



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ

**Νέοι Δείκτες Αυτοφαγίας
Στον Καρκίνο Του Παχέος Εντέρου**

**Novel Autophagy Markers
in Colorectal Cancer**

ΑΝΑΓΙΩΤΟΣ ΚΥΡΙΑΚΟΣ

**ΛΑΡΙΣΑ
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2016**



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ

**Νέοι Δείκτες Αυτοφαγίας
Στον Καρκίνο Του Παχέος Εντέρου**

**Novel Autophagy Markers
in Colorectal Cancer**

ΑΝΑΓΙΩΤΟΣ ΚΥΡΙΑΚΟΣ

**ΛΑΡΙΣΑ
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2016**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ

**Νέοι Δείκτες Αυτοφαγίας
Στον Καρκίνο Του Παχέος Εντέρου**

**Novel Autophagy Markers
in Colorectal Cancer**

ΑΝΑΓΙΩΤΟΣ ΚΥΡΙΑΚΟΣ

A.M.:1811824

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ:

- **ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΕΡΕΥΝΩΝ, ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΠΙΝΤΖΑΣ**
- **ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΑΝΝΑ ΜΑΡΙΑ ΨΑΡΡΑ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Α. Πίντζας

2. Α. Μ. Ψαρρά

3. Α. Ζίφα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ

Εισαγωγή

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι διερεύνηση έκφρασης σε επίπεδο mRNA των αυτοφαγικών γονιδίων Beclin-1 & LC3 καθώς και του προ-αποπτωτικού γονιδίου Noxa σε 108 ζεύγη ιστών παχέος εντέρου (καρκινικός/φυσιολογικός) με real time PCR.

Δείγματα και μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκαν 108 κλινικά δείγματα ιστού από ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και 108 κλινικά δείγματα από φυσιολογικό ιστό ασθενών κατόπιν αφαίρεσης μέρους του παχέος εντέρου εκατέρωθεν του νεοπλάσματος. Τα δείγματα προσφέρθηκαν από το Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Γεώργιος Γεννηματάς” και οι ασθενείς ενημερώθηκαν. Από τα δείγματα αυτά απομονώθηκε RNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη έκφρασης των επιπέδων Noxa, Beclin-1 και LC3.

Στατιστική αξιολόγηση της σημασίας τους ως δείκτες και της σχέσης με την παρουσία μετάλλαξης του KRAS, την διήθηση σε λεμφαδένες και το στάδιο του καρκίνου (MedCalc Software, Ostend, Belgium)

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων στα πειράματα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα MedCalc Software, Ostend, Belgium και οι διαφορές αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας t-test, Mann Whitney test και Wilcoxon test. Χρησιμοποιήσαμε επίσης και την ανάλυση ROC για να αξιολογήσουμε αν μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το κάθε γονίδιο μεμονωμένα ή συνδυαστικά ως διαφοροδιαγνωστικό δείκτη. Τιμές με p-value<0.05 χαρακτηρίστηκαν στατιστικά σημαντικές

Αποτελέσματα

Από την στατιστική ανάλυση προέκυψε στατιστικά σημαντική πτώση των επιπέδων έκφραση του mRNA του Beclin-1 στα καρκινικά σε σύγκριση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά τους, ανεξάρτητα από την παρουσία K-Ras μετάλλαξης.

Στη συνέχεια ανάλυση καμπύλης ROC μας έδειξε ότι το Beclin-1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαφοροδιαγνωστικός δείκτης.

Από την στατιστική ανάλυση προέκυψε στατιστικά σημαντική πτώση των επιπέδων έκφραση του mRNA του LC3 στα καρκινικά σε σύγκριση με τα

αντίστοιχα φυσιολογικά τους, ανεξάρτητα από την παρουσία K-Ras μετάλλαξης.
Στη συνέχεια ανάλυση καμπύλης ROC μας έδειξε ότι το LC3 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαφοροδιαγνωστικός δείκτης.

Από την στατιστική ανάλυση προέκυψε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφραση του mRNA του NOXA στα καρκινικά σε σύγκριση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά τους, ανεξάρτητα από την παρουσία K-Ras μετάλλαξης.
Στη συνέχεια ανάλυση καμπύλης ROC μας έδειξε ότι το NOXA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαφοροδιαγνωστικός δείκτης.
Επίσης στο mRNA του NOXA βλέπουμε μια υπερέκφραση όταν ο καρκίνος είναι στο στάδιο III/IV σε σύγκριση με το στάδιο I/II.

Τέλος ένας συνδυασμός των τριών γονιδίων με ανάλυση καμπύλης ROC μας έδωσε ότι ο συνδυασμός έκφρασης του Beclin-1 και LC3 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαφοροδιαγνωστικός δείκτης.

Συμπεράσματα

Υπάρχει μια σημαντική υποέκφραση των επιπέδων mRNA των Beclin-1 και LC3 σε Κ.Π.Ε. ανεξάρτητα από την παρουσία K-Ras mutant.
Αντίθετα τα επίπεδα mRNA του NOXA υπερεκφράζονται σημαντικά σε Κ.Π.Ε. ειδικά στο στάδιο III/IV των όγκων, ανεξάρτητα από την παρουσία μεταλλάξεων του K-Ras.

Με ανάλυση καμπύλης ROC βλέπουμε ότι η έκφραση του κάθε γονιδίου ξεχωριστά καθώς και η έκφραση του Beclin-1 και LC3 συνδυαστικά έχει διαφοροδιαγνωστική αξία.

ABSTRACT

The aim of our study was to investigate the mRNA expression levels of *Beclin-1*, *Lc3* and *Noxa* genes in 108 colorectal cancer tissues and their corresponding normal mucosa.

Fresh frozen colorectal tissue was obtained from patients undergoing surgery for colorectal cancer at G.Gennimatas General Hospital of Athens. The tissue was removed by the surgeon from the primary tumour near the colonic wall to avoid necrotic areas. Normal mucosa, taken from the histologically negative margins of the tumour, was also obtained from each patient. All patients were informed about the study and gave their consent.

Total RNA was extracted from each specimen and was used to determine the mRNA expression levels of the investigated genes. Differences in the mRNA expression profile of the studied genes between colorectal cancer tissue and normal tissue specimens were evaluated with the non-parametric Wilcoxon Signed Ranks test. Colorectal cancer tissues were classified according to their TNM stage and statistical analysis was performed with the use of Mann-Whitney *U* test. Receiver-operating characteristic (ROC) curves were constructed for quantitative PCR data sets using a single-gene test in colorectal cancer versus normal tissues, by plotting sensitivity versus (1-specificity). Moreover, differences in the mRNA expression profile of the genes was examined between colorectal cancer and normal tissues in subgroups of patients according to the *KRAS* mutation status (mutant or wild-type colorectal cancer tissue) using the Mann-Whitney *U* test. A p-value of 0.05 (or less) was considered as statistically significant.

Beclin-1 and *Lc3* genes are significantly down-regulated in colorectal cancer, independently of *KRAS* mutation status, whereas *Noxa* is significantly up-regulated, also independently of *KRAS* mutation status. ROC analyses showed that *Beclin-1*, *Lc3* and *Noxa* expression has discriminatory value between colorectal cancer and normal tissue. Combinatorial ROC analysis revealed the marginally fair discriminatory value of *Beclin-1* and *Lc3* genes as a panel.

Beclin-1, *Lc3* and *Noxa* mRNA expression levels are significantly deregulated in colorectal cancer and could provide a panel of markers with fair discriminatory value between colorectal cancer and normal tissue

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	10
-----------------------------	----

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
---------------------------	----

1.1 Τι είναι ο Καρκίνος.....	11
------------------------------	----

1.2 Καρκινογένεση.....	11
------------------------	----

1.2.1 Διαδικασία της Καρκινογένεσης Αναλυτικά.....	11
--	----

1.3 Καρκίνος Παχέος Εντέρου.....	13
----------------------------------	----

1.3.1 Ιστολογική Δομή του Παχέος Εντέρου.....	13
---	----

1.3.2 Σταδιοποίηση.....	14
-------------------------	----

1.3.3 Προγνωστικοί Δείκτες.....	14
---------------------------------	----

1.3.4 Μοντέλο Καρκινογένεσης Παχέος Εντέρου.....	15
--	----

1.4 Το μονοπάτι των MAP Κινασών και ο ρόλος του.....	16
--	----

1.5 Το μονοπάτι της 3,4,5 – Τριφωσφορικής Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PIP3).....	18
---	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΠΙΣΚΟΠΙΣΗ ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ.....	19
--	----

2.1	Επισκόπηση της Αυτοφαγίας	20
2.2	Η Αυτοφαγία προστατεύει τα Καρκινικά Κύτταρα από την πείνα	21
2.2.1	Αυτοφαγία και Καταστολή του Όγκου	22
2.2.2	Αυτοφαγία και Κυτταρικός Θάνατος	22
2.2.3	Ο ρόλος της Αυτοφαγίας στην Θεραπεία του Καρκίνου	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΓΟΝΙΔΙΑ NOXA / BECLIN-1 / LC3		23
3.1	Noxa	23
3.2	Beclin-1	25
3.2.1	Αναστολή της Αυτοφαγίας με Συμπλέγματα Beclin1-Bcl2	25
3.2.2	Επικοινωνία μεταξύ Απώπτωσης και Αυτοφαγίας από Beclin-1	26
3.3	LC3	28

Β.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ		30
4.1	ΥΛΙΚΑ	30
4.1.1	Χημικά	30
4.1.2	Εκκινητές	31
4.2	ΜΕΘΟΔΟΙ	32
4.2.1	Μέθοδοι μελέτης RNA	32
4.3	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	35

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	36
5.1 Σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA των γονιδίων Beclin-1 και LC3 σε κλινικά δείγματα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου.	36
5.2 Σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου Noxa σε κλινικά δείγματα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου.	38
5.3 Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των mRNA των γονιδίων Beclin-1, LC3 και Noxa με την σταδιοποίηση TNM στους ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου.	39
5.4 Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης mRNA των γονιδίων Beclin-1, LC3 και Noxa με την παρουσία μεταλλάξεων στο KRAS στα κλινικά δείγματα καρκίνου του παχέος εντέρου.	42
5.5 Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης mRNA των τριών γονιδίων συνδυαστικά σε κλινικά δείγματα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου.	43

Γ. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
6.1 Το γονίδιο Noxa στον καρκίνο του παχέος εντέρου	46
6.2 Τα αυτοφαγικά γονίδια Beclin-1 και LC3 στον καρκίνο του παχέος εντέρου	48
6.3 Ογκογόνος Ras-επαγόμενη έκφραση της Noxa και Beclin-1 προωθεί αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο και περιορισμένη επιβίωση	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Εικόνα 1.1: Χιτώνες Παχέος Εντέρου

Εικόνα 1.2: Μοντέλο Καρκινογένεσης Παχέος Εντέρου

Εικόνα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού της MAP κινάσης Ras-Raf-MEK-ERK1/2

Εικόνα 1.4: Το συνεχώς ενεργοποιημένο μονοπάτι της MAP Κινάσης

Εικόνα 1.5: Το μονοπάτι PI3K-PTEN-Akt

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ

Εικόνα 2.1: Διαδικασία Αυτοφαγίας

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΓΟΝΙΔΙΑ ΝΟΧΑ / BECLIN-1 / LC3

Εικόνα: 3.1: Η σηματοδότηση του Κυτταρικού Θανάτου ρυθμίζεται από οικογένεια Bcl2

Εικόνα 3.2: Κυτταρικοί φαινότυποι των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2

Εικόνα 3.3: Ρύθμιση της διάσπασης Beclin 1 και Bcl-2 κατά την διάρκεια της αυτοφαγίας

Εικόνα 3.4: Το σύστημα σύζευξης του συμπλόκου Atg5-Atg12

Εικόνα 3.5: Το σύστημα σύζευξης της LC3

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία αποτελεί διπλωματική εργασία στα πλαίσια του προπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας» του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Πριν την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω ορισμένους από τους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα μαζί τους και έπαιξαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίησή της.

Πρώτους από όλους θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διπλωματικής εργασίας μου και διευθυντή του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, κ. Αλέξανδρο Πίντζα και την επιβλέπουσα της διπλωματικής εργασίας μου και ειδική τεχνική επιστήμονα του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών κ. Βιβή Κοσμίδου για την πολύτιμη καθοδήγηση τους και την εμπιστοσύνη και εκτίμηση που μου έδειξαν.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω την συνεπιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας και επίκουρο καθηγήτρια του τμήματος μου κ. Άννα Μαρία Ψαρρά, του ανθρώπου που συνέβαλε στη εκτέλεση της παρούσας διπλωματικής. Πολύ περισσότερο όμως, θα ήθελα να την ευχαριστήσω που καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας στάθηκε δίπλα μου ακούραστα, γενναιόδωρα και με αληθινό ενδιαφέρον, δείχνοντας εμπιστοσύνη στο πρόσωπό μου και δίνοντάς μου τη δύναμη για να συνεχίσω. Είναι ένας άνθρωπος που εκτελεί πιστά αυτό που κάνει δίνοντας την αμέριστη προσοχή της για να βοηθήσει πραγματικά και με ενδιαφέρον τον φοιτητή.

Σημαντική ήταν επίσης και η συμβολή της διδάκτωρ Μαρίνας Δεβετζή. Την ευχαριστώ για τις πολύτιμες γνώσεις που μου πρόσφερε κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου και για τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδωσε για τη μελέτη αυτή.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να απευθύνω και στην Μαρία Γουλιελμάκη και τον Αποστόλη Γάλαρη οι οποίοι στάθηκαν σημαντικοί αρωγοί στην προσπάθειά μου.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τι είναι ο Καρκίνος

Καρκίνος ονομάζεται η ασθένεια που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κυττάρων που εμφανίζουν ποικίλο βαθμό πιστότητας με τα προγονικά και δημιουργούν (κακοήθεις) όγκους (μάζες καρκινικών κυττάρων ή αλλιώς νεοπλασίες). [1] Η ονομασία του δόθηκε από τον Ιπποκράτη ο οποίος παρατήρησε ότι η μορφή των όγκων έμοιαζε με καβούρι (καρκίνο). Στην ιατρική ονομάζεται και Νεοπλασματική Νόσος.

1.2 Καρκινογένεση

Ο καρκίνος είναι γενετικό νόσημα: προκύπτει από παθολογικές μεταβολές της αλληλουχίας του DNA. Διαφέρει από άλλα γενετικά νοσήματα κατά το γεγονός ότι οι εμπλεκόμενες μεταλλάξεις είναι σωματικές, δηλαδή συμβαίνουν σε διάσπαρτα μεμονωμένα σωματικά κύτταρα του ώριμου σώματος, και διαφέρουν από τις μεταλλάξεις της γαμετικής σειράς, που μεταβιβάζονται από τα γαμετικά κύτταρα από τα οποία αναπτύσσεται ολόκληρος ο πολυκύτταρος οργανισμός [2].

Ένα μεγάλο μέρος της έρευνας κατά του καρκίνου αναζητά τις αιτίες εμφάνισης αυτών των μεταλλάξεων, παρ' όλα αυτά τα συμπεράσματα είναι ανεπαρκή. Ωστόσο το αποτέλεσμα είναι σαφές: απώλεια ελέγχου της κυτταρικής αύξησης που οδηγεί στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κυττάρων, ο οποίος χαρακτηρίζει την νόσο.

1.2.1 Διαδικασία της Καρκινογένεσης αναλυτικά: [2]

1. Μετατροπή των πρωτοογκογονιδίων σε ογκογονίδια και απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Στο γονιδίωμα των φυσιολογικών κυττάρων υπάρχουν γονίδια τα οποία ελέγχουν την φυσιολογική ανάπτυξη τους, την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση και ονομάζονται πρωτοογκογονίδια. Στο γονιδίωμα επίσης υπάρχουν και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα οποία είναι φυσιολογικά γονίδια που τα προϊόντα τους(πρωτεΐνες) αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Το πρώτο βήμα της καρκινογένεσης είναι η μεταλλαγή των πρωτοογκογονιδίων σε ογκογονίδια, γονίδια δηλαδή που προάγουν τον

σχηματισμό όγκου, αλλά και η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Υπεύθυνη για αυτές τις αλλαγές δεν είναι μία και μοναδική μετάλλαξη αλλά ένα πλήθος μεταλλάξεων που πιθανώς συσσωρεύονται από γενιά σε γενιά, μεταλλάσσοντας τα πρωτοογκογονίδια σε ογκογονίδια και προκαλώντας τέτοιες διαφοροποιήσεις στα ογκοκατασταλτικά γονίδια που τα καθιστούν ανενεργά [2,3].

Τα ογκογονίδια μπορεί να οδηγούν στην παραγωγή μίας μη φυσιολογικής πρωτεΐνης ή ακόμα και σε αφύσικα υψηλά επίπεδα μιας φυσιολογικής πρωτεΐνης. Σε κάθε περίπτωση όμως το κύτταρο οδηγείται σε αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού του. Ενώ ταυτόχρονα η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων καθιστά το κύτταρο ανίκανο να βάλει τέρμα σε αυτόν τον πολλαπλασιασμό. Έτσι ο πολλαπλασιασμός καθίσταται ανεξέλεγκτος και οδηγεί στο σχηματισμό των όγκων

2. Μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά

Έχει διαπιστωθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα προέρχονται από φυσιολογικά κύτταρα, που έχουν ωστόσο κάποια χαρακτηριστικά που τα διαφοροποιούν από αυτά.

Για το λόγο αυτό θεωρούμε ότι τα καρκινικά κύτταρα έχουν υποστεί αλλαγές. Διαπιστώθηκε ότι οι αλλαγές αυτές περνούν κατά την κυτταρική διαίρεση από ένα καρκινικό κύτταρο στα θυγατρικά του, γεγονός που δείχνει ότι πρόκειται για αλλαγές στο γενετικό υλικό.

Η μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά είναι επακόλουθο της μεταλλαγής των πρωτοογκογονιδίων σε ογκογονίδια αλλά και την απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

3. Ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων και δημιουργία όγκων.

Τα ογκογονίδια οδηγούν σε αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού και διαίρεσης των κυττάρων ενώ η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων συνεπάγεται αδυναμία καταστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Έτσι τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα δημιουργώντας όγκους (ή νεοπλασίες, tumors). Στην περίπτωση που ο δημιουργηθείς πρωτοπαθής όγκος είναι καλοήθης, συνήθως μπορεί να αφαιρεθεί πλήρως με χειρουργική επέμβαση χωρίς να υποτροπιάζει.

Αν είναι κακοήθης (καρκινικός) δημιουργεί μεταστάσεις*, με αποτέλεσμα η αφαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου να μην επιφέρει την ίαση, αφού πλέον υπάρχουν άλλες καρκινικές εστίες, σε διάφορα μέρη του σώματος [1,2]. Οι κακοήθεις όγκοι με την αύξηση του μεγέθους τους και την διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων προκαλούν σοβαρά προβλήματα στους ιστούς και στην λειτουργία ολόκληρου του οργανισμού. Ενώ στην περίπτωση των καλοθών τα προβλήματα που δημιουργούν είναι ουσιαστικά μόνο μηχανικά (πιέζουν τους γύρω ιστούς).

Επιπλέον, υπάρχει ο κίνδυνος κακοήθους εξαλλαγής ενός καλοήθους όγκου, δηλαδή να υποπέσει σε κακοήγη όγκο και να αρχίσει να διηθεί τους γύρω ιστούς.

4. Δημιουργία μεταστάσεων.

Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να διεισδύουν στα αιμοφόρα αγγεία και μέσω της ροής του αίματος να μεταφέρονται σε άλλο μέρος του σώματος που δεν βρίσκεται σε επαφή με το προηγούμενο, να εγκαθίστανται και να δημιουργούν νέους καρκινικούς όγκους (αιματογενής διασπορά). Άλλοτε μεταφέρονται μέσω των λεμφαγγείων οπότε έχουμε την λεμφογενή διασπορά. Το αποτέλεσμα είναι να προσβάλλονται και άλλα μέρη και όργανα του σώματος με επακόλουθο την δυσλειτουργία ολόκληρου του οργανισμού και συνήθως, δυστυχώς, τον θάνατο.

1.3 Καρκίνος Παχέος Εντέρου

Τα καρκινώματα στο παχύ έντερο και στο ορθό ανήκουν στους συχνότερους τύπους καρκίνου στις δυτικές χώρες. Μαζί με τον καρκίνο του πνεύμονα, τον καρκίνο του μαστού στις γυναίκες και τον καρκίνο του προστάτη στους άνδρες, αποτελούν την πλειονότητα των θανατηφόρων καρκίνων στις χώρες αυτές και σημαντικό κοινωνικό πρόβλημα.

1.3.1 Ιστολογική δομή του Παχέος Εντέρου

Το τοίχωμα του παχέος εντέρου αποτελείται από τέσσερις χιτώνες: το βλεννογόνο, τον υποβλεννογόνιο, το μυϊκό και τον ορογόνο (εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1: Χιτώνες Παχέος Εντέρου [121]

1.3.2 Σταδιοποίηση

Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται πολλά σχήματα σταδιοποίησης του καρκίνου του παχέος εντέρου. Η κατά Dukes σταδιοποίηση (1937) ήταν η πρώτη κοινά αποδεκτή προσπάθεια:

- Στάδιο A: Το νεόπλασμα περιορίζεται εντός του βλεννογόνου.
- Στάδιο B: Η βλάβη επεκτείνεται στο μυϊκό χιτώνα χωρίς να τον διηθεί σε όλο το πάχος του ή με εξ ολοκλήρου διήθηση του χιτώνα.
- Στάδιο C: Νεοπλασματική διήθηση των λεμφαδένων, με τον όγκο να περιορίζεται εντός του εντερικού τοιχώματος ή να έχει διηθήσει εξ ολοκλήρου το εντερικό τοίχωμα.
- Στάδιο D: Ο όγκος έχει δώσει απομακρυσμένες μεταστάσεις.

