, Ahnen DJ.** Sulindac metabolites induce caspase- and proteasome-dependent degradation of β -catenin protein in human colon cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2003; 2: 885-92

268. **McEntee MF, Chiu C-H, Whelan J.** Relationship of β -catenin and bcl-2 expression to sulindac-induced regression of intestinal tumors in Min mice. *Carcinogenesis* 1999; 20: 635-40
269. **Dihlmann S, Klein S, von Knebel Doeberitz M.** Reduction of β -catenin/T-cell transcription factor signaling by aspirin and indomethacin is caused by an increased stabilization of phosphorylated β -catenin. *Mol Cancer Ther.* 2003; 2: 509-16
270. **Reid G, Wielinga P, Zelcer N, van der Heijden I, Kuil A, de Haas M, Wijnholds J, Borst P.** The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 9244-9
271. **Goel A, Chang DK, Ricciardiello L, Gasche C, Boland CR.** A novel mechanism for aspirin-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 383-90
272. **Seno H, Oshima M, Ishikawa T, Oshima H, Takaku K, Chiba T, Narumiya S, Taketo MM.** Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E₂ receptor EP₂-dependent angiogenesis in Apc ^{Δ 716} mouse intestinal polyps. *Cancer Res.* 2002; 62: 506-11
273. **Yu H-G, Li J-Y, Yang Y-N, Luo H-S, Yu J-P, Meier JJ, Schrader H, Bastian A, Schmidt WE, Schmitz F.** Increased abundance of cyclooxygenase-2 correlates with vascular endothelial growth factor-A abundance and tumor angiogenesis in gastric cancer. *Cancer Lett.* 2003; 195: 43-51
274. **Jones MK, Szabó IL, Kawanaka H, Husain SS, Tarnawski AS.** Von Hippel Lindau tumor suppressor and HIF-1 α : new targets of NSAIDs inhibition of hypoxia-induced angiogenesis *FASEB J.* 2002 ; 16 : 264-6
275. **Wang HM, Zhang GY.** Indomethacin suppresses growth of colon cancer via inhibition of angiogenesis in vivo. *World J Gastroenterol.* 2005; 11: 340-3
276. **Abdelrahim M, Safe S.** Cyclooxygenase-2 inhibitors decrease vascular endothelial growth factor expression in colon cancer cells by enhanced degradation of Sp1 and Sp4 proteins. *Mol Pharmacol.* 2005; 68: 317-29
277. **Safe S, Abdelrahim M.** Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2438-48

278. **Levine L.** Proteasome inhibitors: Their effects on arachidonic acid release from cells in culture and arachidonic acid metabolism in rat liver cells. *BMC Pharmacol.* 2004; 4: 15
279. **Levine L.** Proteolysis negatively regulates agonist-stimulated arachidonic acid metabolism. *Cell Signaling* 1998; 10: 653-9
280. **Rockwell P, Yuan H, Magnusson R.** Proteasome inhibition in neuronal cells induces a proinflammatory response manifested by upregulation of cyclooxygenase-2, its accumulation as ubiquitin conjugates, and production of the prostaglandin PGE. *Arch Biochem Biophys* 2000; 374: 325-33
281. **Chen J-J, Huang W-C, Chen C-C.** Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 in response to proteasome inhibitors involves reactive oxygen species-mediated signaling pathway and recruitment of CCAAT/Enhancer-binding protein δ and CREB-binding protein. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 5579-91
282. **Woo KJ, Park J-W, Kwon TK.** Proteasome inhibitor-induced cyclooxygenase-2 expression in Raw264.7 cells is potentiated by inhibition of c-Jun N-terminal kinase activation. *Biochem Biophys Res Com.* 2006; 342: 1334-40
283. **Mackay H, Hedley D, Major P, Townsley C, Mackenzie M, Vincent M, Degendorfer P, Tsao MS, Nicklee T, Birle D, Wright J, Siu L, Moore M, Oza A.** A phase II trial with pharmacodynamic endpoints of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 5526-33
284. **Erdman SH, Ignatenko NA, Powell MB, Blohm-Mangone K, Holubec H, Guillén-Rodríguez JM, Gerner EW.** APC-dependent changes in expression of genes influencing polyamine metabolism, and consequences for gastrointestinal carcinogenesis, in the Min mouse. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1709-13
285. **Nemoto T, Kubota S, Ishida H, Murata N, Hashimoto D.** Ornithine decarboxylase, mitogen-activated protein kinase and matrix metalloproteinase-2 expressions in human colon tumors. *World J Gastroenterol.* 2005; 11: 3065-9
286. **Babbar N, Gerner EW.** Polyamines as modifiers of genetic risk factors in human intestinal cancers. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31: 388-92
287. **Milovic V, Turchanowa L.** Polyamines and colon cancer. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31: 381-3
288. **Reddy BS, Rao CV.** Chemoprophylaxis of colon cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2006; 2: 13-19

