



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ CAVEOLIN-1 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ
ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ»

ΔΑΟΥΚΟΠΟΥΛΟΥ ΑΡΓΥΡΩ
ΧΗΜΙΚΟΣ, ΑΠΘ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δήμας Κωνσταντίνος.....(Επιβλέπων)

Τζέτη Μαρία.....(Μέλος)

Τσέζου Ασπασία.....(Μέλος)

ΛΑΡΙΣΑ, 2017



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

«THE ROLE OF CAVEOLIN-1 IN PANCREATIC CANCER»

*Στον παππού μου Απόστολο, που υπήρξε θεμέλιος λίθος στη
μέχρι τώρα πορεία μου*

*και την οικογένεια μου,
που στηρίζει με αγάπη κάθε μου βήμα...*

EΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στη Λάρισα, στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και συγκεκριμένα στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας (Τομέας Βασικών Επιστημών) κατά το έτος 2017 υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Φαρμακολογίας και Δήμα Κωνσταντίνου. Κατά τη διεκπεραίωση των πειραμάτων μου υπήρξε άριστη συνεργασία με τα μέλη του εργαστηρίου, καθώς και των λοιπών εργαστηρίων.

Η κάτωθι επιστημονική μελέτη πραγματοποιήθηκε μετά από κόπο, δουλειά και πολλές θυσίες. Αποτελεί υψίστης σημασίας για εμένα η συμβολή των ανθρώπων, που συνέβαλαν στην υλοποίησή της, κι έτσι επιθυμώ να εκφράσω τις αμέριστες ευχαριστίες μου προς αυτούς.

Θα ήθελα αρχικά να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου, Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ.ο. Δήμα Κωνσταντίνο για την αμέριστη βοήθεια του σε επιστημονικά ζητήματα, την καθοδήγηση, τη συνεχή ηθική υποστήριξη, την εμπιστοσύνη του και γενικότερα το κλίμα άριστης συνεργασίας, που φρόντισε να εξασφαλίσει καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερος την κ. Τσέζου Ασπασία για την ευκαιρία, που μου έδωσε να συμμετάσχω στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Γενετική του Ανθρώπου», καθώς μέσω αυτού κατάφερα τόσο να διευρύνω το γνωστικό μου επίπεδο στον τομέα της Βιολογίας, που θεωρώ αλληλένδετο με αυτό της Χημείας, την οποία και υπηρετώ, όσο και να έχω μετέπειτα τη δυνατότητα να συνδυάσω τους δύο αυτούς κλάδους στην επαγγελματική μου πορεία για επιστημονικούς σκοπούς κατά τον καλύτερο δυνατό τρόπο.

Ακόμη, δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την κ. Τζέτη Μαρία, για την ουσιαστική συνδρομή της στη διεύρυνση των γνώσεων μου, καθώς και την ευγενική της συμμετοχή στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή της Διπλωματικής μου Εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στην κ. Σερέτη Ευαγγελία, PhD, για την πολυτιμότερη βοήθειά της σε πρακτικά και θεωρητικά ζητήματα, την υπομονή της, καθώς και για την καίρια συμβολή της στην πραγματοποίηση και ολοκλήρωση της εργασίας μου. Επίσης, δε θα μπορούσα να παραλείψω να αναφέρω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την πρακτική βοήθεια τους το κατά το διάστημα της παρουσίας μου εκεί.

Το μεγαλύτερο και ουσιαστικότερο ευχαριστώ ανήκει στους οικείους μου, οι οποίοι μοιράστηκαν μαζί μου τόσο τις χαρές και τον ενθουσιασμό μου, όσο και τις λύπες, το άγχος και τις απογοητεύσεις μου καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης των πειραμάτων αλλά και συγγραφής της εργασίας μου. Ευχαριστώ πάνω απ' όλα τους γονείς μου, οι οποίοι με στηρίζουν ανιδιοτελώς όλα αυτά τα χρόνια με αγάπη και υπομονή, αλλά και τον παππού μου Απόστολο, που αποτέλεσε πρόσωπο-σταθμό στη μέχρι τώρα πορεία μου με κάθε δυνατό τρόπο.

Οκτώβριος 2017,
Δαουκοπούλου Αργυρώ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Caveolin-1 είναι μια απανταχού εκφρασμένη και αναπόσπαστη διαμεμβρανική πρωτεΐνη για το σχηματισμό των αποκαλούμενων caveolae. Δύο παραλλαγές της Caveolin-1, που αναφέρονται ως 1α (υπολείμματα 1-174) και 1β (υπολείμματα 34-174), μπορούν να διακριθούν. Πιο συγκεκριμένα, η Caveolin-1α περιέχει φωσφορυλιωμένο υπόλειμμα τυροσίνης στη θέση 14 από τις οικογένειες των κινασών τυροσίνης Src, Abl ή Fyn σε απόκριση στο μεγάλο αριθμό διαφορετικών ερεθισμάτων. Αυτή η φωσφορυλίωση έχει παρατηρηθεί ως απάντηση στο οξειδωτικό στρες και προτείνεται ως ένας δείκτης για το στρες, που σχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία στον κυτταρικό θάνατο.

Στον καρκίνο του παγκρέατος, η Caveolin-1 μειώνεται στην προκαρκινική αλλοίωση, όπως τα παγκρεατικά ενδοπορικά θηλώδη βλεννώδη νεοπλάσματα, σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό, αλλά εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό σε διηθητικούς όγκους σε σύγκριση με τους μη διηθητικούς. Επιπρόσθετα με τις επιγενετικές ή γενετικές μεταβολές και τους διαφορετικούς συν-τελεστές ή σηματοδοτικά μονοπάτια, η «λειτουργική διακύμανση» της Caveolin-1, που παρατηρήθηκε θεωρείται ότι αποδίδεται στη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες “συνεργάτες” (δομικά μόρια). Ωστόσο, ο λεπτομερής μηχανισμός είναι ασαφής.

Σκοπός της συγκεκριμένης, λοιπόν, διπλωματικής εργασίας ήταν να μελετηθεί ο ρόλος της Caveolin-1 στον καρκίνο του παγκρέατος. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης και της φωσφορυλίωσης της με τη διαδικασία της Western Blot σε πρωτεϊνικά λήμματα, που απομονώθηκαν τόσο από εγκαθιδρυμένες κυτταρικές σειρές, όσο και από όγκους ασθενών. Πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων για τη σύγκρισή τους και τη διεξαγωγή συμπερασμάτων.

Προέκυψε μεγάλη έκφραση της Caveolin-1 στην παγκρεατική καρκινική κυτταρική σειρά BxPC-3, η οποία φαίνεται να είναι και η πιο επιθετική. Ακολουθούν τα PANC-1, 3^a τα AsPC-1 και τέλος τα MIA Paca-2. Το ίδιο ισχύει και για τη φωσφορυλίωση στο υπόλειμμα τυροσίνη-14. Φαίνεται λοιπόν πως μεγαλύτερη έκφραση έχουν οι πιο επιθετικοί όγκοι. Πέραν των εγκαθιδρυμένων παγκρεατικών καρκινικών κυτταρικών σειρών, χρησιμοποιήθηκαν και 2 ζεύγη καρκινικού/μη-καρκινικού ιστού, τα οποία και προέκυψαν έπειτα από επεμβάσεις αφαίρεσης όγκων σε ασθενείς με παγκρεατικό αδenoκαρκίνωμα. Και σε αυτή την περίπτωση

μεγαλύτερη έκφραση φαίνεται να έχουν οι καρκινικοί ιστοί, συγκριτικά με τους μη-καρκινικούς.

Συμπερασματικά, λοιπόν, η Caveolin-1 πιθανότατα αποτελεί έναν καινοτόμο υποψήφιο βιοδείκτη στην ανάπτυξη όγκου, αλλά και στην επιθετικότητα του παγκρεατικού καρκίνου.

ABSTRACT

Caveolin-1 is a widely expressed and integral transmembrane protein for the formation of so-called caveolae. Two variants of Caveolin-1, referred to as 1 α (residues 1-174) and 1 β (residues 34-174), can be distinguished. In particular, Caveolin-1 α contains a phosphorylated tyrosine residue at position 14 from the families of Src, Abl or Fyn tyrosine kinases in response to a large number of different stimuli. This phosphorylation has been observed in response to oxidative stress and is suggested as a stress indicator associated with increased susceptibility to cell death.

In pancreatic cancer, Caveolin-1 decreases in precancerous lesion, such as pancreatic intrapapillary mucinous neoplasms, compared to normal tissue but is largely expressed in invasive tumors as compared to non-invasive. In addition to epigenetic or genetic alterations and different co-effectors or signaling pathways, the observed "functional variation" of Caveolin-1 is thought to be attributed to the regulation of interactions with "partner" proteins (structural molecules). However, the detailed mechanism is unclear.

The purpose of this work was to study the role of Caveolin-1 in pancreatic cancer. For this purpose, protein expression and protein phosphorylation was studied by the Western Blot procedure on protein isolates isolated from both established cell lines and patient tumors. Quantification of results has been done to compare and conclude conclusions.

There was a large expression of Caveolin-1 in the pancreatic cancer cell line BxPC-3, which appears to be the most aggressive. The following are PANC-1, AspC-1 and MIA Paca-2. The same applies to phosphorylation at the tyrosine-14 residue. It seems, therefore, that the more aggressive tumors are more pronounced. In addition to the established pancreatic cancer cell lines, 2 pairs of cancerous/non-cancerous tissue were used, which resulted from tumor ablation procedures in patients with pancreatic adenocarcinoma. And in this case more expression seems to have cancerous tissues than non-cancerous tissues.

In conclusion, therefore, Caveolin-1 is likely to be an innovative biomarker candidate in tumor growth, but also in the aggressiveness of pancreatic cancer.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην Ευρώπη υπολογίζεται ότι ο παγκρεατικός καρκίνος είναι ο 7^{ος} πιο συχνός καρκίνος, με τη συχνότητα να αυξάνει όσο αυξάνει η ηλικία. Επειδή συνήθως παραμένει ασυμπτωματικός για αρκετό διάστημα, η διάγνωση τίθεται σε προχωρημένο στάδιο, με αποτέλεσμα να αποτελεί την 5^η αιτία θανάτου από καρκίνο.

Ακριβώς, λοιπόν, λόγω της συχνότητας του, αλλά και της θανατηφόρα μορφή καρκίνου, που αποτελεί, με μικρά ποσοστά επιβίωσης, χρήζει νέων και αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων. Ο σκοπός εκπόνησης της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ήταν να μελετηθεί ο ρόλος της πρωτεΐνης Caveolin-1 σαν πιθανός προγνωστικός/προληπτικός βιοδείκτης και στόχος στον καρκίνο του παγκρέατος. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν τόσο τα επίπεδα έκφρασης της Caveolin-1, όσο και της φωσφορυλίωσης της στο υπόλειμμα τυροσίνη-14, καθώς φαίνεται να εμπλέκεται στην ανάπτυξη όγκου.

1.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Στην Ευρώπη ο παγκρεατικός καρκίνος είναι ο 7^{ος} σε συχνότητα καρκίνος, αφού 11,6 άνδρες στους 100.000 διαγιγνώσκονται με καρκίνο του παγκρέατος κάθε χρόνο, ενώ αποτελεί αιτία θανάτου για 35.000 γυναίκες. Η συχνότητα νέων διαγνωσμένων περιστατικών αυξάνει με την ηλικία, και η πλειονότητα των περιστατικών διαγιγνώσκονται άνω της ηλικίας των 65. Επειδή η ασθένεια συνήθως παραμένει ασυμπτωματική για αρκετό καιρό, η διάγνωση γίνεται, όταν πλέον ο όγκος έχει επεκταθεί σε άλλα όργανα. Είναι η 5^η αιτία θανάτου από καρκίνο. Η διάγνωση του τίθεται, όταν υπάρχουν ύποπτα συμπτώματα ή/και ενδεικτικά ευρήματα κατά την κλινική εξέταση. Δεν υπάρχει κάποια εξέταση αίματος, που να μπορεί να θέσει την διάγνωση του άμεσα. Ο καρκινικός δείκτης Ca 19-9 συνήθως αυξάνει στον καρκίνο του παγκρέατος, αλλά δεν θέτει διάγνωση.

Η Caveolin-1 είναι μια απανταχού εκφρασμένη και αναπόσπαστη διαμεμβρανική πρωτεΐνη για το σχηματισμό των αποκαλούμενων caveolae. Δύο

παραλλαγές της Caveolin-1, που αναφέρονται ως 1α (υπολείμματα 1-174) και 1β (υπολείμματα 34-174), μπορούν να διακριθούν. Πιο συγκεκριμένα, η Caveolin-1α περιέχει υπόλειμμα τυροσίνης στη θέση 14, που είναι φωσφορυλιωμένο από τις οικογένειες των κινασών τυροσίνης Src, Abl ή Fyn σε απόκριση στο μεγάλο αριθμό διαφορετικών ερεθισμάτων. Αυτή η φωσφορυλίωση έχει παρατηρηθεί ως απάντηση στο οξειδωτικό στρες και προτείνεται επίσης ως ένας δείκτης για το στρες, που σχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία στον κυτταρικό θάνατο. Συνεπώς, η έκφραση της Caveolin-1 έχει προηγουμένως συνδεθεί με ευαισθησία σε κυτταροτοξικά ερεθίσματα, που προκαλούν απόπτωση.

Στον καρκίνο του παγκρέατος, η Caveolin-1 μειώνεται στην προκαρκινική αλλοίωση, όπως τα παγκρεατικά ενδοπορικά θηλώδη βλεννώδη νεοπλάσματα, σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό, αλλά εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό σε διηθητικούς όγκους σε σύγκριση με τους μη διηθητικούς. Επιπρόσθετα, με τις επιγενετικές ή γενετικές μεταβολές και τους διαφορετικούς συν-τελεστές ή σηματοδοτικά μονοπάτια, η «λειτουργική διακύμανση» της Caveolin-1, που παρατηρήθηκε, θεωρείται ότι αποδίδεται στη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες “συνεργάτες” (δομικά μόρια). Ωστόσο, ο λεπτομερής μηχανισμός είναι ασαφής.

Η Caveolin-1 υπερεκφράζεται σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές παγκρεατικού καρκίνου και σχετίζεται με χειρότερου βαθμού όγκο και κλινικά αποτελέσματα. Σε παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές, η διάσπαση/εξάντληση caveolae/Caveolin-1 μειώνει τον πολλαπλασιασμό, τον σχηματισμό αποικιών και τη μετάσταση. Η μείωση της Caveolin-1 οδηγεί σε μεταβολή της σηματοδότησης JAK / STAT, JNK και Src σε κύτταρα καρκίνου του παγκρέατος. Η υψηλότερη έκφραση συσχετίζεται με χειρότερα αποτελέσματα, είναι ουσιώδης στην ανάπτυξη όγκου και την εισβολή (τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*), είναι υπεύθυνη για την προαγωγή της ανθεκτικότητας στις θεραπείες και μπορεί να χρησιμεύσει ως προγνωστικός/προληπτικός βιοδείκτης και στόχος στον καρκίνο του παγκρέατος.

Με τη διαδικασία της Western Blot πραγματοποιήθηκε η μελέτη των πρωτεϊνικών λημμάτων, που απομονώθηκαν από παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές αλλά και όγκους ασθενών, για τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης τόσο της Caveolin-1, όσο και της φωσφορυλίωσης της στο υπόλειμμα τυροσίνη-14.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
1.1 ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	4
1.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ.....	4
2.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ	8
2.1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ.....	8
2.1.2 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΙΔΟΥΝ ΣΥΝΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟ ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑ ΣΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	8
2.1.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	10
2.2 ΠΑΓΚΡΕΑΣ- ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.....	11
2.2.1 ΣΗΜΑΤΑ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ	11
2.2.2 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΔΟΜΗ & ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ.....	13
2.2.3 ΜΕΡΗ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ.....	14
2.2.4 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΥΦΗ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ	15
2.2.4.1 ΕΝΔΟΚΡΙΝΗΣ ΜΟΙΡΑ	15
2.2.4.2 ΕΞΩΚΡΙΝΗΣ ΜΟΙΡΑ	16
2.3 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ.....	18
2.3.1 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ.....	18
2.3.2 ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ.....	20
2.3.3 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ	21
2.3.4 ΆΛΛΟΙ ΟΓΚΟΙ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ	24
2.4 CAVEOLIN-1	25
2.4.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΙΣ CAVEOLINS	25
2.4.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ CAVEOLIN-1.....	26
2.4.3 Η ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΔΙΑΔΡΟΜΗ ΤΗΣ CAVEOLIN-1.....	33
2.4.4 ΡΟΛΟΙ ΤΗΣ CAVEOLIN-1 ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ	35
2.4.4.1 ΡΟΛΟΣ ΣΤΗ ΛΙΠΙΔΙΚΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ.....	35
2.4.4.2 ΡΟΛΟΣ ΣΤΗΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ ΤΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ.....	37
2.4.4.3 ΡΟΛΟΣ ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ	39
2.4.5 Η ΑΝΤΟΧΗ ΤΗΣ CAVEOLIN-1 ΣΕ ΠΟΛΛΑΠΛΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΣΤΗ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ.....	43
2.4.6 ΜΕΣΟΛΑΒΗΣΗ ΤΗΣ CAVEOLIN-1 ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ.....	46
2.4.7 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ	48
2.4.8 ΆΛΛΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ	49

2.4.9 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟΙ ΑΠΟ ΤΗΝ CAVEOLIN-1, ΠΟΥ ΤΡΟΠΟΠΟΙΟΥΝ ΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ	50
2.4.10 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΜΕΣΟΛΑΒΟΥΜΕΝΟΙ ΤΗΣ CAVEOLIN-1	50
2.4.11 CAVEOLIN-1 ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗ	53
2.4.12 Η ΥΠΟΘΕΣΗ ΤΟΥ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ-ΟΙ ΔΥΟ ΟΥΦΕΙΣ.....	55
2.4.13 CAVEOLIN-1 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ.....	58
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	64
3.1 ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ	64
3.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	65
3.2.1 ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΕΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΙ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ.....	65
3.3 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	69
3.4 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ...	69
3.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ NEUBAUER HEMACYTOMETER ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ TRYPAN BLUE	72
3.6 ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	75
3.7 ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	76
3.8 ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΟΓΚΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΓΚΩΝ.....	77
3.9 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ (BRADFORD ANALYSIS)	79
3.10 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ WESTERN BLOT ANALYSIS.....	80
3.11 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	90
3.12 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΗΝ PVDF MEMBRANE (STRIPPING)	90
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	92
4.1 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ CAVEOLIN-1 ΜΕ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ	92
4.2 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ PHOSPHO-CAVEOLIN-1 (TYR14) ΜΕ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ	95
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	98
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	103

2.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ

2.1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Ο **καρκίνος** αποτελεί το τμήμα, που πληρώνει ο άνθρωπος, για την ικανότητα του να ανανεώνει τους ιστούς του και να επιδιορθώνει λάθη κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του γενετικού του υλικού. Είναι αποτέλεσμα μίας ή περισσότερων μεταλλάξεων, που απορρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο/πολλαπλασιασμό και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Αντιστοιχεί σε ανώμαλη κυτταρική αύξηση, ενώ άλλοι όροι που χρησιμοποιούνται, για να τον περιγράψουν είναι **κακοήθης όγκος** ή **νεοπλασία**. Μπορεί να επηρεάσει οποιοδήποτε σημείο του σώματος.

2.1.2 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΙΔΟΥΝ ΣΥΝΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟ ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑ ΣΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Καθώς αναπτύσσεται, για να είναι επιτυχημένο ένα καρκινικό κύτταρο, πρέπει να αποκτήσει ένα ολόκληρο φάσμα ανώμαλων ιδιοτήτων, ώστε να είναι σε θέση να εκτοπίσει τα φυσιολογικά γειτονικά κύτταρα και να εξασφαλίσει αιματική παροχή επαρκή για τη θρέψη του αναπτυσσόμενου όγκου [1].

Διαφορετικοί καρκίνοι απαιτούν διαφορετικούς συνδυασμούς ιδιοτήτων. Ωστόσο, μια σειρά κρίσιμων χαρακτηριστικών διακρίνει τα καρκινικά από τα φυσιολογικά κύτταρα [2].