1.3.3 Προγνωστικοί Δείκτες

Η πρόγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου εξαρτάται από έναν αριθμό κλινικών και παθολογοανατομικών παραμέτρων:

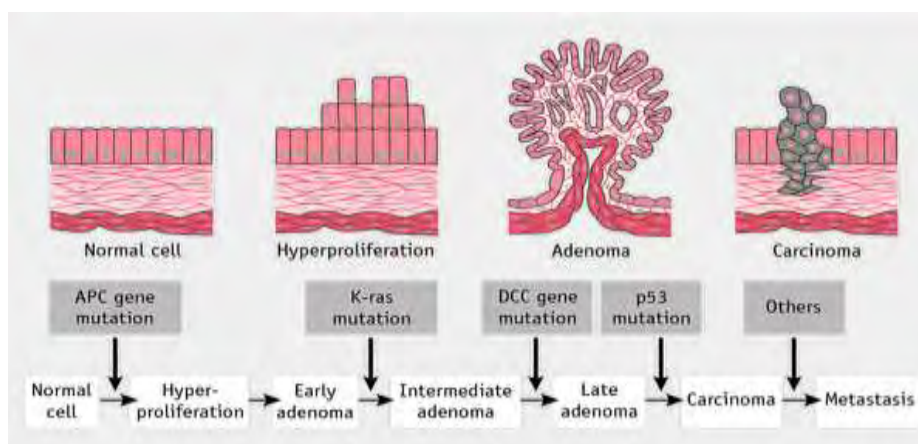
- i. Ηλικία: Άτομα πολύ μικρής ή πολύ μεγάλης ηλικίας έχουν συνήθως κακή πρόγνωση.
- ii. Φύλο: Η πρόγνωση συνήθως είναι καλύτερη στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες.
- iii. Εντόπιση: Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει η εντόπιση του καρκίνου. Έτσι έχουμε καλύτερη πρόγνωση όταν εντοπίζεται στο αριστερό κόλον, σε αντίθεση με το σιγμοειδές και τον πρωκτό όπου έχουμε χειρότερη πρόγνωση.
- iv. Σταδιοποίηση: Αποτελεί την πλέον αξιόπιστη πρόβλεψη για την εξέλιξη του ασθενούς και αυτή γίνεται αξιολογώντας τρεις βασικούς παράγοντες. Αυτοί είναι το βάθος διήθησης του εντερικού τοιχώματος, η προσβολή των γειτονικών λεμφαδένων και η ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων. Η πρόγνωση είναι πολύ καλή όταν ο καρκίνος είναι πολύ μικρός και εντοπίζεται μόνο σε προϋπάρχοντα πολύποδα. Αντίθετα, όταν ο καρκίνος έχει διηθήσει όλο το τοίχωμα του παχέος εντέρου ή έχει δώσει μεταστάσεις σε γειτονικούς λεμφαδένες ή σε απομακρυσμένα όργανα η πρόγνωση είναι κακή.
- v. Ιστολογικός τύπος: Όταν πρόκειται για διάφορους ιστολογικούς υποτύπους όπως το βλεννώδες καρκίνωμα, το μικροκυτταρικό και το "δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου" καρκίνωμα, έχουμε χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με το συνηθισμένο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου.
- vi. Βαθμός κακοήθειας: Όσο πιο καλά διαφοροποιημένο είναι ένα καρκίνωμα τόσο πιο καλή είναι και η πρόγνωση.

1.3.4 Μοντέλο Καρκινογένεσης Παχέος Εντέρου

Αρχικά στάδια της νόσου διακρίνονται ιστολογικά, ενώ η νόσος εξελίσσεται από υπερπλασία σε καλοήγη αδενώματα και διηθητικά καρκινώματα έως συστηματική μεταστατική νόσος. Οι πιο πρώιμα αναγνωρίσιμες προνεοπλασματικές αλλαγές έχουν ως αποτέλεσμα υπερπλαστικές ή δυσπλαστικές κρύπτες. Οι αδενωμάτωσης πολύποδες αποτελούν πρόδρομα στάδια πολλών καρκινωμάτων. Εντοπίζονται ως μοναδικοί καλοήγη ογκοί που προεξέχουν προς τον αυλό του εντέρου και αποτελούνται από πεπαχυμένο, περισσότερο ή λιγότερο αποδιοργανωμένο επιθήλιο. Πολλαπλοί πολύποδες παρατηρούνται σε συγκεκριμένες περιστάσεις, όπως στη FAP. Η γενική αρχή που διέπει τα ανθρώπινα καρκινώματα ότι ξεκινούν από αλλαγές σε αρκετά διαφορετικά γονίδια ισχύει και στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Επιπλέον, οι αλλαγές αυτές έχουν προσδιοριστεί για συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης του όγκου και έχουν συσχετιστεί με συγκεκριμένες ιστολογικές αλλαγές. Αυτό το μοριακό μοντέλο καρκινογένεσης του παχέος εντέρου έχει βοηθήσει στην κατανόηση των υποκείμενων βιολογικών διαδικασιών. Πολλές φορές γίνεται προσπάθεια να μεταφερθεί το μοντέλο και σε άλλους καρκίνους, και υπό αυτή την έννοια ο καρκίνος του παχέος εντέρου έχει γίνει παραδειγματικό μοντέλο στη μοριακή ογκολογία. Το θεμελιώδες βήμα στην ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου και το οποίο οδηγεί αρχικά σε αδενώματα είναι μια συνεχής ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού WNT. Συνήθως προκαλείται από απώλεια λειτουργίας του κλασικού ογκοκατασταλτικού APC (Adenomatosis polyposis coli), λιγότερο συχνά από μεταλλάξεις στο CTNNB1 οι οποίες ενεργοποιούν ογκογονικά τη β-κατενίνη και σπανίως από άλλες αλλαγές στο μονοπάτι. Η ενεργοποίηση φαίνεται να προσδίδει ένα φαινότυπο παρόμοιο με των βλαστικών κυττάρων στα καρκινικά κύτταρα.

Περαιτέρω βήματα για την εξέλιξη στον καρκίνο του παχέος εντέρου σχετίζονται με μεταλλάξεις που ενεργοποιούν το KRAS, απώλεια λειτουργίας της TP53 και απενεργοποίηση της κυτταρικής απόκρισης στον TGF-β. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου υποδεικνύει ότι η ανάπτυξη του όγκου μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω αρκετών διαφορετικών μηχανισμών, όπως αυξημένου ρυθμού σημειακών μεταλλαγών, χρωμοσωματικής αστάθειας ή αυξημένου ρυθμού επιγενετικών αλλαγών. Αυτές οι μοριακά προσδιορισμένες υποκατηγορίες διαφέρουν μετριοπαθώς στη μορφολογία και την κλινική συμπεριφορά, αλλά η ταξινόμηση είναι πολύ χρήσιμη στη διαγνωστική και στην επιλογή των θεραπευτικών στόχων. Για παράδειγμα, μια υποκατηγορία καρκίνου παχέος εντέρου χαρακτηρίζεται από αυξημένη συχνότητα σημειακών μεταλλάξεων, οι οποίες είναι περισσότερο εμφανείς ως συχνές αλλαγές στο μήκος των αλληλουχιών των μικροδορυφόρων. Αυτή η μικροδορυφορική αστάθεια προκαλείται από ατέλεια στο σύστημα επιδιόρθωσης DNA παράταιρων βάσεων. Μπορεί αυθόρμητα να ξεκινήσει από γενετική ή επιγενετική απενεργοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν συστατικά του συστήματος αυτού ή ως συνέπεια κληρονομήσιμων αλλαγών στα γονίδια αυτά, όπως στο κληρονομικό σύνδρομο HNPCC (Hereditary nonpolyposis colorectal cancer). Σημαντική πρόοδος έχει γίνει την τελευταία δεκαετία ως προς την κατανόηση των μοριακών – γενετικών αλλαγών που σχετίζονται με τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Ταυτοποιημένα γονίδια, σχετιζόμενα με όγκους, το DCC (Deleted in Colon Carcinoma) και MMC (Mutated in Colon

Carcinoma) συμμετέχουν σε πολλά στάδια του μετασχηματισμού από φυσιολογικό εντερικό βλεννογόνο σε μεταστατικό καρκίνωμα (εικόνα 1.2).



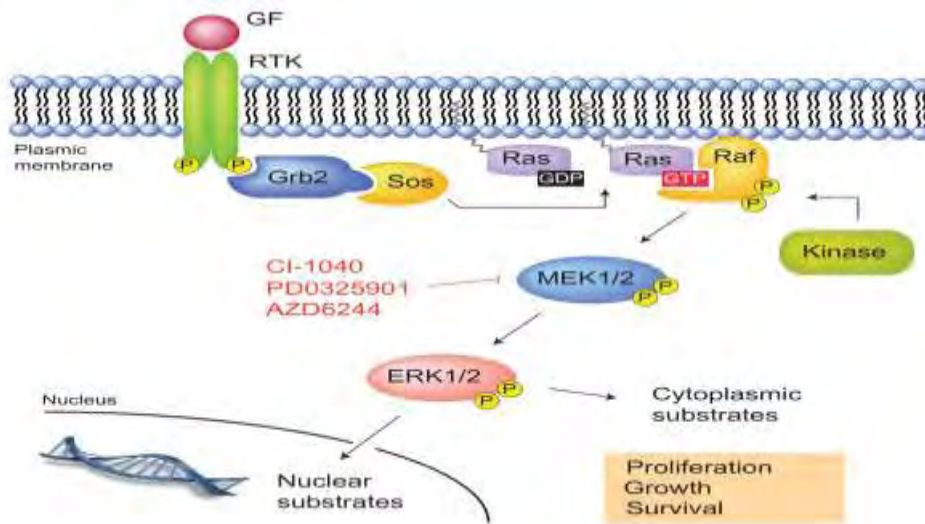
Εικόνα 1.2: Μοντέλο Καρκινογένεσης Παχέος Εντέρου [122]

1.4 Το μονοπάτι της MAP Κινάσης και ο ρόλος του

Στο σποραδικό Κ.Π.Ε., το μονοπάτι KRAS-BRAF-MAPK είναι συχνά μεταλλαγμένο όπου οι μεταλλάξεις του KRAS είναι αντίστροφα σχετιζόμενες με τις μεταλλάξεις του BRAF, με τις τελευταίες να είναι πιο συχνές στον ανθρώπινο καρκίνο. Το μονοπάτι των MAP κινασών συμβάλει στον έλεγχο αυξητικών σημάτων, κυτταρικής επιβίωσης και διείσδυσης στον καρκίνο. Το μονοπάτι αυτό περιλαμβάνει διάφορα πρωτο-ογκογονίδια και απορρυθμίζεται στο 30% περίπου των καρκίνων. Οι ογκογόνες μεταλλάξεις RAS και BRAF, που ενεργοποιούν το μονοπάτι σηματοδότησης των πρωτεϊνικών κινασών ενεργοποιημένων από μιτογόνα (MAPK), συμβαίνουν σε 37% και 13% των Κ.Π.Ε., αντίστοιχα. [4,5]

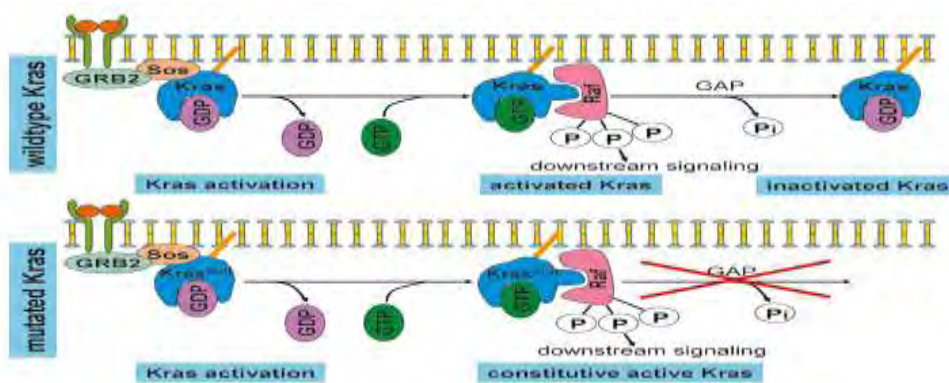
Οι υποδοχείς MAP κινάσης, έχουν ενδογενή δράση τυροσινικής κινάσης στα κυτταροπλασματικά τους κατάλοιπα, μια ενεργότητα που είναι αρχικά αδρανής. Η σύνδεση του προσδέτη στα εξωκυτταρικά κατάλοιπα αυτών των υποδοχέν τυροσινικής κινάσης (RTKs) οδηγεί στον διμερισμό τους και την ενεργοποίηση της δράσης της τυροσινικής κινάσης, ξεκινώντας ένα ενδοκυτταρικό μονοπάτι σηματοδότησης που βασικά προάγει τον πολλαπλασιασμό. Στα κύτταρα των θηλαστικών όλοι οι RTKs, φαίνεται να χρησιμοποιούν ένα καλά διατηρημένο μονοπάτι μεταφοράς σήματος στο οποίο το σήμα μεταφέρεται στην πρωτεΐνη RAS, οδηγώντας στην ενεργοποίησή της. Η RAS είναι μια GTPάση και συνεπώς, ενεργοποιείται με την εναλλαγή GDP με GTP. Η ενεργοποιημένη RAS-GTP προάγει την δημιουργία σηματοδοτικών συμπλεγμάτων στην μεμβράνη όπου είναι σηνδεδεμένη από τρεις πρωτεϊνικές κινάσες που δρουν διαδοχικά, τις RAF, MEK, και ERK. Η ενεργή RAS-GTP πρωτεΐνη προσδένεται στο αμινοτελικό ρυθμιστικό κατάλοιπο της RAF, μιας κινάσης σερίνης/θρεονίνης, οδηγώντας στην ενεργοποίησή της. Υδρόλυση της RAS-GTP σε RAS-GDP απελευθερώνει την ενεργή RAF η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την MEK (εικόνα 1.3).

Η ενεργοποιημένη πλέον MEK, φωσφορυλιώνει την ERK, μια άλλη κινάση σερίνης/θρεονίνης ενεργοποιώντας την καταλυτική της δράση. Η πρωτεΐνη ERK με τη σειρά της φωσφορυλιώνει πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων και μεταγραφικών παραγόντων που μεσολαβούν σε κυτταρικές αποκρίσεις όπως αύξηση και διαφοροποίηση. Έτσι, η ενεργοποίηση της RAS ενεργοποιεί ένα καταρράκτη κινασών, των RAF, MEK και ERK: ενεργοποιώντας RTK►RAS►RAF►MEK►ERK.



Εικόνα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού της MAP κινάσης Ras-Raf-MEK-ERK1/2 [123]

Έχει αποδειχθεί ότι το μονοπάτι των MAP κινασών συμμετέχει στην παθογένεση, ανάπτυξη και ογκογονική συμπεριφορά του Κ.Π.Ε. στον άνθρωπο. Ανάμεσα στα πιο καλά μελετημένα ογκογονίδια είναι τα RAS γονίδια. Υπάρχουν τρεις μορφές των μικρών RAS GTPασων, η H-RAS (Harvey – RAS), η N-RAS (Neutoblastoma – RAS) και η K-RAS (Kirsten – RAS), εκ των οποίων το KRAS είναι το πιο συχνά ενεργοποιημένο ογκογονίδιο. Τα ογκογονίδια KRAS φέρουν σημειακές μεταλλάξεις, οδηγώντας σε αντικαταστάσεις αμινοξέων (συνήθως στα κωδικόνια 12 και 13) παράγοντας πρωτεΐνες με σημαντικά μειωμένη ενεργότητα GTPάσης, δηλαδή ικανότητα υδρόλυσης της GTP. Οι μεταλλαγμένες KRAS πρωτεΐνες είναι, γι' αυτό το λόγο, κλειδωμένες σε μια συνεχώς ενεργοποιημένη GTP-προσδεσμένη κατάσταση, μεταφέροντας το σήμα συνεχώς προς την ERK (εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4: Το συνεχώς ενεργοποιημένο μονοπάτι της MAP κινάσης. Όταν η πρωτεΐνη RAS είναι συνεχώς ενεργή και προωθεί ανεξέλεγκτα το σήμα προς τον πυρήνα προκαλώντας τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό του.
(<http://akramania.byethost11.com/Robbins/63.html@printing=true.htm>)

Άλλο μεταλλαγμένο μέλος αυτού του μονοπατιού είναι η RAF κινάση σερίνης/θρεονίνης. Υπάρχουν, επίσης, τρεις γνωστοί τύποι για την RAF, η A-RAF, η B-RAF, και η C-RAF. Η πιο συχνά μεταλλαγμένη μορφή στον κολοορθικό καρκίνο είναι η B-RAF. Η πιο συχνή μετάλλαξη σε αυτό το γονίδιο, οδηγεί στην αντικατάσταση ενός γλουταμικού οξέος στο κωδικόνιο 600(V600E) και η μεταλλαγμένη BRAF παρουσιάζει αυξημένη δράση κινάσης. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις στον καρκίνο του παχέος εντέρου είναι στο KRAS σε σχέση με το BRAF και είναι αντιστρεπτά σχετιζόμενες μεταξύ τους. Τέλος, ένας ακόμη μηχανισμός που πιθανόν να συμβάλει στην ενεργοποίηση των MAPK στον ορθοκολικό καρκίνο είναι η αύξηση των υποδοχέων EGFR, οι οποίοι ενεργοποιούν την σηματοδότηση και οδηγούν σε αύξηση της κυτταρικής διαίρεσης.[6-9]

1.5 Το μονοπάτι της 3,4,5 – Τριφωσφορικής Φωσφατιδιλοϊνοσιτόλης (PIP₃)

Το μονοπάτι της PIP₃ αποτελείται από τις πρωτεΐνες PIPK3-PIP3-AKT, και πρόσφατα έχει δείχθει ότι συμβάλει και αυτό στην παθογένεια και ανάπτυξη του κολοορθικού καρκίνου [5]. Τα πιο σημαντικά ευρήματα αφορούν στις πρόσφατα χαρακτηρισμένες μεταλλάξεις του PIPK3CA, γονιδίου που κωδικοποιεί την καταλυτική περιοχή p110α και το οποίο έχει βρεθεί μεταλλαγμένο στο 25% των περιπτώσεων Κ.Π.Ε.. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό φαίνεται να συμβαίνουν σε σχετικά προχωρημένα στάδια νεοπλασίας, κατά τη στιγμή που οι όγκοι αρχίζουν να διεισδύουν και να δίνουν μεταστάσεις (εικόνα 1.5).

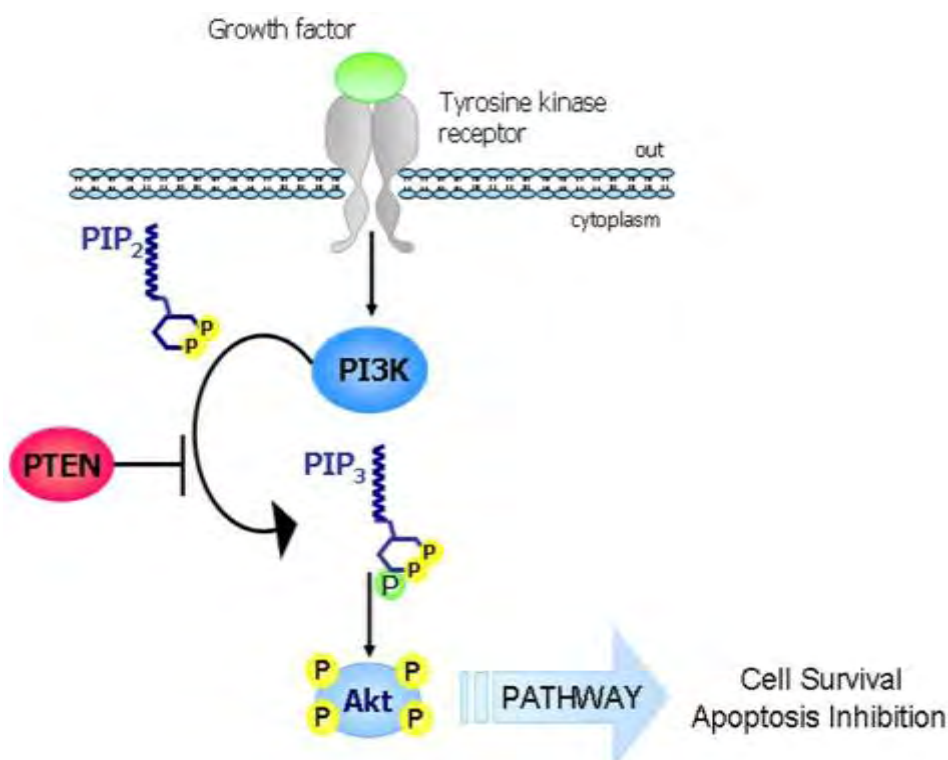
Υπάρχουν 3 διαφορετικές τάξεις των PI3K. Η τάξη I (υπομονάδα A και B), η II και η III. Η ομάδα IA των PI3K συγκροτούνται από μια καταλυτική περιοχή 110 kDa και μια ρυθμιστική περιοχή 85 kDa. Η p110α καταλυτική περιοχή περιέχει την περιοχή πρόσδεσης στη RAS, στη RAS-GTP μορφή της. Η ενεργοποιημένη PI3K φωσφορυλιώνει την PIP₂ στο 3' - OH του δακτυλίου της ινοσιτόλης, μετατρέποντας την σε PIP₃. Η PIP₃ με την σειρά της φωσφορυλιώνει την AKT.

Η AKT διαθέτει μια πρωτεϊνική περιοχή γνωστή ως PH (Pleckstrin Homology). Η περιοχή αυτή προσδένεται στα φωσφοϊνοσιπίδια με μεγάλη συγγένεια. Η ενεργότητα της AKT ρυθμίζεται αρνητικά από την πρωτεΐνη PTEN, η οποία ουσιαστικά λειτουργεί αντίστροφα από την PI3K. Η PTEN λειτουργεί ως φωσφατάση αποφωσφορυλιώνοντας την PIP₃ στην PIP₂. Έτσι, η εντοπισμένη στη μεμβράνη AKT απελευθερώνεται από το μονοπάτι μειώνοντας σημαντικά το ποσοστό ενεργοποίησής της.

Η AKT με τη σειρά της, φωσφορυλιώνει διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, που συμμετέχουν, στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου(κυκλίνη D1, C-MYC), στην απόπτωση μειώνοντας την έκφραση προαποπτωτικών

γονιδίων (BAD, κασπάση-9) ή αυξάνοντας την έκφραση αντιαποπτωτικών γονιδίων (μέσω του NfκB), στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την μεταναστευτικότητα.

Ένας από τους πιο συχνούς μηχανισμούς απορρύθμισης του παραπάνω μονοπατιού στον Κ.Π.Ε. είναι μέσω του ογκογόνου RAS ή μεταλλάξεων στο γονίδιο PI3KCA. Παρομοίως, ο ογκοκατασταλτικός παράγοντας PTEN που ανταγωνίζεται την δράση της PI3K βρίσκεται επίσης πολλές φορές μεταλλαγμένος. Είναι γεγονός ότι υπάρχει μεγάλη δυσκολία να προκληθεί κυτταρικός θάνατος μέσω απόπτωσης στον καρκίνο όπου το PI3K μονοπάτι είναι ενεργοποιημένο μέσω σωματικών μεταλλάξεων.[7]



Εικόνα 1.5: Το μονοπάτι PI3K-PTEN-Akt [124]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΕΠΙΣΚΟΠΙΣΗ ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ

2.1 Επισκόπηση της Αυτοφαγίας

Είναι μια δυναμική διαδικασία που περιλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος της αποικοδόμησης των κυτταροπλασματικών οργανιδίων και πρωτεϊνών.

Βασίζεται στην λειτουργία της “κυτταρικής ανακύκλωσης”, η αυτοφαγία παίζει βασικό ρόλο στον ποιοτικό έλεγχο των κυτταρικών συστατικών και την παροχή θρεπτικών ουσιών και υλικών για νεόδμητες δομές στα κύτταρα κάτω από μεταβολικό στρες.

Είναι μια εξελικτική συντηρημένη διαδικασία που συμβαίνει σε όλα τα ευκαριώτικα κύτταρα από τη ζύμη μέχρι τα θηλαστικά. [10-12]

Όπως φαίνεται στην εικόνα 2.1 μια μεμβράνη απομόνωσης (ονομάζεται επίσης και phagophore), η οποία είναι μια διπλή μεμβράνη αποτελούμενη από 2 παράλληλες λιπιδιακές διπλοστοιβάδες, σχηματίζεται και επιμηκύνεται.