289. **Li H, Schut HA, Conran P, Kramer PM, Lubet RA, Steele VE, Hawk EE, Kelloff GJ, Pereira MA.** Prevention by aspirin and its combination with alpha-difluoromethylornithine of azoxymethane-induced tumors, aberrant crypt foci and prostaglandin E2 levels in rat colon. *Carcinogenesis* 1999; 20: 425-30
290. **Reddy BS, Patlolla JM, Simi B, Wang SH, Rao CV.** Prevention of colon cancer by low doses of celecoxib, a cyclooxygenase inhibitor, administered in diet rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Cancer Res.* 2005; 65: 8022-7
291. **Ashktorab H, Dawkins FW, Mohamed R, Larbi D, Smoot DT.** Apoptosis induced by aspirin and 5-fluorouracil in human colonic adenocarcinoma cells. *Dig Dis Sci.* 2005; 50: 1025-32
292. **Cusack Jr. JC, Liu R, Houston M, Abendroth K, Elliott PJ, Adams J, Baldwin Jr AS.** Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: Implications for systemic nuclear factor- κ B inhibition. *Cancer Res.* 2001; 61: 3535-40
293. **Fujita T, Doihara H, Washio K, Kawasaki K, Takabatake D, Takahashi H, Tsukuda K, Ogasawara Y, Shimizu N.** Proteasome inhibitor bortezomib increases PTEN expression and enhances trastuzumab-induced growth inhibition in trastuzumab-resistant cells. *Anti-cancer Drugs* 2006; 17: 455-62
294. **Papandreou CN, Daliani DD, Nix D, Yang H, Madden T, Wang X, Pien CS, Millikan RE, Tu S-M, Pagliaro L, Kim J, Adams J, Elliott P, Esseltine D, Petrusich A, Dieringer P, Perez C, Logothetis CJ.** Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with advanced solid tumors with observations in androgen-independent prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2004; 22: 2108-21
295. **Aghajanian C, Dizon DS, Sabbatini P, Raizer JJ, Dupont J, Spriggs DR.** Phase I trial of bortezomib and carboplatin in recurrent ovarian or primary peritoneal cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 5943-9
296. **Aghajanian C, Soignet S, Dizon DS, Pien CS, Adams J, Elliott PJ, Sabbatini P, Miller V, Hensley ML, Pezzulli S, Canales C, Daud A, Spriggs DR.** A phase I trial of the novel proteasome inhibitor PS341 in advanced solid tumor malignancies. *Clin Cancer Res.* 2002; 8: 2505-11
297. **Dy GK, Thomas JP, Wilding G, Bruzek L, Mandrekar S, Erlichman C, Alberti D, Binger K, Pitot HC, Alberts SR, Hanson LJ, Marnocha R, Tutsch K, Kaufmann SH, Adjei AA.** A phase I and pharmacologic trial of two schedules of the

proteasome inhibitor, PS-341 (Bortezomib, Velcade), in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 3410-6

298. **Choi HJ, Kim HH, Lee HS, Huh GY, Seo SY, Jeong JH, Kim J-M, Yoo YH.** Lactacystin augments the sulindac-induced apoptosis in HT-29 cells. *Apoptosis* 2003; 8: 301-5

299. **Minami T, Adachi M, Kawamura R, Zhang Y, Shinomura Y, Imai K.** Sulindac enhances the proteasome inhibitor bortezomib-mediated oxidative stress and anticancer activity. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 5248-56

300. **Voutsadakis I, Patrikidou A, Tsapakidis K, Stathakis NE, Papandreou CN.** Combined treatment of colorectal cancer cell lines with aspirin and bortezomib. *J Clin Oncol.* 2007; 25(June 20 suppl): abstract 14562

301. **Drexler HCA.** Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 855-60

302. **Leonard JP, Furman RR, Coleman M.** Proteasome inhibition with bortezomib: A new therapeutic strategy for non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 2006; 119: 971-9

303. **David E, Sun S-Y, Waller EK, Chen J, Khuri FR, Lonial S.** The combination of the farnesyl transferase inhibitor lonafarnib and the proteasome inhibitor bortezomib induces synergistic apoptosis in human myeloma cells that is associated with down-regulation of p-AKT. *Blood* 2005; 106: 4322-9