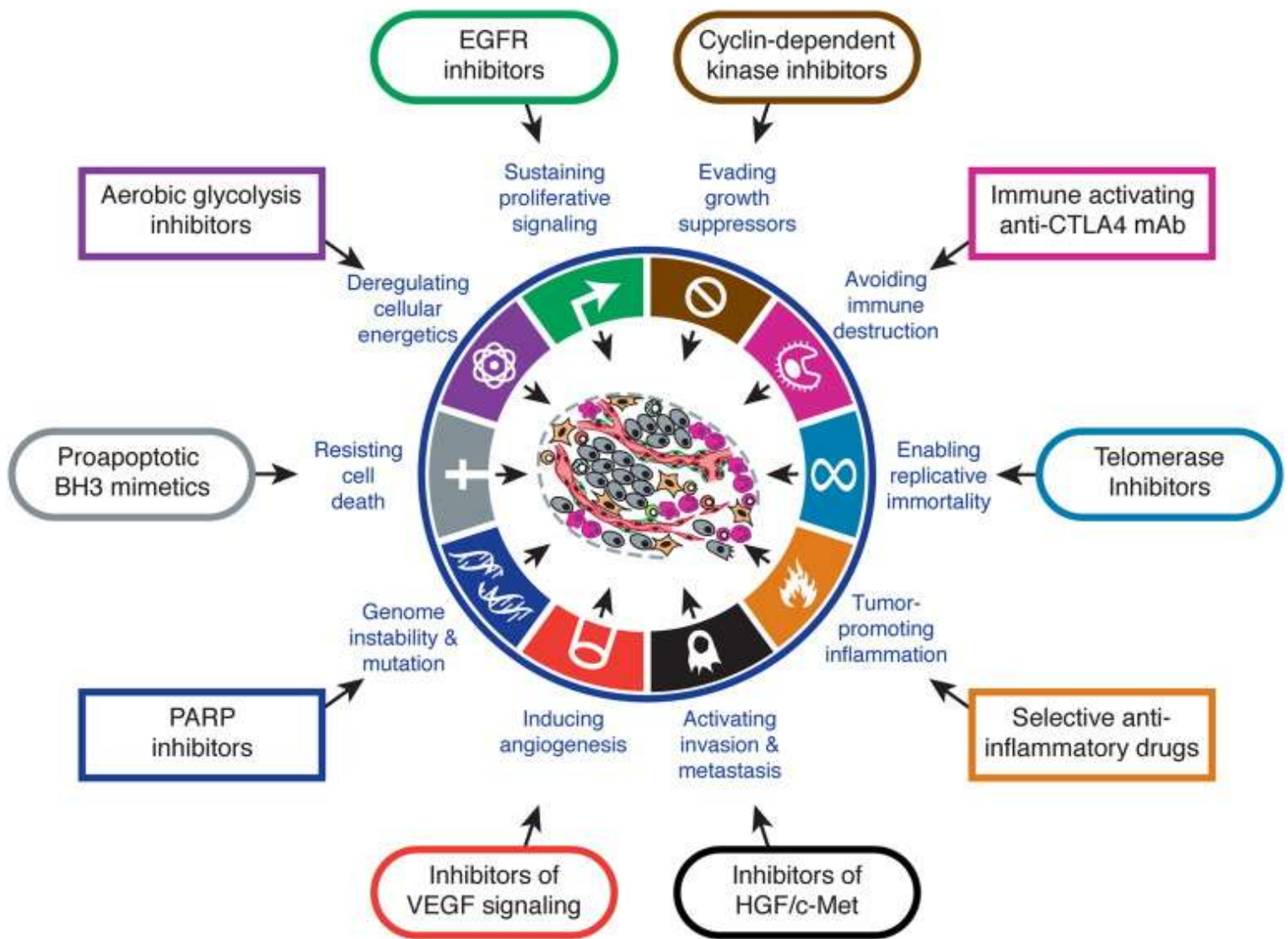
Τα χαρακτηριστικά ή αλλιώς **ορόσημα του καρκίνου** σύμφωνα με τους D. Hanahan & R. A. Weinberg (2000) είναι [3]:

1. **Αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα**
2. **Αναισθησία σε αντι-αυξητικά σήματα**
3. **Αποφυγή απόπτωσης**
4. **Απεριόριστος πολλαπλασιασμός**
5. **Συνεχής αγγειογένεση**
6. **Διήθηση και μετάσταση**

Και τα 6 ορόσημα του καρκίνου προκύπτουν άμεσα ή έμμεσα από μεταλλάξεις-αλλαγές στο γένωμα = *γενετική αστάθεια*.

Η ίδια ερευνητική ομάδα το 2011 πρόσθεσε άλλα 4, τα οποία και εντάχθηκαν ως συμπληρωματικά στα προαναφερθέντα, και έχουν ως εξής (Εικ.1) [277]:

7. **Γενετική αστάθεια και μεταλλαγές**
8. **Φλεγμονή που προωθεί τον καρκίνο**
9. **Απορρύθμιση κυτταρικής ενέργειας-μεταβολισμού**
10. **Αποφυγή ανοσο-καταστροφής**



Εικόνα 1. Θεραπευτική στόχευση των οροσήμων του καρκίνου [2]

2.1.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ο καρκίνος θεωρείται ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα, που μπορεί να προσβάλλει ανθρώπους όλων των ηλικιών, και αποτελεί μια από τις πιο ενδιαφέρουσες προκλήσεις της Μοντέρνας Ιατρικής. Σε παγκόσμια κατάταξη όσον αφορά τα αίτια θνησιμότητας έρχεται 2^{ος} αμέσως μετά τις καρδιοπάθειες, με βάση αποτελέσματα, που δημοσιεύτηκαν το 2006 στις ΗΠΑ, όπως φαίνεται στον πίνακα παρακάτω (Πίν.1) [4].

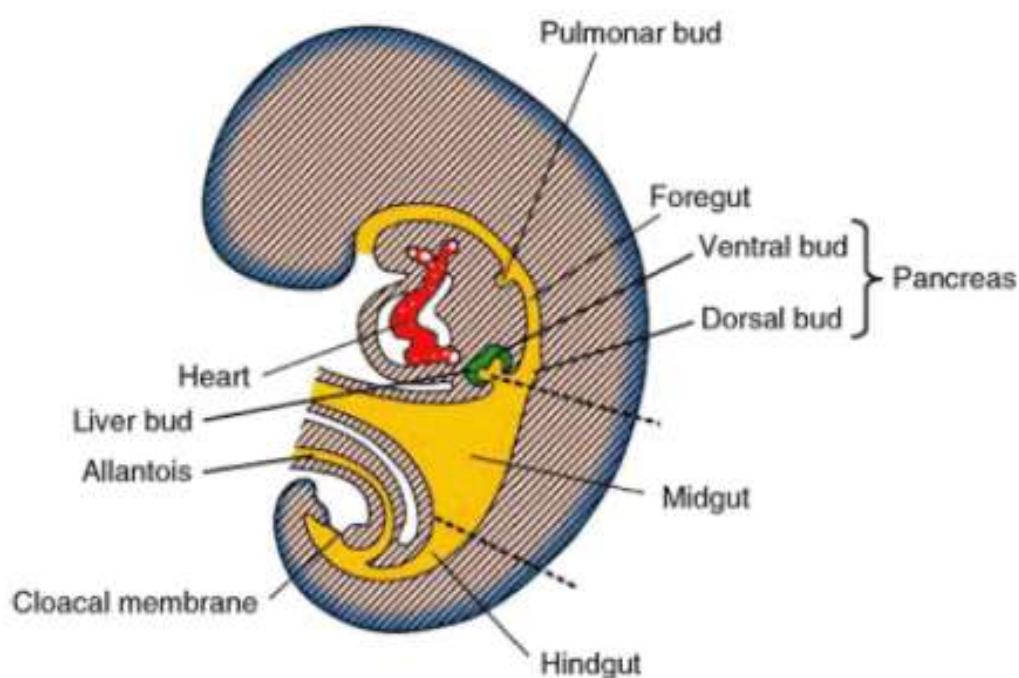
Κατάταξη	Αιτία Θανάτου	Αριθμός Θανάτων	% όλων των Θανάτων
1	Καρδιοπάθειες	631,636	26,0
2	Καρκίνος	559,888	23,1
3	Χρόνιες Αναπνευστικές Παθήσεις	137,119	5,7
4	Ατυχήματα (ακούσιοι τραυματισμοί)	124,583	5,1
5	Εγκεφαλικό επεισόδιο	121,599	5,0
6	Νόσος Alzheimer	72,449	3,0
7	Διαβήτης	72,432	3,0
8	Μορφές Γρίπης και Πνευμονία	56,326	2,3

Πίνακας 1. Κύριες αιτίες θανάτου και αριθμού θανάτων, ανά φύλο, φυλή και ισπανόφωνη προέλευση: Ηνωμένες Πολιτείες, 1980 και 2014 [4]

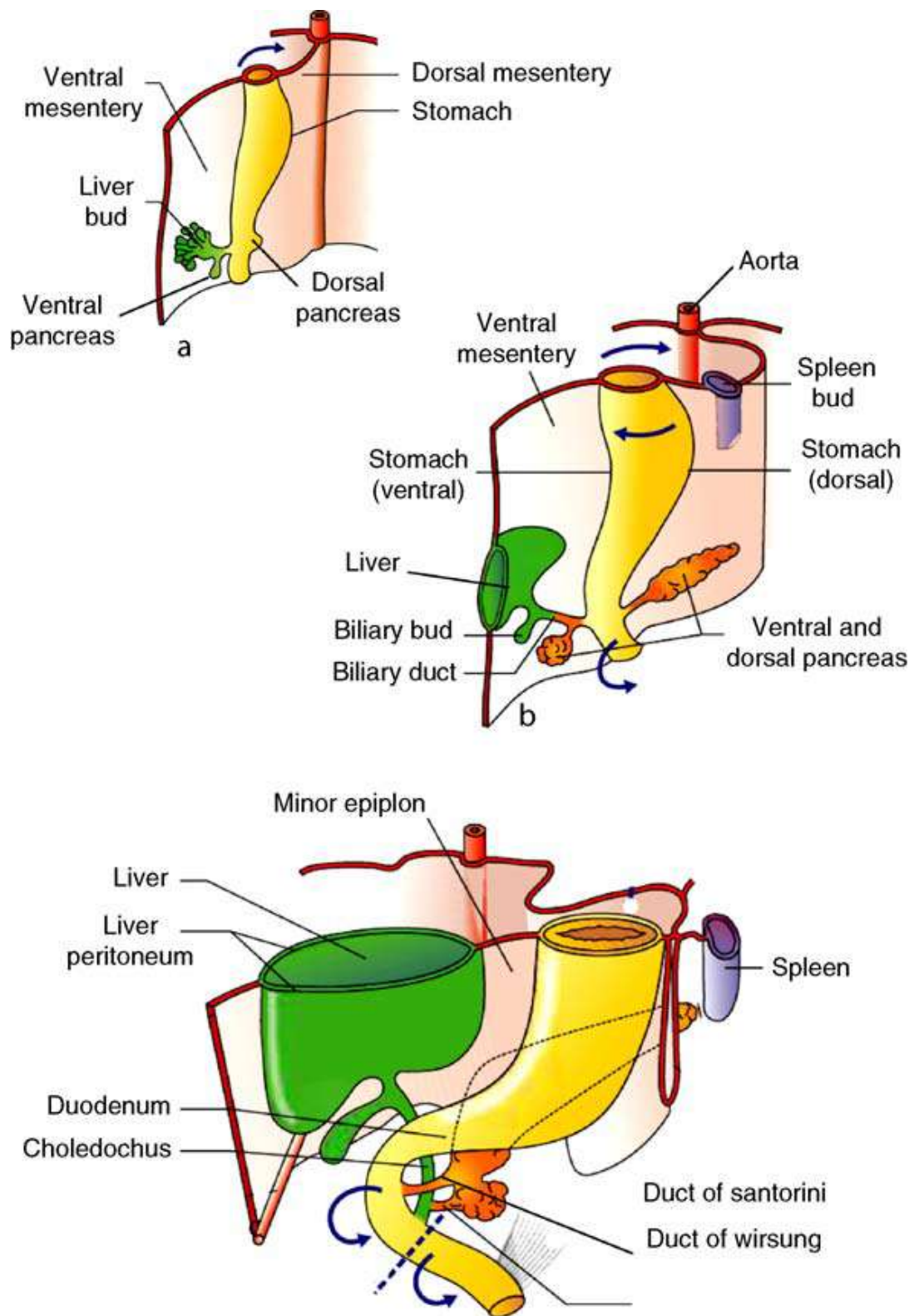
2.2 ΠΑΓΚΡΕΑΣ- ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

2.2.1 ΣΗΜΑΤΑ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ

Η ανάπτυξη του παγκρεατικού αδένος (Εικ.2) ξεκινά την 5^η εβδομάδα της ζωής του ανθρώπινου εμβρύου από τις ραχιαίες και κοιλιακές ενδοδερμικές εκβολές από το πιο ουραίο τμήμα του πρωτόγονου ελαφρού στρώματος. Καθώς το δωδεκαδάκτυλο μεγαλώνει και περιστρέφεται γύρω από το διαμήκη άξονά του, το κοιλιακό οστόν, που θα σχηματίσει την αγκιστροειδή απόφυση και το κάτω μέρος της κεφαλής του παγκρέατος, μετατοπίζεται προς τα πίσω και ασφαλίεται με το ραχιαίο οφθαλμό κατά τη διάρκεια της 7^{ης} εβδομάδας ανάπτυξης, σχηματίζοντας τον αδένιο του παγκρέατος. Η ανάπτυξη του παγκρέατος (Εικ.3) συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με αυτή του ήπατος. Και οι δύο αυτοί αδένες προέρχονται από το ίδιο ενδοδερμικό τμήμα του πρόσθιου εντέρου [5,6]. Όμως, ενώ τα μοριακά σήματα, που εκπέμπονται από το καρδιακό σύμπλεγμα σχηματίζουν το ήπαρ, οι κυτταρικές επικοινωνίες με τη νωτιαία χορδή είναι αυτές, που καθορίζουν την ανάπτυξη του παγκρέατος [7-9].



Εικόνα 2. Πρωτόγονο έντερο σε ένα σιγμοειδές τμήμα ανθρώπινου εμβρύου 4 εβδομάδων [277]

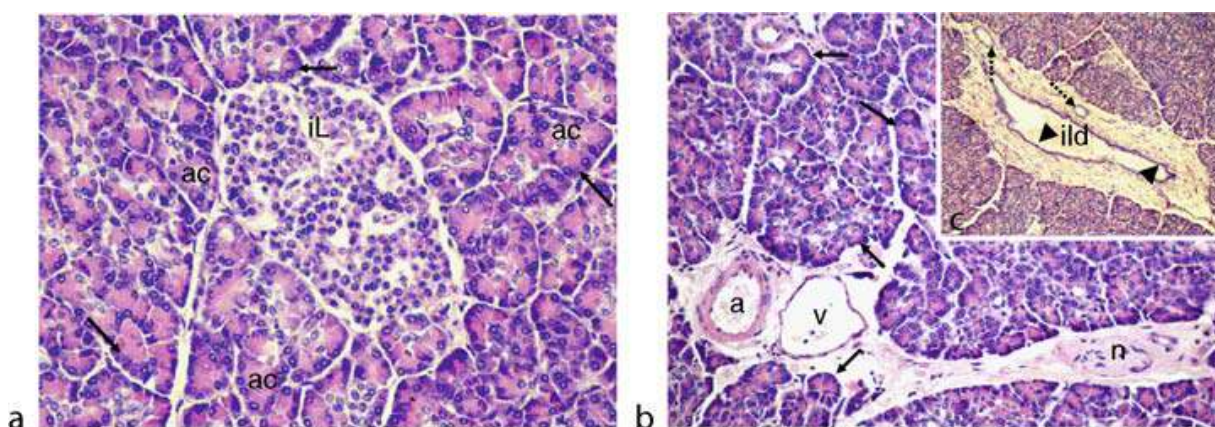


Εικόνα 3. Ανάπτυξη του παγκρέατος σε ανθρώπινα έμβρυα των 5 (α), 6 (β) και 7 (γ) εβδομάδων. Τα βέλη δείχνουν την περιστροφή του εντέρου γύρω από το διαμήκη άξονά του. Διακεκομμένη γραμμή: όριο ανάμεσα στο πρόσθιο και το μεσαίο [277]

2.2.2 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΔΟΜΗ & ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ

Το πάγκρεας είναι ο 2^{ος} σε μέγεθος μεικτός αδένας του γαστρεντερικού συστήματος, μετά το ήπαρ, με μήκος, που κυμαίνεται από 12-15 cm και βάρος 50-70 g στις γυναίκες και 80-90 στους άνδρες. Έχει γκριζοκόκκινη απόχρωση, μαλακή σύσταση και επιφάνεια (Εικ.4), διαχωρίζεται σε μικρά λόβια, ενώ μορφολογικά διακρίνεται σε 3 μέρη: την κεφαλή, το σώμα και την ουρά. Το όριο μεταξύ κεφαλής και σώματος αποτελεί μία στενότερη μοίρα, που καλείται ισθμός ή αυχένος του παγκρέατος, ενώ αντίστοιχο όριο για το σώμα και την ουρά δεν υπάρχει. Είναι όργανο καθηλωμένο στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο και εκτείνεται από την αγκύλη του δωδεκαδακτύλου έως την πύλη του σπληνός. Περιβάλλεται από μια κάψουλα συνδετικού ιστού, που διαχωρίζει το παρέγχυμα σε λοβούς, μέσω λεπτών διαχωριστικών τοιχωμάτων, που περιέχουν νεύρα, λεμφικά και αιμοφόρα αγγεία και αποβολικούς αγωγούς. Στηρίζεται από τα όργανα, που βρίσκονται πίσω του: το περιτόναιο, την αγκύλη του δωδεκαδακτύλου, τους εκφορητικούς πόρους και τα αγγεία του.

Είναι αδένας σύνθεσης, αποθήκευσης και σύνθετης έκκρισης σημαντικών ορμονών και πεπτικών ενζύμων. Καθημερινά, εκκρίνει περίπου 1200 ml παγκρεατικού χυμού, ο οποίος είναι απαραίτητος για την πέψη υδατανθράκων, πρωτεϊνών και λιπών των τροφών [10].



Εικόνα 4. Ιστολογική δομή του ενήλικου παγκρέατος [277]

2.2.3 ΜΕΡΗ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ

Το πάγκρεας περιβάλλει χαλαρός συνδετικός ιστός (ψευδοκάψα) και διακρίνεται στα εξής μέρη:

- Αγκιστροειδής απόφυση
- Αυχένιας
- Κεφαλή
- Ουρά
- Σώμα

Οι πόροι του παγκρέατος είναι 2: ο μείζων (**Wirsung**) και ο ελάσσων (**Santorini**). Ο μείζων παγκρεατικός πόρος (**Wirsung**) διατρέχει την ουρά, το σώμα και την κεφαλή, μεταξύ άνω και κάτω χείλους, απ' όπου και συγκεντρώνει παγκρεατικό υγρό. Έχει διάμετρο από 1,2-7 mm. Κατά μήκος της διαδρομής του εκβάλλουν σε αυτόν 15-20 βραχείς πόροι. Στην κεφαλή συναντά την κάτω επιφάνεια του χοληδόχου πόρου, για να εισέλθει στο τοίχωμα του δωδεκαδακτύλου, έτσι ώστε να σχηματίσει την μείζονα θηλή του δωδεκαδακτύλου (φύμα του Vater) [11-13]. Η εκβολή του πόρου σε ποσοστό 75% είναι κοινή με το χοληδόχο πόρο, ενώ στις υπόλοιπες περιπτώσεις εκβάλλει στο φύμα. Στο στόμιο της εκβολής η διάταξη των λείων μυϊκών ινών είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό του σφιγκτήρα, ενώ οι πτυχές του βλεννογόνου εμποδίζουν την είσοδο της χολής ή του εντερικού περιεχομένου στο εσωτερικό του, δημιουργώντας έτσι μία υποτυπώδη βαλβίδα [11].

Ο επικουρικός ή ελάσσων παγκρεατικός πόρος (**Santorini**), έχοντας διαδρομή περισσότερο επιπολής (πλησιέστερα προς την πρόσθια επιφάνεια), ξεκινά από το μείζονα παγκρεατικό πόρο (αυχένιας του παγκρέατος) καταλήγοντας προς τα επάνω στο έλασσον φύμα, όπου βρίσκεται 2 cm κεντρικότερα του μείζονος φύματος. Παροχετεύει το άνω τμήμα της κεφαλής του αδένου. Κατά την πορεία του συχνά αναστομώνεται με το μείζονα εκφορητικό πόρο και εντοπίζεται μπροστά από το χοληδόχο πόρο με μήκος, που ανέρχεται σε 3-4 cm και εύρος, που κυμαίνεται σε 2-3 mm [11,14].

2.2.4 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΥΦΗ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ

Το πάγκρεας διαθέτει 2 διαφορετικούς τύπους αδενικού ιστού στενά συνδεδεμένους μεταξύ τους: την ενδοκρινή και εξωκρινή μοίρα του παγκρέατος. Η κύρια μάζα του αδένα (95%) ανήκει στην εξωκρινή μοίρα, μέσα στην οποία υπάρχουν εμβόλιμες περιοχές ενδοκρινικών κυττάρων με διάσπαρτη και ακανόνιστη εμφάνιση, που καλούνται παγκρεατικά νησίδια ή **νησίδια του Langerhans**, τα οποία και αποτελούν την ενδοκρινή μοίρα [11,15].

2.2.4.1 ΕΝΔΟΚΡΙΝΗΣ ΜΟΙΡΑ

Η λειτουργική μονάδα του ενδοκρινικού παγκρέατος είναι τα νησίδια του Langerhans, που ανευρίσκονται σε τυχαία διάταξη εντός του αδένα. Ο αριθμός τους ανέρχεται περίπου στο 1.000.000 αποτελώντας το 1-1,5% της μάζας του παγκρέατος. Το καθένα από αυτά περιέχει κατά μέσο όρο 2.500 κύτταρα με διάμετρο, που κυμαίνεται από 0,2 μέχρι 0,5mm, και χαρακτηρίζονται από έλλειψη επικοινωνίας με το σύστημα των παγκρεατικών πόρων. Εμβρυολογικά προέρχονται από τα επιθηλιακά κύτταρα των εκφορητικών πόρων και την αδενοκυψέλη (ενδοδερμική καταγωγή). Σχηματίζονται από δεκάδες έως εκατοντάδες κύτταρα, που περιέχουν πολλά αιμοφόρα αγγεία. Η ενδοκρινής μοίρα αρχίζει να λειτουργεί κατά την εμβρυική ζωή (2^{ος} μήνας κύησης), πριν αρχίσει η λειτουργία της εξωκρινούς. Βρίσκονται κυρίως στην ουρά, παρά στο σώμα και την κεφαλή του παγκρέατος. Ιστολογικά αποτελούνται από τουλάχιστον 4 τύπους κυττάρων νησιδίων:

- ❖ Τα άλφα (Α) κύτταρα αποτελούν το 15-20% των κυττάρων των νησιδίων, κατανέμονται ομοιογενώς επάνω στον αδένα και κυρίως γύρω από την περιφέρεια των νησίδων.
- ❖ Τα βήτα (Β) κύτταρα, που αντιπροσωπεύουν το 50-80%, βρίσκονται στην πλειοψηφία τους προς την περιφέρεια και μόνο μερικά από αυτά στο κέντρο των νησιδίων. Διασπούν την ινσουλίνη [16,17].
- ❖ Τα δέλτα (Δ) κύτταρα συμπληρώνουν το 3-10%. Διασκορπίζονται από τις νησίδες και έχουν μικρούς κυτταροπλασματικούς κόκκους, που περιέχουν σωματοστατίνη.