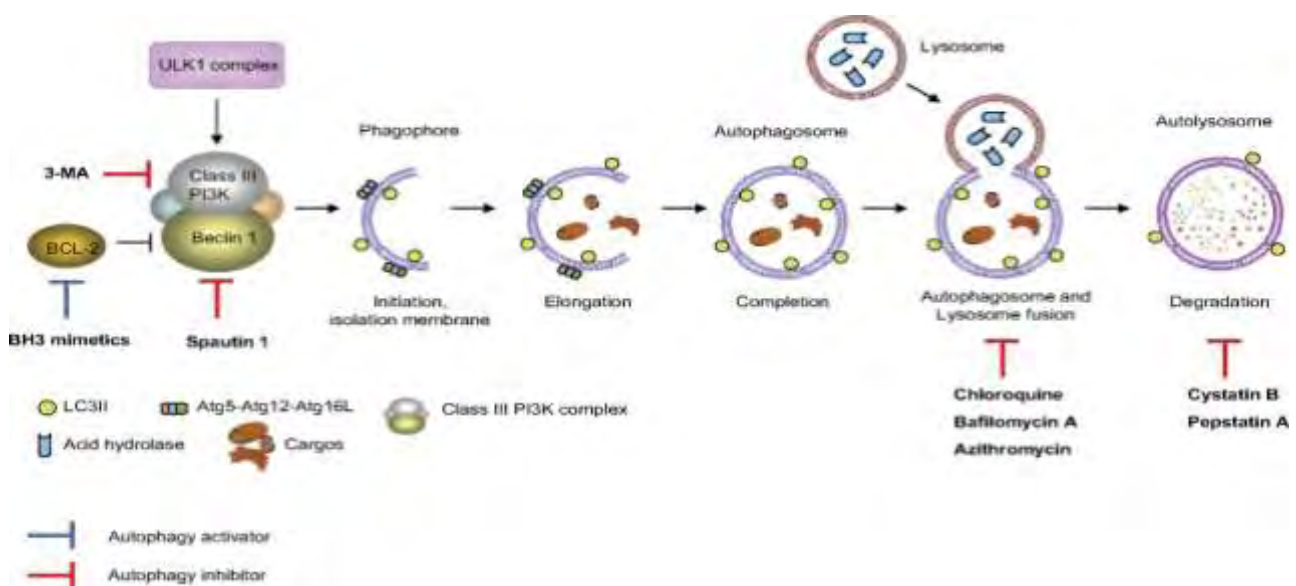
Μεμβράνες απομόνωσης ξεκινούν παγιδεύοντας κυτταροπλασματικά συστατικά στο πρώτο βήμα της αυτοφαγίας. Τα άκρα της μεμβράνης απομόνωσης συντήκονται και δημιουργείται το αυτοφαγόσωμα. Τα κυτταροπλασματικά συστατικά είναι εντελώς βυθισμένα στο αυτοφαγόσωμα. Στη συνέχεια το αυτοφαγόσωμα υποβάλλεται σε μια διαδικασία ωρίμανσης. Τέλος, το αυτοφαγόσωμα συντήκεται με το λυσόσωμα για να σχηματίσει το αυτολυσόσωμα και τα παγιδευμένα συστατικά, καθώς και η εσωτερική μεμβράνη του αυτοφαγόσωματος, διασπώνται από λυσοσωμικές υδrolάσες όπως καθεψίνες.

Σε σύγκριση με το σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεοσώματος το οποίο αναγνωρίζει συγκεκριμένους στόχους για καταστροφή, η αυτοφαγία θεωρείται ότι περικλείει - παγιδεύει συστατικά μη-επιλεκτικά. [13]

Μια πολύ συνοπτική περιγραφή της λειτουργίας της αυτοφαγίας είναι η ανακύκλωση, κατά την οποία μειώνει τα απόβλητα και αποδίδει πόρους. [14]

Κατεστραμμένα οργανίδια και ανώμαλα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες συσσωρεύονται στα γερασμένα κύτταρα ή κύτταρα από διάφορες καταπονήσεις, όπως οξειδωτικό στρες και λοιμώξεις.

Οι αυτοφαγικοί μηχανισμοί καταστρέφουν και μειώνουν τα κυτταρικά “σκουπίδια”. Η αυτό-πέψη παρέχει συστατικά και υλικά για νεόδμητες κυτταρικές δομές. Τα αμινοξέα και τα λιπαρά οξέα που παράγονται από την αυτοφαγική καταστροφή χρησιμοποιούνται από τον κύκλο τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) για να παραχθεί ATP, μια κύρια πηγή ενέργειας για διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. [15]



Εικόνα 2.1: Διαδικασία Αυτοφαγίας [125]

2.2 Η Αυτοφαγία προστατεύει τα Καρκινικά Κύτταρα από την πείνα

Το μεταβολικό στρες φαίνεται να επάγει την απόπτωση.[16] Σε πολλά κύτταρα όγκου η απόπτωση καταστέλλεται από την υπερέκφραση των αντι-αποπτωτικών μορίων ή την έλλειψη προ-αποπτωτικών μορίων. Μικρότερη απόπτωση μπορεί να εξηγήσει τον περιορισμένο κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων κάτω από μεταβολικό στρες, αλλά ο τρόπος με τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα εξασφαλίζουν τα απαραίτητα τους θρεπτικά συστατικά παραμένει ένα μυστήριο.

Μια πιθανή λύση είναι ότι τα κύτταρα αφομοιώνουν τα δικά τους συστατικά και αποκτούν αμινοξέα ως εναλλακτική πηγή ενέργειας. Η αυτοφαγία φαίνεται ιδανική για τα καρκινικά κύτταρα για να διατηρήσουν την ενέργεια της ομοιόστασης με ένα τέτοιο αυτόνομο τρόπο.

Η αυτοφαγία είναι γνωστό ότι επάγεται από διάφορες μορφές μεταβολικού στρες, συμπεριλαμβανομένων την στέρση θρεπτικών συστατικών, την στέρση του παράγοντα ανάπτυξης και την υποξία.[17,18] Δεδομένου ότι συχνά παρατηρούνται αυτές οι συνθήκες σε μικροπεριβάλλοντες όγκους, η αυτοφαγία είναι πιθανόν να ενεργοποιείται σε καρκινικά κύτταρα.

Η αυτοφαγία είναι επίσης γνωστό ότι επάγει κυτταρικά το θάνατο και πιθανός θυσιάζει ένα μέρος του επιμέρους κυτταρικού όγκου για την υποστήριξη παρατεταμένης επιβίωσης και τη συνεχή ανάπτυξη άλλων κυττάρων στη μάζα του όγκου.

Η αναστολή της αυτοφαγίας θα μπορούσε να παρέχει στους όγκους ορισμένα αναπτυξιακά πλεονεκτήματα. Πως θα μπορούσε να συμβεί αυτό?

Τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του όγκου απαιτούν τα καρκινικά κύτταρα να υποβληθούν σε υψηλότερο επίπεδο πρωτεϊνοσύνθεσης από ότι αποικοδόμησης πρωτεϊνών για να αυξηθεί ο όγκος.

Ως εκ τούτου η αναστολή της αυτοφαγίας, θα μπορούσε να διατηρήσει την συνεχή ανάπτυξη του όγκου. Επιπλέον πιστεύεται ότι η αυτοφαγία μειώνει τον ρυθμό μετάλλαξης και καταστέλλει την ογκογένεση εξαλείφοντας τα κατεστραμμένα οργανίδια που παράγουν γονοτοξικό στρες, όπως ελεύθερες ρίζες.[19]

Ως εκ τούτου, ο αποκλεισμός της αυτοφαγίας θα μπορούσε να συμβάλει στην ανάπτυξη του καρκίνου, όχι μόνο με την μείωση του ποσοστού της πρωτεϊνικής αποικοδόμησης αλλά και επιτρέποντας ελεύθερες ρίζες να συσσωρεύονται.

Παρά το γεγονός ότι η αυτοφαγία καταστέλλεται κατά την διάρκεια των πρώιμων σταδίων της ογκογένεσης φαίνεται να ρυθμίζεται προς τα πάνω κατά τα τελευταία στάδια ανάπτυξης του όγκου ως ένας προστατευτικός μηχανισμός έναντι στρεσογόνων συνθηκών.[20,21,22] Καθώς ο όγκος μεγαλώνει, τα καρκινικά κύτταρα στην περιφέρεια (κοντά στα αιμοφόρα αγγεία) συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται με την διατήρηση του αναβολισμού.[18] Από την άλλη πλευρά, τα καρκινικά κύτταρα που βρίσκονται στις κεντρικές περιοχές του όγκου είναι ελάχιστα αγγειοποιημένα, έτσι ώστε η επαγωγή της αυτοφαγίας να τους επιτρέπει να επιβιώσουν σε χαμηλά επίπεδα θρεπτικών συστατικών και χαμηλό οξυγόνο.[22]

2.2.1 Αυτοφαγία και Καταστολή του Όγκου

Μια αντίθετη άποψη παρουσιάστηκε από μια μελέτη εξέτασης της πρωτεΐνης Beclin-1, ως υποψήφιος καταστολέας του όγκου. Η Beclin-1 αλληλεπιδρά με κατηγορία III PI3-κινάσης, Vsp3, και αυτή η αλληλεπίδραση ήταν ζωτικής σημασίας για την επαγωγή της αυτοφαγίας και την καταστολή της ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού σε ξενομόσχευμα κυτταρικών σειρών. [23-25]

Παρατηρήθηκε η απώλεια του αλληλόμορφου γονιδίου που κωδικοποιεί Beclin-1 σε 40-75% των σποραδικών καρκίνων του μαστού, ωοθηκών και προστάτη. [26]

Επιπλέον η έκφραση της Beclin-1 πρωτεΐνης ήταν μειωμένη, αλλά όχι εντελώς μειωμένη σε όγκους ποντικών καθώς και σε ανθρώπινα κλινικά δείγματα. [25]

Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η Beclin-1 είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο.

2.2.2 Αυτοφαγία και Κυτταρικός Θάνατος

Ο τύπου II και “αυτοφαγικός” μη αποπτωτικός προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος καθορίζεται μορφολογικά από την ύπαρξη αυτοφαγοσώματος.[27]

Ο αυτοκαννιβαλισμός, που είναι η κατάσταση στην οποία περίσσεια αυτοφαγικού καταβολισμού υπερβαίνει την ικανότητα για τον κυτταρικό αναβολισμό, συχνά υποστηρίζεται ως ο πιθανός μηχανισμός για τον αυτοφαγικό θάνατο.

Η αποικοδόμηση κυτταροπροστατευτικών παραγόντων είναι ένας άλλος αναμφισβήτητος μηχανισμός αυτοφαγικού θανάτου.[28]

2.2.3 Ο ρόλος της Αυτοφαγίας στην Θεραπεία του Καρκίνου

Η αυτοφαγία μπορεί να προωθήσει την προσαρμογή των κυττάρων και την επιβίωση, αλλά υπό ορισμένες συνθήκες οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Ο κυτταρικός θάνατος συνδέεται πιο συχνά με απόπτωση, αλλά μπορεί επίσης να προκύψει μέσω άλλων μηχανισμών συμπεριλαμβανομένης της αυτοφαγίας. Ένας αριθμός μελετών έχουν αναφέρει ότι η αυτοφαγία ή αυτοφαγικός κυτταρικός θάνατος, ενεργοποιείται σε καρκινικά κύτταρα που προέρχονται από ιστούς όπως του μαστού, παχέος εντέρου, του προστάτη και του εγκεφάλου, σε απάντηση σε διάφορες αντικαρκινικές θεραπείες.

Δυστυχώς η αυτοφαγική απόκριση των καρκινικών κυττάρων σε θεραπευτικά μέσα δεν είναι πάντα μια ένδειξη καρκινικού θανάτου. Μπορεί επίσης να είναι μια προστατευτική ανταπόκριση στην θεραπεία, επιτρέποντας την ανακύκλωση των πρωτεϊνών και των κυτταρικών συστατικών.[20,21] Η αυτοφαγία μπορεί να λειτουργήσει για να αφαιρέσει πρωτεΐνες ή οργανίδια που έχουν καταστραφεί από τις αντικαρκινικές θεραπείες ή μέσω της αποικοδόμησης των κυτταρικών συστατικών μπορεί να παρέχει θρεπτικά συστατικά για ταχεία ανάπτυξη των κυττάρων. Στην πραγματικότητα οι αναστολές της αυτοφαγίας μπορεί να παράγουν διαφορετικά αποτελέσματα – την ανάπτυξη των κυττάρων ή κυτταρικό θάνατο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΓΟΝΙΔΙΑ NOXA / BECLIN-1 / LC3

3.1 Noxa

Η Noxa είναι BH-3 πρωτεΐνη, μέλος της οικογένειας Bcl-2. Η οικογένεια Bcl-2 παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μιτοχονδριακού μονοπατιού για την απόπτωση. Η οικογένεια Bcl-2 αποτελείται από πρωτεΐνες που αναστέλλουν ή προάγουν την απόπτωση και περιέχουν μεταβλητές περιοχές ομολογίας BH1, BH2, BH3, BH4.

Η απελευθέρωση των μελών της οικογένειας Bcl-2 είναι ένα συχνό χαρακτηριστικό των ανθρώπινων κακοηθών νόσων και η αιτία για αντίσταση στη θεραπεία.

Η Bcl-2 οικογένεια πρωτεϊνών, που ρυθμίζουν την απόπτωση κατά μήκος του εγγενούς μιτοχονδριακού μονοπατιού απόπτωσης (εικόνα 3.1), ενεργοποιείται σε απάντηση σε μια σειρά από στρεσογόνα ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένων της στέρησης παραγόντων, απόσυρσης κυτοκίνης, ροής Ca⁺⁺, ή βλάβης του DNA που προκαλείται από UV ή ακτινοβολία γ. Μπορούν, επίσης, να συμβάλουν στον κυτταρικό θάνατο που προκλήθηκε από μέλη της οικογένειας παραγόντων νέκρωσης όγκων όπως Fas, TNF ή TRAIL.[29]

Με βάση την λειτουργία τους, τα μέλη της οικογένειας Bcl-2 μπορούν να χωριστούν σε προαποπτωτικές ή προεπιβιωτικές πρωτεΐνες. Προεπιβιωτικές πρωτεΐνες περιέχουν έως και τέσσερις Bcl-2 ομόλογες περιοχές.[30] Τα προαποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 μπορούν να υποδιαιρεθούν σε πρωτεΐνες πολλαπλών περιοχών που φέρουν 3 από τις 4 BH-περιοχές (BH1, BH2, BH3) και συμπεριλαμβάνουν τις Bax, Bak και Bok και εκείνων που περιέχουν μόνο τη BH3-περιοχή και αναφέρονται ως BH3-only πρωτεΐνες, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται οι Bim/Bod, Bid, Bmf, Puma/Bbc3, Noxa/APR, Bad, Bik/Nbk/Blk and Hrk/DP5. [29]

Οι Bcl-2 προεπιβιωτικοί συγγενείς, δηλαδή Bclxl, Mcl, Mclw και Bfl1/A1, είναι γνωστό ότι προστατεύουν τα κύτταρα από απόπτωση μέχρι να εξουδετερωθούν από BH3-only πρωτεΐνες (εικόνα 3.2).

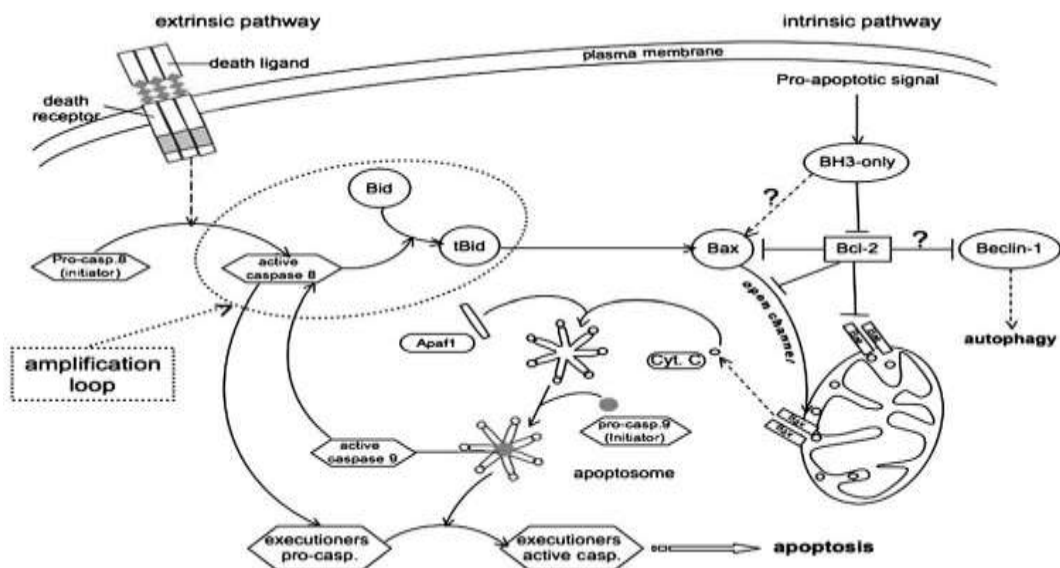
Οι BH3-only πρωτεΐνες προωθούν την απώλεια μιτοχονδριακής ακεραιότητας.[31] Η Puma και Bim μπορούν να συνδέονται με όλα τα προεπιβιωτικά μόρια με παρόμοια συγγένεια, ενώ οι Bad και Bmf μπορούν να συνδεθούν μόνο στην Bcl-2 και η Noxa μπορεί να δεσμευτεί μόνο σε Bfl1/A1 και Mcl1.[32] Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, το κύτταρο υφίσταται απόπτωση όταν όλα τα προ-επιβιωτικά μόρια Bcl2 που εκφράζονται σε αυτό το κύτταρο εξουδετερωθούν με BH-only πρωτεΐνες που έχουν ενεργοποιηθεί και επάγουν ένα δεδομένο σήμα απόπτωσης. Αυτό στη συνέχεια οδηγεί σε ενεργοποίηση του Bax ή/και του Bak επιτρέποντας τη διαπερατότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (MOMP), προκαλώντας την απελευθέρωση κασπασών που ενεργοποιούν πρωτεΐνες και άλλους μεσολαβητές κυτταρικού θανάτου, ενώ αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες όπως Bcl2 χρησιμεύουν στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων οι οποίες για να

διατηρήσουν την ακεραιότητα αντιτίθενται σε Bax και Bak(σχήμα 3.2). Επαγωγή του MOMP συσχετίζεται με ολιγομερισμό του Bax και Bak στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, η οποία είναι αντίθετη με αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως Bcl2 και Bclxl . [33,34]

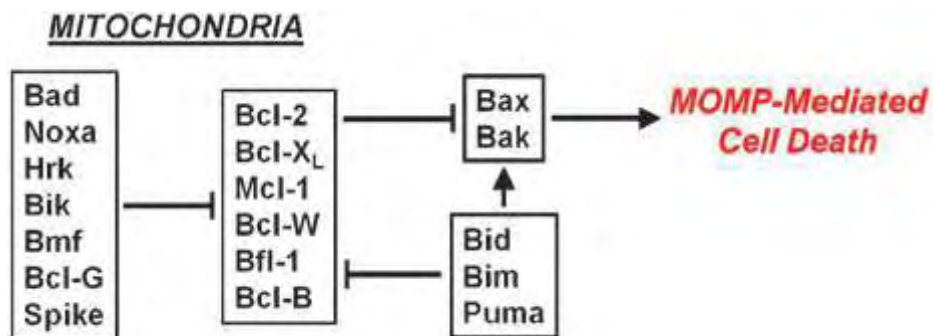
Έτσι, Bax και σχετικές δομικές προαποπτωτικές πρωτεΐνες (Bak, Bok) υποθέτουν ότι σχηματίζουν πρωτεϊνούχους και λιπιδικούς πόρους κατά τον ολιγομερισμό σε μιτοχονδριακές μεμβράνες, μόνες τους ή σε συνδυασμό με μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, επιτρέποντας έτσι την διαφυγή διάφορων αποπτωτικών πρωτεϊνών από αυτά τα οργανίδια. [35,36]

Μιτοχόνδρια επάγουν την απόπτωση με την απελευθέρωση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση κασπασών (για παράδειγμα κυτοχρώματος c) και εξουδετερώνουν ενδογενείς αναστολές των κασπασών, καθώς επίσης απελευθερώνουν αρκετούς κασπασό-ανεξάρτητους νεκρωτικούς διαμεσολαβητές κυτταρικού θανάτου (εικόνα 3.1). [36,37]

MOMP επίσης οδηγεί δευτερευόντως στην επεξεργασία του δραστικού οξυγόνου προκαλώντας υπεροξειδωση των λιπιδίων και βλάβη της μεμβράνης, η οποία επηρεάζει την κανονική ομοιόσταση των ιόντων, προκαλώντας κυτταρική διόγκωση και διάρρηξη της πλασματικής μεμβράνης, καθώς και την ρήξη των λυσοσωμάτων και την απελευθέρωση των υδρολυτικών ενζύμων που καταστρέφουν πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και λιπίδια.



Εικόνα 3.1: Η σηματοδότηση του Κυτταρικού θανάτου ρυθμίζεται από οικογένεια Bcl2 [126]



Εικόνα 3.2: Κυτταρικοί φαινότυποι των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 [127]

3.2 Beclin-1

Η Beclin-1 είναι μια πρωτεΐνη απαραίτητη για την έναρξη του σχηματισμού του αυτοφαγοσώματος.[38] Χρησιμεύει ως ένα ικρίωμα, το οποίο με την δέσμευση με άλλες πρωτεΐνες σχηματίζει δομές προαυτοφαγοσώματος. Η Beclin-1 ρυθμίζει τον συντονισμό της αυτοφαγίας και η μεμβρανική της διακίνηση εμπλέκεται σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες. Η Beclin-1 είναι μια αυτοφαγική πρωτεΐνη με BH3-only τομέα, η οποία εκφράζεται σε πολλούς ανθρώπινους ιστούς και εντοπίζεται κυρίως εντός των κυτταροπλασματικών δομών, συμπεριλαμβανομένων του ER, των μιτοχονδρίων, trans-golgi και περιπτυρηνικών μεμβρανών.[38,39] Η Beclin-1 περιέχει 3 εντοπισμένες δομικές περιοχές: μια περιοχή BH3 στο N-τελικό άκρο, έναν κεντρικό τομέα συσπειρωμένης σπείρας (CCD) και μια εξελικτικά συντηρημένη περιοχή (ECD). Αντιαποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 αλληλεπιδρούν με την περιοχή BH3 της Beclin-1.