304. **Inoue T, Shiraki K, Fuke H, Yamanaka Y, Miyashita K, Yamaguchi Y, Yamamoto N, Ito K, Sugimoto K, Nakano T.** Proteasome inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL by suppressing caspase inhibitors and AKT pathway. *Anti-Cancer Drugs* 2006; 17: 261-8

305. **Undas A, Brummel-Ziedins KE, Mann KG.** Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet action. *Blood* 2007; 109: 2285-92

306. **Solomon SD, McMurray JJV, Pfeffer MA, Wittes J, Fowler R, Finn P, Anderson WF, Zuber A, Hawk E, Bertagnolli M, for the Adenoma Prevention with Celecoxib (APC) Study Investigators.** Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *N Engl J Med.* 2005; 352: 1071-80

307. **Solomon SD, Pfeffer MA, McMurray JJV, Fowler R, Finn P, Levin B, Eagle C, Hawk E, Lechuga M, Zuber AG, Bertagnolli MM, Arber N, Wittes J,**

- for the APC and PreSAP Trial Investigators.** Effect of celecoxib on cardiovascular events and blood pressure in two trials for the prevention of colorectal adenomas. *Hypertension* 2006; 114: 1028-35
308. **Sooriakumaran P.** COX-2 inhibitors and the heart: are all coxibs the same? *Postgrad Med J.* 2006; 82: 242-5
309. **Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC.** Bortezomib (PS-341): A novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer Control* 2003; 10: 361-9
310. **O'Connor OA.** Proteasome inhibitors. Στο: *Chabner BA, Longo DL, eds. Cancer Chemotherapy and Biotherapy. Lippincott Williams & Wilkins, 2006, σελ. 621-40*
311. **Yu JL, May L, Lhotak V, Shahrzad S, Shirasawa S, Weitz JI, Coomber BL, Mackman N, Rak JW.** Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood* 2005; 105: 1734-41
312. **Hata T, Yamamoto H, Ngan CY, Koi M, Takagi A, Damdinsuren B, Yasui M, Fujie Y, Matsuzaki T, Hemmi H, Xu X, Kitani K, Seki Y, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M.** Role of p21^{waf1/cip1} in effects of oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2005; 4: 1585-94
313. **Hsi LC, Baek SJ, Eling TE.** Lack of cyclooxygenase-2 activity in HT-29 human colorectal carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 2000; 256: 563-570
314. **Lev-Ari S, Strier L, Kazanov D, Madar-Shapiro L, Dvory-Sobol H, Pinchuk I, Marian B, Lichtenberg D, Arber N.** Celecoxib and curcumin synergistically inhibit the growth of colorectal cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 6738-6744
315. **Blake C, Tsao J-L, Wu A, Shibata D.** Stepwise deletions of polyA sequences in mismatch repair-deficient colorectal cancers. *Am J Pathol.* 2001; 158: 1867-70
316. **Meyers M, Hwang A, Wagner MW, Boothman DA.** Role of DNA mismatch repair in apoptotic responses to therapeutic agents. *Environ Mol Mutagen.* 2004; 44: 249-64
317. **Voutsadakis IA.** Pathogenesis of colorectal carcinoma and therapeutic implications: The roles of the ubiquitin-proteasome system and Cox-2. *J Cell Mol Med.* 2007; 11: 252-85

- 318. Crew TE, Elder DJE, Paraskeva C.** A cyclooxygenase-2 (COX-2) selective non-steroidal anti-inflammatory drug enhances the growth inhibitory effect of butyrate in colorectal carcinoma cells expressing COX-2 protein: regulation of COX-2 by butyrate. *Carcinogenesis* 2000; 21: 69-77
- 319. Cheung NC, Choy MS, Halliwell B, Teo TS, Bay BH, Lee AY-W, Qi RZ, Koh VH, Whiteman M, Koay ES-C, Chiu LL, Zhu H-J, Wong KP, Beart PM, Cheng H-C.** Lactacystin-induced apoptosis of cultured mouse cortical neurons is associated with accumulation of PTEN in the detergent-resistant membrane fraction. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61: 1926-34
- 320. Dikshit P, Chatterjee M, Goswami A, Mishra A, Jana NR.** Aspirin induces apoptosis through the inhibition of proteasome function. *J Biol Chem.* 2006; 281: 29228-35
- 321. Scorrano L, Korsmeyer SJ.** Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Research Commun.* 2003; 304: 437-44