- ❖ Τα F (PP) κύτταρα διαχωρίζουν το παγκρεατικό πολυπεπτίδιο, αντιπροσωπεύουν μόνο το 1% του κυτταρικού πληθυσμού των νησιδίων και αναστέλλουν την εξωκρινή μοίρα [18].

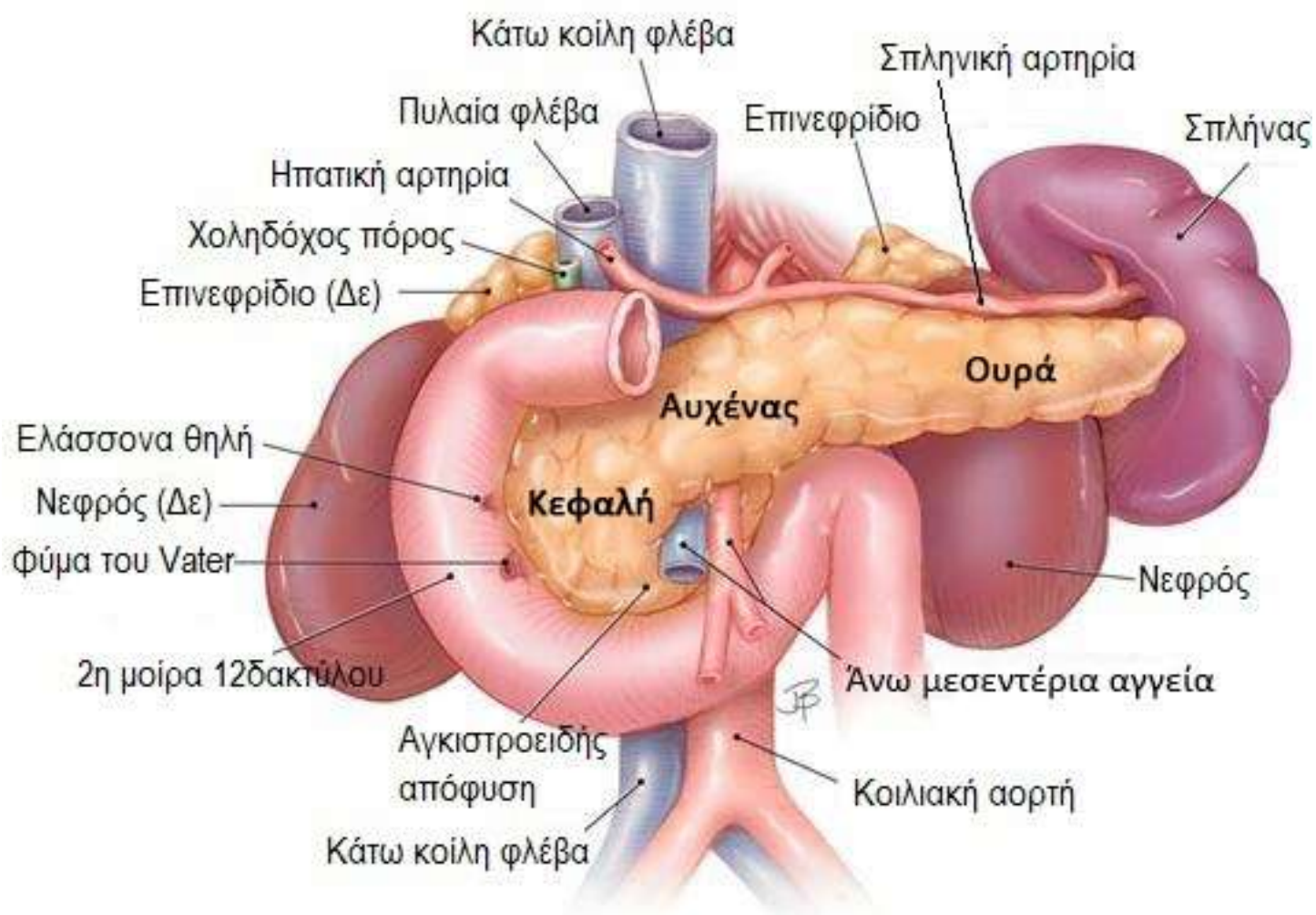
Οι νησιδιακές διαφορές μεταξύ των περιοχών του παγκρέατος αντανακλούν τη διαφορετική εμβρυολογική προέλευση και αγγείωση αυτών των περιοχών από την συνένωση, των οποίων προκύπτει το πάγκρεας ως ενιαίο όργανο [19].

Ο αλληλοεπηρεασμός των νησιδιακών κυττάρων επιτυγχάνεται με ενδοκρινικές (μέσω της κυκλοφορίας), παρακρινικές (μέσω του διάμεσου χώρου) και ακόμη με την ύπαρξη άμεσων υπομικροσκοπικών επικοινωνιών, που επιτρέπουν τη διέλευση μικρών μορίων (ιόντα και νουκλεοτίδια), με μοριακό βάρος μικρότερο των 1000 Da, καθώς και ηλεκτρικών ρευμάτων [20-22].

2.2.4.2 ΕΞΩΚΡΙΝΗΣ ΜΟΙΡΑ

Αυτό το τμήμα του παγκρέατος είναι ένα τυπικός ολόκληρος υδαρής, σύνθετος, κυψελοειδής αδένας με μήκος 12-15 cm και βάρος 85-100 g, που διαιρείται λειτουργικώς σε 2 τμήματα, το ενδοκρινικό με τα νησίδια του Langerhans και το εξωκρινικό με την αδενοκυψέλη. Σχηματίζεται από πολλούς μικρούς λοβούς, που οριοθετούνται από λεπτά τοιχώματα συνδετικού ιστού, που περιέχουν πολλά αιμοφόρα και λεμφικά αγγεία, νεύρα και διασωληνωτούς αγωγούς. Διαθέτει μορφολογία παρόμοια με αυτή των σιελογόνων αδένων. Η εξωκρινής μοίρα εκκρίνει το παγκρεατικό υγρό, το οποίο είναι απαραίτητο για την ομαλή λειτουργία της πέψης [23-25]. Ο ρυθμός έκκρισης του αδένου κυμαίνεται από 0,2 ml/min κατά τη φάση της ηρεμίας, ενώ είναι δυνατόν να φτάσει μέχρι και τα 4 ml/min. Αποτελείται από αδενοκυψέλη βοτρυοειδούς τύπου και εκφορητικά σωληνάκια, ενώ ο συνδετικός του ιστός, που περιβάλλει τα λοβία του αδένου, δημιουργεί προσεκβολές στο εσωτερικό του, σχηματίζοντας τα διαφράγματα, όπου ανευρίσκονται λείες μυϊκές ίνες, αγγεία και νεύρα. Σε μικροσκοπικό επίπεδο, μπορούν να εντοπιστούν 2 λειτουργικά διαμερίσματα: η **αδενοκυψέλη** και ο **αγωγός** [26].

Τόσο η ενδοκρινής, όσο και η εξωκρινής μοίρα είναι ανεξάρτητες στα λειτουργικά τους χαρακτηριστικά, καθώς και τις παθολογικές μεταβολές.



Εικόνα 5. Ανατομικές σχέσεις του παγκρέατος με τα γύρω όργανα και δομές [278]

2.3 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ

2.3.1 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ

Ο καρκίνος του παγκρέατος είναι η 4^η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο σε Ευρώπη και Η.Π.Α. και οδηγεί σε κατ'εκτίμηση 227.000 θανάτους ανά έτος παγκοσμίως. Εμφανίζεται σπάνια πριν την ηλικία των 40 ετών, και πάνω από τις μισές περιπτώσεις παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος εμφανίζονται σε άτομα άνω των 70 ετών [27]. Μερικοί από τους παράγοντες κινδύνου για την κακοήθη αυτή νόσο (Εικ.6) περιλαμβάνουν το κάπνισμα [28], το οικογενειακό ιστορικό χρόνιας παγκρεατίτιδας [29], την προχωρημένη ηλικία [28], το φύλο (αρσενικό), το σακχαρώδη διαβήτη [30,31], την παχυσαρκία [32-34], την ομάδα αίματος (εκτός της O), τις περιστασιακές εκθέσεις π.χ. σε διαλύτες χλωριωμένου υδρογονάνθρακα και νικέλιο, την Αφροαμερικανική καταγωγή, τη δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, πλούσια σε κόκκινο κρέας και χαμηλή περιεκτικότητα σε λαχανικά και φολικό οξύ [35] και πιθανώς τη μόλυνση *Helicobacter pylori* [36-38] και την περιοδοντική νόσο. Φαίνεται ότι η μεσογειακή δίαιτα (πλούσια σε φρούτα και λαχανικά) έχει προστατευτικό ρόλο. Ο σακχαρώδης διαβήτης, αν και δεν είναι σαφές, αν αποτελεί παράγοντα κινδύνου, συχνά αναπτύσσεται σε ασθενείς λίγους μήνες έως και 2-3 έτη πριν από την εκδήλωση καρκίνου. Είναι επίσης γνωστό ότι η χρόνια παγκρεατίτιδα συνυπάρχει ή προδιαθέτει την ανάπτυξη καρκίνου. Αν και η αιτία του παγκρεατικού καρκίνου είναι πολύπλοκη και πολυπαραγοντική, το κάπνισμα και το οικογενειακό ιστορικό είναι κυρίαρχα. Περίπου το 20% των παγκρεατικών όγκων προκαλούνται από το κάπνισμα, ενώ οι τύποι καρκίνου από τους καπνιστές περιέχουν περισσότερες γενετικές μεταλλάξεις από εκείνες των μη καπνιστών.

Το οικογενειακό ιστορικό είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για τη νόσο, καθώς περίπου το 7-10% των προσβεβλημένων ατόμων έχουν οικογενειακό ιστορικό.

Παράγοντες κινδύνου για Παγκρεατικό Καρκίνο



Εικόνα 6. Παράγοντες κινδύνου καρκίνου του παγκρέατος [279]

Το πάγκρεας, όπως προαναφέρθηκε, είναι ένα σύνθετο όργανο με πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Κάθενας από αυτούς τους τύπους μπορεί να δώσει γένεση για διαφορετικούς τύπους όγκων. Η σωστή διάγνωση του τύπου του όγκου είναι σημαντική, δεδομένου ότι η πρόγνωση για την επιβίωση εξαρτάται από τον τύπο και η χειρουργική εξαίρεση μερικών από αυτούς στο πάγκρεας μπορεί να συνδεθεί με σχεδόν φυσιολογική ζωή. Συχνά, ο τύπος του όγκου, που είναι παρών στο πάγκρεας, μπορεί να εντοπιστεί από εξειδικευμένες εξετάσεις όπως μελέτες με ραδιοϊσότοπα, καθώς και ΑΤ και MRI.

Ανάλογα με το ποιας μοίρας τα κύτταρα γίνονται καρκινικά, 2 είναι οι βασικές κατηγορίες παγκρεατικού καρκίνου:

- Το **αδενοκαρκίνωμα**, που αφορά τα κύτταρα της εξωκρινούς μοίρας, είναι η πιο συχνή μορφή και συνήθως αναπτύσσεται στην κεφαλή του παγκρέατος.
- Το **νευροενδοκρινικό**, καρκίνωμα που αφορά τα κύτταρα της ενδοκρινούς μοίρας, και έχει διαφορετική βιολογική συμπεριφορά με αποτέλεσμα να διαφέρει η διαγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση.

Το 85% των ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο έχουν τον πολύ επιθετικό τύπο του αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος. Σε περίπου 15% των ασθενών βρίσκονται άλλοι όγκοι στο πάγκρεας, που είναι λιγότερο επιθετικοί και συχνά ιάσιμοι.

Τα πρώιμα σημάδια και συμπτώματα δεν είναι εξειδικευμένα και ενδέχεται να περιλαμβάνουν κιτρίνισμα του δέρματος, πόνο στην κοιλιακή χώρα ή τη μέση, απώλεια όρεξης, ανεξήγητη απώλεια βάρους, ανοιχτόχρωμα κόπρανα (ανοιχτό γκρι, λευκά) και σκούρα ούρα [39]. Συχνά δεν υπάρχουν συμπτώματα στα πρώτα στάδια και τα εξειδικευμένα συμπτώματα, που θα μπορούσαν να υποδείξουν παγκρεατικό καρκίνο, εν γένει δεν εμφανίζονται παρά μόνο, όταν η ασθένεια είναι σε προχωρημένο στάδιο [27, 39]. Όταν ο καρκίνος διαγιγνώσκεται, έχει συνήθως εξαπλωθεί σε άλλα σημεία του σώματος [27, 39].

2.3.2 ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ

Το πιο συχνό είδος παγκρεατικού καρκίνου, όπως προαναφέρθηκε, είναι το αδενοκαρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου ή εξωκρινής παγκρεατικός καρκίνος. Ξεκινά στα κύτταρα των βλεννογόνων των παγκρεατικών πόρων, οι οποίοι παράγουν και εκκρίνουν πεπτικά ένζυμα [39]. Το 85% όλων των καρκινικών όγκων του παγκρέατος είναι αδενοκαρκινώματα. Το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα αποτελεί την 4^η κύρια αιτία θανάτων από καρκίνο σε άνδρες και γυναίκες στις ΗΠΑ. Η Αμερικανική Αντικαρκινική Εταιρεία υπολογίζει ότι κάθε έτος 29.000 Αμερικανοί διαγιγνώσκονται με αδενοκαρκίνωμα και περίπου 28.000 ετησίως πεθαίνουν από την πάθηση αυτή.

Περίπου το 20-40% των ασθενών με καρκίνο στο πάγκρεας έχουν καρκίνο μόνο μέσα στο πάγκρεας κατά την στιγμή της διάγνωσης. Η χειρουργική αφαίρεση του όγκου συστήνεται σε αυτήν την ομάδα ασθενών, μιας και είναι η καλύτερη επιλογή για καλή απώτερη επιβίωση. Η χειρουργική επέμβαση σ' αυτή την περίπτωση είναι μια ιδιαίτερα εξειδικευμένη επέμβαση και επομένως ο ασθενής πρέπει να αξιολογηθεί από έναν χειρουργό, πεπειραμένο σε επεμβάσεις παγκρέατος. Περίπου 60-80% των ασθενών έχουν την στιγμή της διάγνωσης προχωρημένο καρκίνο, επειδή εισβάλλει στους περιβάλλοντες ιστούς έξω από το πάγκρεας (τοπικά προχωρημένος), ή έχει δώσει μεταστάσεις έξω από το πάγκρεας (μεταστατικός).

Η 5ετής επιβίωση για τους ασθενείς, που υποβάλλονται σε χειρουργική εξαίρεση, είναι περίπου 6,9%. Τα αποτελέσματα της χειρουργικής επέμβασης έχουν βελτιωθεί εντυπωσιακά τις τελευταίες 2 δεκαετίες, έτσι ώστε σήμερα το ποσοστό θνησιμότητας από χειρουργική επέμβαση είναι λιγότερο από 3-4% στα 3^οβάθμια κέντρα χειρουργικής.

2.3.3 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ

Τα αδενοκαρκινώματα του παγκρεατικού πόρου εξελίσσονται μέσω μη επιθετικών πρόδρομων αλλοιώσεων, κατά κανόνα παγκρεατικών ενδοεπιθηλιακών νεοπλασιών, αποκτώντας επιλεκτικά γενετικά και επιγενετικά τροποποιημένες μεταβολές κατά μήκος της οδού. Οι καρκίνοι του παγκρέατος εξελίσσονται επίσης από τα ενδοπρωκτικά θηλοειδή βλεννογόνα νεοπλάσματα ή βλεννώδη κυστικά νεοπλάσματα.

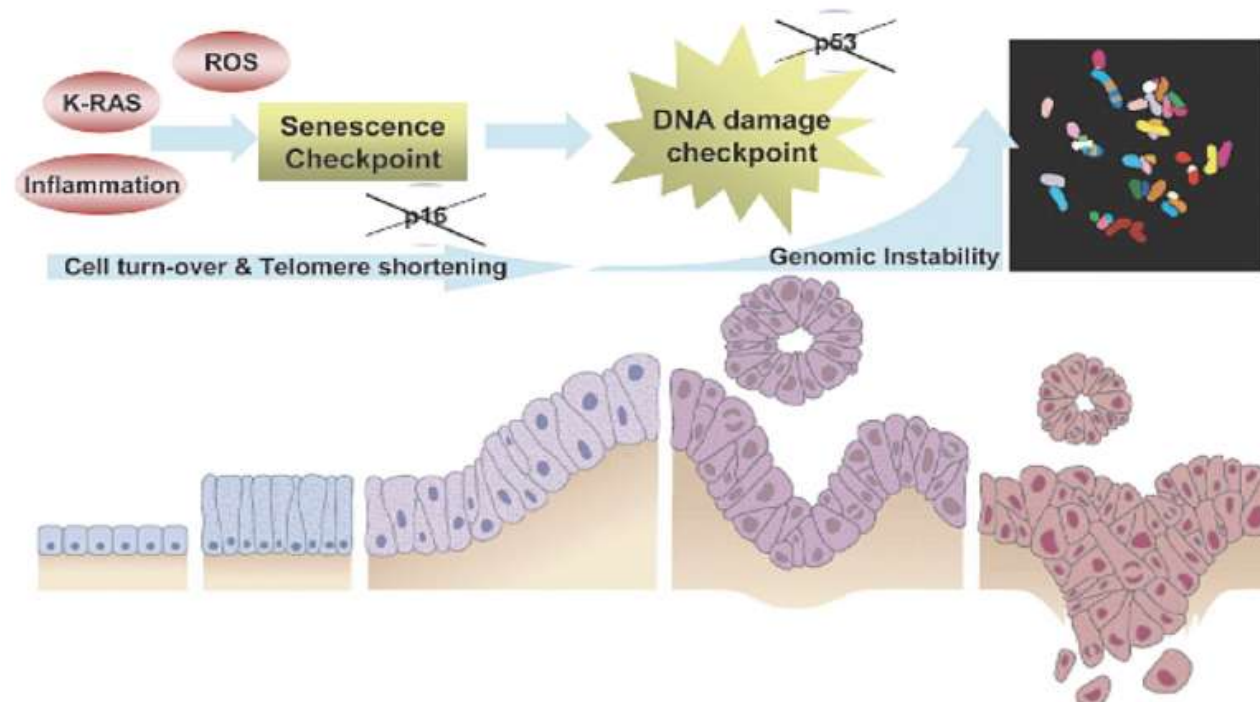
Τα εξόνια των 24 παγκρεατικών αδενοκαρκινωμάτων υποβλήθηκαν σε ανάλυση αλληλουχίας, για να χαρακτηριστούν πληρέστερα τα μεταλλαγμένα γονίδια [40]. Οι συχνότερες γενετικές ανωμαλίες σε διηθητικά παγκρεατικά αδενοκαρκινώματα είναι η μεταλλακτική ενεργοποίηση του KRAS ογκογονιδίου και η αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των CDKN2A, TP53, SMAD4 και BRCA2,[41] εκτεταμένες χρωμοσωμικές απώλειες, γονιδιακές ενισχύσεις [40], και κόντεμα των τελομερών [42]. Η μετάλλαξη KRAS και η μείωση των τελομερών είναι οι πρώτες γνωστές καταγεγραμμένες γενετικές

ανωμαλίες, ακόμη και σε χαμηλού βαθμού παγκρεατικές ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες [42,43], ενώ το κόντεμα των τελομερών πιστεύεται ότι συμβάλλει στη χρωμοσωμική αστάθεια και αδρανοποίηση των TP53, Smad4, και BRCA2, η οποία συμβαίνει σε προχωρημένες παγκρεατικές ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες και επιθετικά καρκινώματα [44,45] Μεταλλαγμένα γονίδια σε παγκρεατικούς καρκίνους (<20%) περιλαμβάνουν ογκογονίδια όπως BRAF, MYB, AKT2, και EGFR, και ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως MAP2K4, STK11, TGFBR1, TGFBR2, ACVR1B, ACVR2A, FBXW7 και EP300 [40]. Δομική ανάλυση μεταλλαγμένων γονιδίων εμπλέκει τα PIK3CG, DGKA, STK33, TTK και PRKCG ως μεταλλάξεις χαμηλής συχνότητας [46].

Τα θηλώδη κυστικά νεοπλάσματα περικλείουν πολλές από τις γενετικές αλλοιώσεις, που καταγράφονται στις παγκρεατικές ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες, αλλά με αξιοσημείωτες διαφορές, π.χ. τα ενδοπρωκτικά θηλώδη νεοπλάσματα σπάνια απενεργοποιούν το SMAD4 [47].

Εκτός από τα γονίδια που προαναφέρθηκαν, οι επιγενετικές αλλαγές μπορούν επίσης να μεταβάλλουν τη γονιδιακή λειτουργία στους παγκρεατικούς καρκίνους [48]. Η επιγενετική δυσλειτουργία περιλαμβάνει μεταβολές στη μεθυλίωση του DNA, τροποποιήσεις των ιστονών καθώς και μη κωδικοποιητικά RNAs. Η μεθυλίωση του υποκινητή και η γενετική αποσιώπηση στον καρκίνο του παγκρέατος αναφέρθηκε 1^η φορά για το ογκοκατασταλτικό γονίδιο CDKN2A, του οποίου η επιγενετική αποσιώπηση περιορίζεται στα νεοπλάσματα, χωρίς γενετική απενεργοποίηση του CDKN2A [49]. Μόνο μερικά κλασσικά ογκοκατασταλτικά γονίδια και γονίδια επιδιόρθωσης DNA υποβάλλονται σε επιγενετική αποσιώπηση σε παγκρεατικούς καρκίνους, π.χ. MLH1 και CDH1, που μεθυλιώνονται σε μικρό ποσοστό όγκων. Πολλά άλλα γονίδια είναι συχνά στόχοι ανώμαλης μεθυλίωσης και αποσιώπησης σε παγκρεατικούς καρκίνους, συμπεριλαμβανομένων των CDKN1C, RELN, SPARC, TFPI2 και άλλων [48,50-54]. Μερικά από τα συνηθέστερα αναπόφευκτα υπερμεθυλιωμένα γονίδια σε παγκρεατικά νεοπλάσματα έχουν αξιολογηθεί για τη διαγνωστική ή βιολογική τους σημασία.[55,48,56] Η υπομεθυλίωση του υποκινητή υπερεκφρασμένων γονιδίων έχει επίσης αναφερθεί σε αρκετά γονίδια, όπως τα SFN, MSLN και S100A4,[57] καθώς και τα γονίδια βλεννίνης [58].