3.2.1 Αναστολή της Αυτοφαγίας με Συμπλέγματα Beclin1-Bcl2

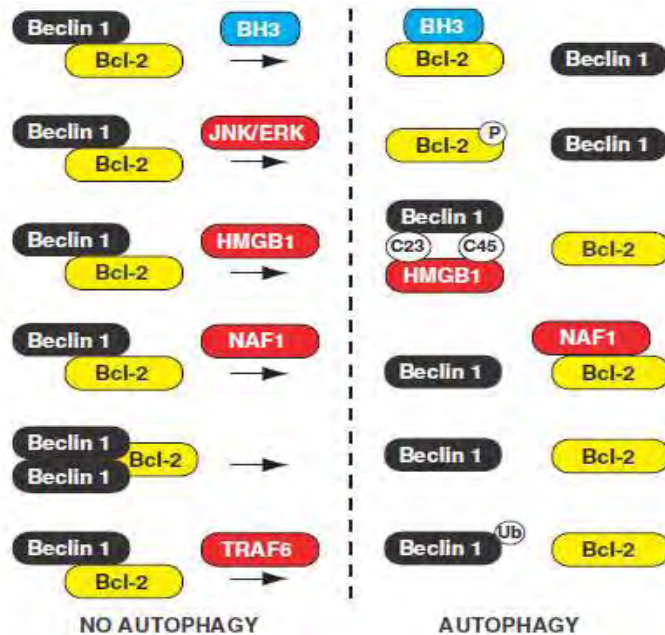
Μεταλλάξεις είτε στην BH3-only περιοχή εντός της Beclin1 ή στην περιοχή του BH3 εντός της Bcl2, διαταράσσουν το σύμπλοκο Beclin1-Bcl2, με αποτέλεσμα τη διέγερση της αυτοφαγίας. Η Beclin1 δεν μπορεί να εξουδετερώσει την αντιαποπτωτική λειτουργία της Bcl2, η οποία ασκείται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Αντίθετα, η Bcl2 μειώνει την προαυτοφαγική δραστηριότητα της Beclin-1.[40,41] Επί του παρόντος, υπάρχουν αρκετά διαφορετικά μέσα για τη ρύθμιση της διάσπασης Beclin-1 και Bcl-2 κατά την διάρκεια της αυτοφαγίας σε κύτταρα θηλαστικών (εικόνα 3.3).

Αυτά περιλαμβάνουν:

(1) Ανταγωνιστική μετατόπιση της περιοχής BH3 της Beclin-1 από άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2. Η Beclin-1 αλληλεπιδρά με τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες Bid, Bad and BNIP3, αλλά όχι με Bax και Bak. Επιπλέον, οι προαποπτωτικές BH3-only πρωτεΐνες, όπως BNIP3, Bad, Noxa, Puma, BimEL και Bik επάγουν αυτοφαγία [42]

(2) JNK1 και ERK διαμεσολαβούμενη φωσφορυλίωση της Bcl2 [6,7] ή DAPK διαμεσολαβούμενη φωσφορυλίωση της Beclin-1[43]

(3) Ανταγωνιστική μετατόπιση του Bcl-2 από άλλες πρωτεΐνες που συνδέονται με την Beclin1 όπως HMGB1, UVRAG ή Atg14L / Barkor, το οποίο πιθανότατα ξεκινά μια προγραμματισμένη αύξηση της αντι-αποπτωτικής κατάστασης, προωθεί την αυτοφαγία, και τελικά προστατεύει το κύτταρο κατά τη διάρκεια του κυτταρικού στρες. [45]



Εικόνα 3.3: Ρύθμιση της διάσπασης *Beclin 1* και *Bcl-2* κατά την διάρκεια της αυτοφαγίας [128]

3.2.2 Επικοινωνία μεταξύ Απόπτωσης και Αυτοφαγίας από *Beclin-1*:

Σε γενικές γραμμές, τα (BH3-only) μέλη της οικογένειας Bcl2 μπορούν να συνδεθούν-δεσμευτούν και να ανταγωνιστούν τις πρωτεΐνες προεπιβίωσης οδηγώντας σε αυξημένη απόπτωση. Ωστόσο, σε αντίθεση με άλλες γνωστές BH3-only πρωτεΐνες, η *Beclin1* δε λειτουργεί ως προ-αποπτωτικό μόριο, ακόμη και αν αυτό υπερεκφράζεται.

Οι Bcl2 πρωτεΐνες, δεδομένου ότι αλληλεπιδρούν με τη *Beclin1*, δε χάνουν το αντιαποπτωτικό τους δυναμικό.[46] Αντίθετα, η *Beclin-1* έχει ένα αντιαποπτωτικό ρόλο σε πολλές ρυθμίσεις, συμπεριλαμβανομένων του TRAIL, χημειοθεραπείας, ακτινοβολίας, ανοσοθεραπείας, στέρησης θρεπτικών, αναστολής αγγειογένεσης και υποξίας. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η *Beclin-1* αναστέλλει την απόπτωση δεν είναι ακόμη σαφής, αλλά μπορεί να σχετίζεται με ανεξέλεγκτη αυτοφαγία ως ένας προσαρμοζόμενος και μη βλαβερός μηχανισμός, καθαρίζοντας αποπτωτικά κύτταρα.

Οι πρωτεάσες κυστεΐνης/ασπαρτικού είναι κασπάσες που έχουν ένα κεντρικό ρόλο στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, είναι ενδιαφέρον ότι οι κασπάσες μπορεί να διασπάσουν *Beclin1* στην απόπτωση, με αυτό τον τρόπο καταστρέφουν την προ-αυτοφαγική δραστηριότητα.[47,48]

Η *Beclin1* εκφράζεται ανεπαρκώς σε φυσιολογικό κόλον και γαστρικό βλεννογόνο. Η υπερέκφραση σε καρκινώματα ήταν πολύ συχνή εκδήλωση.[49]

Τα υψηλότερα επίπεδα της έκφρασης σχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση σε ασθενείς με σταδίου III καρκίνο του παχέος εντέρου.[50]

Μια μελέτη σε ηπατοκυτταρικά καρκινώματα πρότεινε ότι η απώλεια *Beclin1* σε κύτταρα όγκου σχετίζεται επίσης με την υποτροπή της νόσου.[52]

Υπάρχει μια σχετική υποέκφραση της *Beclin1* σε καρκινώματα του μαστού σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς, γεγονός που υποδηλώνει ότι η

μειωμένη έκφραση των πρωτεϊνών αυτοφαγίας μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη ή την πρόοδο του καρκίνου του μαστού.[51]

Ως εκ τούτου, φαίνεται πως τόσο η υποέκφραση όσο και η υπερέκφραση της Beclin1 μπορεί να παρατηρηθούν σε καρκινώματα.

Υπάρχουν 4 διαφορετικά μοτίβα έκφρασης της Beclin1: υποέκφραση Beclin1, κανονικό-like πρότυπο, υπερέκφραση Beclin1. Η τελευταία κατηγορία διαιρείται σε 2 υπομονάδες περιορισμένης και εκτεταμένης υπερέκφρασης.

Η εκτεταμένη υπερέκφραση της Beclin1 ήταν σημαντικά συνδεδεμένη με τους ιστολογικούς δείκτες της επιθετικότητας του όγκου, όπως κομβική εμπλοκή, υψηλός ιστολογικός βαθμός και αγγειακή εισβολή. Ανάλυση επιβίωσης επιβεβαίωσε απειλητικό προγνωστικό ρόλο της εκτεταμένης υπερέκφρασης της Beclin1, αλλά παρόμοια κακή επιβίωση επίσης δείχθηκε σε όγκους με απώλεια έκφρασης της Beclin1.

Η διατήρηση της έκφρασης της Beclin1 μπορεί κατ' ανάγκη να σχετίζεται με καλή πρόγνωση.

Η υπερέκφραση της Beclin1 μπορεί να είναι ένας άμεσος δείκτης της επιθετικότητας του όγκου. Εκτενής υπερέκφραση συνδέθηκε με προς τα πάνω ρύθμιση HLF1a και LDHS, υποδεικνύοντας υποοξικήτητα όγκων και ένα όξινο περιβάλλον εντός του όγκου.

Προς τα πάνω ρύθμιση της Beclin1 μπορεί να είναι μια απάντηση στις δυσμενείς εντός του όγκου απαιτητικές συνθήκες προκειμένου να ενταθεί η αυτοφαγική δραστηριότητα για τα καρκινικά κύτταρα για να ανακυκλώσουν πρωτεΐνες και κατεστραμμένα οργανίδια για να επιβιώσουν.[53]

Το συμπέρασμα είναι ότι η Beclin1 έχει ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την μετάσταση ανθρώπινου ορθοκολικού καρκίνου. Η απώλεια έκφρασης πιθανόν να σχετίζεται με αλληλόμορφες απώλειες του γονιδίου ή microRNA ρυθμιστική δραστηριότητα όπως προτείνεται στη βιβλιογραφία και να καθορίζει κακή πρόγνωση προωθώντας αντι-αποπτωτικά μονοπάτια, ενώ η υπερέκφραση της πρωτεΐνης που συνδέεται με υποξία όγκου και οξύτητα καθορίζει επίσης υπομονάδες των όγκων με μια επιθετική κλινική συμπεριφορά.

3.3 LC3

Μια λιπιδιακή μορφή του LC3, LC3 II, έχει δειχθεί ότι είναι ένας δείκτης αυτοφαγοσώματος στα θηλαστικά και έχει χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της αυτοφαγίας σε νευροεκφυλιστικές και νευρομυϊκές παθήσεις, ογκογένεση και βακτηριακές και ιογενείς λοιμώξεις.[54,55,56,57,58,59,60,61]

Πολλά ομόλογα θηλαστικών των Atg γονιδίων του ζυμομύκητα έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι μοριακοί μηχανισμοί της αυτοφαγίας είναι συντηρημένοι από τις ζύμες μέχρι τα θηλαστικά. Τα περισσότερα από τα οποία χαρακτηρίζονται από τα γονιδιακά προϊόντα ATG, συμπεριλαμβανομένων Atg3, Atg5, Atg10, Atg12, και LC3 εμπλέκονται σε 2 τροποποιήσεις σαν ουβικουιτινίωση των πρωτεϊνών στόχων, Atg12-σύζευξη και LC3-τροποποίηση τα οποία είναι απαραίτητα για την δυναμική διαδικασία σχηματισμού αυτοφαγοσώματος.[62,63,64,65,66,67]

Η Atg12 σύζευξη είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του προαυτοφαγοσώματος, ενώ η LC3 τροποποίηση είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος.[68,69]

Η Atg12 ενεργοποιείται από ένα E1-like ένζυμο Atg7 και μεταφέρεται στο E2-like ένζυμο Atg10 και συζευγνύεται με Atg5 για να σχηματίσει ένα πρόδρομο αυτοφαγόσωμα (εικόνα 3.4).[70,71,72,73,74]

Pro-LC3 επεξεργάζεται στη μορφή του κυτταροπλάσματος, LC3I, εκθέτοντας ένα καρβοξύλιο Gly.[75] LC3I ενεργοποιείται επίσης από Atg7, μεταφέροντας την σε Atg3, ένα δεύτερο E2-like ένζυμο και τροποποιείται σε μια συνδεδεμένη μεμβρανική μορφή, LC3II (εικόνα 3.5).[64,65] LC3 II είναι εντοπισμένη σε προ-αυτοφαγοσώματα και αυτοφαγοσώματα, καθιστώντας αυτή την πρωτεΐνη ένα αυτοφαγικό δείκτη. Ακολούθως, μετά την συγχώνευση των αυτοφαγοσωμάτων με τα λυσοσώματα, η ενδο-αυτοφαγοσωμική LC3 αποικοδομείται από τα λυσοσωματικά υδρολυτικά ένζυμα. Η Atg12 και LC3 τροποποίηση συνδέονται μεταξύ τους, και τα 2 E-like ένζυμα είναι σημαντικά στη ρύθμιση των αντιδράσεων τροποποίησης-ουβικουπινίωσης-like κατά την διάρκεια της αυτοφαγίας.[76]

Η έκφραση του LC3 μειώνεται σε ανθρώπινους καρκινικούς ιστούς πνεύμονα σε σύγκριση με τους ομόλογους φυσιολογικούς ιστούς, αλλά αυτή η υποέκφραση δεν σχετίζεται σημαντικά με κλινικοπαθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά.[77]

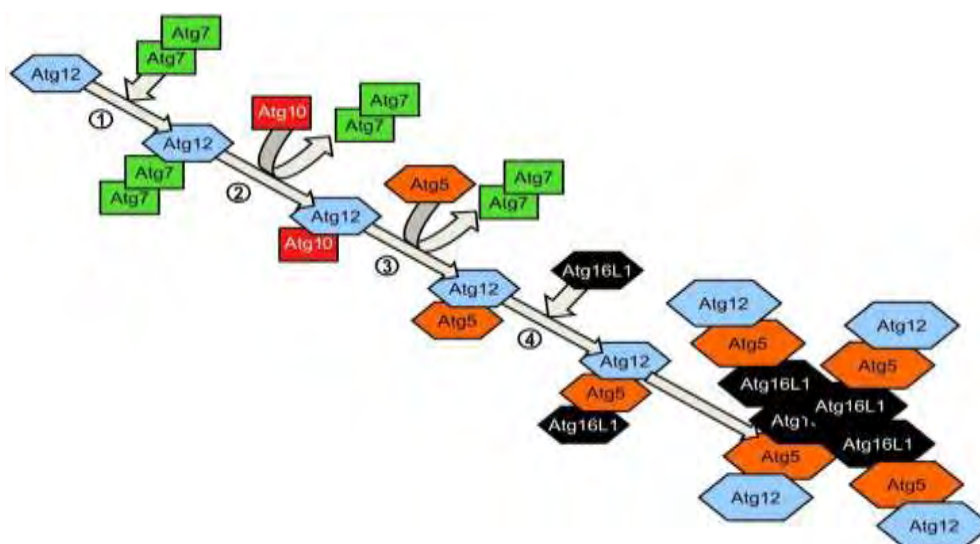
Η έκφραση αυξάνεται σημαντικά σε ιστούς CRC σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς σε επίπεδο mRNA και πρωτεϊνών.[78]

Τα διακριτά επίπεδα έκφρασης σε CRC και καρκίνο του πνεύμονα μπορεί να συσχετίζονται με τον τύπο του καρκίνου.[79]

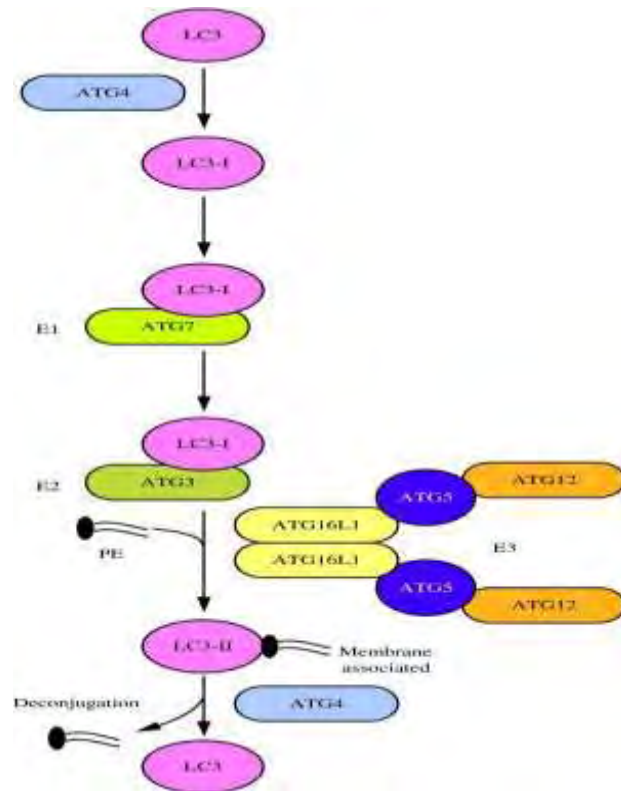
Ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι:

Η υπερέκφραση του LC3 συσχετίστηκε με μικρότερη διαφοροποίηση των κυττάρων.[78]

Χαμηλά επίπεδα LC3 σε CRC είναι ένας δείκτης θετικής πρόγνωσης.[80]



Εικόνα 3.4: Το σύστημα σύζευξης του συμπλόκου Atg5-Atg12 [129]



Εικόνα 3.5: Το σύστημα σύζευξης της LC3 [130]

Β.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Υλικά

4.1.1 Χημικά

Trizol: Invitrogen, Life Technology

iQ SYBR – Green Supermix: Biorad

RNaseOUT (Recombinant Ribonuclease Inhibitor): Invitrogen

Superscript II Reverse Transcriptase: Invitrogen

5x First Strand Buffer: Invitrogen

DNTPs για RT-PCR: Promega

Τυχάιοι primers (Random Primers): Promega

4.1.2 Εκκινητές

Real – time PCR

GAPDH F: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3'

R: 5'-CATGGGTGGAATCATATTGGAA-3'

NOXA F: 5'-TGGAAGTCGAGTGTGCTACTCAAC-3'

R: 5'-CAGAAGAGTTTGGATATCAGATTCAGA-3'

BECLIN-1 F: 5'-GGCTGAGAGACTGGATCAGG-3'
R: CTGCGTCTGGGCATAACG-3'

LC3 F: 5'-GAGAAGCAGCTTCCTGTTCTGG-3'
R: 5'-GTGTCCGTTACCAACAGGAAG-3'

Οι παραπάνω εκκινητές επιλέχθηκαν σύμφωνα με δημοσιευμένες μελέτες.

4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1 Μέθοδοι μελέτης RNA

Κλινικά δείγματα

Χρησιμοποιήθηκαν 108 κλινικά δείγματα ιστού από ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και 108 κλινικά δείγματα από φυσιολογικό ιστό ασθενών, κατόπιν αφαίρεσης μέρους του παχέος εντέρου εκατέρωθεν του νεοπλάσματος. Τα δείγματα προσφέρθηκαν από το Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Γεώργιος Γεννηματάς” και οι ασθενείς ενημερώθηκαν. Από τα δείγματα αυτά απομονώθηκε RNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη έκφρασης των επιπέδων Noxa, Beclin-1 και LC3.

Απομόνωση RNA από κύτταρα

Το RNA απομονώνεται από τα κύτταρα με το αντιδραστήριο TRIZOL σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Invitrogen.

1. Τα δείγματα-ιστοί που βρίσκονται στην κατάψυξη μεταφέρονται σε φιαλίδιο bizoux αφού προσθέσουμε 2ml TRIZOL. Τα δείγματα ομογενοποιούνται μέσα στο Trizol για 1 – 2 min, μένουν σε θερμοκρασία δωματίου για 5min και στη συνέχεια κάθε ομογενοποιημένο δείγμα χωρίζεται σε 2 eppendorf χωρητικότητας 1,5ml.

2. Ακολουθεί προσθήκη 200μl χλωροφορμίου στα erpendorf. Αφού τα δείγματα αναδευτούν σε vortex ανά παλμούς για λίγα δευτερόλεπτα επωάζονται για 3-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, φυγοκεντρώνται για 20 λεπτά στα 12.000g. Κατ' αυτό τον τρόπο το μίγμα χωρίζεται σε δυο φάσεις, την οργανική και την υδατική. Η οργανική – φαινόλης, χλωροφόρμιου – φάση περιέχει τις πρωτεΐνες, η ενδιάμεση φάση που χωρίζει την οργανική από την υδατική DNA και η ανώτατη φάση ή υδατική φάση περιέχει το RNA.
3. Μεταφέρεται η υδατική φάση σε νέο erpendorf και ακολουθεί προσθήκη ισοπροπανόλης, η ποσότητα της οποίας είναι ίση με την ποσότητα(ml) της υδατικής φάσης. Τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και φυγοκεντρώνται για 20 λεπτά στα 12.000g.
4. Μετά την φυγοκέντριση παίρνουμε το RNA σε ίζημα. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε με προσθήκη 1ml αιθανόλης. Ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος κα φυγοκέντριση για 4 λεπτά στα 7.500g.
5. Αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο με προσοχή, τα δείγματα αφήνονται να στεγνώσουν για 10 λεπτά και κατόπιν προστίθεται απεσταγμένο νερό ανάλογα με την ποσότητα του RNA-ίζημα. Αναδεύονται και το RNA μετράται με φωτόμετρο στα 260nm. Ο τύπος υπολογισμού της συγκέντρωσης προκύπτει από το νόμο του Beer και είναι $C = A_{260} \times 40$ x βαθμό διάλυσης.

PCR αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse transcription – PCR, RT – PCR) σε RNA από κλινικά δείγματα

Η αντίστροφη μεταγραφή, δηλαδή η σύνθεση του cDNA (complementary DNA) γίνεται στο Thermal Cycler και είναι η εξής:

1. Η ποσότητα του RNA που επιθυμούμε (συνήθως μg) επωάζεται στους 60oC για 2 min και στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρονται σε πάγο για 5 min. Η επώαση αυτή γίνεται για πλήρη αποδιάταξη όλων των μορφών του RNA, διότι το ριβοσωμικό, το μεταφορικό και όλες οι μορφές RNA βρίσκονται σε μορφή διπλής έλικας μεταξύ τους σε αντίθεση με το αγγελιοφόρο RNA (mRNA) που βρίσκεται πάντα σε γραμμική μορφή. Με αυτό τον τρόπο κάνουμε cDNA για ολικό RNA του κυτάρου.
2. Στη συνέχεια προστίθεται: 1μl εκκινητή oligo-dT, 1μl dNTPs, 1μl τυχαίων εκκινητών και αποστειρωμένο νερό μέχρι όγκου 12μl.
3. Το μείγμα επωάζεται στους 65 oC για 5min και μεταφέρουμε ξανά στο πάγο για 8 min. Σε αυτή την θερμοκρασία αποδιατάσσουμε τους εκκινητές που τυχόν δημιουργούν δίκλωνες δομές μεταξύ τους.
4. Στη συνέχεια προστίθενται: 4μl First-Stand Buffer (5x), 2μl DTT, 1μl

RnaseOUT και το μίγμα επωάζεται στους 42°C για 2 min και μεταφέρεται ξανά στον πάγο. Έτσι γίνεται επίτευξη της προσκόλλησης των εκκινητών στο RNA πριν τον πολυμερισμό.

5. Τέλος προστίθεται 1μl SuperScript II και αφού το δείγμα αναδευτεί επωάζεται στους 42°C για 1 ώρα, όπου γίνεται ο πολυμερισμός του cDNA, ενώ ακολουθεί απενεργοποίηση της αντίδρασης με θέρμανση στους 70°C για 15 min.
6. Τα δείγματα αραιώνονται με αποστειρωμένο νερό συνήθως μέχρι 100 μl (εξαρτάται από την ποσότητα του RNA που χρησιμοποιείται).

Real time PCR σε cDNA από κλινικά δείγματα

Η μέθοδος της PCR σε πραγματικό χρόνο είναι μια παραλλαγή της κλασικής PCR και βασίζεται στην ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR με φθορίζοντα μόρια και στη μέτρηση της εκπομπής του παραγόμενου φθορισμού κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Μια αντίδραση PCR θεωρείται ότι αποτελείται από τρεις φάσεις, την πρώιμη φάση “υποβάθρου” ή φάση θορύβου, τη εκθετική φάση ή λογαριθμική φάση, και την φάση “κορεσμού”. Η φάση θορύβου διαρκεί έως ότου το σήμα του προϊόντος PCR είναι μεγαλύτερο από το σήμα του υποβάθρου του συστήματος. Η φάση της εκθετικής ανάπτυξης ξεκινά μόλις συσσωρευτεί επαρκής ποσότητα προϊόντος, έτσι ώστε να είναι ανιχνεύσιμο πάνω από το θόρυβο, και ολοκληρώνεται όταν η απόδοση της αντίδρασης μειωθεί, καθώς η αντίδραση εισέρχεται στην φάση “κορεσμού”. Η PCR σε πραγματικό χρόνο βασίζεται στην καταγραφή του φθορισμού που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, ο οποίος και αποτελεί δείκτη παραγωγής αντιγράφων σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Η λήψη του σήματος γίνεται με ανίχνευση στην λογαριθμική φάση της αντίδρασης. Το λαμβανόμενο σήμα αυξάνει ευθέως ανάλογα με την ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης PCR. Με την καταγραφή της ποσότητας του εκπεμπόμενου φθορισμού σε κάθε κύκλο είναι δυνατόν να παρακολουθείται η αντίδραση κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης, όπου η πρώτη σημαντική αύξηση του προϊόντος σχετίζεται με την αρχική ποσότητα του εκμαγείου-στόχου. Δηλαδή, ο κύκλος όπου κάθε αντίδραση δίνει πρώτη φορά σήμα μεγαλύτερο του σήματος υποβάθρου εξαρτάται από την ποσότητα DNA-στόχου που υπήρχε στο δείγμα στην αρχική αντίδραση.

Στην παρούσα μελέτη το σύστημα ανίχνευσης του προϊόντος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SYBR Green. Το SYBR Green είναι μια χρωστική που προσδένεται στη διπλή έλικα του DNA. Θεωρείται ότι εισέρχεται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA και με την σύνδεση του σε αυτό ο φθορισμός του αυξάνεται μέχρι και 100 φορές. Έτσι κατά την αύξηση του προϊόντος καθώς προχωρά η αντίδραση της PCR αυξάνει και το σήμα φθορισμού. Η χρωστική αυτή παρ' όλο που είναι σταθερή και δεν απαιτεί σχεδιασμό και βελτιστοποίηση, το γεγονός ότι συνδέεται με οποιοδήποτε δίκλωνο DNA αποτελεί μειονέκτημα καθώς θα δώσει σήμα και για μη ειδικό προϊόν. Στη

παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε σχετικός ποσοτικός προσδιορισμός, δηλαδή χρησιμοποιήθηκε γονίδιο αναφοράς ως προς το οποίο προσδιορίζεται η ποσότητα του γονιδίου-στόχου, οπότε και τυχόν σφάλματα που μπορεί να γίνονται κατά τη διάρκεια του προσδιορισμού γίνονται και στα δυο γονίδια.

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ειδικό για PCR πλακίδιο 96 θέσεων, σε κάθε μια από τις οποίες χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα:

- 5μl iQ SYBR Green Supermix
- 0.2μl από τον κάθε εκκινητή (forward και reverse) αρχικής συγκέντρωσης 10μM.
- 2μl cDNA
- 2.6μl νερού προς συνολικό όγκο αντίδρασης 10μl

Το πλακίδιο τοποθετείται σε ειδικό μηχάνημα για Real time – PCR (Bio – Rad iCycler) και η αντίδραση γίνεται για 45 κύκλους. Οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται είναι: 94oC για 3 λεπτά, 95oC για 30 δευτερόλεπτα προς πλήρη αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, 60oC για 1 λεπτό προς πρόσδεση των εκκινητών στο DNA και πολυμερισμό της νεοσυντηθέμενης αλυσίδας από την DNA πολυμεράση (αντίδραση ενός σημείου) και 55oC όπου γίνεται τήξη των προϊόντων. Το γονίδιο που χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς για την ποσοτικοποίηση είναι το GAPDH.

4.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων στα πειράματα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα MedCalc Software (Ostend, Belgium) και οι διαφορές αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας t-test, Mann Whitney test και Wilcoxon test. Χρησιμοποιήσαμε επίσης και την ανάλυση ROC για να αξιολογήσουμε αν μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το κάθε γονίδιο μεμονωμένα ή συνδυαστικά ως διαφοροδιαγνωστικό δείκτη. Τιμές με $p\text{-value} < 0.05$ χαρακτηρίστηκαν στατιστικά σημαντικές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

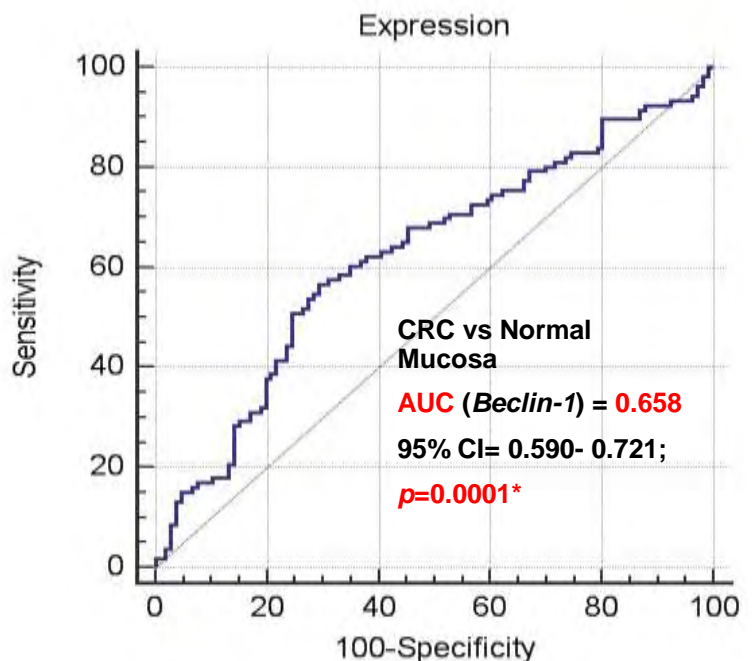
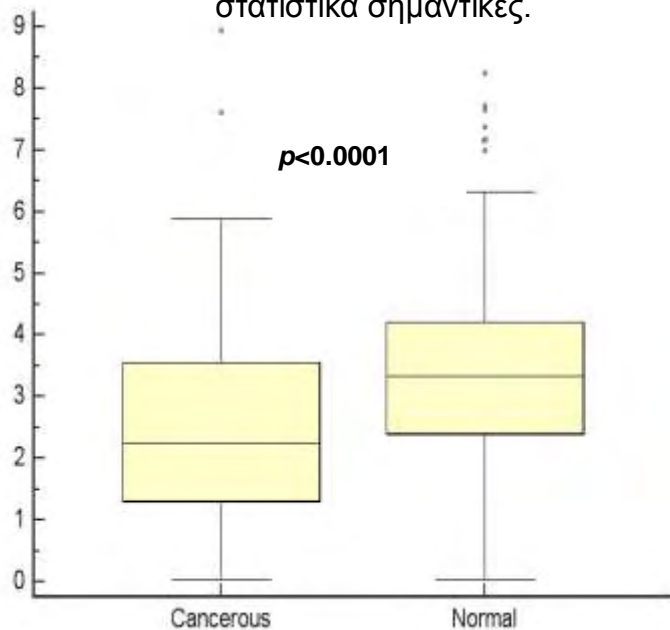
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα 70 από τα 108 κλινικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, έχουν αναλυθεί, προηγουμένως στο εργαστήριο για τα επίπεδα έκφρασης mRNA των πιο κάτω γονιδίων, καθώς και για την παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο KRAS (σε όλα τα δείγματα) από τα μέλη του εργαστηρίου Μαργαρίτα Βλάσση και Βιβή Κοσμίδου.

5.1 Σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA των γονιδίων Beclin-1 και LC3 σε κλινικά δείγματα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των επιπέδων έκφρασης των mRNA των γονιδίων Beclin-1 και LC3 έγινε σε 108 κλινικά δείγματα ιστού από ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου καθώς και στα αντίστοιχα φυσιολογικά τους. Τα επίπεδα έκφρασης των τριών γονιδίων ελέγχθηκαν μέσω real-time PCR, ώστε να δειχθεί η κλινική σημασία τους στην ανάπτυξη του καρκίνου. (διαγράμματα 5.1 και 5.3)

Στη συνέχεια τα αποτελέσματα των μετρήσεων στα πειράματα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα MedCalc Software (Ostend, Belgium) και οι διαφορές αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας t-test, Mann Whitney test και Wilcoxon test. Χρησιμοποιήσαμε επίσης και την ανάλυση ROC για να αξιολογήσουμε αν μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το κάθε γονίδιο μεμονωμένα ή συνδυαστικά ως διαφοροδιαγνωστικό δείκτη. Τιμές με $p\text{-value} < 0.05$ χαρακτηρίστηκαν στατιστικά σημαντικές.

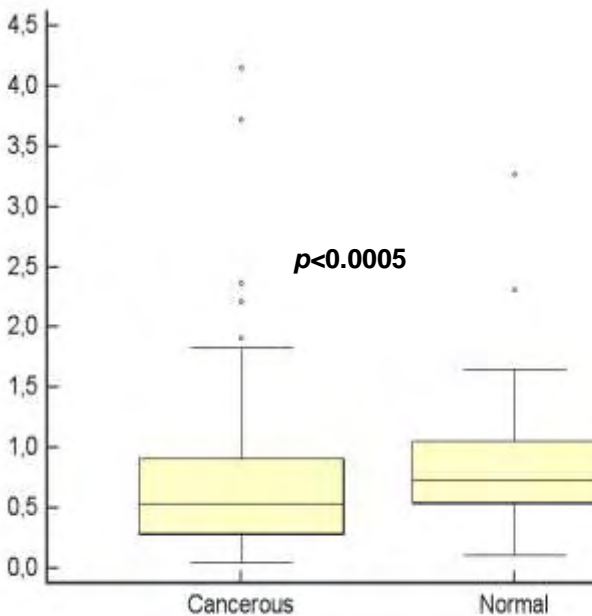


Διάγραμμα 5.1

Σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA του Beclin-1 στα κλινικά δείγματα καρκίνου του παχέος εντέρου σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα ($p\text{Value}<0.05$).

Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης του mRNA του Beclin-1 έγινε με real-time PCR χρησιμοποιώντας τη σχετική μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (όπου $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq (Cq_{\text{Beclin-1}} - Cq_{\text{GAPDH}})_{\text{παθολογικά}} - \Delta Cq (Cq_{\text{Beclin-1}} - Cq_{\text{GAPDH}})_{\text{φυσιολογικά}}$).

Το γονίδιο GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό γονίδιο αναφοράς.



Διάγραμμα 5.3

Σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA του LC3 στα κλινικά δείγματα καρκίνου του παχέος εντέρου σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα ($p\text{Value}<0.05$).

Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης του mRNA του LC3 έγινε με real-time PCR χρησιμοποιώντας τη σχετική μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (όπου $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq (Cq_{\text{LC3}} - Cq_{\text{GAPDH}})_{\text{παθολογικά}} - \Delta Cq (Cq_{\text{LC3}} - Cq_{\text{GAPDH}})_{\text{φυσιολογικά}}$).

Το γονίδιο GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό γονίδιο αναφοράς.

Διάγραμμα 5.2

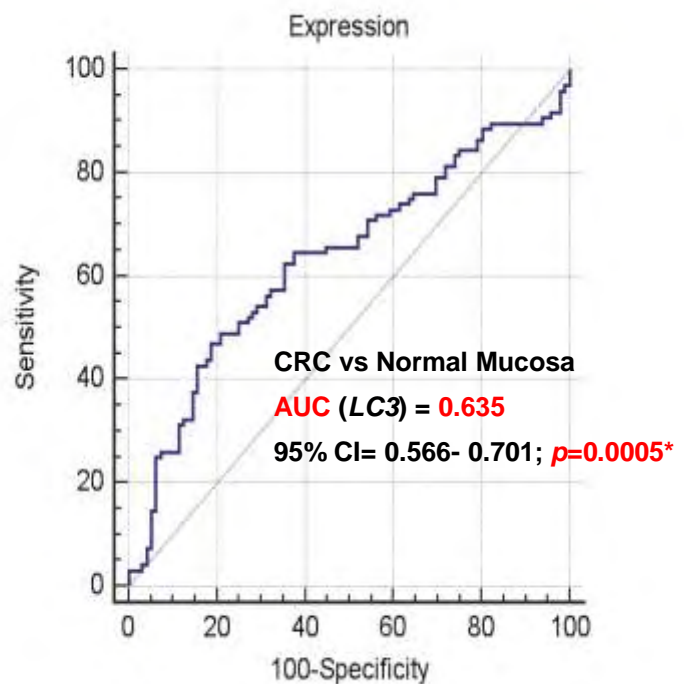
Η επιφάνεια κάτω από την ROC καμπύλη είναι μετρική της ακρίβειας του μοντέλου. Όσο πιο κοντά στη διαγώνιο τόσο λιγότερο ακριβές είναι το μοντέλο.

AUC=0.5 καμιά διαγνωστική αξία

AUC=1.0 μοντέλο με τέλεια ακρίβεια

Το AUC πρέπει να είναι $0.6 < \text{AUC}$ για να υπάρχει διαφοροδιαγνωστική αξία του γονιδίου Beclin-1 μεταξύ παθολογικών και φυσιολογικών στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Το Beclin-1, μπορεί να θεωρηθεί ένας καλός διαφοροδιαγνωστικός δείκτης αφού έχουμε ένα καλό AUC ($\text{AUC} > 0.6$) και ένα πολύ καλό p-value ($p\text{Value} < 0.05$).



Διάγραμμα 5.4

Η επιφάνεια κάτω από την ROC καμπύλη είναι μετρική της ακρίβειας του μοντέλου. Όσο πιο κοντά στη διαγώνιο τόσο λιγότερο ακριβές είναι το μοντέλο.

AUC=0.5 καμιά διαγνωστική αξία

AUC=1.0 μοντέλο με τέλεια ακρίβεια

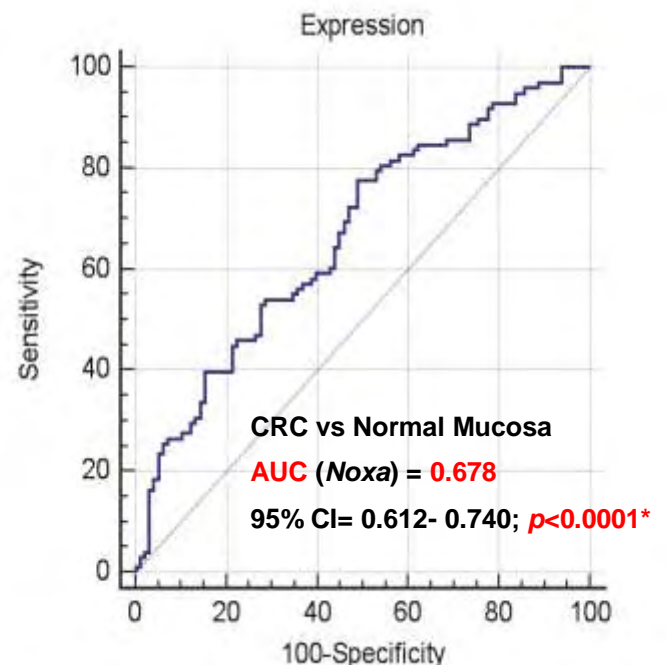
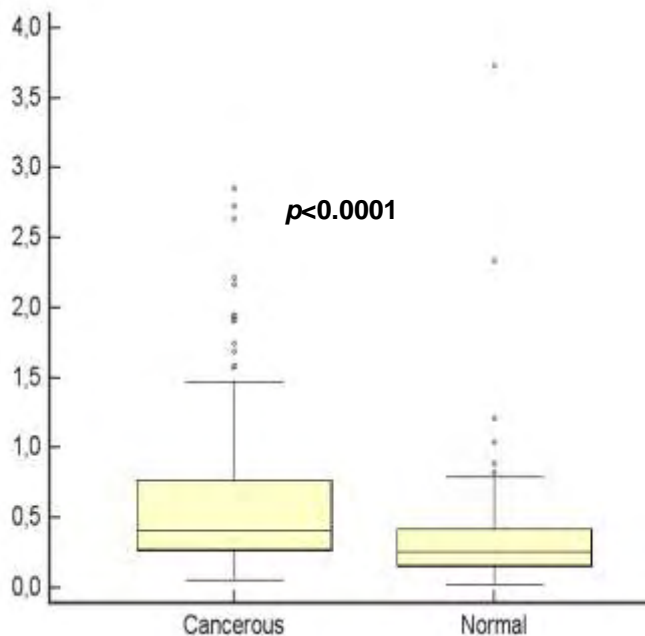
Το AUC πρέπει να είναι $0.6 < \text{AUC}$ για να υπάρχει διαφοροδιαγνωστική αξία του γονιδίου LC3 μεταξύ παθολογικών και φυσιολογικών στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Το LC3, μπορεί να θεωρηθεί ένας καλός διαφοροδιαγνωστικός δείκτης αφού έχουμε ένα καλό AUC ($\text{AUC} > 0.6$) και ένα πολύ καλό p-value ($p\text{Value} < 0.05$).

Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA των γονιδίων Beclin-1 και LC3 των παθολογικών δειγμάτων καρκίνου του παχέος εντέρου σε σχέση με τα επίπεδα των φυσιολογικών δειγμάτων. Έτσι, τα βιομόρια αυτά, μπορούν να χαρακτηριστούν καρκινικοί δείκτες, καθώς βρίσκονται υποεκφρασμένα σε βιολογικά δείγματα (ιστός) με κακοήγη εξαλλαγή. (5.2 και 5.4)

5.2 Σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου Noxa σε κλινικά δείγματα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου.

Στα ίδια κλινικά δείγματα έγινε ανάλυση των επιπέδων έκφρασης mRNA του γονιδίου Noxa και συγκρίθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του μεταξύ των παθολογικών και των φυσιολογικών δειγμάτων. (διάγραμμα 5.5)



Διάγραμμα 5.5

Σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA του Noxa στα κλινικά δείγματα καρκίνου του παχέος εντέρου σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα (p Value<0.05).

Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης mRNA του Noxa έγινε με real-time PCR χρησιμοποιώντας τη σχετική μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (όπου $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq (Cq_{Noxa} - Cq_{GAPDH})_{\text{παθολογικά}} - \Delta Cq (Cq_{Noxa} - Cq_{GAPDH})_{\text{φυσιολογικά}}$. Το γονίδιο GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό γονίδιο αναφοράς

Διάγραμμα 5.6

Η επιφάνεια κάτω από την ROC καμπύλη είναι μετρική της ακρίβειας του μοντέλου. Όσο πιο κοντά στη διαγώνιο τόσο λιγότερο ακριβές είναι το μοντέλο.

AUC=0.5 καμιά διαγνωστική αξία

AUC=1.0 μοντέλο με τέλεια ακρίβεια

Το AUC πρέπει να είναι $0.6 < AUC < 1$ για να υπάρχει διαφοροδιαγνωστική αξία του γονιδίου Noxa μεταξύ παθολογικών και φυσιολογικών στον καρκίνο του παχέος εντέρου

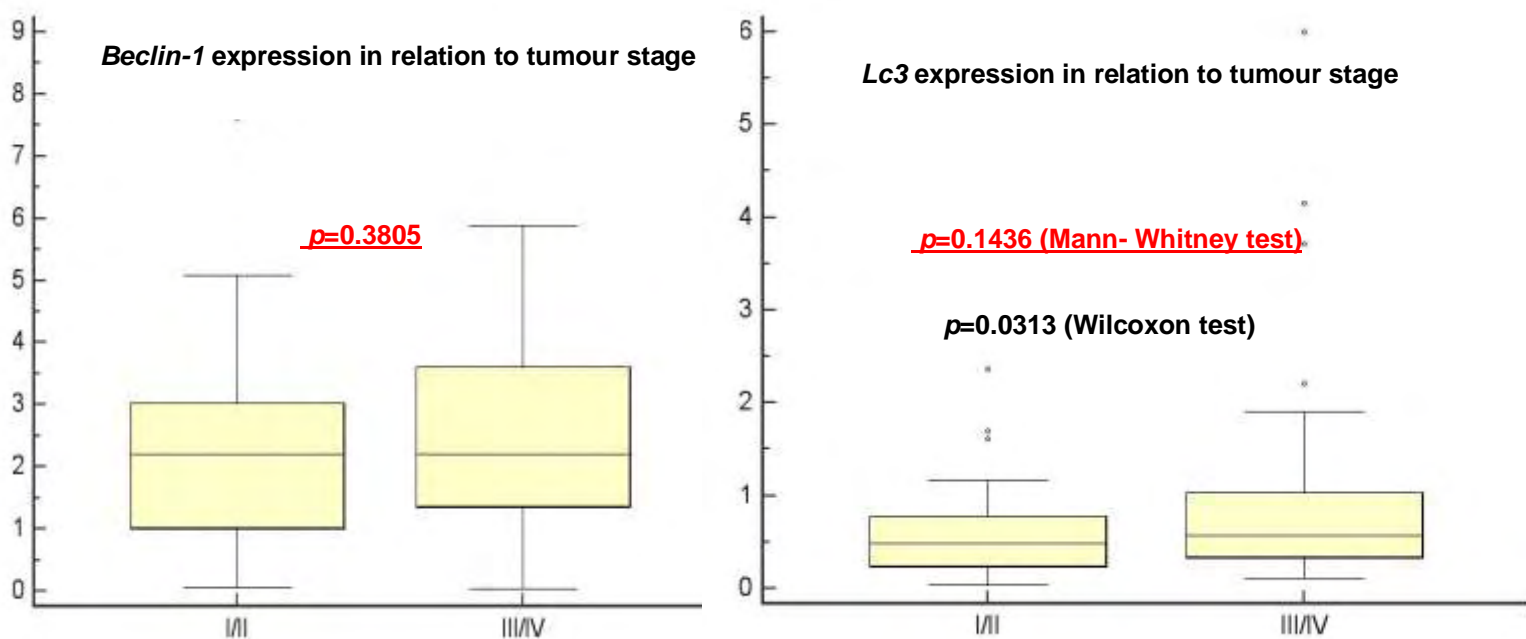
Το Noxa, μπορεί να θεωρηθεί ένας καλός διαφοροδιαγνωστικός δείκτης αφού έχουμε ένα καλό AUC ($AUC > 0.6$) και ένα πολύ καλό p -value (p Value<0.05)

Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου Noxa στα παθολογικά κλινικά σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα, καθιστώντας το βιομόριο αυτό, πιθανό καρκινικό δείκτη τουλάχιστον για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, όπου η υπερέκφραση του σε βιολογικά δείγμα(ιστό) σχετίζεται με την παρουσία κακοήθειας. (5.6)

5.3 Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των mRNA των γονιδίων Beclin-1, LC3 και Noxa με την σταδιοποίηση TNM στους ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου.