PDAC Progression and Genomic Instability



Εικόνα 7. Πρόοδος παγκρεατικού καρκίνου και γενωμική αστάθεια [301]

Οι μεταβολές στην έκφραση των microRNAs φαίνεται να συμβάλλουν στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου. Η υπερέκφραση αρκετών microRNAs στους παγκρεατικούς καρκίνους, συμπεριλαμβανομένων των miR-21, miR-34, miR-155 και miR-200 πιστεύεται ότι συνεισφέρει στη νεοπλασματική εξέλιξη [59-62]. Επιπλέον, επειδή είναι σταθερά και ανιχνεύσιμα στο ανθρώπινο πλάσμα θα μπορούσαν να είναι χρήσιμοι διαγνωστικοί δείκτες [60].

Οι γενετικές και επιγενετικές αλλοιώσεις των παγκρεατικών καρκίνων πιθανώς παίζουν ρόλο στην επιθετικότητα του όγκου και στα πρότυπα εξέλιξης.

Η μοριακή εξέλιξη των παγκρεατικών καρκίνων εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας σωματικές μεταλλάξεις ως μοριακά ρολόγια. Από αυτή την ανάλυση, ένας αρχικός πρόδρομος νεοπλασματικός κλώνος θα διαρκέσει περισσότερο από 10 χρόνια, για να εξελιχθεί σε κακοήγη και μερικά επιπλέον έτη για την εμφάνιση μεταστατικών υποκλώνων από τον πρωτογενή καρκίνο [63]. Σύγκριση των μοριακών μεταβολών του πρωτοπαθούς καρκίνου του παγκρέατος και των μεταστάσεων του αποκαλύπτει όχι μόνο ότι σχεδόν όλα τα κύρια γονίδια μεταλλάσσονται, πριν από την ανάπτυξη διηθητικού αδενοκαρκινώματος, αλλά και επίσης ότι η γενετική αστάθεια συνεχίζεται και μετά τον καρκίνο με κάποια γενετική ανομοιογένεια, που προκύπτει σε

διαφορετικές μεταστάσεις [64]. Αν και αυτές οι εκτιμήσεις αντικατοπτρίζουν ένα εύρος συμπεριφοράς όγκου σε διαφορετικούς ασθενείς, υποδηλώνουν ότι ένας πρωτογενής καρκίνος μπορεί να παραμείνει στο πάγκρεας για πολλά χρόνια πριν από τη μετάσταση, προσφέροντας ενδεχομένως ευκαιρίες για έλεγχο [64,65].

2.3.4 Άλλοι όγκοι του παγκρέατος

Το 15% των όγκων, που αναπτύσσονται στο πάγκρεας, δεν είναι αδενοκαρκινώματα και έχουν συχνά πολύ καλύτερη πρόγνωση. Δεδομένου ότι πολλοί ασθενείς με αυτούς τους όγκους θεραπεύονται συχνά μετά από τη χειρουργική επέμβαση, ο προσδιορισμός και η επιθετική θεραπεία αυτών των όγκων είναι σημαντική. Οι τύποι των όγκων, που βρίσκονται σε αυτήν την ομάδα, είναι:

- Κυστικοί όγκοι ή νεοπλάσματα (π.χ. βλεννώδες κυσταδένωμα, ορώδες κυσταδένωμα)
- Νευροενδοκρινικοί όγκοι του παγκρέατος (pNETs) ή όγκοι των νησιδίων του παγκρέατος
- Θηλώδη κυστικά νεοπλάσματα (IPMNs)
- Λέμφωμα του παγκρέατος
- Κυψελιδικοί όγκοι του παγκρέατος (acinar cell tumors)
- Μεταστατικοί όγκοι στο πάγκρεας κ.α.

Η πλειοψηφία αυτών των όγκων είναι καλοήθεις ή μη-κακοήθεις, εντούτοις ακόμη και οι κακοήθεις όγκοι έχουν 5ετή ποσοστά επιβίωσης της τάξεως του 40-60% ανάλογα με τον τύπο του όγκου. Λαμβάνοντας υπόψη την άριστη έκβαση, η επιθετική χειρουργική θεραπεία είναι η ενδεδειγμένη για αυτούς τους όγκους.

2.4 CAVEOLIN-1

2.4.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΙΣ CAVEOLINS

Οι caveolins είναι 21-24 kDa μοριακού βάρους πρωτεΐνες, εξαιρετικά εμπλουτισμένες σε εξειδικευμένες 50-100 Nm μεμβράνες πλάσματος σχήματος ωμέγα, που αναφέρονται ως caveolae [66]. Είναι σημαντικό, ωστόσο, να αναφερθεί ότι η μορφολογία των caveolae μπορεί να ποικίλει σημαντικά από πεπλατυσμένη εντός της μεμβράνης του πλάσματος, σε πολύπλευρες δομές σε μεμονωμένα σημεία της μεμβράνης, που μοιάζουν με ροζέττες ή ακόμα και δομές τύπου σωληναρίου. Αυτή η οικογένεια πρωτεϊνών περιλαμβάνει 3 κύρια μέλη: Caveolin-1, 2 και 3, που κωδικοποιούν 5 διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης. Οι περισσότεροι ιστοί στον οργανισμό εκφράζουν τουλάχιστον μία από αυτές τις ισομορφές. Ιδιαίτερη έλλειψη παρατηρείται στα καλλιεργημένα λεμφοκύτταρα και ορισμένα νευρωνικά κύτταρα.

Οι Caveolin-1 και 2 είναι παρούσες σε πολλούς τύπους κυττάρων και συχνά συν-εκφράζονται, ενώ η κατανομή της Caveolin-3 είναι πολύ πιο μικρή και ουσιαστικά περιορίζεται στα μυϊκά και γλοιοκά κύτταρα [67]. Οι Caveolin-1 και -3 σχηματίζουν ομο-ολιγομερή, με τον ολιγομερισμό να είναι απαραίτητος για τη βιογένεση των caveolae. Διπλή αποσιώπηση, που έχει πραγματοποιηθεί σε μελέτες, για τις Caveolin-1 και -3 εμφανίζει παντελή έλλειψη caveolae. Στα σκελετικά και καρδιακά μυϊκά κύτταρα, η Caveolin-3 αντικαθιστά την Caveolin-1 στις caveolae. Τα σκελετικά μυϊκά κύτταρα εκφράζουν επιλεκτικά τη β ισομορφή της Caveolin-1, αλλά στοχεύουν στο κυτοσόλιο, όπου τείνει να συλλέγει κατά μήκος του τη γραμμή Z [68]. Η Caveolin-2 σχηματίζει ετερο-ολιγομερή με την Caveolin-1 και απαιτεί την παρουσία της δεύτερης για σταθερότητα. Αποσιώπηση της Caveolin-1 συνεπάγεται αποσιώπηση σε Caveolin-2 [69-71]. Είναι αξιοσημείωτο ότι η Caveolin-2 φαίνεται πως δεν μπορεί να εξέλθει μόνη της από το σύμπλεγμα Golgi [72] και αποικοδομείται γρήγορα στα κύτταρα, που δεν εκφράζουν Caveolin-1. Αυτά τα ολιγομερή ωριμάζουν σε σύμπλοκα υψηλότερου μοριακού βάρους, μόλις φτάσουν στις caveolae. Ενώ οι caveolins είναι απαραίτητες, δεν είναι κατ'ανάγκη επαρκείς για το σχηματισμό των caveolae. Ελλείπει πρωτεϊνών, που ονομάζονται cavins, ο σχηματισμός μορφολογικά ανιχνεύσιμων caveolae ή σωληνοειδών δομών είναι εξασθενημένος [73-76]. Με την απουσία των cavins, οι caveolins, σχετίζονται με μικροπεριοχές της μεμβράνης του πλάσματος και παραμένουν εκεί ως επίπεδες caveolae [77].

Στις caveolins έχουν αποδοθεί πολλαπλοί ρόλοι στα κύτταρα εκτός από το σχηματισμό caveolae, συμπεριλαμβανομένου του κυστιδίου, της ενδοκύττωσης, της ομοιόστασης της χοληστερόλης, καθώς και της ρύθμισης της μεταγωγής σήματος, της γονιδιακής έκφρασης και της μετατροπής των πρωτεϊνών [77-78].

2.4.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ CAVEOLIN-1

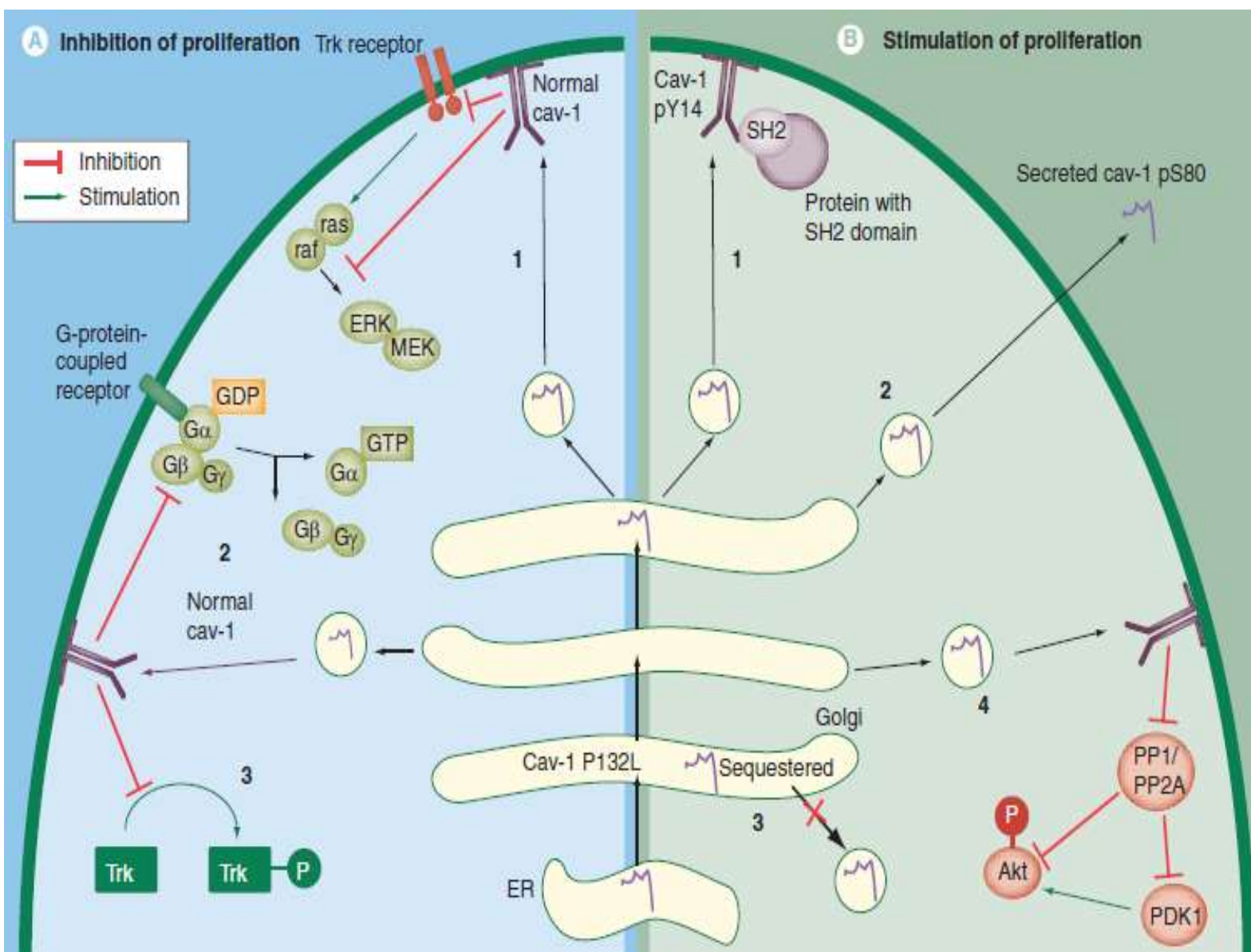
Η Caveolin-1 είναι μια απανταχού εκφρασμένη και αναπόσπαστη διαμεμβρανική πρωτεΐνη για το σχηματισμό των αποκαλούμενων caveolae (μικρές σπηλαιώδεις διογκώσεις της μεμβράνης του πλάσματος). Οι caveolae εμπλέκονται στις κύριες φυσιολογικές λειτουργίες των κυττάρων των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων των διαδικασιών της ενδοκύττωσης και τρανσκύτωσης, της μεταγωγής σήματος και της ομοιόστασης της χοληστερόλης. Το γονίδιο της Caveolin-1 (Εικ.10,11) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7 (7q31.1) και περιλαμβάνει 3 εξόνια (30, 165, και 342bp) και 2 ιντρόνια (1.5 και 32kb). Η αλληλουχία της φιλοξενεί μια κεντρική υδρόφοβη περιοχή (υπολείμματα 102-134), η οποία πιστεύεται ότι υιοθετεί μια διαμόρφωση τύπου φουρκέτας, που εισάγει στο εσωτερικό φύλλο της μεμβράνης του πλάσματος. Συνεπώς, αμφότερες οι καρβοξυ- και αμινοτελικές άκρες βρίσκονται στο κυτοσόλιο. Μια δομική αλληλουχία, η οποία αναφέρεται ως "περιοχή ικριώματος της Caveolin" (CSD, υπολείμματα 82-101), βρίσκεται δίπλα στην υδρόφοβη περιοχή στο αμινοτελικό άκρο και απαιτείται για τον ομο- και ετερο-ολιγομερισμό, καθώς και την αλληλεπίδραση με μια πληθώρα πρωτεϊνών σηματοδότησης [69]. Στην καρβοξυτελική περιοχή, η Caveolin-1 περιέχει 3 υπολείμματα παλμιτοϋλιωμένης κυστεΐνης, που είναι σημαντικά για τον ολιγομερισμό, αλλά όχι τον εντοπισμό στις caveolae [79-80], καθώς και μια υποτιθέμενη περιοχή τύπου WW (κατάλοιπα 98-132) ανάλογη με εκείνη της Caveolin-3 [81-82].

Δύο παραλλαγές της Caveolin-1, που αναφέρονται ως 1α (υπολείμματα 1-174) και 1β (υπολείμματα 34-174), μπορούν να διακριθούν, και οι οποίες δημιουργούνται είτε από εναλλακτικά μετάγραφα, είτε από εναλλακτική εκκίνηση από το ίδιο αντίγραφο [69,83]. Και οι 2 πρωτεΐνες αποδίδονται σε διαφορετικούς ρόλους στα κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, η Caveolin-1α περιέχει υπόλειμμα τυροσίνης στη θέση

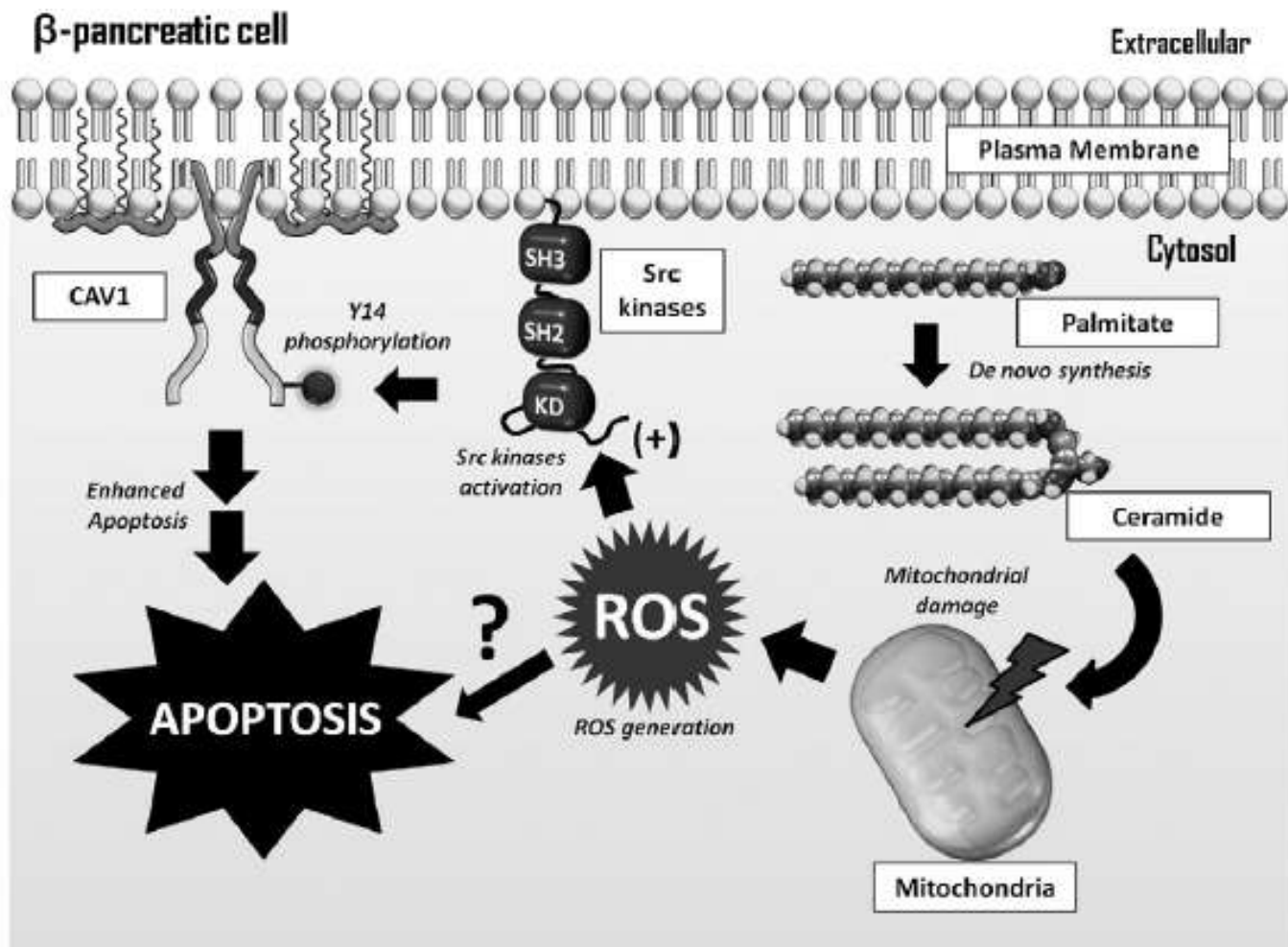
14, που είναι φωσφορυλιωμένο σε απόκριση στο μεγάλο αριθμό διαφορετικών ερεθισμάτων (Εικ.8,9) από τις οικογένειες των κινασών τυροσίνης Src, Abl ή Fyn [84,85,86]. Αυτή η φωσφορυλίωση έχει παρατηρηθεί ως απάντηση στο οξειδωτικό στρες και προτείνεται επίσης, ως ένας δείκτης για το στρες [87-89], που σχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία στον κυτταρικό θάνατο [90,91]. Συνεπώς, η έκφραση της Caveolin-1 έχει προηγουμένως συνδεθεί με ευαισθησία σε κυτταροτοξικά ερεθίσματα, που προκαλούν απόπτωση [92-95]. Αν και είναι φυσιολογικά παρούσα σε β-κύτταρα [96], όπου συμμετέχει στη ρύθμιση της έκκρισης ινσουλίνης [96,97], καμία μελέτη μέχρι σήμερα δεν έχει σχετιζόμενη έκφραση Caveolin-1 με αυξημένη ευαισθησία στη λιποτοξικότητα στα β-κύτταρα.

Συχνά, αλλά όχι πάντοτε, εμπλέκονται κινάσες τυροσίνης του υποδοχέα της οικογένειας Src και ενεργοποιείται η φωσφορυλίωση [78]. Η σημασία της Caveolin-1 στο πλαίσιο αυτό υπογραμμίζεται από το γεγονός ότι η αποσιώπηση της παρουσιάζει αξιοσημείωτα μειωμένη ικανότητα αναγέννησης συγκεκριμένων ιστών, όπως το ήπαρ, και επίσης δραματική μείωση της διάρκειας ζωής[98-99]. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι, η φωσφορυλίωση της θεωρείται επίσης ιδιαίτερα σημαντική για τη μετανάστευση των κυττάρων, καθώς και τη μετάσταση. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι η Caveolin-1 είναι επίσης σημαντικός παράγοντας στη ρύθμιση της σηματοδότησης.

Πράγματι, ένας μεγάλος αριθμός μονοπατιών σηματοδότησης έχειδειχθεί ότι ρυθμίζεται από αυτή και ομοίως η ευελιξία υπογραμμίζει τη σημασία αυτής της πρωτεΐνης και τη δυνατότητα συμμετοχής της σε πολλές παθολογίες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, όπου και διαδραματίζει έναν εξαιρετικά διαφορούμενο ρόλο, που εξαρτάται από διάφορους παράγοντες [100]. Μια επιπλέον πολυπλοκότητα είναι ότι βρίσκεται στη μεμβράνη του πλάσματος και σε άλλα υποκυτταρικά διαμερίσματα, όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), το σύμπλεγμα Golgi, τα ενδοσώματα, τα μιτοχόνδρια και σε σχετιζόμενα με τον πυρήνα τμήματα[101-103]. Έτσι, μεγάλο μέρος της υπάρχουσας σύγχυσης, που σχετίζεται με τη λειτουργία της, πιθανώς αντανακλά το γεγονός ότι συχνά είναι ασαφές ποιοι στόχοι της Caveolin-1 εμπλέκονται σε ένα συγκεκριμένο γεγονός.