Εφ' όσον τα επίπεδα έκφρασης των mRNA των γονιδίων Beclin-1/ LC3 και Noxa εμφανίστηκαν σημαντικά μειωμένα και αυξημένα αντιστοίχως, στα κλινικά δείγματα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου, συσχετίστηκαν περαιτέρω με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Αρχικά έγινε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης mRNA των γονιδίων Beclin-1, LC3 και Noxa με την σταδιοποίηση TNM. (διάγραμμα 5.7 και 5.8)



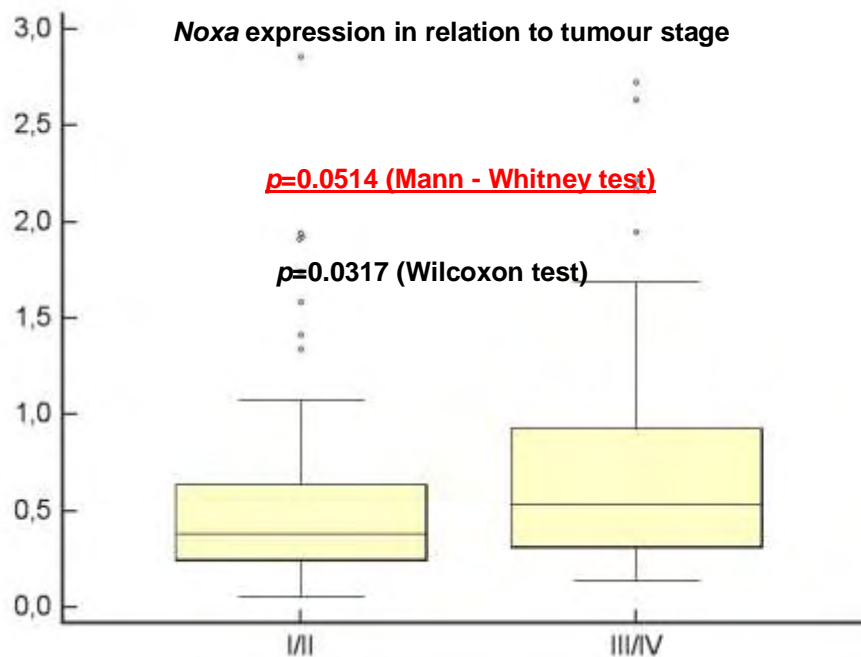
Διάγραμμα 5.7

Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης mRNA των γονιδίων Beclin-1 και LC3 με την TNM σταδιοποίηση.

Καμιά διαφορά των επιπέδων έκφρασης mRNA των γονιδίων Beclin-1 και LC3 στα κλινικά δείγματα καρκίνου του παχέος εντέρου είτε ο όγκος βρίσκεται στο στάδιο I/II είτε ο όγκος βρίσκεται στο στάδιο III/IV ($p\text{Value} > 0.05$).

Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης mRNA του Noxa έγινε με real-time PCR χρησιμοποιώντας τη σχετική μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (όπου $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq (\text{Cq}_{LC3 \text{ ή } Beclin1} - \text{Cq}_{GAPDH})_{\text{παθολογικά}} - \Delta Cq (\text{Cq}_{LC3 \text{ ή } Beclin1} - \text{Cq}_{GAPDH})_{\text{φυσιολογικά}}$).

Το γονίδιο GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό γονίδιο αναφοράς



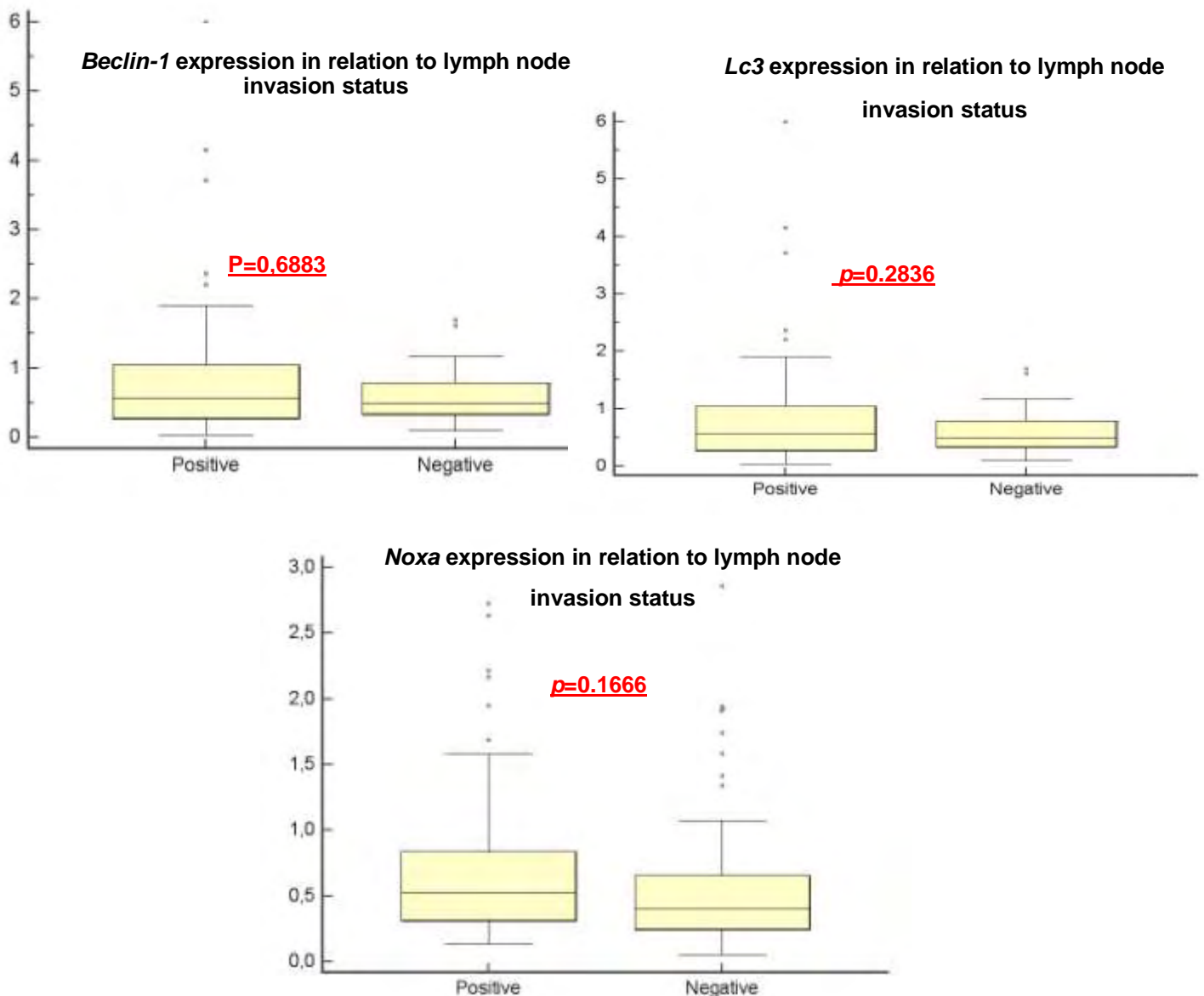
Διάγραμμα 5.8

Σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA του Noxa στα κλινικά δείγματα καρκίνου του παχέος εντέρου όταν ο όγκος βρίσκεται στο στάδιο III/IV σε σύγκριση με το στάδιο I/II ($p\text{Value}<0.05$).

Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης mRNA του Noxa έγινε με real-time PCR χρησιμοποιώντας τη σχετική μέθοδο $2^{-\Delta\Delta C}$ (όπου $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq (Cq_{\text{Noxa}} - Cq_{\text{GAPDH}})_{\text{παθολογικά}} - \Delta Cq (Cq_{\text{Noxa}} - Cq_{\text{GAPDH}})_{\text{φυσιολογικά}}$).

Το γονίδιο GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό γονίδιο αναφοράς

Στη συνέχεια, αφού τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με την παρουσία ή απουσία μετάστασης σε λεμφαδένες συγκρίθηκαν τα επίπεδα έκφρασης για τα τρία γονίδια, ώστε να συσχετιστούν με το φαινόμενο της μετάστασης. Με εφαρμογή t-test, Mann Whitney test και Wilcoxon test, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων Beclin-1, LC3 και Noxa δεν συσχετίζονται με παρουσία μετάστασης ($P>0.05$). (διάγραμμα 5.9)



Διάγραμμα 5.9

Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης mRNA των γονιδίων Beclin-1, LC3 και Noxa με την μετάσταση σε λεμφαδένες.

Καμιά διαφορά των επιπέδων έκφρασης mRNA των γονιδίων Beclin-1, LC3 και Noxa στα κλινικά δείγματα καρκίνου του παχέος εντέρου είτε ο όγκος είναι θετικός στην μετάσταση είτε ο όγκος είναι αρνητικός στη μετάσταση. ($p\text{Value} > 0.05$)

Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης mRNA των γονιδίων έγινε με real-time PCR χρησιμοποιώντας τη σχετική μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (όπου $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq (\text{Cq Noxa} - \text{Cq GAPDH})_{\text{παθολογικά}} - \Delta Cq (\text{Cq Noxa} - \text{Cq GAPDH})_{\text{φυσιολογικά}}$).

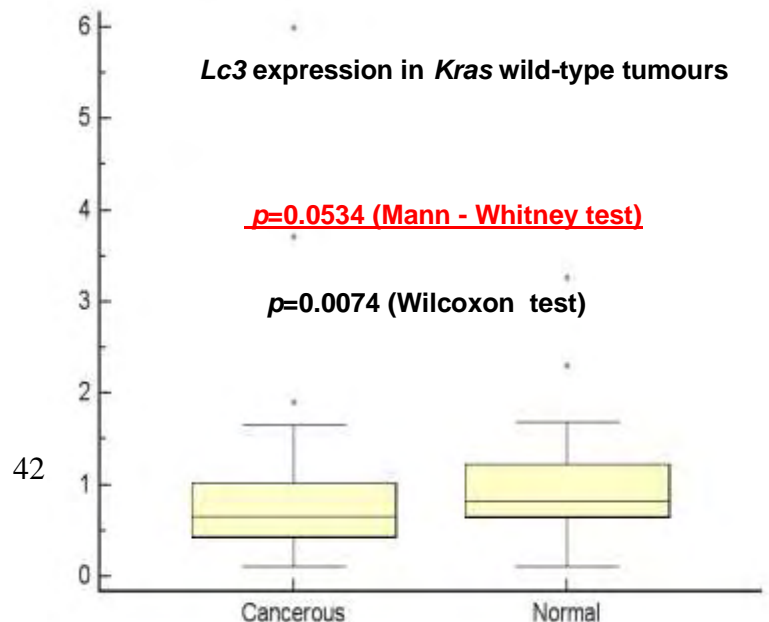
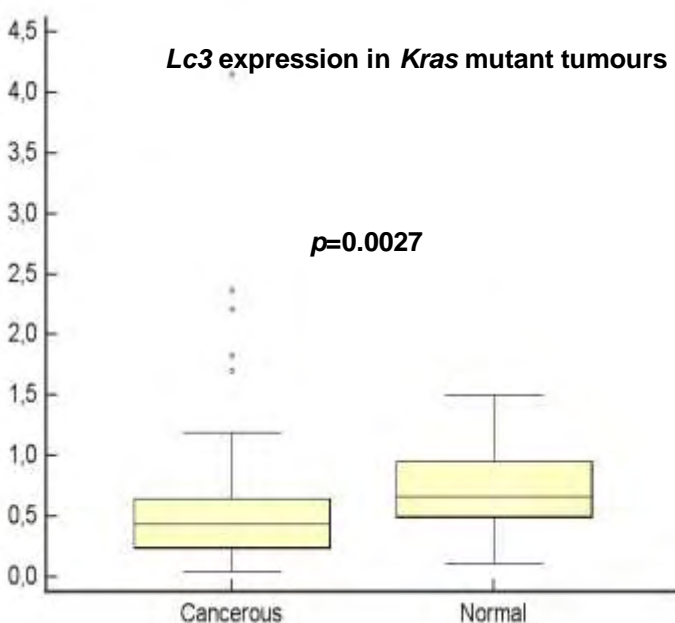
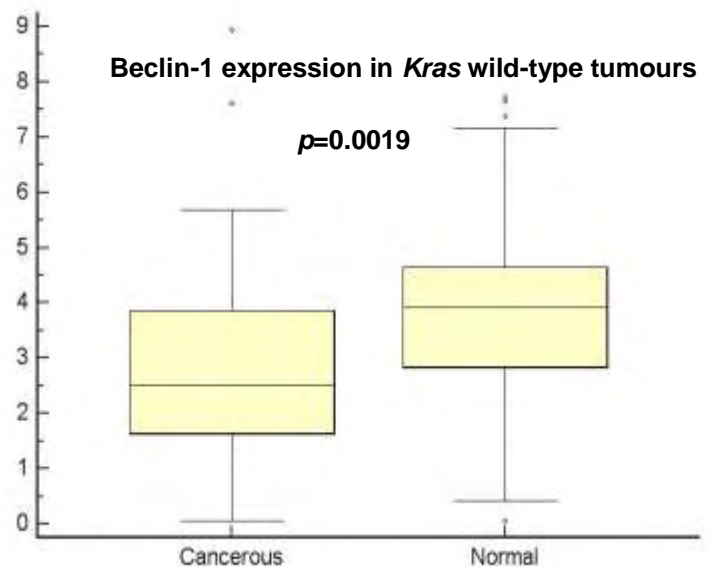
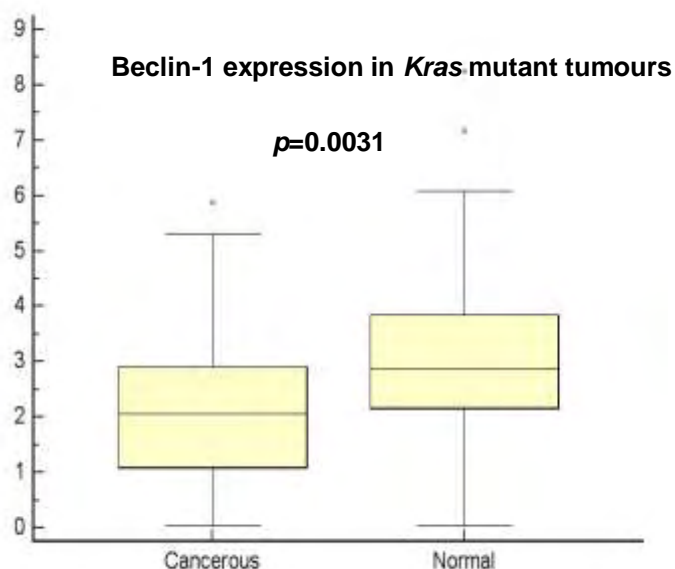
Το γονίδιο GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό γονίδιο αναφοράς

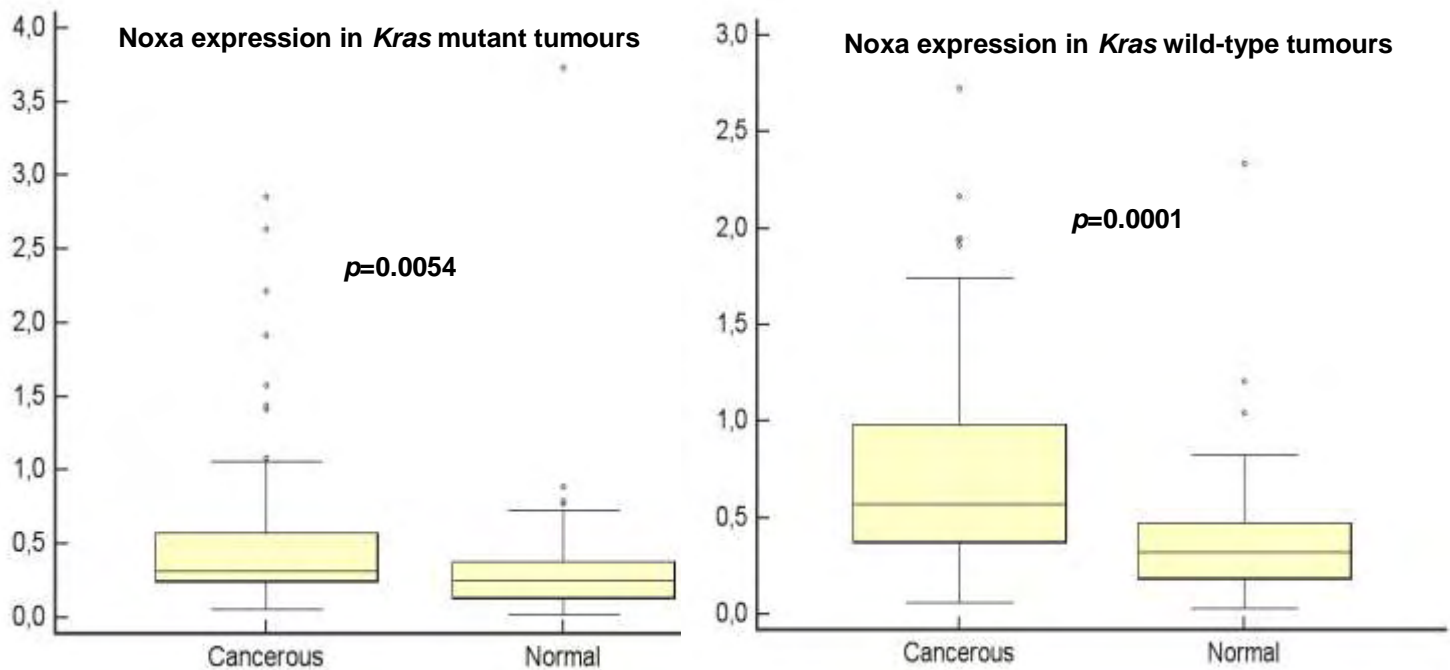
5.4 Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης mRNA των γονιδίων Beclin-1, LC3 και Noxa με την παρουσία μεταλλάξεων στο KRAS στα κλινικά δείγματα καρκίνου του παχέος εντέρου.

Προϋπάρχουσα γνώση (ευγενική παραχώρηση) από τα μέλη του εργαστηρίου Μαργαρίτα Βλάσση και Βιβή Κοσμίδου

Τα κλινικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, έχουν αναλυθεί, προηγουμένως στο εργαστήριο για την παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο KRAS. Η παρουσία των μεταλλάξεων συσχετίστηκε με τα επίπεδα έκφρασης mRNA των γονιδίων Beclin-1, LC3 και Noxa, ώστε να ελεγχθεί ο ρόλος της παρουσίας της μετάλλαξης στην έκφραση των τριών γονιδίων.

Σύμφωνα με το διάγραμμα 5.10 δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των τριών γονιδίων (Beclin-1, LC3 και Noxa) συναρτήσει της παρουσίας μετάλλαξης του KRAS.





Διάγραμμα 5.10

Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης mRNA των γονιδίων Beclin-1, LC3 και Noxa με την παρουσία μετάλλαξης KRAS.

Καμιά διαφορά των επιπέδων έκφρασης mRNA των γονιδίων Beclin-1, LC3 και Noxa στα κλινικά δείγματα καρκίνου του παχέος εντέρου είτε υπάρχει μετάλλαξη KRAS είτε δεν υπάρχει. (pValue<0.05)

Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης mRNA των γονιδίων έγινε με real-time PCR χρησιμοποιώντας τη σχετική μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (όπου $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq (Cq_{Noxa} - Cq_{GAPDH})_{\text{παθολογικά}} - \Delta Cq (Cq_{Noxa} - Cq_{GAPDH})_{\text{φυσιολογικά}}$).

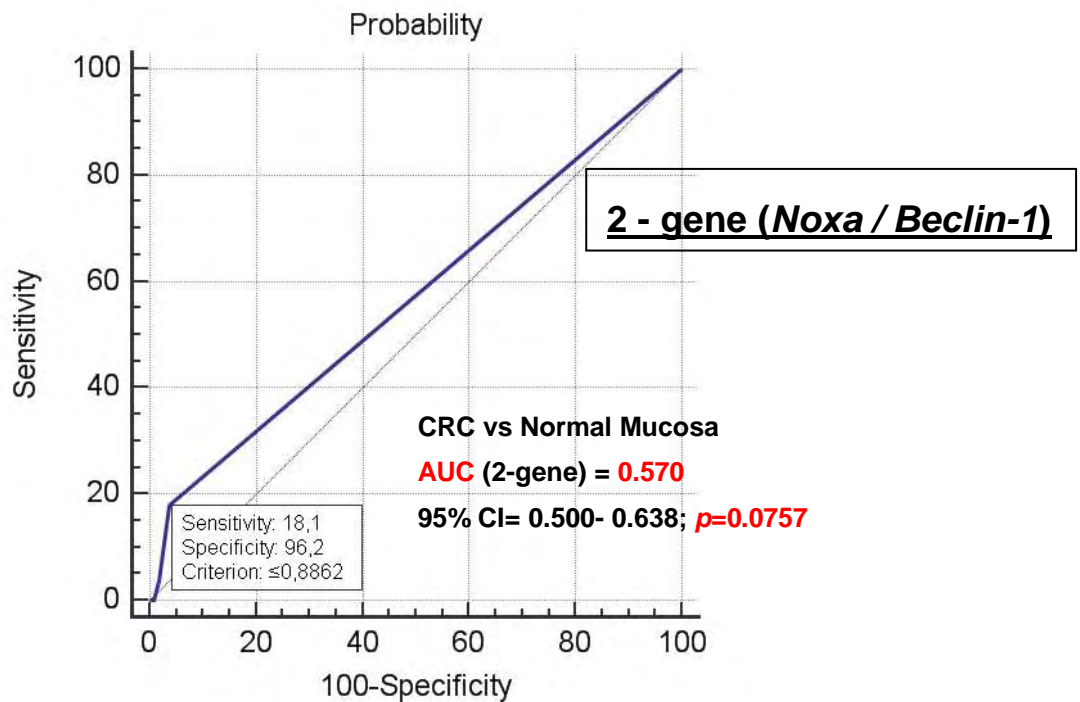
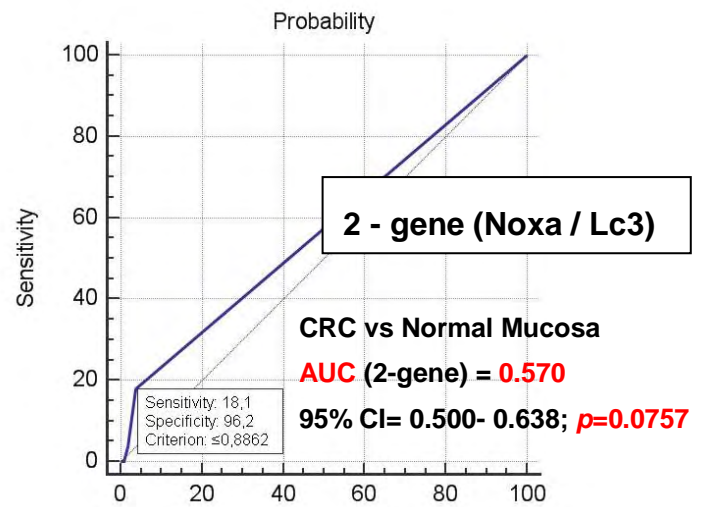
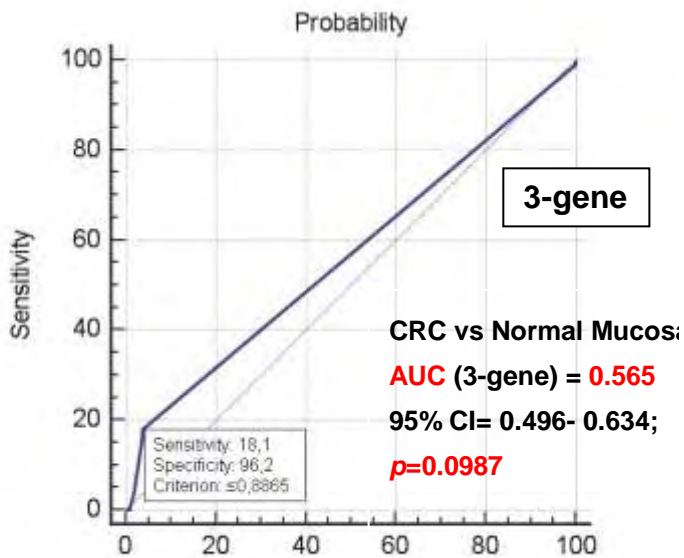
Το γονίδιο GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό γονίδιο αναφοράς

5.5 Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης mRNA των τριών γονιδίων συνδυαστικά σε κλινικά δείγματα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου.

Στη συνέχεια με ανάλυση ROC προσπαθήσαμε να συνδυάσουμε την έκφραση των τριών γονιδίων για να δούμε αν μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τα γονίδια συνδυαστικά ως διαφοροδιαγνωστικούς δείκτες, με καλύτερη διαφοροδιαγνωστική αξία απ' ότι το κάθε γονίδιο μεμονωμένα.

Ο συνδυασμός των τριών γονιδίων (3 gene) καθώς και ο συνδυασμός των

δύο γονιδίων (2 gene - Noxa/LC3 και Noxa/Beclin-1) δεν είχε καμιά διαφοροδιαγνωστική αξία αφού $AUC < 0.6$ και $p\text{Value} > 0,05$ (διάγραμμα 5.11)



Διάγραμμα 5.11

Η επιφάνεια κάτω από την ROC καμπύλη είναι μετρική της ακρίβειας του μοντέλου. Όσο πιο κοντά στη διαγώνιο τόσο λιγότερο ακριβές είναι το μοντέλο.

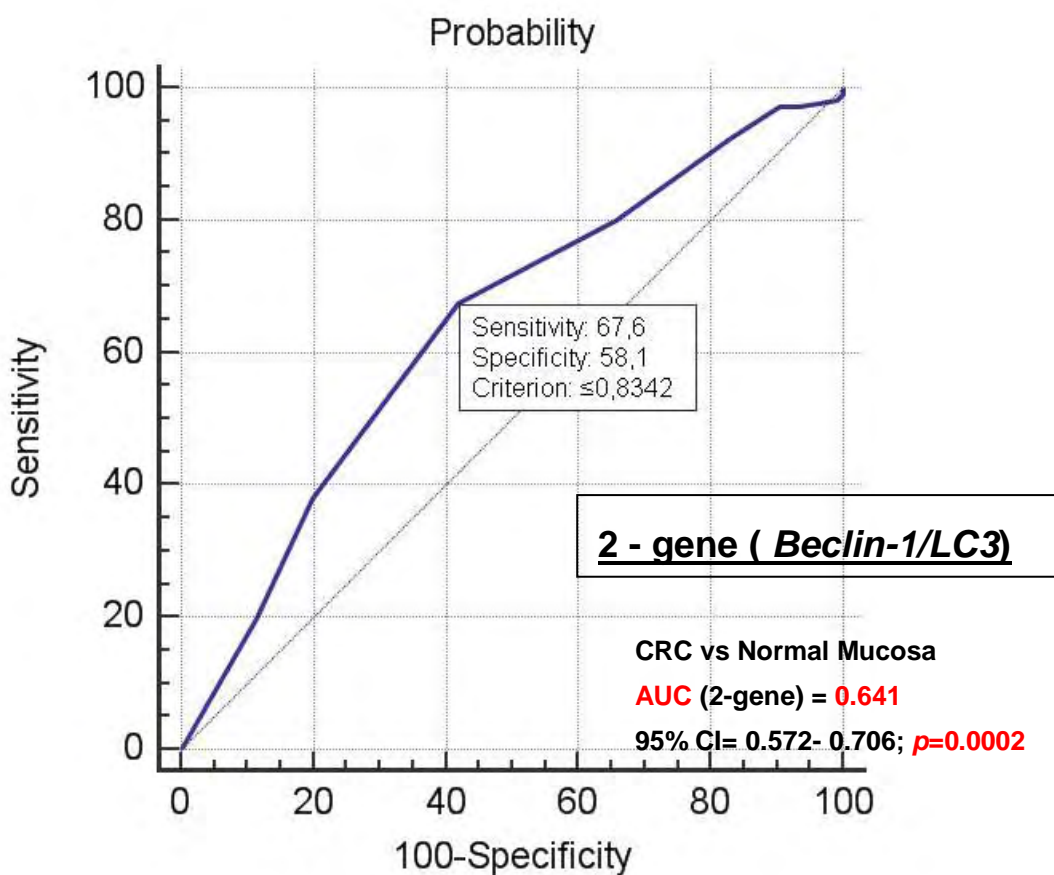
$AUC=0.5$ καμιά διαγνωστική αξία

$AUC=1.0$ μοντέλο με τέλεια ακρίβεια

Το AUC πρέπει να είναι $0.6 < AUC$ για να υπάρχει διαφοροδιαγνωστική αξία των γονιδίων συνδυαστικά μεταξύ παθολογικών και φυσιολογικών στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Τα 3 γονίδια συνδυαστικά καθώς και τα 2 γονίδια συνδυαστικά (Noxa/LC3 και Noxa/Beclin-1) δεν μπορούν να θεωρηθούν διαφοροδιαγνωστικοί δείκτες αφού έχουμε ένα κακό AUC ($AUC < 0.6$) και ένα πολύ κακό $p\text{-value}$ ($p\text{Value} > 0.05$)

Αντίθετα ο συνδιασμός των δυο γονιδίων (2 gene – Beclin-1 και LC3) έχει διαφοροδιαγνωστική αξία αφού $AUC > 0.6$ και $p\text{Value} < 0,05$.



Διάγραμμα 5.12

Η επιφάνεια κάτω από την ROC καμπύλη είναι μετρική της ακρίβειας του μοντέλου. Όσο πιο κοντά στη διαγώνιο τόσο λιγότερο ακριβές είναι το μοντέλο.

$AUC=0.5$ καμιά διαγνωστική αξία

$AUC=1.0$ μοντέλο με τέλεια ακρίβεια

Το AUC πρέπει να είναι $0.6 < AUC$ για να υπάρχει διαφοροδιαγνωστική αξία των γονιδίων συνδιαστικά μεταξύ παθολογικών και φυσιολογικών στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Τα 2 γονίδια συνδυαστικά (2 gene – Beclin-1 και LC3) έχουν διαφοροδιαγνωστική αξία αφού έχουμε ένα καλό AUC ($AUC > 0.6$) και ένα πολύ καλό $p\text{-value}$ ($p\text{Value} < 0.05$)

Γ. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Παρατηρείται μια σημαντική υποέκφραση των επιπέδων mRNA των γονιδίων Beclin-1 και LC3 σε Κ.Π.Ε. ανεξάρτητα από την παρουσία μεταλλάξεων στο K-Ras.

Αντίθετα τα επίπεδα mRNA του Noxa υπερεκφράζονται σημαντικά σε Κ.Π.Ε., ειδικά στο στάδιο III/IV των όγκων, ανεξάρτητα από την παρουσία μεταλλάξεων του K-Ras.

Με ανάλυση καμπύλης ROC βλέπουμε ότι η έκφραση του κάθε γονιδίου ξεχωριστά καθώς και η έκφραση του Beclin-1 και LC3 συνδυαστικά έχει διαφοροδιαγνωστική αξία.

6.1 Το γονίδιο Noxa στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Η Noxa είναι BH-3 μέλος της οικογένειας Bcl-2 πρωτεϊνών. Η οικογένεια Bcl-2 παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του μιτοχονδριακού μονοπατιού για την απόπτωση. Σύμφωνα με πολλές μελέτες, υπερέκφραση του γονιδίου Noxa παρατηρείται σε πολλούς τύπους καρκίνου. Στην παρούσα μελέτη, παρουσιάζεται σημαντική κλινική σημασία του γονιδίου Noxa στον καρκίνο του παχέος εντέρου, καθώς βρίσκεται υπερεκφρασμένο στα καρκινικά δείγματα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά τους, αποτέλεσμα το οποίο είναι σύμφωνο με αρκετές μελέτες.

Επαγωγή της αυτοφαγίας από την Noxa: η παρατήρηση ότι η Noxa, μέλος της οικογένειας BH3-only πρωτεϊνών, μπορεί να προωθήσει ένα μη αποπτωτικό μονοπάτι κυτταρικού θανάτου είναι αντιφατική. Ωστόσο, η Noxa είναι ένας από τους λιγότερο ισχυρούς τελεστές για την ενεργοποίηση Bax/Bak και την ενεργοποίηση του αποπτωτικού μονοπατιού στην απόπτωση.

[81]

Επίσης, στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου Noxa έχει μικρή επίδραση σε πολυάριθμα προ-αποπτωτικά σήματα, υποδηλώνοντας ότι αυτή η πρωτεΐνη μπορεί να διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο σε άλλα πλαίσια.

Έτσι η αυξημένη έκφραση των BH3-only πρωτεϊνών, εκτός από τον πολύ γνωστό ρόλο τους στην προώθηση της απόπτωσης μπορούν επίσης να προωθήσουν την αυτοφαγία σε ορισμένα πλαίσια.[82,83]

Το αποτέλεσμα (δηλαδή απόπτωση ή αυτοφαγία) είναι πιθανόν να εξαρτάται από συγκεκριμένες BH3-only πρωτεΐνες, οι οποίες υπερεκφράζονται /ενεργοποιούνται, και την ικανότητα των επιμέρους BH3-only πρωτεϊνών να εμπλέκονται με το απαιτούμενο εύρος προεπιβιωτικών μελών της οικογένειας Bcl2 για την προώθηση της απόπτωσης.

Από την άποψη αυτή, η Noxa είναι γνωστό ότι εμπλέκεται σε ένα περιορισμένο φάσμα προεπιβιωτικών Bcl2 πρωτεϊνών, εμφανίζοντας μεγαλύτερη συγγένεια για Mcl1 και A1, αλλά μικρή σύνδεση με άλλα μέλη της

οικογένειας Bcl2 σε ενδογενή επίπεδο. [84]

Η διαπίστωση ότι η Noxa είναι συχνά υπερεκφρασμένη σε μελανώματα, η οποία συνδέεται επίσης με την παθογένεια της νόσου είναι ενδιαφέρουσα, καθώς αυτό υποδηλώνει ότι η Noxa μπορεί να έχει ένα ρόλο προ-επιβίωσης σε μελάνωμα κυττάρων, ενώ το δυναμικό επαγωγής απόπτωσης της έχει διατηρηθεί υπό έλεγχο.[85,86]

Η Mcl-1, που μπορεί να συνδέεται και να αναστέλλει την Noxa, αυξάνεται επίσης με την εξέλιξη του μελανώματος [85,87] και η ικανότητα του Noxa να ενεργοποιεί την απόπτωση καθορίζεται από μια ισορροπία μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του Noxa και των επιπέδων του Mcl-1 [88], καθώς φαίνεται ότι η υψηλή έκφραση των Mcl-1 είναι επαρκής για να επιτρέψει τα κύτταρα του μελανώματος να αντέχουν εξίσου υψηλά επίπεδα Noxa.[89]

Είναι κατανοητό ότι η αυξημένη έκφραση Noxa εν όψει των υψηλών επιπέδων Mcl-1 μπορεί να οδηγήσει σε ελεγχόμενη αυτοφαγία ανακυκλώνοντας κατεστραμμένα οργανίδια και ανεπιθύμητες πρωτεΐνες.

Σε συμφωνία με αυτό, η αυτοφαγία προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα από την απόπτωση σε πολλά πειραματικά συστήματα.[90,91,92]

Συμπερασματικά, αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η Noxa δεν είναι απλά μια πρωτεΐνη προ-απόπτωσης, αλλά λειτουργεί ως ένα φρουρός ασφαλείας που συμπληρώνει όχι μόνο την παροχή θρεπτικών συστατικών αλλά επίσης έχει ένα ρόλο προ-επιβίωσης μέσω ενεργοποίησης της αυτοφαγίας. [93]

Ένα μεγάλο πάνελ διαφόρων ανθρωπίνων όγκων ελέγχθηκαν για μεταλλάξεις στο γονίδιο Noxa. Μεμονωμένες μεταλλάξεις δε βρέθηκαν να έχουν επίδραση στην ικανότητα της Noxa να επάγει απόπτωση in vitro.[131] Μελέτες δείχνουν ότι αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης Noxa σχετίζεται με την εξέλιξη του καρκίνου και συνδέεται με βιοχημική υποτροπή του καρκίνου του προστάτη.[132]

BH3-only πρωτεΐνες ως μεσολαβητές των αντικαρκινικών θεραπειών: Οι έρευνες για τους μοριακούς μηχανισμούς της απόπτωσης που προκαλούνται από συμβατικές θεραπείες και νέους αντικαρκινικούς παράγοντες έχουν αποκαλύψει τον κρίσιμο ρόλο των BH3-only πρωτεϊνών κατά τη διαδικασία της ανταπόκρισης και της αντίστασης του φαρμάκου.

Οι Puma και Noxa σχετίζονται με τις επιπτώσεις από κλασσικούς παράγοντες βλάβης του DNA, καθώς και της ακτινοθεραπείας, αλλά κάπως αναπάντεχα φαίνεται ότι η Noxa είναι ένας σχετικός μεσολαβητής της απόπτωσης σε απόκριση προς την αναστολή του πρωτεασώματος. Σε κακοήθες μελάνωμα, αλλά όχι πρωτογενή μελανοκύτταρα καθώς και σε πολλαπλό μύελωμα, αλλά όχι σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος, μη επιλεκτική αναστολή του πρωτεασώματος με Birtetomib/Velcade προκαλεί αύξηση της έκφρασης της Noxa που προηγείται της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων [133,134]. Αξίζει να σημειωθεί ότι η επαγωγή της Noxa δεν είναι απλά μια συνέπεια της διαταραγμένης αποικοδόμησης του πρωτεασώματος του προεπιβιωτικού μέλους Mcl1, το οποίο συμπλέκεται με την Noxa για την συνεργασία αποικοδόμησης στο πρωτεάσωμα, αλλά εμφανίζεται επίσης και κατά το μεταγραφικό επίπεδο με ένα C-Myc-εξαρτώμενο τρόπο.[140]

Αναστολείς σεκρετάσης (GSI), που αναστέλλουν την επεξεργασία του υποδοχέα Notch και την ενεργοποίησή του, αναφέρθηκε να επάγουν την απόπτωση σε μελάνωμα και κυτταρικές σειρές πολλαπλού μυελώματος με ένα τρόπο που εξαρτάται από την Noxa.

Συνοπτικά, όλες αυτές οι παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν ότι η ενεργοποίηση μιας ή περισσότερων BH3-only πρωτεϊνών μεσολαβεί στις επιδράσεις όλων των αντικαρκινικών παραγόντων.

6.2 Τα αυτοφαγικά γονίδια Beclin-1 και LC3 στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Στην παρούσα μελέτη, εξετάσαμε την έκφραση των αυτοφαγικών γονιδίων LC3 και Beclin-1 στο καρκίνο του παχέος εντέρου και βρήκαμε ότι και τα δύο γονίδια υποεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά.

Μελέτες από τη βιβλιογραφία έρχονται σε αντίθεση με τα δικά μας αποτελέσματα καθώς δείχνουν ότι η αυτοφαγία έχει ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου. Αντίθετα, άλλες μελέτες έρχονται σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα.

Ωστόσο, δεν είναι σαφές εάν η αυτοφαγία καταστέλλει την ανάπτυξη όγκων ή παρέχει στα καρκινικά κύτταρα έναν μηχανισμό διάσωσης κάτω από συνθήκες πίεσης, όπως πείνα, προωθώντας την ανάπτυξη των όγκων. [94-98]

Προηγούμενες μελέτες απέδειξαν ότι η αυτοφαγία λαμβάνει χώρα στα περισσότερα μη καρκινικά κύτταρα για την πρόληψη της συσσώρευσης των αδρανών πρωτεϊνών και ελαττωματικών κυτταρικών δομών και ότι επάγεται όταν τα κύτταρα αντιμετωπίζουν συνθήκες στρες, όπως πείνα. [99-103]

Σε κάθε περίπτωση, θεωρητικά η αυτοφαγία πρέπει να λαμβάνει χώρα σε καρκινικά κύτταρα που βρίσκονται στην κεντρική περιοχή του καρκίνου. Αντίθετα, στην μελέτη μας υπάρχει υποέκφραση των αυτοφαγικών γονιδίων LC3 και Beclin-1 στα καρκινικά κύτταρα στην κεντρική περιοχή του όγκου.

Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει τη διαταραγμένη αυτοφαγία με την εξέλιξη του όγκου.[104] Αλληλική απώλεια του γονιδίου Beclin-1 βρέθηκε σε καρκίνους ωθηκών, του μαστού και του προστάτη.[104] Μειωμένη έκφραση του Beclin-1 έχει συσχετιστεί με την εξέλιξη του όγκου των μαστών, των ωθηκών και του καρκίνου του εγκεφάλου και με χαμηλότερη επιβίωση σε καρκίνους του οισοφάγου, του παχέος εντέρου, του ήπατος και του εγκεφάλου.[105 – 111]

Σε αντίθεση, άλλοι ερευνητές βρήκαν ότι η υπερέκφραση του Beclin-1 συσχετίζεται με ογκογένεση σε καρκίνους του παχέος εντέρου και του γαστρεντερικού. [112-114]

Οι Liang X.H. *et al.* (2001) βρήκαν ότι τα υψηλότερα επίπεδα της έκφρασης του Beclin1 συνδέονται με καλύτερη πρόγνωση σε ασθενείς με σταδίου III καρκίνο του παχέος εντέρου. [135]

Μια άλλη μελέτη σε ηπατοκυτταρικά καρκινώματα από την άλλη πλευρά πρότεινε ότι η απώλεια Beclin-1 σε κύτταρα όγκου ήταν σημαντικότερο μοτίβο το οποίο συσχετίστηκε με την υποτροπή της νόσου. [136]

Ως εκ τούτου, φαίνεται ότι τόσο η υποέκφραση όσο και η υπερέκφραση του Beclin-1 συναντώνται σε ανθρώπινα καρκινώματα.

Η υπερέκφραση του γονιδίου Beclin-1 μπορεί να είναι μια απάντηση στις δυσμενείς συνθήκες εντός του όγκου, προκειμένου να ενταθεί η αυτοφαγική δραστηριότητα για τα καρκινικά κύτταρα για να ανακυκλώσουν πρωτεΐνες και κατεστραμμένα οργανίδια για να επιβιώσουν.

Ο Samokhvalov V. *et al.* (2008) έδειξε ότι RNAi knockdown λειτουργεία του Beclin-1 μειώνει την επιβίωση κάτω από υποξικό στρες.[141]

Η υπερέκφραση της Beclin-1 μπορεί επομένως να είναι απάντηση επιβίωσης στις δυσμενείς συνθήκες και θα μπορούσε να υποδεικνύει επιθετικότητα του όγκου που συνδέεται με υποξία και οξύτητα.

Η έκφραση του γονιδίου LC3 έχει αναφερθεί ότι είναι μειωμένη στον καρκίνο του εγκεφάλου και των ωοθηκών [107,115] και αυξημένη σε νεοπλάσματα οισοφάγου και γαστρεντερικού.[115] Η έκφραση του LC3 βρέθηκε να συσχετίζεται με κακή έκβαση σε καρκίνο του παγκρέατος και με μια καλύτερη επιβίωση σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα.[115,116]

Ο Jiang Z.F. *et al.* (2012) έδειξε ότι η έκφραση του LC3 μειώνεται σε ανθρώπινους καρκινικούς ιστούς του πνεύμονα σε σύγκριση με τους ομόλογους φυσιολογικούς ιστούς, αλλά αυτή η έκφραση δε συσχετίζεται σημαντικά με κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά.[137]

Η έκφραση του LC3 συσχετίστηκε σημαντικά με την διαφοροποίηση των κυττάρων και τα διακριτά επίπεδα έκφρασης σε καρκίνο του παχέος εντέρου και καρκίνο του πνεύμονα μπορεί να συσχετίζονται με τον τύπο του καρκίνου. [138]

Η σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του LC3 και της διαφοροποίησης των κυττάρων προτείνει ότι κακοήθη κύτταρα μπορεί να προκύψουν από την αύξηση της αυτοφαγίας, επομένως χαμηλότερη έκφραση του LC3 σε καρκίνο του παχέος εντέρου είναι δείκτης θετικής πρόγνωσης.[139]

Ως εκ τούτου, η βιολογική σημασία και οι κλινικές επιπτώσεις των διακυμάνσεων έκφρασης των γονιδίων Beclin-1 και LC3 στον καρκίνο φαίνεται να σχετίζονται με τον τύπο του όγκου και το πλαίσιο των ιστών[104,117], υποδεικνύοντας ότι διάφορες θεραπευτικές στρατηγικές θα μπορούσαν να προβλέψουν είτε αύξηση είτε μείωση της αυτοφαγίας. [118]

Από τους ισχυρισμούς αυτούς προκύπτει ότι η αναγνώριση των συγκεκριμένων μοτίβων αυτοφαγίας σε βιοψίες ιστού μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τη διάγνωση και εξατομικευμένη θεραπεία του καρκίνου.

Από θεραπευτικής άποψης η Beclin-1 και LC3 αναδύονται ως στόχοι για την ανάπτυξη μοριακών θεραπειών.

Σίγηση της Beclin-1 πρωτεΐνης και της LC3 πρωτεΐνης μπορεί να αποδειχθεί θανατηφόρα για τους όγκους των οποίων η επιβίωση εξαρτάται από την απόκριση εντατικοποίησης της αυτοφαγίας κυττάρων, όπως οι όγκοι υψηλού υποξικού περιεχομένου των κυττάρων.

Οι Song J *et al.*, 2009 [119] βρήκαν ότι η θεραπεία των κυττάρων ήπατος με Beclin-1 siRNA οδήγησε σε χημειοευσθητοποίηση υπό συνθήκες υποξίας. Επίσης, ο αποκλεισμός της αυτοφαγίας ευαισθητοποιεί τα καρκινικά κύτταρα στην ακτινοβολία. [120]

6.3 Ογκογόνος Ras-επαγόμενη έκφραση της Noxa και Beclin-1 προωθεί αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο και περιορισμένη επιβίωση

Στην μελέτη μας προσπαθήσαμε να συνδέσουμε την παρουσία μεταλλάξεων του K-Ras με την έκφραση των γονιδίων στα καρκινικά κύτταρα, χωρίς όμως να φαίνεται να υπάρχει κάποια συσχέτιση, παρόλο που κάποιες μελέτες δείχνουν κάποια συσχέτιση της παρουσίας μεταλλάξεων του K-Ras με τα γονίδια Noxa και Beclin-1.

Η απορρύθμιση ογκογονιδίων, όπως MYC και RAS, είναι τυπικά ανεπαρκής για να μετασχηματίσει κύτταρα από μόνη της, κάτι το οποίο οφείλεται στην ενεργοποίηση των μονοπατιών που περιορίζουν τον πολλαπλασιασμό.

Μελέτες έχουν δείξει ότι το ογκογόνο H-Ras μπορεί να προκαλέσει αναστολή του πολλαπλασιασμού ή γήρανση ανάλογα με το κυτταρικό περιβάλλον.