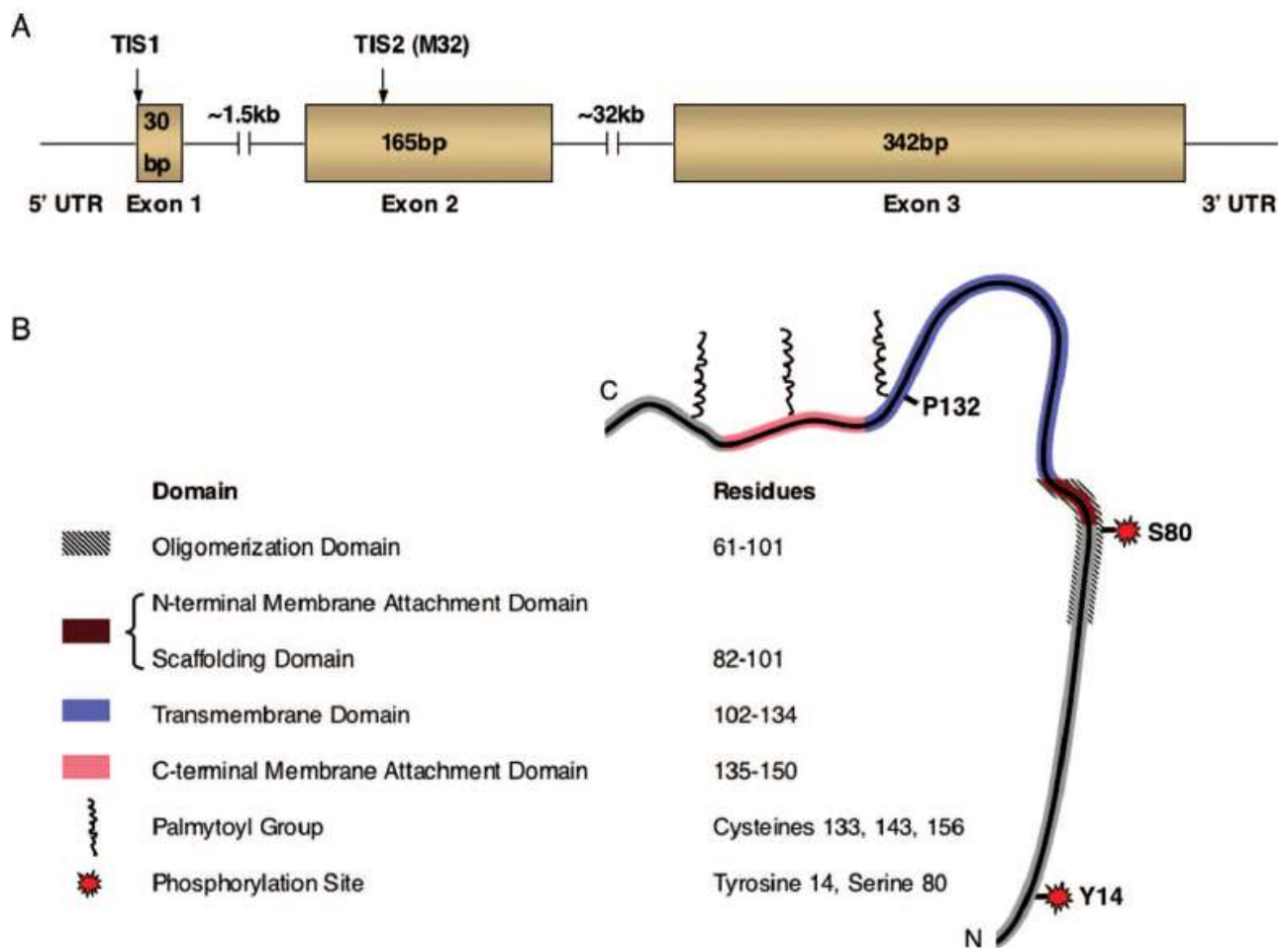


Εικόνα 8. Μηχανισμοί που αντανακλούν τις ανασταλτικές/διεγερτικές ιδιότητες της Caveolin-1 [280]: **A)** Αναστολή της ανάπτυξης. Η φυσιολογική caveolin έχει την περιοχή ικρίωματος, που λειτουργεί ως ένας ενδογενής αναστολέας κινάσης, αναγνωρίζοντας τις πιο γνωστές κινάσες, κι έτσι αναστέλλει την διεγερόμενη δραστηριότητα της ανάπτυξης διάφορων σηματοδοτικών μορίων, συμπεριλαμβανομένων των: υποδοχέα κινάσης τυροσίνης (RTKs) (1), οικογένειας κινασών Src και μελών της αλληλουχίας Ras-p42/44 MAPK (3), καθώς επίσης και του υποδοχέα συζευγμένου με G πρωτεΐνη (2). **B)** Διέγερση της ανάπτυξης. (1) Η Caveolin-1 υποβάλλεται σε φωσφορυλίωση στην τυροσίνη-14, καθώς το NH₂ άκρο της χρησιμεύει σαν πρωτεΐνη ικρίωματος για τη στρατολόγηση των πρωτεΐνων με την περιοχή SH₂, όπως η Grb-7. Αυτή με τη σειρά της αυξάνει την ανεξάρτητη από την αγκύρωση ανάπτυξη των κυττάρων (2), η Caveolin-1 μπορεί να υποστεί φωσφορυλίωση σερίνης στη θέση Ser80, γεγονός που χρησιμεύει στη μετατροπή της Caveolin-1 σε διαλυτή εκκριτική πρωτεΐνη (3), Η P132L μετάλλαξη εντοπίζεται μέσα στην περιοχή της μεμβράνης, και γι' αυτό η μεταλλαγμένη Cav-1 (P132L) παραμένει παγιδευμένη μέσα στο σύμπλεγμα Golgi.(4). Η Caveolin-1 προάγει την ενεργοποίηση της Akt σηματοδότησης έχοντας ως αποτέλεσμα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση.

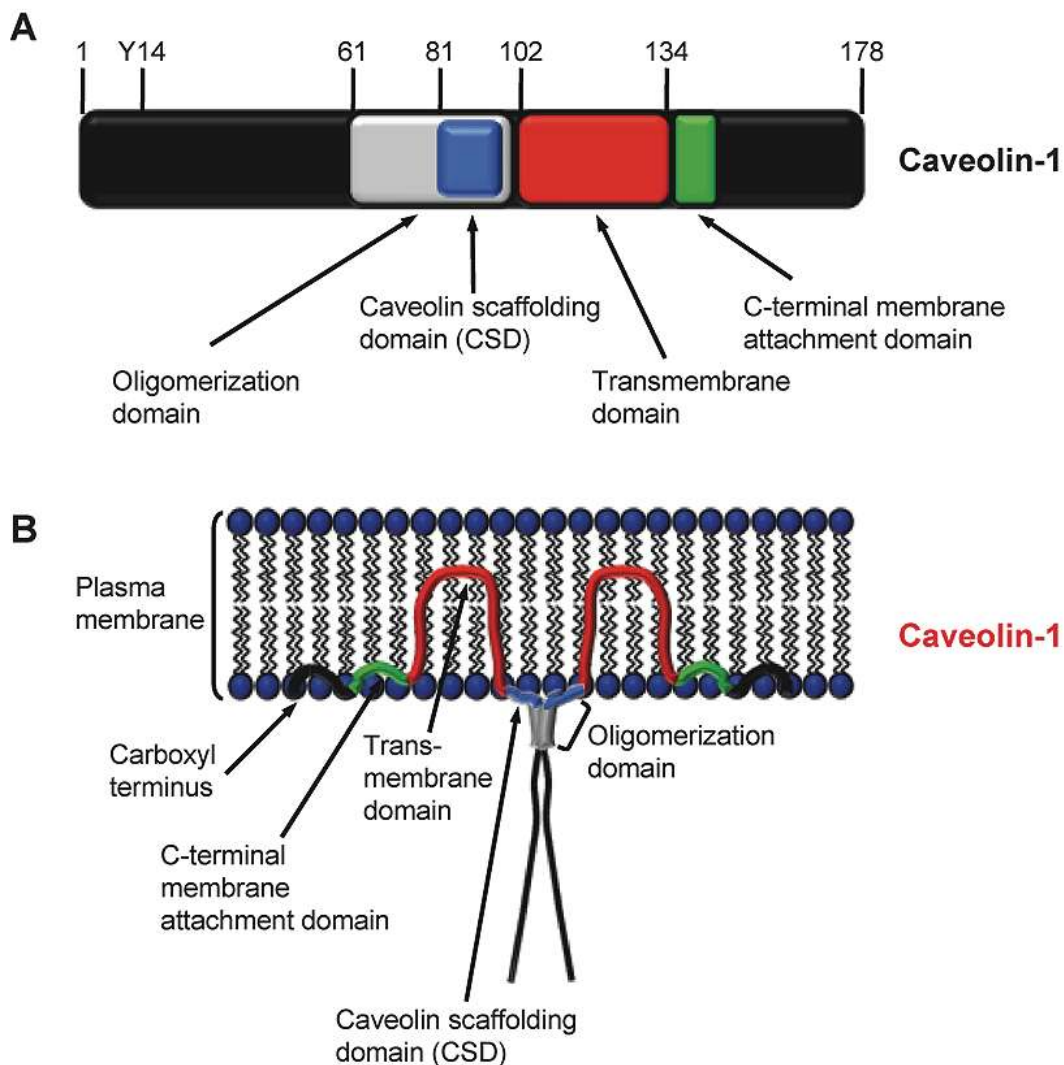


Εικόνα 9. Μοντέλο σύνοψης των κύριων ευρημάτων. Το παλμιτικό υλικό απορροφάται από το κύτταρο και χρησιμοποιείται ως πρόδρομος για τη σύνθεση de novo κεραμιδίου. Αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα κεραμιδίου με τη σειρά τους, προκαλούν μιτοχονδριακή βλάβη και αυξάνουν το οξειδωτικό στρες. Τα αυξημένα επίπεδα ROS προκαλούν σε μεγάλο βαθμό αποπτωτικό θάνατο β -κυττάρων. Επιπροσθέτως, το ROS ενεργοποιεί την Src οικογένεια κινασών, που φωσφορυλιώνει την Caveolin-1 στην τυροσίνη-14 και έτσι αυξάνει τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, που επάγεται από την παλμιτοϋλίωση. Το μοντέλο, που παρουσιάζεται εδώ, παρέχει μια εύλογη εξήγηση για το πώς η έκφραση της Caveolin-1 ευαισθητοποιεί τα β -κύτταρα στην επαγόμενη από παλμιτοϋλίωση απόπτωση [300].

Αρχικά, η Caveolin-1 προτάθηκε να συμπεριφέρεται ως ογκοκατασταλτικό, καθώς η παρουσία της συνδέεται με την αναστολή των οδών σηματοδότησης, που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα των κυττάρων, ενώ παράλληλα προάγουν τον βασικό ή διεγερτικό από ερεθίσματα κυτταρικό θάνατο. Εξάλλου, η έκφραση της αποδείχθηκε ότι αναστρέφει τα χαρακτηριστικά, που σχετίζονται με τον κυτταρικό μετασχηματισμό και αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου. Αντιστρόφως, σε μεταγενέστερα στάδια κατά την πρόοδο του όγκου, η Caveolin-1 έχει αποδειχθεί ότι προάγει τη μετανάστευση των κυττάρων του όγκου, την αντοχή σε πολλά φάρμακα και συνεπώς η παρουσία της σχετίζεται με την κακή πρόγνωση ασθενών. Είτε προάγει τη μία, είτε την άλλη απάντηση, η Caveolin-1 φαίνεται να εξαρτάται από τον τύπο του όγκου και το κυτταρικό πλαίσιο [78,100].



Εικόνα 10. Σχηματική δομή του γονιδίου αλλά και της πρωτεΐνης Caveolin-1 A) Το γονίδιο της Caveolin-1, B) Πρωτεϊνόμενη δομή της πρωτεΐνης Caveolin-1 [281]



Εικόνα 11. Δομή της Caveolin-1. Α. Σημαντικές λειτουργικές περιοχές και η θέση φωσφορυλίωση Β. εντοπισμός της Caveolin-1 στη μεμβράνη του πλάσματος [282]

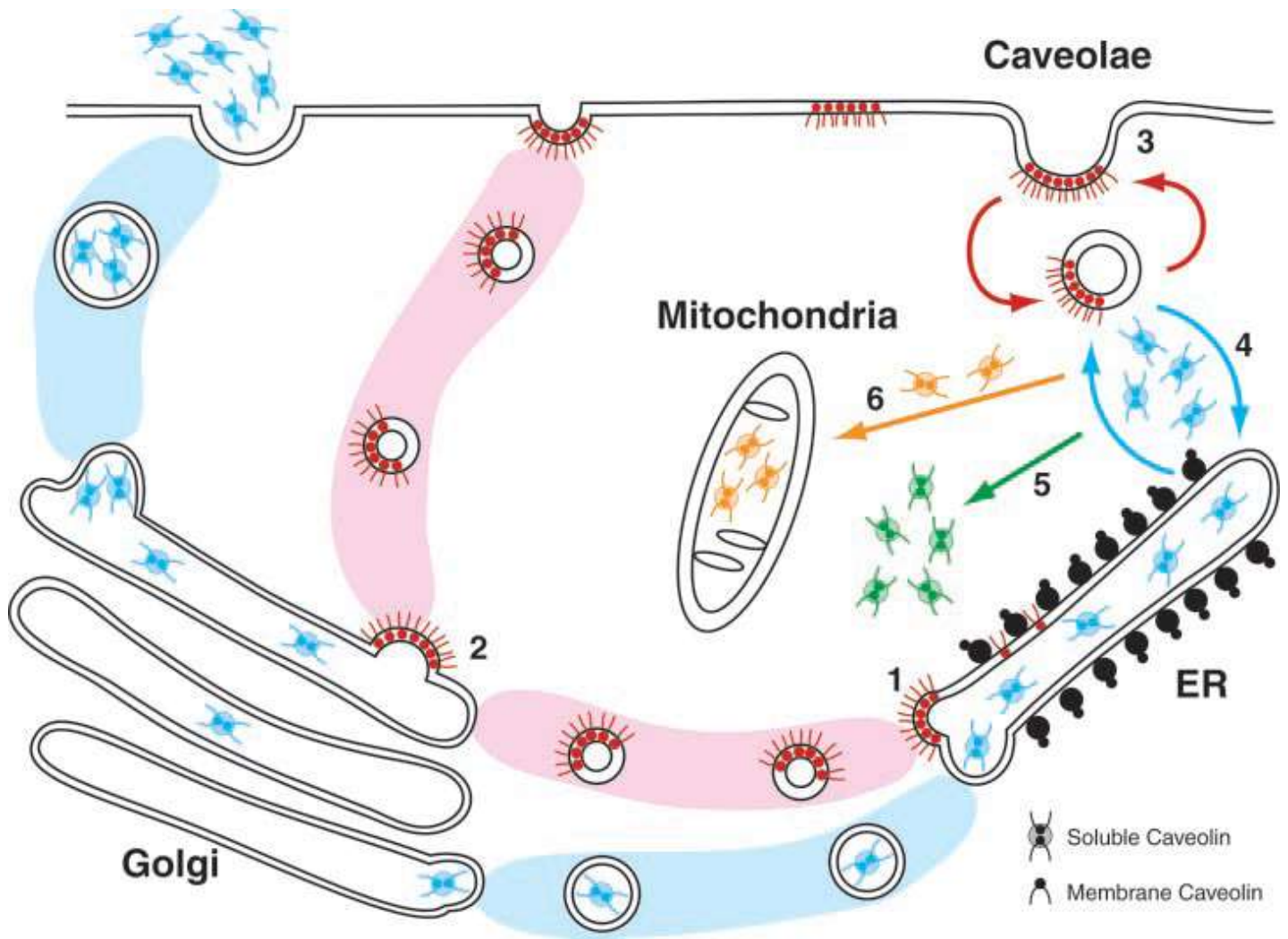
Η αμινοξική αλληλουχία της Caveolin-1 προβλέπει ότι μια ολοκληρωμένη πρωτεΐνη μεμβράνης και υπάρχουν ισχυρά πειραματικά στοιχεία ότι έχει αυτή την ιδιότητα. Εισάγεται συν-μεταφραστικά στο ER1 και μεταφέρεται στο σύμπλεγμα Golgi, όπου ενσωματώνεται σε λιπιδικές περιοχές, που ταξινομούν μόρια για την αποστολή στην κυτταρική επιφάνεια [104]. Η προτιμώμενη θέση για την Caveolin-1 στην κυτταρική επιφάνεια είναι η caveola [105]. Κινείται με κυστίδια, που προέρχονται από την caveola σε πολλαπλά εσωτερικά διαμερίσματα, και στη συνέχεια ανακυκλώνεται πίσω στην κυτταρική επιφάνεια [106].

Αντιθέτως, υπάρχουν αναμφισβήτητες αποδείξεις ότι η Caveolin-1 μπορεί να είναι μια διαλυτή πρωτεΐνη. Η σήμανση με ανοσοσφαιρίνη ανιχνεύει πρώτα διαλυτή Caveolin-1 στον αυλό του ER, αφού τα κύτταρα εκτεθούν σε οξειδάση χοληστερόλης [107]. Έχει βρεθεί επίσης μια μικρή δεξαμενή διαλυτής Caveolin-1 σε κυτταρόπλασμα ινοβλαστών σε ένα σύμπλεγμα με μοριακούς συνοδούς [108]. Μια έρευνα ρουτίνας για την κατανομή της caveolin-1 σε διάφορους ιστούς ταυτοποίησε κύτταρα, που στοχεύουν την Caveolin-1 κυρίως στο κυτοσόλιο (σκελετικά μυϊκά κύτταρα και κερατινοκύτταρα), στον αυλό των εκκριτικών κυστιδίων (σερικά κύτταρα του παγκρέατος, στομάχι και σιελογόνοι αδένες) και στα μιτοχόνδρια (επιθηλιακά κύτταρα αεραγωγών και ηπατοκύτταρα) [109,110]. Τόσο η εκκρινόμενη, όσο και η κυτοσολική Caveolin-1 φαίνεται να είναι ενσωματωμένες σε λιποπρωτεϊνικά σωματίδια, τα οποία μπορεί να εξηγούν, γιατί είναι διαλυτή. Έτσι, αποτελεί μια ασυνήθιστη πρωτεΐνη, που μπορεί να είναι και ενιαία πρωτεΐνη μεμβράνης και διαλυτή σε πολλαπλά κυτταρικά διαμερίσματα. Αυτή η ιδιότητα είναι μια σημαντική ένδειξη για τη λειτουργία της.

Η Caveolin-1 (VIP21) αναγνωρίστηκε για 1^η φορά ως φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη στην τυροσίνη-14 σε μετασχηματισμένα κύτταρα σαρκώματος Rous [111], που εμπλουτίστηκαν και στις 2 caveolae [105] και σε κυστίδια, που στοχεύουν στην κορυφαία επιφάνεια πολωμένων επιθηλιακών κυττάρων [112]. Οι Caveolae (κυστίδια πλασμαλμάλης) ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά το 1953-1955 ως ενδοκυτταρικές δομές, που μεταφέρουν μόρια μέσω των ενδοθηλιακών κυττάρων [113]. Η Caveolin-1 έχει εντοπιστεί στα νήματα, που αποτελούν αυτό το στρώμα. Εύκολα ολιγομερίζεται *in vitro* [104] και πρόσφατες δομικές μελέτες δείχνουν ότι τα αμινοτελικά άκρα 101 αμινοξέων συναρμολογούνται σε επταμερικές υπομονάδες, που φαίνονται να αποτελούν το βασικό δομικό στοιχείο κάθε νηματίου [114]. Τα χαρακτηριστικά άλλων επικαλύψεων με μεμβράνες, όπως clathrin, COPI και COPII, οδήγησαν στην προσδοκία ότι η Caveolin-1 ήταν απαραίτητη για την εκβλάστηση των caveolae [115].

2.4.3 Η ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΔΙΑΔΡΟΜΗ ΤΗΣ CAVEOLIN-1

Η Caveolin-1 φαίνεται να έχει βασικές λειτουργίες στη μεταφορά των λιπιδίων, την κυκλοφορία μεμβράνης και την κυτταρική σηματοδότηση. Η μηχανιστική βάση αυτών των λειτουργιών παραμένει άγνωστη, αλλά αντικατοπτρίζεται στην πολύπλοκη και μυστηριώδη ενδοκυτταρική κυκλοφορία αυτής της πρωτεΐνης. Ένα μοντέλο προτείνεται στην Εικ.12 για το πώς πιστεύεται ότι η Caveolin-1 μπορεί να κινηθεί από τον τόπο σύνθεσης της σε διάφορα διαμερίσματα στο κύτταρο. Φαίνεται να εισάγεται συν-μεταφραστικά στην ER μεμβράνη με τα N- και C-τελικά άκρα στο κυτταρόπλασμα (Εικ.12, κόκκινη διαδρομή). Στη συνέχεια ενσωματώνεται σε κυστίδια (Εικ. 12, 1), που μετακινούνται προς το σύμπλεγμα Golgi σε ένα βήμα, που απαιτεί τα αμινοξέα 66-70 (IDFED) [116]. Εντός του συμπλέγματος Golgi γίνεται ολιγομερισμός της Caveolin-1 και καθίσταται αδιάλυτη [117]. Ο ολιγομερισμός εξαρτάται από τα αμινοξέα 91-100 (TFTVTKYWFY) και 135-140 (KSFLIE). Η φυσαλιδώδης μεταφορά στην κυτταρική επιφάνεια (Εικ. 12,2) εξαρτάται τόσο από την ικανότητα του μορίου να ολιγομερίζεται, όσο και από τα αμινοξέα 71-80 (VIAEPEGTHS). Μόλις φθάσει στην κυτταρική επιφάνεια, πιθανώς ενσωματώνεται στη λειτουργία των caveolae, που εσωτερικοποιούνται και ανακυκλώνονται (Εικ. 12, 3). Σε κάποιο στάδιο του κύκλου εσωτερικοποίησης των caveolae πιστεύεται ότι η Caveolin-1 μπορεί να εισέλθει στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ως μια διαλυτή πρωτεΐνη ενσωματωμένη σε ένα λιπιδικό μόριο (Εικ. 12, 4-6). Τα ακριβή αμινοξέα στην πρωτεΐνη, που ελέγχει αυτό το στάδιο, δεν είναι γνωστά αλλά μπορεί να εξαρτώνται από την παλμιτοϋλίωση των κυστεϊνών 133, 143 και 156 [118]. Υπάρχουν πολλαπλοί στόχοι για τη διαλυτή Caveolin-1. Μπορεί να πάει στο ER (Εικ. 12, 4) και είτε να πάρει νέα συνθετική χοληστερόλη για μεταφορά πίσω στις caveolae (επιστροφή μπλε βέλος) ή να εισέλθει στον αυλό του ER. Εάν συμβεί αυτό, τότε η διαλυτή Caveolin-1 (Εικ.12, μπλε διαδρομή) ενσωματώνεται σε σωματίδια τύπου HDL, που εκκρίνονται από το κύτταρο [110]. Μια άλλη πιθανότητα είναι ότι η διαλυτή Caveolin-1 παραμένει στο κυτοσόλιο (Εικ. 12, πράσινο). Μερικές από αυτές μπορεί να στοχεύουν σε λιπιδικές σταγόνες [119]. Τέλος, η διαλυτή μορφή μπορεί να μεταφερθεί στα μιτοχόνδρια (Εικ. 12, πορτοκαλί). Παρ' όλα αυτά, τίποτα δεν είναι γνωστό για το πώς ρυθμίζεται η διανομή της Caveolin-1 ή περίπου ο μηχανισμός, που είναι υπεύθυνος για τη μετατροπή της από μεμβράνη σε διαλυτή πρωτεΐνη.



Εικόνα 12. Ενδοκυττάρια διαδρομή της Caveolin-1 [283]

2.4.4 ΡΟΛΟΙ ΤΗΣ CAVEOLIN-1 ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ

Η Caveolin-1 αλληλεπιδρά με αμφότερα λιπίδια και λιπιδικές άγκυρες πρωτεϊνών. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις προβλέπουν ότι λειτουργεί στη λιπιδική μεταφορά, την κυκλοφορία μεμβράνης και τη μεταγωγή σήματος.

2.4.4.1 ΡΟΛΟΣ ΣΤΗ ΛΙΠΙΔΙΚΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ

Ο ρόλος στη λιπιδική μεταφορά χοληστερόλης αποτελεί προϋπόθεση για τη δομή [105] και τη λειτουργία των caveolae [209]. Οι *in vitro* αναλύσεις έδειξαν ότι η Caveolin-1 αλληλεπιδρά με τη χοληστερόλη [210], υποδηλώνοντας ότι ίσως οργανώνει τη χοληστερόλη της μεμβράνης στις caveolae. Δεσμεύεται επίσης με ακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας υψηλής συγγένειας [211], τα οποία μπορεί να εξηγούν την ικανότητά της να αλληλεπιδρά με τα GM1 γαγγλιοσίδια [212], που συλλέγονται στις caveolae. Μπορεί, ωστόσο, να ισχυριστεί κανείς ότι η Caveolin-1 παίζει σημαντικό ρόλο στην εισαγωγή και εξαγωγή της κυτταρικής χοληστερόλης από τις caveolae.

Η 1^η ένδειξη ότι οι caveolae εμπλέκονται στην κυκλοφορία της χοληστερόλης προήλθε από την παρατήρηση ότι σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ινοβλάστες η χοληστερόλη κινείται κατευθείαν στην επιφάνεια των caveolae μέσα σε λίγα λεπτά, αφού συντεθούν στο ER [213]. Από τις caveolae, η χοληστερόλη μετακινείται γρήγορα σε άλλες περιοχές της μεμβράνης του πλάσματος και στον εξωκυτταρικό χώρο. Η ταχεία μεταφορά της νέας χοληστερόλης στην επιφάνεια των λεμφοκυττάρων εξαρτάται από την έκφραση της Caveolin-1 [213]. Η μη-παλμιτουλοποιημένη Caveolin-1 εξασθενεί στη μεταφορά νέας χοληστερόλης σε αυτά τα κύτταρα [118]. Η μεταφορά της νέας χοληστερόλης από το ER στη μεμβράνη του πλάσματος αναστέλλεται επίσης από την προγεστερόνη και αυτό το στεροειδές προκαλεί τη συσσώρευση της Caveolin-1 στις εσωτερικές μεμβράνες [104]. Τέλος, η έκφραση μίας κολοβής Caveolin-3 πρωτεΐνης (Cav^{DGV}) μειώνει δραματικά την περιεκτικότητα χοληστερόλης των caveolae σε κύτταρα CV1, κάτι το οποίο μπορεί να αντιστραφεί με την προσθήκη εξωγενούς χοληστερόλης [214]. Ο μηχανισμός

δράσης της Cav^{DGV} δεν είναι γνωστός, αν και πιστεύεται ότι παρεμποδίζει τη λειτουργία της caveolin-1.

Η χοληστερόλη της μεμβράνης του πλάσματος μπορεί να μετακινηθεί απευθείας στο ER [215]. Η ελεύθερη χοληστερόλη, οι εστέρες της χοληστερόλης και οι αιθέρες της χοληστερόλης στην HDL, που δεσμεύονται στο SR-B1 μπορούν επίσης να μετακινηθούν από τις caveolae σε ενδοκυττάριας θέσεις [216]. Η έκφραση της Caveolin έχει συνδεθεί με την εισαγωγή χοληστερόλης [217], αλλά η ταχεία μετανάστευση της στο ER μετά την οξείδωση της χοληστερόλης στις caveolae [107] υποδηλώνει ότι έχει άμεσο ρόλο στην εισαγωγή χοληστερόλης. Το μυστήριο είναι πώς μπορεί η Caveolin-1, η οποία είναι μια ενσωματωμένη πρωτεΐνη μεμβράνης στις caveolae, να μεταφέρει χοληστερόλη σε ενδοκυττάρια διαμερίσματα, όπως το ER.

Μια λύση σε αυτό το παζλ μπορεί να αποτελεί η κυτοσολική Caveolin-1. Αρκετά εργαστήρια έχουν επαληθεύσει την αρχική ανακάλυψη [108] ότι δηλαδή το κυτοσόλιο πολλών κυττάρων περιέχει μία ομάδα διαλυτής Caveolin-1. Αυτή η Caveolin-1 σχετίζεται με τη χοληστερόλη και συμπεριφέρεται σαν μια πρωτεΐνη, που είναι ενσωματωμένη σε ένα σωματίδιο με το μέγεθος [218] και την πυκνότητα πλεύσης [109] της HDL. Οι εστέρες της χοληστερόλης, που εισέρχονται στα κύτταρα μέσω των caveolae, φαίνεται να συσχετίζονται με την κυτοσολική Caveolin-1. Ομοίως, το ίδιο σωματίδιο μπορεί επίσης να φέρει νέα χοληστερόλη από το ER στη μεμβράνη του πλάσματος [216]. Πρόσφατα βρέθηκε ότι η δέσμευση της apoA1 στο SR-B1 διεγείρει το σχηματισμό σωματιδίων κυτοσολικών λιπιδικών μορίων, που περιέχουν Caveolin-1, χοληστερόλη και φωσφολιπίδια [218]. Είναι σημαντικό ότι η Caveolin-1 εκκρίνεται από εξωκρινή εκκριτικά κύτταρα σε σωματίδια HDL, που περιέχουν apoA1, εγείροντας την πιθανότητα λιπιδικά μόρια πλούσια σε Caveolin στο κυτταρόπλασμα να εμπλέκονται στη συναρμολόγηση των εκκρινόμενων λιποπρωτεϊνών. Τα διαλυτά κυτταροπλασματικά μόρια Caveolin μπορεί επίσης να είναι σημαντικά για τη βιογένεση κυτταροπλασματικών λιπιδικών σταγονιδίων [119].

Συνοπτικά, η Caveolin-1 έχει μια λειτουργία στη μεταφορά ενδοκυττάριας και εξωκυττάριας λιπιδίων. Αυτή η λειτουργία μπορεί να οφείλεται για τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της Caveolin-1 στα λιποκύτταρα [109], καθώς επίσης και τις εμφανείς ανωμαλίες στον μεταβολισμό των λιπιδίων, που παρατηρούνται σε ποντίκια με μηδενική έκφραση Caveolin-1 [219]. Η Caveolin-1 δεν συμπεριφέρεται σε μια

απλή λιπιδική πρωτεΐνη, αλλά αντιθέτως φαίνεται να αποτελεί μέρος ενός νέου ενδοκυτταρικού λιπιδικού σωματιδίου, το οποίο μεταφέρει λιπίδια μεταξύ οργανιδίων όμοια με τον τρόπο, που οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος μετακινούν τα λιπίδια μεταξύ των ιστών. Η ακριβής σύνθεση λιπιδίων και πρωτεϊνών αυτού του σωματιδίου παραμένει προς προσδιορισμό.

2.4.4.2 ΡΟΛΟΣ ΣΤΗΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ ΤΩΝ MEMBRANΩΝ

Ο κύριος χώρος, όπου κάποιος θα ανέμενε η Caveolin-1 να λειτουργήσει στην κυκλοφορία της μεμβράνης, είναι στην caveola. Οι Caveolae είναι γνωστές για τις μοναδικές ενδοκυτταρικές ιδιότητες τους [113]. Η Caveolin-1 θα μπορούσε να προσελκύσει πρωτεΐνες στις caveolae με τον ίδιο τρόπο, που οι προσαρμογείς clathrin προσελκύουν διαμεμβρανικούς υποδοχείς σε επικαλυμμένα κοιλώματα και/ή να λειτουργεί ως μοριακός κινητήρας, που επηρεάζει την καταστροφή και την εκβλάστηση της μεμβράνης. Υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία, ωστόσο, ότι λειτουργεί με αυτόν τον τρόπο. Η Caveolin-1 έχει αναφερθεί ότι αλληλεπιδρά με αρκετές κινάσες υποδοχέα τυροσίνης, συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα EGF (EGFR). Η πληροφορία για τον εντοπισμό του EGFR σε caveolae/σχεδίες, ωστόσο, βρίσκεται στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα [220], έτσι η αλληλεπίδραση με την Caveolin-1 πιθανότατα δεν έχει καμία σχέση με την προσέλκυση EGFR στις caveolae. Μια πρόσφατη μελέτη αμφισβητεί επίσης την υπόθεση ότι η Caveolin-1 είναι απαραίτητη για την εσωτερικοποίηση των caveolae. Η πρόσληψη μεσολαβούμενης από τον υποδοχέα του παράγοντα αυτοκρινούς κινητικότητας (AMF) συμβαίνει κανονικά και μέσω αμφίδρομων μονοπατιών [221]. Το μονοπάτι των caveolae παραδίδει τον παράγοντα απευθείας στο ER, ενώ οι επικαλυμμένες κοιλότητες τον παραδίδουν στα ενδοσώματα. Η παράδοση στο ER, ωστόσο, φαίνεται να εμφανίζεται σε κύτταρα με έλλειψη Caveolin-1. Αυτά τα κύτταρα στερούνται ορατών, σχήματος φιάλης, caveolae, κάτι το οποίο είναι σύμφωνο με προηγούμενες παρατηρήσεις, αλλά η χορήγηση AMF στο ER είναι 5 φορές γρηγορότερη από ότι σε κύτταρα, που εκφράζουν Caveolin-1. Η ταυτοποίηση των caveolae ως οδός εισόδου κατέστη δυνατή με τη διαμόλυνση αυτών των κυττάρων με μία κυρίαρχη αρνητική δυναμίνη, η οποία εμποδίζει την εκδήλωση κυστιδίων από τις μεμβράνες του πλάσματος. Υπό αυτές τις συνθήκες, η ανεπάρκεια των κυττάρων σε Caveolin έχει ως

αποτέλεσμα πολυάριθμες μεμβράνες σχήματος φλάσκας, οι οποίες είναι μορφολογικά αδιαίρετες από αυτές, που βρέθηκαν σε κύτταρα, που εκφράζουν Caveolin-1 και περιέχουν υποδοχείς AMF. Με άλλα λόγια, χωρίς Caveolin-1, η εσωτερικοποίηση των caveolae είναι τόσο γρήγορη, που οι σφαιρικές σχήματος φλάσκας είναι δύσκολο να βρεθούν σε εικόνες λεπτής διατομής, εκτός εάν παρεμποδιστεί η εσωτερίκευση. Οι παρατηρήσεις αυτές συμφωνούν με μια πρόσφατη έκθεση, που υποδεικνύει ότι η εσωτερίκευση μιας πρωτεΐνης γλυκοσυλοφωσφατιδυλοϊνοσιτόλης μέσω του μονοπατιού των caveolae είναι η ίδια ανεξάρτητα από το αν τα κύτταρα εκφράζουν ή όχι Caveolin-1 [222]. Σε αντίθεση με αυτές τις μελέτες, η ενδοκύττωση της λευκωματίνης από ενδοθηλιακά κύτταρα με μηδενική έκφραση Caveolin-1 είναι σημαντικά μειωμένη [223]. Η μελέτη αυτή δεν καθόρισε, ωστόσο, εάν το ελάττωμα οφείλεται στη δυσλειτουργία των caveolae ή στην απουσία του υποδοχέα αλβουμίνης GP60 στην κυτταρική επιφάνεια.

Εάν επιβεβαιωθούν οι μελέτες για την πρόσληψη AMF, τότε η Caveolin-1 πρέπει να είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της εσωτερικοποίησης και της κυκλοφορίας της μεμβράνης caveolae. Πώς θα μπορούσε να γίνει αυτό; Μία ρυθμιστική και όχι δομική λειτουργία για την Caveolin-1 συμφωνεί με αρκετές πρόσφατες παρατηρήσεις σχετικά με την κίνηση πληθυσμών μεμβράνης, που περιέχουν φοριζούσα πρωτεΐνη Caveolin [106]. Απροσδόκητα, οι περισσότερες caveolae στην επιφάνεια των κυττάρων είναι ακίνητες και δεν μετακινούνται σε εσωτερικές θέσεις του κυττάρου [106]. Η εσωτερίκευση τους ρυθμίζεται στενά από την PKC και τις κινάσες τυροσίνης [113]. Τα παθογόνα, όπως ο ιός SV40, μπορούν να επιβάλουν αυτό το ρυθμιστικό σύστημα και να τονώσουν τη δική τους εσωτερίκευση μέσω caveolae με την ενεργοποίηση μιας άγνωστης κινάσης τυροσίνης [224]. Οι Caveolae τείνουν να συλλέγονται σε πλούσιες σε ακτίνη περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης και περιέχουν έναν αριθμό πρωτεϊνών δέσμευσης ακτίνης. Το ένα είναι η φλαμίνη, η οποία μπορεί να αλληλεπιδρά άμεσα με την Caveolin-1. Συνεπώς, μια σημαντική λειτουργία της Caveolin-1 μπορεί να είναι η ρύθμιση της αλληλεπίδρασης των caveolae με τον κυτταροσκελετό της φλοιώδους ακτίνης, ελέγχοντας έτσι κατά πόσον οι caveolae είναι στην κυτταρική επιφάνεια ή ταξιδεύουν σε εσωτερικές θέσεις. Αυτή η αλληλεπίδραση, με τη σειρά της, μπορεί να ελεγχθεί με φωσφορυλίωση στην τυροσίνη-14.

2.4.4.3 ΡΟΛΟΣ ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ

Αμέσως μετά την ταυτοποίηση της Caveolin-1 ως πρωτεΐνη σήμανσης caveolae, αναπτύχθηκαν διαδικασίες για την απομόνωση των caveolae από τους ιστούς, καθώς και τα κύτταρα ιστοκαλλιέργειας [113]. Ένα απροσδόκητο αποτέλεσμα της χρήσης αυτών των διαδικασιών απομόνωσης ήταν η ανακάλυψη ότι οι caveolae είναι πλούσιες σε πολλαπλά μόρια, που λειτουργούν στην κυτταρική μεταγωγή σήματος [113]. Η ικανότητα ταχείας απομόνωσης αυτών των περιοχών μεμβράνης οδήγησε στην ανακάλυψη ότι πολλά μόρια σηματοδότησης συνδέονται δυναμικά με τις caveolae. Για παράδειγμα, οι ανενεργοί ινοβλάστες έχουν πολύ μικρό Raf-1 στις caveolae, αλλά εμπλουτίζονται σε EGFR. Αφού ο EGF δεσμεύεται με τον EGFR, ο Raf-1 προσλαμβάνεται στις caveolae ταυτόχρονα με τον EGFR, που μετακινείται σε μεμβράνες non-caveolae [225]. Ολόκληρες υπομονάδες σηματοδότησης όπως η PDGFR-Ras-ERK (εξωκυτάρια κινάση ρύθμισης σήματος) έχουν εντοπιστεί στις caveolae και είναι πλήρως λειτουργικές, ακόμη και μετά την απομόνωση των caveolae από το κύτταρο [226]. Υπό το πρίσμα αυτών των ανακαλύψεων, ήταν φυσικό να πιστεύεται ότι η Caveolin-1 ρυθμίζει τη μεταγωγή σήματος προσελκύνοντας σηματοδοτικά μόρια στις caveolae και ρυθμίζοντας τη δραστηριότητά τους.

Μια λειτουργία ικρίωματος για την Caveolin-1 προέκυψε από την εξέταση της τάσης αυτού του μορίου για ολιγομερισμό [227]. Καθαρή Caveolin-1 σχηματίζει αυθόρμητα ολιγομερή σε διάλυμα, και χάρτες ολιγομερισμού σε μία περιοχή του μορίου μεταξύ των αμινοξέων 80 και 101, η οποία βρίσκεται στην αμινοτελική πλευρά της υποτιθέμενης περιοχής εισαγωγής μεμβράνης [228]. Η ικανότητα πολυμερισμού ταιριάζει καλά με την ιδέα ότι η Caveolin-1 είναι ένα δομικό συστατικό της επίστρωσης νηματοειδούς caveolae. Οι Li et al [229] ήταν οι πρώτοι, που έδειξαν ότι ένα συνθετικό πεπτίδιο, που ταιριάζει με την αλληλουχία αμινοξέων μεταξύ των υπολειμμάτων 80 και 101, αναστέλλει τη δραστηριότητα Src κινάσης. Επιπλέον, μια πρωτεΐνη σύντηξης GST, που περιέχει τα αμινοξέα 61-101 της Caveolin-1, αλληλεπιδρά κατά προτίμηση με ανενεργή Src. Η ακολουθία μεταξύ 80 και 101 ονομάστηκε περιοχή ικρίωματος της caveolin-1 [229]. Ακολούθως χρησιμοποιήθηκε ένα πεπτίδιο συνθετικού πεδίου ικρίωματος για την απομόνωση 2 μοτίβων σύνδεσης από μια βιβλιοθήκη εμφάνισης φάγου με τις ακολουθίες

φΧφΧΧΧφ και φΧΧΧΧφΧφ, όπου το φ είναι αρωματικό [230]. Πολλές, αλλά όχι όλες, οι αλληλεπιδράσεις με την Caveolin-1 πρωτεΐνες περιέχουν μία από τις αλληλουχίες αυτές.

Ένα βασικό μέρος της υποθέσεως πεδίου ικρίωματος της Caveolin-1 είναι η πρόταση ότι λειτουργεί για την απενεργοποίηση των σηματοδοτικών μορίων [231]. Πολλές μελέτες έχουν τεκμηριώσει μια αλληλεπίδραση μεταξύ του ικρίωματος της και διαφόρων μορίων σηματοδότησης. Αν και αυτές οι αλληλεπιδράσεις συχνά καταστέλλουν τη σηματοδοτική δραστηριότητα του μορίου όπως προβλέπεται [104], σε μερικές περιπτώσεις ο σκελετός αυτός διεγείρει τη δραστηριότητα [232] ή δεν έχει καμία επίδραση [233]. Η πιο συνηθισμένη δοκιμασία, που χρησιμοποιείται σε αυτές τις μελέτες, μετρά το αποτέλεσμα του πεπτιδίου σκελετού (έναντι μιας αλληλουχίας πεπτιδίων, που ανακατεύεται) σχετικά με τη δραστηριότητα σηματοδότησης *in vitro*. Πρόσφατα, ωστόσο, αυτό το πεπτίδιο έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την ενεργότητα eNOS, μετά την εισαγωγή σε ζωντανά κύτταρα [234]. Τα αποτελέσματα τουλάχιστον 50 μελετών είναι σε βασική συμφωνία με την υπόθεση του πεδίου ικρίωματος της Caveolin-1.