Η απορρύθμιση της δραστηριότητας H-Ras μπορεί να οδηγήσει σε κασπασο-ανεξάρτητο κυτταρικό θάνατο με χαρακτηριστικά της αυτοφαγίας. Ras-επαγόμενη αυτοφαγία συνδέθηκε με υπερέκφραση των BH3-only πρωτεϊνών Noxa καθώς και τη ρύθμιση της αυτοφαγίας από Beclin-1.

Σίγηση της έκφρασης του Noxa ή του Beclin-1 μειώνει την Ras-επαγόμενη αυτοφαγία και αυξάνει την επιβίωση. Ο Ras-επαγόμενος κυτταρικός θάνατος αναστέλλεται επίσης με συνέκφραση των μελών της οικογένειας Bcl-2 που αναστέλλουν την λειτουργία της Beclin-1. Επιπλέον, Ras-επαγόμενη αυτοφαγία συνδέθηκε με την μεσολάβηση της Noxa που μετατόπισε το μέλος της οικογένειας Bcl2, Mcl1, από Beclin-1. [142]

Έτσι, η Ras-επαγόμενη έκφραση των Noxa και Beclin-1 προάγει αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο, ο οποίος αντιπροσωπεύει ένα μηχανισμό για τον περιορισμό του ογκογόνου δυναμικού του Ras. Εν κατακλείδι, από τα πιο πάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι απορρύθμισή της H-Ras δραστηριότητας μπορεί να οδηγήσει σε κασπασο-ανεξάρτητο κυτταρικό θάνατο με χαρακτηριστικά της αυτοφαγίας. Έτσι, εκτός από την πρόωρη κυτταρική γήρανση, ο Ras-επαγόμενος κυτταρικός θάνατος είναι πιθανόν να αντιπροσωπεύει έναν πρόσθετο μηχανισμό που χρησιμεύει για τον περιορισμό του ογκογόνου δυναμικού από την απελευθέρωση σημάτων Ras.

Συμπερασματικά, από την παρούσα μελέτη αναδείχθηκε η κλινική σημασία των τριών γονιδίων Noxa, Beclin-1 και LC3 στην ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου, τα οποία αλλάζουν σημαντικά τα επίπεδα έκφρασής τους σε ιστούς καρκίνου παχέος εντέρου σε σύγκριση με τα φυσιολογικά δείγματα. Για να μπορέσουν να συσχετιστούν τα τρία γονίδια μεταξύ τους καθώς και με το K-Ras, ίσως θα έπρεπε να αυξηθεί ο αριθμός των εξεταζόμενων κλινικών δειγμάτων ή να μελετηθούν και τα τρία γονίδια σε επίπεδο πρωτεΐνης. Επίσης, η συσχέτιση θα μπορούσε να είναι ισχυρή εάν κατά την παραλαβή του καρκινικού ιστού από τον ασθενή, μπορούσε να συλλεγεί μεγαλύτερο ποσοστό καρκινικών κυττάρων από τον ιστό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Emanuel Rubin Essential Pathology, Third Edition, Lippincott Williams & Wilkins
2. Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter Βασικές Αρχές κυτταρικής Βιολογίας Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης
3. Thomas D. Gelehrter Francis S. Collins David Ginsburg Αρχές Ιατρικής Γενετικής Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης
4. Jermal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., et al, 2011, Global Cancer Statistics. CA CANCER J CLIN, 69-90.
5. Markowitz, D.S. And Bertagnolli, M.M, 2009, Molecular Basis of Colorectal Cancer. N Engl j Med, 361, 2449-60
6. Lodish, H., Matsudaira, P., Krieger, S. And Zipursky, D., Molecular Cell Biology, 5th edition, Freeman, New Tork, 2003, 936-937, 592-594, 941-952, 424-428.
7. Oikonomou, E. And Pintzas, A., 2006, Cance Genetics of sporadic Colorectal Cancer: BRAF and PI3KCA Mutation their Impact on Signaling and Novel Targeted Therapies.
8. Frank J.Y. And Richardson, B.C., 2005, The MAPK signaling pathways and colorectal cancer. Lancer Oncol, 6, 322-27.
9. Kranenburg, O., 2005, The KRAS ongene: Past, present and future. Biochim Biophys Acta, 1756, 81-82.
10. Klionsky, D. J. & Emr, S. D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. Science 290, 1717–1721 (2000). Comprehensive review of autophagic processes.
11. Levine, B. & Klionsky, D. J. Development by selfdigestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. Dev. Cell 6, 463–477 (2004). Comprehensive review of autophagy in eukaryotic development.
12. Meijer, A. J. & Codogno, P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. Int. J. Biochem. Cell Biol. 36, 2445–2462 (2004).

- Comprehensive review of the autophagic process in mammalian cells.
13. L. Yu, L. Strandberg, M.J. Lenardo, The selectivity of autophagy and its role in cell death and survival, *Autophagy* 4 (2008).
 14. M. Komatsu, T. Ueno, S. Waguri, Y. Uchiyama, E. Kominami, K. Tanaka, Constitutive autophagy: vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons, *Cell Death Differ.* 14 (2007) 887– 894.
 15. J.J. Lum, D.E. Bauer, M. Kong, M.H. Harris, C. Li, T. Lindsten, C.B. Thompson, Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis, *Cell* 120 (2005) 237–248.
 16. D.A. Nelson, T.T. Tan, A.B. Rabson, D. Anderson, K. Degenhardt, E. White, Hypoxia and defective apoptosis drive genomic instability and tumorigenesis, *Genes Dev.* 18 (2004) 2095–2107.
 17. N. Mizushima, B. Levine, A.M. Cuervo, D.J. Klionsky, Autophagy fights disease through cellular self-digestion, *Nature* 451 (2008) 1069–1075.
 18. G.L. Semenza, Mitochondrial autophagy: life and breath of the cell *Autophagy* 4 (2008).
 19. Edinger, A. L. & Thompson, C. B. Defective autophagy leads to cancer. *Cancer Cell* 4, 422–424 (2003).
 20. Ogier-Denis, E. & Codogno, P. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1603, 113–128 (2003).
 21. Gozuacik, D. & Kimchi, A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23, 2891–2906 (2004). Reference 7, together with reference 6, provide comprehensive reviews of autophagy in cancer.
 22. Cuervo, A. M. Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.* 14, 70–77 (2004).
 23. N. Furuya, J. Yu, M. Byfield, S. Pattingre, B. Levine, The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function, *Autophagy* 1 (2005) 46–52.
 24. X. Zeng, J.H. Overmeyer, W.A. Maltese, Functional specificity of the Mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking, *J. Cell Sci.* 119 (2006) 259–270.
 25. X.H. Liang, S. Jackson, M. Seaman, K. Brown, B. Kempkes, H. Hibshoosh, B. Levine, Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1, *Nature* 402 (1999) 672 - 676.

26. V.M. Aita, X.H. Liang, V.V. Murty, D.L. Pincus, W. Yu, E. Cayanis, S. Kalachikov, T.C. Gilliam, B. Levine, Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21, *Genomics* 59 (1999) 59–65.
27. P.G. Clarke, Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms, *Anat. Embryol. Berl.* 181 (1990) 195–213.
28. M.C. Maiuri, E. Zalckvar, A. Kimchi, G. Kroemer, Self-eating and selfkilling: crosstalk between autophagy and apoptosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 741–752.
29. Youle RJ, Strasser A (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:47–59. doi:10.1038/nrm230
30. Huang DC, Adams JM, Cory S (1998) The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *EMBO J* 17:1029–1039. doi:10.1093/emboj/17.4.1029
31. Willis SN, Adams JM (2005) Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 17:617–625. doi: 10.1016/j.ceb.2005.10.001
32. Chipuk JE, Green DR. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* 18: 157–164.
33. Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20: 929–935.
34. Chipuk JE, Green DR. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* 18: 157–164.
35. Chipuk JE, Green DR. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* 18: 157–164.
36. Reed JC. (2002). Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Disc* 1: 111–121.
37. Penninger JM, Kroemer G. (2003). Mitochondria, AIF and caspases—rivaling for cell death execution. *Nat Cell Biol* 5: 97–99.

38. Cao Y, Klionsky DJ (2007) Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell Res* 17: 839–849
39. Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T (2001) Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* 2: 330–335
40. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 2005; 122: 927–939.
41. Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P et al. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *Embo J* 2007; 26: 2527–2539.
42. Sinha S, Levine B. The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene* 2008; 27 (Suppl 1): S137–S148
43. Zalckvar E, Berissi H, Mizrachy L, Idelchuk Y, Koren I, Eisenstein M et al. DAP-kinasemediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep* 2009; 10: 285–292.
44. Chen CH, Wang WJ, Kuo JC, Tsai HC, Lin JR, Chang ZF et al. Bidirectional signals transduced by DAPK-ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK. *Embo J* 2005; 24: 294–304.
45. Shi CS, Kehrl JH. TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced autophagy. *Sci Signal* 2010; 3: ra42.
46. Ciechomska IA, Goemans GC, Skepper JN, Tolkovsky AM. Bcl-2 complexed with Beclin-1 maintains full anti-apoptotic function. *Oncogene* 2009; 28: 2128–2141.
47. Djavaheiri-Mergny M, Maiuri MC, Kroemer G. Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. *Oncogene* 2010; 29: 1717–1719.
48. Luo S, Rubinsztein DC. Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL. *Cell Death Differ* 2010; 17: 268–277.
49. Ahn CH, Jeong EG, Lee JW, Kim MS, Kim SH, Kim SS, Yoo NJ, Lee SH (2007) Expression of Beclin-1, an autophagy-related protein, in gastric and colorectal cancers. *APMIS* 115: 1344–1349
50. Li BX, Li CY, Peng RQ, Wu XJ, Wang HY, Wan DS, Zhu XF, Zhang XS (2009) The expression of Beclin 1 is associated with favorable

prognosis in stage IIIB colon cancers. *Autophagy* 5: 303–306

51. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by Beclin 1. *Nature* 402: 672–676
52. Ding ZB, Shi YH, Zhou J, Qiu SJ, Xu Y, Dai Z, Shi GM, Wang XY, Ke AW, Wu B, Fan J (2008) Association of autophagy defect with a malignant phenotype and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 68: 9167–9175
53. MI Koukourakis, A Giatromanolaki, E Sivridis, M Pitiakoudis, KC Gatter and AL Harris (2010) Beclin 1 over- and underexpression in colorectal cancer: distinct patterns relate to prognosis and tumour hypoxia
54. Baehrecke, E. H. (2003). Autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death Differ*, 10, 940–945.
55. Bursch, W. (2001). The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ*, 8, 569–581.
56. Cuervo, A. M. (2003). Autophagy and aging—when “all you can eat” is yourself. *Sci Aging Knowledge Environ*, 36, 25.
57. Dorn, B. R., Dunn Jr., W. A., & Progulske-Fox, A. (2002). Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cell Microbiol*, 4, 1–10.
58. Edinger, A. L., & Thompson, C. B. (2003). Defective autophagy leads to cancer. *Cancer Cell*, 4, 422–424.
59. Eskelinen, E. L., Tanaka, Y., & Saftig, P. (2003). At the acidic edge: Emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol*, 13, 137–145
60. Eskelinen, E. L., Tanaka, Y., & Saftig, P. (2003). At the acidic edge: Emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol*, 13, 137–145
61. Lemasters, J. J., Qian, T., He, L., Kim, J. S., Elmore, S. P., & Cascio, W. E. et al., (2002). Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxid Redox Signal*, 4, 769–781
62. Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., & George, M. D. et al., (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395, 395–398.

63. Mizushima, N., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2002). Mouse Apg10 as an Apg12-conjugating enzyme: Analysis by the conjugation-mediated yeast two-hybrid method. *FEBS Lett*, 532, 450–454.
64. Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Komatsu, M., Ueno, T., & Kominami, E. (2002a). Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP–LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. *J Biol Chem*, 277, 13739–13744.
65. Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Ueno, T., & Kominami, E. (2001). The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae*Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP–LC3. *J Biol Chem*, 276, 1701–1706.
66. D.J. Klionsky (Ed.) (2004). *Autophagy*. Georgetown, Texas: Landes Bioscience.
67. Mizushima, N., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2003). Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 35, 553–561.
68. Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., & Noda, T. et al., (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 19, 5720–5728.
69. Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., & Suzuki, K. et al., (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol*, 152, 657–668.
70. Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., & George, M. D. et al., (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395, 395–398.
71. Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., & Suzuki, K. et al., (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol*, 152, 657–668.
72. Mizushima, N., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2002). Mouse Apg10 as an Apg12- conjugating enzyme: Analysis by the conjugation-mediated yeast two-hybrid method. *FEBS Lett*, 532, 450–454.
73. Nemoto, T., Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Minematsu-Ikeguchi, N., Yokota, M., & Ohsumi, M. et al., (2003). The mouse APG10 homologue, an E2-like enzyme for Apg12p conjugation, facilitates MAP–LC3 modification. *J Biol Chem*, 278, 39517–39526.

74. Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Ueno, T., & Kominami, E. (2001). The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *J Biol Chem*, 276, 1701–1706.
75. Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., & Noda, T. et al., (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 19, 5720–5728.
76. Isei Tanida, Takashi Ueno, Eiki Kominami LC3 conjugation system in mammalian autophagy
77. Jiang ZF, Shao LJ, Wang WM, Yan XB, Liu RY. Decreased expression of Beclin-1 and LC3 in human lung cancer. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 259-267.
78. Shuhua Wu^{1*}, Chenbo Sun^{1*}, Dong Tian^{2*}, Yangyang Li², Xiangqian Gao², Shuang He², Tangyue Li² Expression and clinical significances of Beclin1, LC3 and mTOR in colorectal cancer
79. Mariño G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, Knecht E, Mizushima N, López-Otín C. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *J Biol Chem* 2007; 282: 18573-18583.
80. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Harris AL, Polychronidis A, Gatter KC, Sivridis E. Prognostic relevance of light chain 3 (LC3A) autophagy patterns in colorectal adenocarcinomas. *J Clin Pathol* 2010; 63: 867-872.
81. Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2005). BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol. Cell* 17, 525–535.
82. Maiuri, M.C., Criollo, A., Tasdemir, E., Vicencio, J.M., Tajeddine, N., Hickman, J.A., Geneste, O., and Kroemer, G. (2007). BH3-only proteins and BH mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy* 3, 374–376.
83. Rashmi, R., Pillai, S.G., Vijayalingam, S., Ryerse, J., and Chinnadurai, G. (2008). BH3-only protein BIK induces caspase-independent cell death with autophagic features in Bcl-2 null cells. *Oncogene* 27, 1366–1375.

84. Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., and Huang, D.C. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell* 17, 393–403
85. Zhuang L, Lee CS, Scolyer RA, McCarthy SW, Zhang XD, Thompson JF and Hersey P. Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma. *Mod Pathol.* 2007; 20(4):416- 426.
86. Hersey P, Zhang XD and Mhaidat N. Overcoming resistance to apoptosis in cancer therapy. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 615:105-126.
87. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM and Huang DC. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell.* 2005; 17(3):393-403.
88. Mei Y, Xie C, Xie W, Tian X, Li M and Wu M. Noxa/Mcl-1 balance regulates susceptibility of cells to camptothecin-induced apoptosis. *Neoplasia.* 2007; 9(10):871-881.
89. Jiang CC, Chen LH, Gillespie S, Wang YF, Kiejda KA, Zhang XD and Hersey P. Inhibition of MEK sensitizes human melanoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2007; 67(20):9750-9761.
90. Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R and Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5(9):726-734.
91. Zhan Z, Li Q, Wu P, Ye Y, Tseng HY, Zhang L and Zhang XD. Autophagy-mediated HMGB1 release antagonizes apoptosis of gastric cancer cells induced by vincristine via transcriptional regulation of Mcl-1. *Autophagy.* 2012; 8(1):109-121.
92. Lee AS. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res.* 2007; 67(8):3496- 3499.
93. Qiang L, Zhao B, Ming M, Wang N, He TC, Hwang S, Thorburn A and He YY. Regulation of cell proliferation and migration by p62 through stabilization of Twist1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(25):9241-9246.
94. Jin S and White E: Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress. *Autophagy* 3: 28-31, 2007.

95. Levine B: Cell biology: autophagy and cancer. *Nature* 446: 745-747, 2007.
96. Alva AS, Gultekin SH and Baehrecke EH: Autophagy in human tumors: cell survival or death? *Cell Death Differ* 11: 1046-1048, 2004.
97. Ogier-Denis E and Codogno P: Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim Biophys Acta* 1603: 113-128, 2003.
98. Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R and Kondo S: The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer* 5: 726-734, 2005.
99. Klionsky DJ and Emr SD: Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290: 1717-1721, 2000.
100. Tsukada M and Ohsumi Y: Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 333: 169-174, 1993.
101. Cuervo AM: Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol* 14: 70-77, 2004.
102. Blommaert EF, Luiken JJ and Meijer AJ: Autophagic proteolysis: control and specificity. *Histochem J* 29: 365-385, 1997.
103. Martinet W, De Meyer GR, Andries L, Herman AG and Kockx MM: In situ detection of starvation-induced autophagy. *J Histochem Cytochem* 54: 85-96, 2006.
104. Chen N, Karantza-Wadsworth V. Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2009, doi:10.1016/j.bbamcr.2008.12.013.
105. Jin S, White E. Tumor suppression by autophagy through the management of metabolic stress. *Autophagy* 2008;4:563-6.
106. Miracco C, Cosci E, Oliveri G, et al. Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumors. *Int J Oncol* 2007;30:429-36.
107. Shen Y, Li DD, Wang LL, Deng R, Zhu XF. Decreased expression of autophagy-related proteins in malignant epithelial ovarian cancer. *Autophagy* 2008;16:1067-8.
108. Chen Y, Lu Y, Lu C, Zhang L. Beclin 1 expression is a predictor of clinical outcome in patients with esophageal squamous cell carcinoma and correlated to hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α expression. *Pathol Oncol Res* 2009;9.

109. Pirtoli L, Cevenini G, Tini P, et al. The prognostic role of Beclin 1 protein expression in high-grade gliomas. *Autophagy* 2009;5:7.
110. Li BX, Li CY, Peng RQ, et al. The expression of beclin 1 is associated with favorable prognosis in stage IIIB colon cancers. *Autophagy* 2009;5:303-6.
111. Shi YH, Ding ZB, Zhou J, Qiu SJ, Fan J. Prognostic significance of Beclin 1-dependent apoptotic activity in hepatocellular carcinoma. *Autophagy* 2009;5(3):380-2 Epub 2009 Apr 19.
112. Ahn CH, Jeong EG, Lee JW, et al. Expression of beclin 1, an autophagy-related protein, in gastric and colorectal cancers. *Apmis* 2007;115:1344-9.
113. Sato K, Tsuchihira K, Fujii S, et al. Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. *Cancer Res* 2007;67:9677-84.
114. Yoshioka A, Miyata H, Doki Y, et al. LC3, an autophagosome marker, is highly expressed in gastrointestinal cancer. *Int J Oncol* 2008;33: 461-8.
115. Aoki H, Kondo Y, Aldape K, et al. Monitoring autophagy in glioblastoma with antibody against isoform B of human microtubule-associated protein 1 light chain 3. *Autophagy* 2008;4:467-75.
116. Fujii S, Mitsunaga S, Yamazaki M, et al. Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome. *Cancer Sci* 2008;99:1813-9.
117. Marino G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, et al. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *J Biol Chem* 2007;282:18573-83.
118. de Bruin EC, Medema JP. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat Rev* 2008;34:737-49.
119. Song J, Qu Z, Guo X, Zhao Q, Zhao X, Gao L, Sun K, Shen F, Wu M, Wei L (2009) Hypoxia-induced autophagy contributes to the chemoresistance of hepatocellular carcinoma cells. *Autophagy* 5: 1131–1144
120. Apel A, Herr I, Schwarz H, Rodemann HP, Mayer A (2008) Blocked autophagysensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy. *Cancer Res* 68: 1485–1494

121. Anna Pérez-Bosque, Lluïsa Miró, Mònica Maijó et al. Oral Serum-Derived Bovine Immunoglobulin/Protein Isolate Has Immunomodulatory Effects on the Colon of Mice that Spontaneously Develop Colitis (2016) 1(5): e0154823.
122. Walther, A., et al., Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(7): p. 489-99.
123. Christophe Frémin¹ and Sylvain Meloche From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy 2010; 3: 8
124. Francesca Molinari¹ and Milo Frattini Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer 2013; 3: 326.
125. Kiichi Nakahira, and Augustine M. K. Choi Autophagy: a potential therapeutic target in lung diseases 2013;305:L93-L107
126. Anna Frenzel et. al., Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Science* 2009; 14 : 584 - 596
127. KW Yip and JC Reed Bcl-2 family proteins and cancer (2008) 27, 6398–6406
128. R Kang, HJ Zeh, MT Lotze, and D Tang The Beclin 1 network regulates autophagy and Apoptosis (2011) 18, 571–580,
129. Sarron Randall-Demllo,¹ Marcello Chieppa,² and Rajaraman Eri¹, Intestinal Epithelium and Autophagy: Partners in Gut Homeostasis 2013; 4: 30
130. Katherine R. Parzych and Daniel J. Klionsky An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation 2014 ; 20: 460–473.
131. Lee SH, Soung YH, Lee JW et al (2003) Mutational analysis of Noxa gene in human cancers. *APMIS* 111:599–604. doi:10.1034/j.1600-0463.2003.1110602.x
132. Diallo JS, Aldejmah A, Mouhim AF et al (2007) NOXA and PUMA expression add to clinical markers in predicting biochemical recurrence of prostate cancer patients in a survival tree model. *Clin Cancer Res* 13:7044–7052. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1224
133. Fernandez Y, Verhaegen M, Miller TP et al (2005) Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by

- proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer Res* 65:6294–6304. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0686
134. Qin JZ, Ziffra J, Stennett L et al (2005) Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res* 65:6282–6293. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0676
135. Liang XH, Yu J, Brown K, Levine B (2001) Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function. *Cancer Res* 61: 3443–3449
136. Ding ZB, Shi YH, Zhou J, Qiu SJ, Xu Y, Dai Z, Shi GM, Wang XY, Ke AW, Wu B, Fan J (2008) Association of autophagy defect with a malignant phenotype and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 68: 9167–9175
137. Jiang ZF, Shao LJ, Wang WM, Yan XB, Liu RY. Decreased expression of Beclin-1 and LC3 in human lung cancer. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 259-267.
138. Mariño G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, Knecht E, Mizushima N, López-Otín C. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *J Biol Chem* 2007; 282: 18573-18583.
139. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Harris AL, Polychronidis A, Gatter KC, Sivridis E. Prognostic relevance of light chain 3 (LC3A) autophagy patterns in colorectal adenocarcinomas. *J Clin Pathol* 2010; 63: 867-872.
140. Nikiforov MA, Riblett M, Tang WH et al (2007) Tumor cellselective regulation of NOXA by c-MYC in response to proteasome inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19488– 19493. doi:10.1073/pnas.0708380104
141. Samokhvalov V, Scott BA, Crowder CM (2008) Autophagy protects against hypoxic injury in *C. elegans*. *Autophagy* 4: 1034–104
142. Mohamed Elgendy, Clare Sheridan, Gabriela Brumatti, and Seamus J. Martin Oncogenic Ras-Induced Expression of Noxa and Beclin-1 Promotes Autophagic Cell Death and Limits Clonogenic Survival DOI 10.1016/j.molcel.2011.02.009