Παρά τη συμφωνία, άλλες εκτιμήσεις δεν ταιριάζουν στην υπόθεση του πεδίου ικρίωματος. Ο Πίνακας 2 καταδεικνύει σαφώς ότι η Caveolin-1 είναι ένα μη επιδεκτικό μόριο, όταν πρόκειται να αλληλεπιδράσει με πρωτεΐνες, που συγκεντρώνονται στις caveolae, αλλά δεν υπάρχει κανένας τρόπος να αποδειχθεί η πραγματική έκταση της ασυδοσίας του. Το ικρίωμα μπορεί απλώς να είναι μια ιδιαίτερα κολλώδης περιοχή, που δεσμεύεται μη-συγκεκριμένα με πολλές πρωτεΐνες στο κύτταρο. Πρόσφατες μελέτες σχετικά με την δομή της 1-101 περιοχής της Caveolin-1 υποδηλώνουν ότι τα αμινοξέα 79-96 της περιοχής ικρίωματος έχουν δευτεροταγή δομή α-έλικας [114]. Μια αλληλεπικαλυπτική ομάδα θετικά φορτισμένων και αρωματικών αμινοξέων σχηματίζει στη μία πλευρά έλικα, ενώ η άλλη είναι πλούσια σε πολικά, αφόρτιστα αμινοξέα. Έτσι, η κύρια αλληλεπιδρώσα επιφάνεια του σκελετού είναι μια απλή έλικα η οποία, επιπλέον, μεσολαβεί σε πλευρικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Caveolins κατά τη διάρκεια της συναρμολόγησης νήματος επικάλυψης caveolae. Έχει επίσης την τάση να αλληλεπιδρά μη-ειδικά με τις μεμβράνες [235]. Μια άλλη πτυχή είναι η έλλειψη γενετικών αποδείξεων ότι ο σκελετός λειτουργεί ως καταστολέας ή ενεργοποιητής

κυτταρικής σηματοδότησης. Εισαγωγή μεταλλάξεων σε αυτή την περιοχή του μορίου υπονομεύει σοβαρά την κυκλοφορία από το σύμπλεγμα Golgi [116], πράγμα που καθιστά αδύνατο να προσδιοριστεί, εάν η μετάλλαξη αυτής της περιοχής του μορίου έχει επίδραση στη μεταγωγή σήματος. Πράγματι, μια μετάλλαξη, που συμβαίνει φυσικά στην περιοχή αυτή της ισομορφής της Caveolin-3, είναι ασταθής και δεν βρίσκεται στην κυτταρική επιφάνεια [236].

Η Caveolin-1 μπορεί να ρυθμίζει τη μεταγωγή σήματος μέσω αλληλεπίδρασης με λιπίδια και όχι με πρωτεΐνες. Όπως συζητήθηκε παραπάνω, υπάρχουν καλά πειραματικά και γενετικά αποδεικτικά στοιχεία ότι, εμπλέκεται στη διατήρηση των επιπέδων χοληστερόλης στις caveolae. Η χοληστερόλη των Caveolae, με τη σειρά της, είναι σαφώς απαραίτητη για τον εντοπισμό ορισμένων σηματοδοτικών μορίων στις caveolae και για τη ρύθμιση της αλληλεπίδρασης μεταξύ σηματοδοτικών μορίων. Ένα καλό παράδειγμα είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ του PDGFR και πολλαπλών σηματοδοτικών μορίων. Όταν η χοληστερόνη υποκαθιστά την χοληστερόλη στις caveolae, το PDGF διεγείρει την κανονική αυτοφωσφορυλίωση του PDGFR, αλλά κανένα από τα υποστρώματα του PDGFR δεν φωσφορυλιώνεται. Αυτό δεν οφείλεται στο ότι ο PDGFR έχει μεταναστεύσει εκτός caveolae και δεν είναι λόγω απώλειας των υποστρωμάτων από το σκελετό [237]. Μάλλον, φαίνεται ότι η χοληστερόλη απαιτείται για τη σύζευξη του PDGFR με τα φυσιολογικά υποστρώματά της. Με άλλα λόγια, τα λιπίδια των caveolae σχηματίζουν τα ίδια ένα ικρίωμα, που οργανώνει πολλαπλά μόρια σηματοδότησης και ελέγχει τις αλληλεπιδράσεις με τον PDGFR. Η ακεραιότητα αυτού του "λιπιδικού ικριώματος" εξαρτάται από τη χοληστερόλη. Συνεπώς, μια λειτουργία για την Caveolin-1 είναι η διατήρηση του λιπιδικού ικριώματος στις caveolae, με απομάκρυνση της οξειδωμένης χοληστερόλης και αντικατάστασή της με νέα χοληστερόλη.

Proteins	Interacting region of Cav-1
PDGFR α and β	82-101
EGFR	61-101
Insulin receptor	81-101
TGF β RI	61-101
TrkA/p75NTR	Whole protein
Hedgehog receptor	81-101
Estrogen receptor	82-101
Androgen receptor	Whole protein
H-Ras	61-101
G α_q /G α_{12} /G α_{13}	Whole protein
Adenylyl cyclase/PLC β 2	82-101
Trp1/IP3R/G α_{11}	Whole protein
c-Src	61-101
Lyn	81-101
Csk	PY14
GRK1, -2, and -5	61-101
COX-2	Whole protein
PLD/PKC α	82-101
PKA	81-101
PKC ϵ	Whole protein
Integrin/cortactin/Src	Whole protein
Integrin(α_5)Shc/Pyn	Whole protein
uPAR/integrin β 1	Whole protein
eNOS	82-101
nNOS	Whole protein
Flotillin 1, 2/Cav-2	Whole protein
190-kDa pY	Whole protein
30-kDa pY	Whole protein
HSP56/cyc40/cycA	Whole protein
Filamin	1-101
Grb7	PY 14
Striatin/SQ2NA/zinodin	Whole protein
Cocmaxin 43	82-101 and 135-178
Lipids	Interacting region of Cav-1
Cholesterol	Whole protein
Fatty acids	Whole protein
GM1	Whole protein
GD3	Whole protein

Πίνακας 2. Μια μερική λίστα πρωτεϊνών και λιπιδίων, που αλληλεπιδρούν με την Caveolin-1

[283]

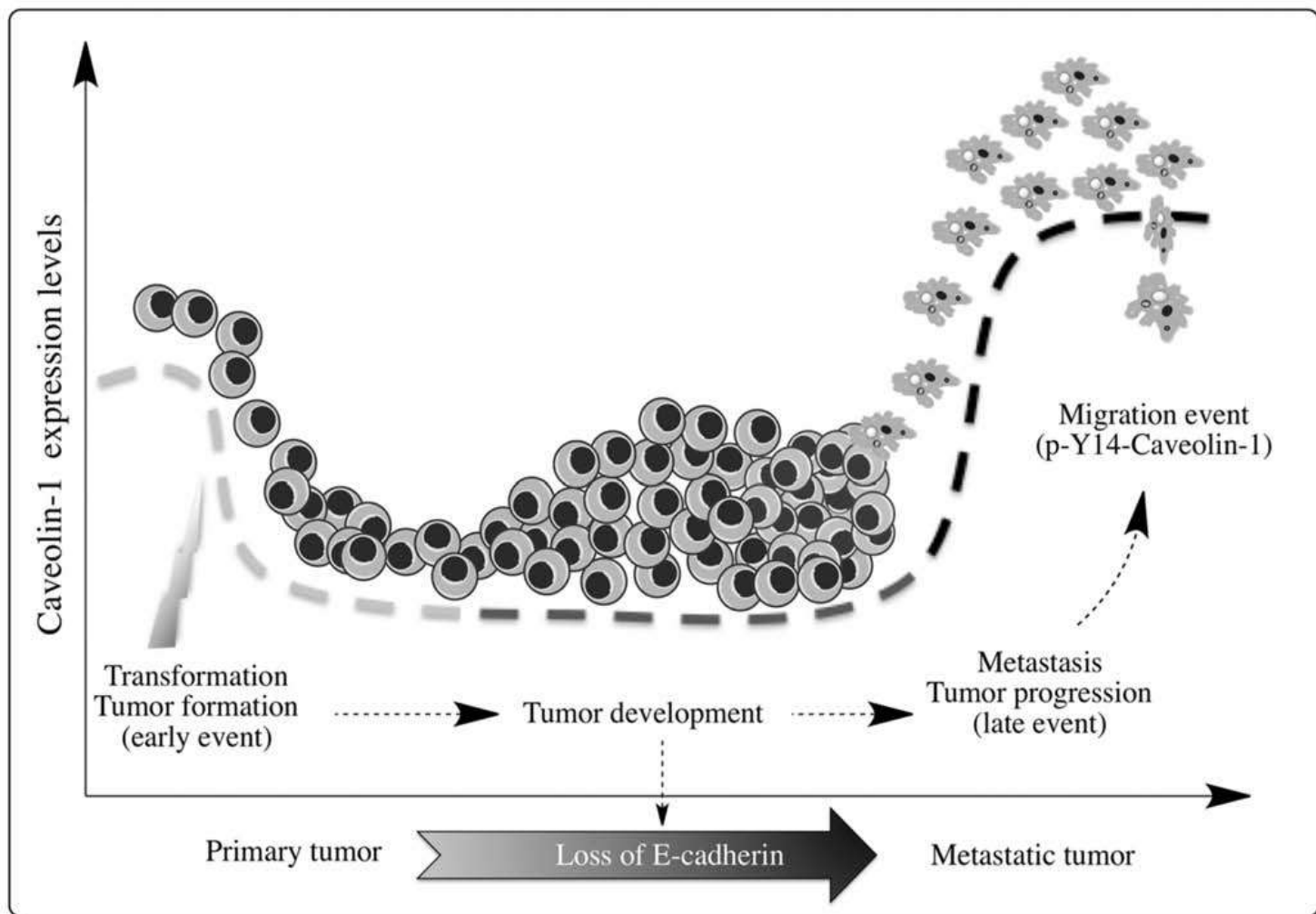
2.4.5 Η ΑΝΤΟΧΗ ΤΗΣ CAVEOLIN-1 ΣΕ ΠΟΛΛΑΠΛΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΣΤΗ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ

Η Caveolin-1 είναι επίσης μια πρωτεΐνη, που προάγει πιο επιθετικά χαρακτηριστικά σε κύτταρα όγκου, όπως η μετάσταση και η αντοχή σε πολλαπλά φάρμακα. Σε φυσιολογικό ιστό του προστάτη η Caveolin-1 δεν εκφράζεται, αλλά τα επίπεδα αυξάνονται κατά τον σχηματισμό όγκου [138-141]. Επιπλέον, ευνοεί τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη μέσω ενός αυτοκρινούς/παρακρινικού μηχανισμού [142-143]. Ομοίως, αυξάνεται στα - ανθεκτικά σε πολλαπλά φάρμακα- MCF7 κύτταρα καρκίνου του μαστού [144] και προάγει την ανεξάρτητη από την αγκυροβόληση επιβίωση προωθώντας την ανόικη [145-146]. Σε ασθενείς, η παρουσία της Caveolin-1 σχετίζεται με αυξημένη μετάσταση, αντοχή σε πολλαπλά φάρμακα και φτωχότερη πρόγνωση [147-149]. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι σχετίζεται με την πολωμένη κατανομή των κυτταρικών σηματοδοτικών στοιχείων και απαιτείται για κυτταρική πόλωση και μετανάστευση [150-152]. Επιπλέον, εκ νέου έκφραση της Caveolin-1 στα κύτταρα αδενοκαρκινώματος είναι επαρκής, για να προωθήσει το σχηματισμό των φιλοπόδιων, την κυτταρική μετανάστευση και να ενισχύσει το μεταστατικό δυναμικό αυτών των κυττάρων [153]. Η φωσφορυλίωση της στην τυροσίνη-14 ευνοεί τη μετανάστευση κυττάρων και την ανεξάρτητη από την αγκύρωση ανάπτυξη μέσω της πρωτεΐνης προσαρμογής Grb7 [154].

Αυτές οι παρατηρήσεις ενισχύουν έντονα την ιδέα ότι η Caveolin-1 εμφανίζει χαρακτηριστικά, που δεν μπορούν να συμφιλωθούν με τον ορισμό της ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Πράγματι, η Caveolin-1 είναι γνωστό ότι προάγει τον σχηματισμό όγκων και στον καρκίνο του προστάτη η παρουσία της συσχετίζεται με την κακή πρόγνωση και επιβίωση των ασθενών. Η έκφραση της αυξάνεται στους πρωτεύοντες όγκους του προστάτη [141] και ορισμένες κυτταρικές σειρές προερχόμενες από λευχαιμία [58]. Επίσης, σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη η παρουσία της ενισχύει την ανάπτυξη του όγκου και ευνοεί τη μετάσταση [138-139, 143, 156]. Είναι σημαντικό ότι η έκφραση της Caveolin-1 σε δείγματα δεν περιορίζεται σε ιστούς, όπως ο προστάτης, όπου τα επίπεδα είναι χαμηλά υπό κανονικές συνθήκες. Για παράδειγμα, αυξημένη έκφραση παρατηρείται επίσης στο

κόλον [128] και στον καρκίνο του μαστού [145, 149, 157], καρκινικά κύτταρα, όπου η ανάπτυξη όγκου συνδέεται με την αρχική απώλεια της Caveolin-1 (Εικ.13).

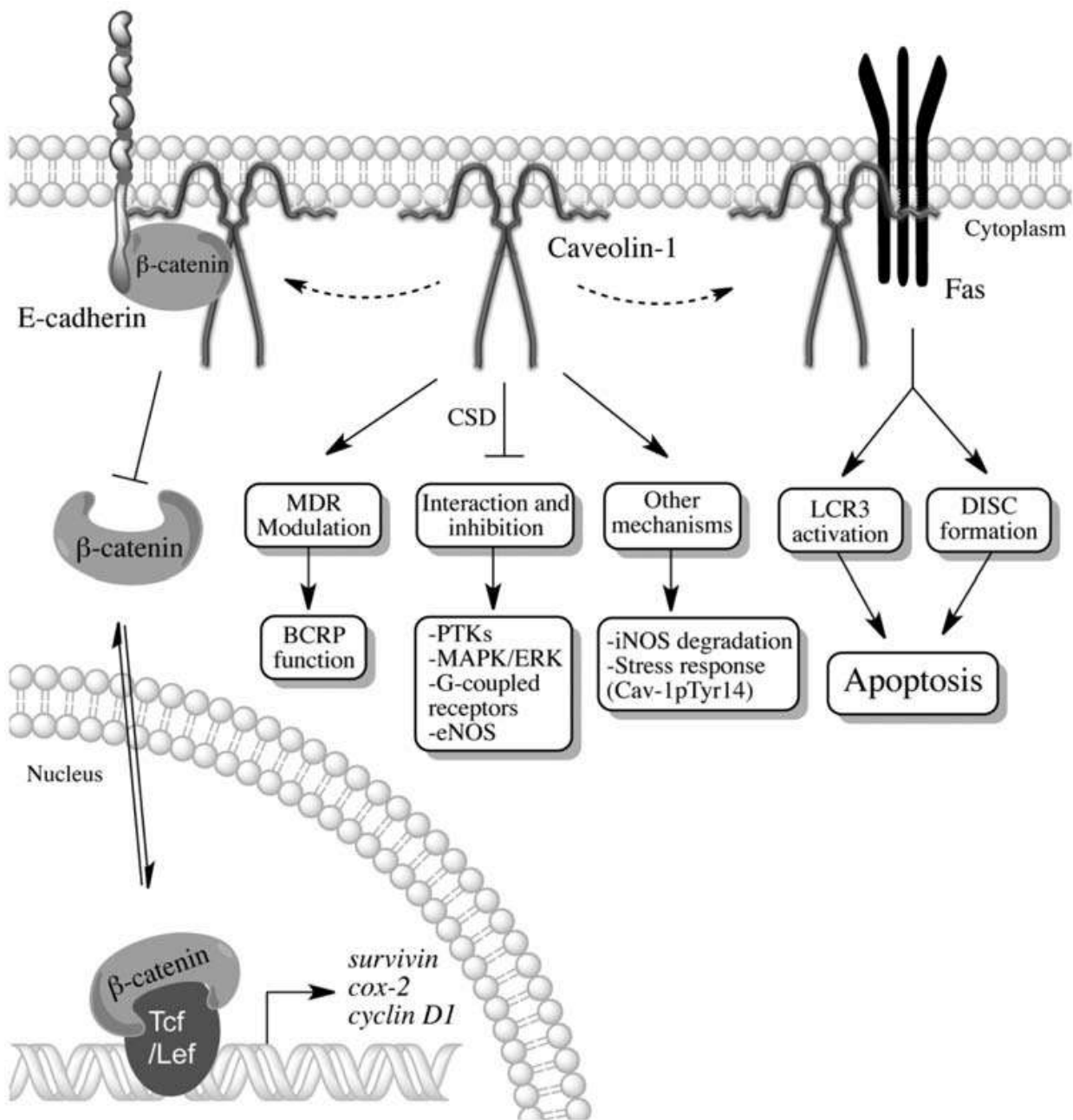
Μια πιθανή εξήγηση για αυτές τις διαφορές είναι ότι η Caveolin-1 λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό σε συστήματα, όπου επικρατούν συμβάντα αρνητικής σηματοδότησης καθοδικής ρύθμισης της Caveolin-1. Εναλλακτικά, η θετική σηματοδότηση με τη μεσολάβηση της Caveolin-1 είναι πιθανόν να είναι σημαντική σε εκείνες τις περιπτώσεις, όπου η παρουσία της πρωτεΐνης σχετίζεται με την πιο επιθετική συμπεριφορά του όγκου. Ένα συμπέρασμα αυτής της έννοιας είναι ότι η Caveolin-1 λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό, όταν συνδέεται με γεγονότα, που ευνοούν τον κυτταρικό θάνατο, ενώ η πιο επιθετική συμπεριφορά του όγκου είναι πιθανό να συσχετιστεί με μηχανισμούς εξαρτώμενους από την Caveolin-1, που ευνοούν την κυτταρική επιβίωση.



Εικόνα 13. Διπλός ρόλος της Caveolin-1 στον καρκίνο [284]. Η ικανότητα της Caveolin-1 να συμμετέχει σε γεγονότα, που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ή την απόπτωση αντικατοπτρίζεται στον διπλό ρόλο, που προτείνεται να διαδραματίσει η πρωτεΐνη στον καρκίνο. Σε ορισμένους ιστούς (μαστός, πνεύμονα, κόλον), που συνάδουν με τη λειτουργία της ως ογκοκατασταλτικό, η έκφραση της Caveolin-1 μειώνεται (ανοιχτή γκρι διακεκομμένη γραμμή) στα πρώιμα στάδια του μετασχηματισμού των κυττάρων και της ανάπτυξης του όγκου. Ωστόσο, καθώς οι όγκοι εξελίσσονται, συμβαίνουν αλλαγές, που δημιουργούν ένα "επιτρεπτό" κυτταρικό πλαίσιο. Αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν μεταβολές εντός του κυττάρου, που σχετίζονται με επιθηλιακή-μεσεγγυματική αλλαγή, όπως η απώλεια E-cadherin. Εναλλακτικά, αλλαγές στο περιβάλλον των κυττάρων του όγκου λόγω φλεγμονής μπορεί επίσης να συμβάλλουν στη δημιουργία ενός τέτοιου "επιτρεπτού" πλαισίου. Κατά την εκ νέου έκφραση της Caveolin-1 (μαύρη διακεκομμένη γραμμή), που προκαλείται από μηχανισμούς, που μένουν να καθοριστούν, η πρωτεΐνη μπορεί να αναπτύξει ριζικά διαφορετικά χαρακτηριστικά (μεταβατική σημείωση στη μορφολογία των κυττάρων) και να προάγει τα χαρακτηριστικά, που σχετίζονται με αυξημένη κακοήθεια (ανθεκτικότητα σε πολλαπλά φάρμακα και μετάσταση). Σε αυτό το πλαίσιο, η φωσφορυλίωση της Caveolin-1 στην τυροσίνη-14 είναι πιθανό να αντιπροσωπεύει μια διαδικασία, που προάγει τη μετανάστευση των κυττάρων του όγκου και ενισχύει τη μετάσταση. Σε άλλους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του προστάτη, η Caveolin-1 δεν εκφράζεται κανονικά. Ωστόσο, καθώς προχωρούν οι όγκοι, μπορεί να ανιχνευθεί αυξημένη έκφραση, η οποία στη συνέχεια συνδέεται με αυξημένη κακοήθεια των κυττάρων του όγκου, όπως υποδεικνύεται στο παραπάνω μοντέλο.

2.4.6 ΜΕΣΟΛΑΒΗΣΗ ΤΗΣ CAVEOLIN-1 ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ

Η Caveolin-1 θεωρείται ως αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης, κάτι το οποίο είναι βασισμένο σε παρατηρήσεις, που συνδέουν την αλληλεπίδραση της με την επακόλουθη αναστολή της λειτουργίας της πρωτεΐνης-στόχου. Πολλές από αυτές τις αλληλεπιδράσεις, όπως εκείνες με τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), τις κινάσες Src, την οδό Ras/Raf/MAPK, τις PKCs και την ενδοθηλιακή συνθετάση του νιτρικού οξειδίου (eNOS), εμφανίζονται μέσω της περιοχής ικρίωματος της Caveolin-1 (CSD- αμινοξέα 82-101) και την περιοχή δέσμευσης του ικρίωματος (CBD), που βρίσκεται στις αντίστοιχες πρωτεΐνες-στόχους [69]. Ωστόσο, όπως υπογραμμίζεται στην Εικ.14, αρκετοί άλλοι τρόποι δράσης είναι προφανείς και η συσχέτιση με την Caveolin-1 δεν εμποδίζει απαραίτητα τη λειτουργία της πρωτεΐνης-στόχου.



Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση μερικών από τις οδούς σηματοδότησης, που διαμορφώνονται από την Caveolin-1 [284]. Η Caveolin-1 απεικονίζεται ως ένα πολύ ευπροσάρμοστο μόριο, που ρυθμίζει τις διαδικασίες σηματοδότησης, τόσο σε μεταγραφικό, όσο και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Στα αριστερά, η Caveolin-1 φαίνεται να συμμετέχει στο σχηματισμό ενός συμπλέγματος πολλαπλών πρωτεϊνών, το οποίο περιλαμβάνει την E-καντερίνη/β-κατενίνη και βοηθά στην απομόνωση της β-κατενίνης στη μεμβράνη, αποκλείοντας έτσι την β-κατενίνη/Tcf- εξαρτώμενη μεταγραφή γονιδίων όπως Survivin, COX-2 και Cyclin D1. Στο κέντρο, όπως φαίνεται, συνδέεται με πολλά διαφορετικά μόρια και ρυθμίζει τη λειτουργία τους. Ορισμένες από αυτές τις αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν το CSD και είναι ανασταλτικές. Για άλλες η συσχέτιση μπορεί να οδηγήσει ή όχι σε αναστολή (διαμόρφωση MDR). Στους "Άλλους Μηχανισμούς", οι αλληλεπιδράσεις με την Caveolin-1 μπορεί να οδηγήσουν σε αποδόμηση, όπως συμβαίνει με την iNOS. Εναλλακτικά, η φωσφορυλίωση της Caveolin-1 στην τυροσίνη-14 ευνοεί τις αλληλεπιδράσεις και τη σηματοδότηση, που συνδέονται με κυτταρικές αποκρίσεις στο "στρες". Τέλος, στα δεξιά απεικονίζονται ορισμένες συνδέσεις μεταξύ της Caveolin-1 και του Fas (CD95).

2.4.7 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

Η Caveolin-1 προάγει την αναστολή του κυτταρικού κύκλου μέσω ενός μονοπατιού, που εξαρτάται από το p53/p21Waf1Cip1 [158]. Επίσης, ενισχύει την πρόωρη γήρανση σε πρωτογενείς ινοβλάστες [159]. Η επαγόμενη από οξειδωτικό στρες γήρανση περιλαμβάνει αυξημένη έκφραση Caveolin-1 μέσω μεταγραφής εξαρτώμενης από το p38 MAPK ενεργοποιημένη με Sp1 [160]. Η έκφραση της και η ενδοκυττάρια κατανομή εξαρτώνται από την προσκόλληση κυττάρου-κυττάρου με τρόπο σχετικό με αυτόν, που παρατηρείται στη β-κατενίνη [161-162]. Πράγματι, μελέτες έχουν εμπλέξει την Caveolin-1 ως αρνητικό ρυθμιστή της μεταγραφής εξαρτώμενης από β-catenin-Tcf/Lef [125, 163-164]. Αν και παραμένει ασαφές, αν η αλληλεπίδραση μεταξύ Caveolin-1 και β-κατενίνης είναι άμεση ή έμμεση, θεωρείται ότι η πρόσληψη β-κατενίνης στις caveolae και/ή πρωτεϊνικά σύμπλοκα, που περιέχουν Caveolin-1 στην κυτταρική επιφάνεια, αποκλείει τη β-κατενίνη Tcf/εξαρτώμενη από Lef μεταγραφή των γονιδίων στόχων [125, 164-165]. Συγκεκριμένα, η Caveolin-1 προτείνεται πως προωθεί τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G0/G1 και μειώνει τον αριθμό των κυττάρων στη φάση S μειώνοντας την έκφραση Cyclin D1 [158,166]. Επιπλέον φάνηκε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης Survivin της αναστολής της απόπτωσης (IAP) και της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2) ρυθμίζονται καθοδικά της Caveolin-1 με τρόπο εξαρτώμενο από β-catenin-Tcf/Lef [164-165]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η μείωση της έκφρασης της Survivin σχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία στα αντικαρκινικά φάρμακα [167]. Επιπλέον, η μείωση αυτή παρέχει μια εξήγηση για αρκετές αλλαγές, που προκαλούνται από την παρουσία της Caveolin-1, συμπεριλαμβανομένης της μείωσης του αριθμού των κυττάρων στη G2M και της αυξημένης ευαισθησίας στην απόπτωση [164]. Σύμφωνα με αυτές τις παρατηρήσεις, η απουσία της Caveolin-1 in vivo οδηγεί σε υπερπολλαπλασιασμό και αυξημένη σηματοδότηση β-catenin-Tcf/Lef σε αμφοτερές εντερικές κρύπτες και βλαστοκύτταρα του μαστικού αδένου [168-169].

2.4.8 ΑΛΛΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

Εναλλακτικοί τρόποι δράσης περιλαμβάνουν βελτιωμένη αποδόμηση προκαλούμενη από πρωτεάσωμα της επαγόμενης ισομορφής της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου (iNOS) μέσω αλληλεπίδρασης, που απαιτεί πιθανώς το τμήμα 101-135 της Caveolin-1 [170-171]. Η φωσφορυλίωση της Caveolin-1 στην τυροσίνη-14 από μέλη των κινασών της οικογένειας Src και άλλες κινάσες τυροσίνης, συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα ινσουλίνης [172-174], επιτρέπει την πρόσληψη του καρβοξυτελικού άκρου της Src κινάσης (Csk), η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει το Src υπόλειμμα Y527, που ευνοεί την ενδομοριακή δέσμευση στο περιοχή SH₂ και την αυτο-αναστολή της κινάσης [175-176]. Επειδή αυτή η θέση φωσφορυλιώνεται σε απόκριση σε μια ποικιλία αυξητικών παραγόντων (ινσουλίνη, PDGF, EGF) και σε ερεθίσματα στο στρες, συμπεριλαμβανομένης της ακτινοβολίας UV, του μηχανικού και οξειδωτικού στρες, καθώς και της υπεροσφαιρίνης, μπορεί η φωσφορυλίωση της Caveolin-1 στην τυροσίνη-14 να αποτελεί ένα σημαντικό στοιχείο στην απόκριση έναντι του κυτταρικού στρες [177]. Πράγματι, αν και οι Caveolin-1 αποσιωπημένοι οργανισμοί είναι βιώσιμοι και γόνιμοι, μειώνεται η ικανότητά τους να ανταποκρίνονται σε συγκεκριμένες καταστάσεις άγχους, καθώς και η διάρκεια ζωής τους γενικά [70-71, 98-99]. Η φωσφορυλίωση στην τυροσίνη-14 συνδέεται επίσης με αυξημένη, ανεξάρτητη από αγκυροβόληση, ανάπτυξη και μετανάστευση κυττάρων μέσω ενός Grb7- εξαρτώμενου μηχανισμού [154], καθώς και με τη μεταλλοπρωτεϊνάση μήτρας τύπου I [178]. Επιπροσθέτως, θεωρείται κρίσιμο συμβάν στην εσωτερικοποίηση μικροπεριοχής μεμβράνης ρυθμιζόμενη από ιντεγκρίνη [179-180], καθώς και στον επαγόμενο από τον EGF σχηματισμό caveolae [181]. Επιπλέον, η παρουσία ή η απουσία αυτού του ιστοτόπου μπορεί να θεωρηθεί λειτουργική για μη-περιττούς ρόλους, που αποδίδονται στις 2 ισομορφές 1α και 1β της Caveolin-1 στην πρόωρη ανάπτυξη σπονδυλωτών [182]. Έτσι, η φωσφορυλίωση στην τυροσίνη-14 είναι σαφώς σχετικά με τη λειτουργία της Caveolin-1 σε διάφορες ρυθμίσεις. Ωστόσο, οι απαντήσεις, που σχετίζονται με το εκάστοτε συμβάν, είναι πολύ μεταβλητές.

2.4.9 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟΙ ΑΠΟ ΤΗΝ CAVEOLIN-1, ΠΟΥ ΤΡΟΠΟΠΟΙΟΥΝ ΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ

Η Caveolin-1 έχει εμπλακεί από καιρό στον κυτταρικό θάνατο, είτε με ευαισθητοποίηση, είτε με άμεση επαγωγή της απόπτωσης. Μια ποικιλία πιθανών μηχανισμών έχει συσχετιστεί με λειτουργίες της σε κύτταρα. Αρχικά, πολλοί συνδέονταν με την ιδέα ότι η Caveolin-1 δεσμεύεται και αναστέλλει σημαντικά συστατικά των οδών της κυτταρικής επιβίωσης, ευνοώντας έτσι τη διαπερατότητα των μιτοχονδρίων και την ενεργοποίηση της κασπάσης.

2.4.10 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΜΕΣΟΛΑΒΟΥΜΕΝΟΙ ΤΗΣ CAVEOLIN-1

Όπως αναφέρθηκε, η Caveolin-1 εμπλέκεται αρχικά ως "ογκοκατασταλτικό", που εμποδίζει τις διαδρομές, που σχετίζονται με τον μετασχηματισμό των κυττάρων. Εν τω μεταξύ, έχει καταστεί σαφές ότι μπορεί επίσης να προάγει συμβάντα σηματοδότησης, που ευνοούν την κυτταρική επιβίωση [183-184].

Η καθοδική ρύθμιση της Caveolin-1 σε καρδιομυοβλάστες με Cav-1-siRNA μειώνει σημαντικά τη φωσφορυλίωση στην τυροσίνη-14 στον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα I (IGFIR) και την ενεργοποίηση Akt μετά από διέγερση IGF-I και σε αυτά τα κύτταρα ο IGF-I δεν μπορεί να αποτρέψει την απόπτωση, που προκαλείται από την απομάκρυνση του ορού [185]. Σε ενδοθηλιακά HUVEC, η καθοδική ρύθμιση της αναστέλλει την επαγόμενη από ινσουλίνη ενεργοποίηση της eNOS (συνθετάση ενδοθηλιακού μονοξειδίου του αζώτου), έναν αντι-αποπτωτικό παράγοντα σε αυτά τα κύτταρα [186]. Επιπλέον, φαίνεται να παίζει ρόλο προ-επιβίωσης στα κύτταρα καρκίνου του προστάτη με την προώθηση της σηματοδότησης PI3K/Akt. Δεσμεύεται και αναστέλλει τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες σερίνης/θρεονίνης PP1 και PP2A, οδηγώντας σε υψηλότερες δραστηριότητες PDK1, Akt και ERK1/2, καθώς και σε μείωση της επαγόμενης από θαψιγαργίνη απόπτωσης στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκίνου του προστάτη LNCaP [187]. Επίσης, η υπερέκφραση της Caveolin-1 προστατεύει από την απόπτωση, που διεγείρεται από c-myc σε κύτταρα LNCaP [188] και η απώλεια της ευνοεί την απόπτωση των κυττάρων

όγκου του προστάτη σε μοντέλο προστάτη διαδερμικού αδενοκαρκινώματος (TRAMP) [189]. Ακόμη, η φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ Caveolin-1 και του υποτιθέμενου ογκογονικού αναστολέα διαφοροποίησης/δέσμευσης DNA (ID-1) παίζει έναν ουσιαστικό ρόλο στην επιθηλιακή μετάπτωση, την κυτταρική μετανάστευση και την αντίσταση στην επαγόμενη από ταξόλη απόπτωση στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη LNCaP και 22RV1. Και πάλι, τα παρατηρούμενα αντι-αποπτωτικά αποτελέσματα εξαρτώνται από την οδό PI3K / Akt [190].

Οι αντι-αποπτωτικές λειτουργίες της Caveolin-1 έχουν επίσης αναφερθεί σε άλλους τύπους κυττάρων. Σε πρωτογενείς φλοιώδεις νευρώνες, η έκφραση της προστατεύει από τον ισχαιμικό κυτταρικό θάνατο, ο οποίος επάγεται μέσω διέγερσης του υποδοχέα N-μεθυλ-D-ασπαρτικού (NMDAR). Σε αυτά τα κύτταρα, η Caveolin-1 πιστεύεται ότι ευνοεί το σωστό εντοπισμό των συστατικών σηματοδότησης NMDAR/Src, οικογένειας κινάσης τυροσίνης/ERK [191]. Στα λεμφοβλαστοειδή κύτταρα TK6, η έκφραση της προστατεύεται από την απόπτωση, που επάγεται από την ακτινοβολία UV, καθώς επίσης προάγει τον πολλαπλασιασμό μετά από προσβολή [192] και αποσιώπηση της Caveolin-1 με κύτταρα ευπαθή από siRNA ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος σε ιονίζουσα ακτινοβολία [193]. Εκτός αυτού, η επαγόμενη από NO αντίσταση στην αποίκισ, που διαμεσολαβείται από την Caveolin-1 σε κύτταρα NCI-H4060 ανθρώπινου πνευμονικού καρκινώματος, και η υπερέκφραση της προστατεύει από την αποσύνδεση, που προκαλείται από απόπτωση [194]. Η υπερέκφραση της στα HepG2, μία κυτταρική σειρά ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, προστατεύει από την απόπτωση, που προκαλείται από τη στέρηση του ορού και επίσης ενισχύει τη μετανάστευση και την εισβολή με την αύξηση της έκφρασης των MMP-2, MMP-9 και VEGF, υποδηλώνοντας ότι η Caveolin-1 μπορεί να είναι ένας κρίσιμος παράγοντας προ-επιβίωσης στον καρκίνο του ήπατος [195]. Υψηλά επίπεδα γλυκόζης προκαλούν απόπτωση στα HLE-B3, μια επιθηλιακή κυτταρική σειρά φακών και το αποτέλεσμα παρατηρείται ταυτόχρονα με την έκφραση Caveolin-1. Με την προσθήκη συμβαστατίνης (αναστολέας 3-υδροξυ-3-μεθυλ-γλουταρυλικού συνενζύμου A) ή την προσθήκη EGF σε κύτταρα HEE-B3 καλλιεργημένα σε μέσο υψηλής συγκέντρωσης σε γλυκόζη, η έκφραση της αυξάνεται, ενώ η απόπτωση μειώνεται [196]. Είναι ενδιαφέρον ότι η Caveolin-1 έχει βρεθεί ότι αποτρέπει την οξειδωτική βλάβη στα ανθρώπινα SK-N-MC κύτταρα νευροβλαστώματος.

Αξιοσημείωτο είναι πως οι θετικοί κυτταρικοί πληθυσμοί ως προς DAF-2DA (παράγωγα NO) και Αννεξίνη V μειώθηκαν με κυτταρική θεραπεία με πεπτίδιο CSD (περιοχή ικριώματος Caveolin-1) και με διαμόλυνση Caveolin-1, αλλά όχι με CSC, κωδικοποιημένο πεπτίδιο ελέγχου. Πράγματι, σε μελέτη η υποξία ενεργοποίησε το iNOS και προήγαγε την παραγωγή NO, με αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης της. Αυτή η αύξηση προστατεύει τα κύτταρα νευροβλαστώματος έναντι οξειδωτικής βλάβης με αναστολή της έκφρασης iNOS και παραγωγή NO. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η αύξηση της ρύθμισης της Caveolin-1 σε απόκριση της υποξίας μπορεί να χρησιμεύσει στην πρόληψη οξειδωτικής βλάβης σε κύτταρα νευροβλαστώματος [197].

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, η Caveolin-1 όχι μόνο προστατεύει από την απόπτωση με την ενίσχυση των αντι-αποπτωτικής σηματοδοτώντας σε κυτταρικές σειρές, αλλά επίσης πως παίζει παρόμοιο ρόλο στη φυσιολογία των κυττάρων. Πράγματι, η απουσία της Caveolin-1 προκαλεί κυτταρική βλάβη και απόπτωση στα θυρεοκύτταρα. Σε αυτή την περίπτωση, η απουσία της οδηγεί σε δυσλειτουργία των θυρεοκυττάρων, υπερβολικό οξειδωτικό στρες και τελικά κυτταρικό θάνατο[198]. Επίσης, η γενετική απόσπαση της Caveolin-1 αυξάνει τον όγκο της εγκεφαλικής ισχαιμίας λόγω της εξασθενημένης αγγειογένεσης των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων, όπου η έκφραση της Caveolin-1 φαίνεται να είναι απαραίτητη για την αύξηση των επιπέδων πρωτεΐνης του eNOS μετά από μια ισχαιμική προσβολή [199].

Συνοπτικά, αυτές οι αναφορές υποδεικνύουν ότι εκτός από τον καλά τεκμηριωμένο προ-αποπτωτικό ρόλο της, η Caveolin-1 δρα επίσης ως αντι-αποπτωτικός παράγοντας και παράγοντας προ-επιβίωσης σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, όπου φαίνεται ότι εμπλέκονται διάφοροι πιθανοί μηχανισμοί. Έτσι, όπως ήδη έχει αναφερθεί, η Caveolin-1 διαδραματίζει έναν εξαιρετικά διαφορούμενο ρόλο στη ρύθμιση των κυτταρικών οδών επιβίωσης και πολλαπλασιασμού, όπου τα παρατηρούμενα αποτελέσματα φαίνεται ότι εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το κυτταρικό πλαίσιο.

2.4.11 CAVEOLIN-1 ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η Caveolin-1 έχει επιπτώσεις στις οδούς επιβίωσης κυττάρων με διάφορους τρόπους, που τελικά μπορεί να προδιαθέτουν ή ακόμη και να προωθήσουν άμεσα τον κυτταρικό θάνατο.

Η δέσμευση των ligands στους κατάλληλους υποδοχείς θανάτου επάγει τη συσσωμάτωση των υποδοχέων και της κασπάσης 8, ακολουθούμενη από την ενεργοποίηση της κασπάσης 3/7, οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο μέσω της εξωγενούς οδού [200]. Ένα πιθανό μοτίβο σύνδεσης της Caveolin-1 (G53LHHHDGQFCH) ταυτοποιήθηκε στην αλληλουχία του ανθρώπινου υποδοχέα θανάτου Fas και σε ένα μοντέλο πνευμονικής επιθηλιακής απόπτωσης, επαγόμενο από υπεροξία. Η αλληλεπίδραση Caveolin-1 και Fas ακολουθήθηκε από Fas πολυμερισμό και το σηματοδοτικό σύμπλοκο επαγόμενου θανάτου (DISC). Σε αυτό το πλαίσιο, η συσσωμάτωση και η αποτελεσματικότητα της διάσπασης BID, του εξαρτώμενου από την Caveolin-1 υποδοχέα, απαιτούν την παλμιτοϋλίωση του Fas. Η απουσία της Caveolin-1 σε ελαττωματικά κύτταρα (Cav-1^{-/-}) διέσπασε τον σχηματισμό DISC. Επιπλέον, διαταράχθηκε η μετάλλαξη της τυροσίνης-14 (Y14F) επαγόμενη από υπεροξία από την αλληλεπίδραση μεταξύ του BID και της Caveolin-1, ο μειωμένος σχηματισμός του tBID και η αυξημένη αντίσταση στην επαγόμενη από υπεροξία απόπτωση [201].

Πρόσφατα, η ελαφριά αλυσίδα 3B της αυτοφαγικής συσχετιζόμενης με μικροσωληνίσκους πρωτεΐνης 3B (LC3B) έχει μελετηθεί ως ρυθμιστής θανάτου των κυττάρων των πνευμόνων. Στα επιθηλιακά κύτταρα, η LC3B σχηματίζει ένα σύμπλοκο με τον υποδοχέα θανάτου Fas σε λιπίδια, που απαιτεί την παρουσία της Caveolin-1. Τα διάφορα σύμπλοκα, Fas-LC3B, Fas-Caveolin-1 και Caveolin-1-LC3B, παρατηρήθηκαν σε επιθηλιακά κύτταρα υπό βασικές συνθήκες. Ωστόσο, αυτά τα σύμπλοκα αποσυνδέθηκαν γρήγορα μετά την κυτταρική θεραπεία με καπνό τσιγάρου. Η μείωση της έκφρασης της LC3B μειώνει το σχηματισμό DISC στα επιθηλιακά κύτταρα. Σε αυτό το μοντέλο, ο Fas απομονώθηκε από την Caveolin-1 και επομένως ρυθμίζει την εξωγενή οδό της απόπτωσης. Επιπροσθέτως, προτείνεται ότι η LC3B απομονώνει το Fas στην βασική κατάσταση. Ως εκ τούτου, η καθαρή επίδραση της έκφρασης της LC3B είναι προαποπτωτική κατά την έκθεση σε καπνό τσιγάρου [202-203].

Η Caveolin-1 εμπλέκεται επίσης στη ρύθμιση της οδού ενδογενούς απόπτωσης μέσω μελετών, που καθιερώνουν τη σύνδεση με ακετυλοχολινεστεράση (AChE). Η δραστηριότητα και η φαρμακολογική αναστολή της AChE βρέθηκε να αυξάνει σε διάφορους τύπους αποπτωτικών κυττάρων [204] και η μεσολαβούμενη από το αντινοηματικό RNA καθοδική ρύθμιση της AChE απέτρεψε την απόπτωση. Κατά την έναρξη της απόπτωσης, η AChE βρέθηκε στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια, μετά από δέσμευση στον κυτταρικό θάνατο, το ένζυμο συσσωρεύτηκε στον πυρήνα και σε αποπτωτικά σώματα [204-205]. Επιπλέον, η AChE αλληλεπιδρά με την Caveolin-1 κατά τη διάρκεια της απόπτωσης σε περιστατικά, που προηγούνται του σχηματισμού του αποπτωσώματος. Ενώ η AChE διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην προαγωγή του ολιγομερισμού του Araf-1, η Caveolin-1 δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά ούτε με το κυτόχρωμα C ούτε με τον Araf-1 [206].

Η απόπτωση των μακροφάγων θεωρείται σημαντική για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας των ανοσοαποκρίσεων. Ενεργοποιώντας θεραπεία των απομονωμένων μακροφάγων *in vivo* με παράγοντες, που προκαλούν απόπτωση, οδηγεί σε μια δραματική αύξηση στα επίπεδα της Caveolin-1, ενώ η caveolin-2 δεν επηρεάζεται. Η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) θεωρείται καθοριστικό χαρακτηριστικό, που συνδέεται με την απόπτωση [207]. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι, η Caveolin-1 υπάρχει σε λιπιδικές σχεδίες και συσσωματώνεται με την PS στην κυτταρική επιφάνεια των αποπτωτικών μακροφάγων, όπου προτείνεται ότι συμμετέχει στην αποτελεσματική εξωτερίκευση της PS [208]. Λαμβάνοντας υπόψη όλα αυτά μαζί, οι παρατηρήσεις συνδέουν την Caveolin-1 άμεσα με τη ρύθμιση των μηχανισμών, που σχετίζονται με την εκτέλεση τόσο των εξωγενών, όσο και των ενδογενών οδών απόπτωσης.

2.4.12 Η ΥΠΟΘΕΣΗ ΤΟΥ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ-ΟΙ ΔΥΟ ΟΨΕΙΣ

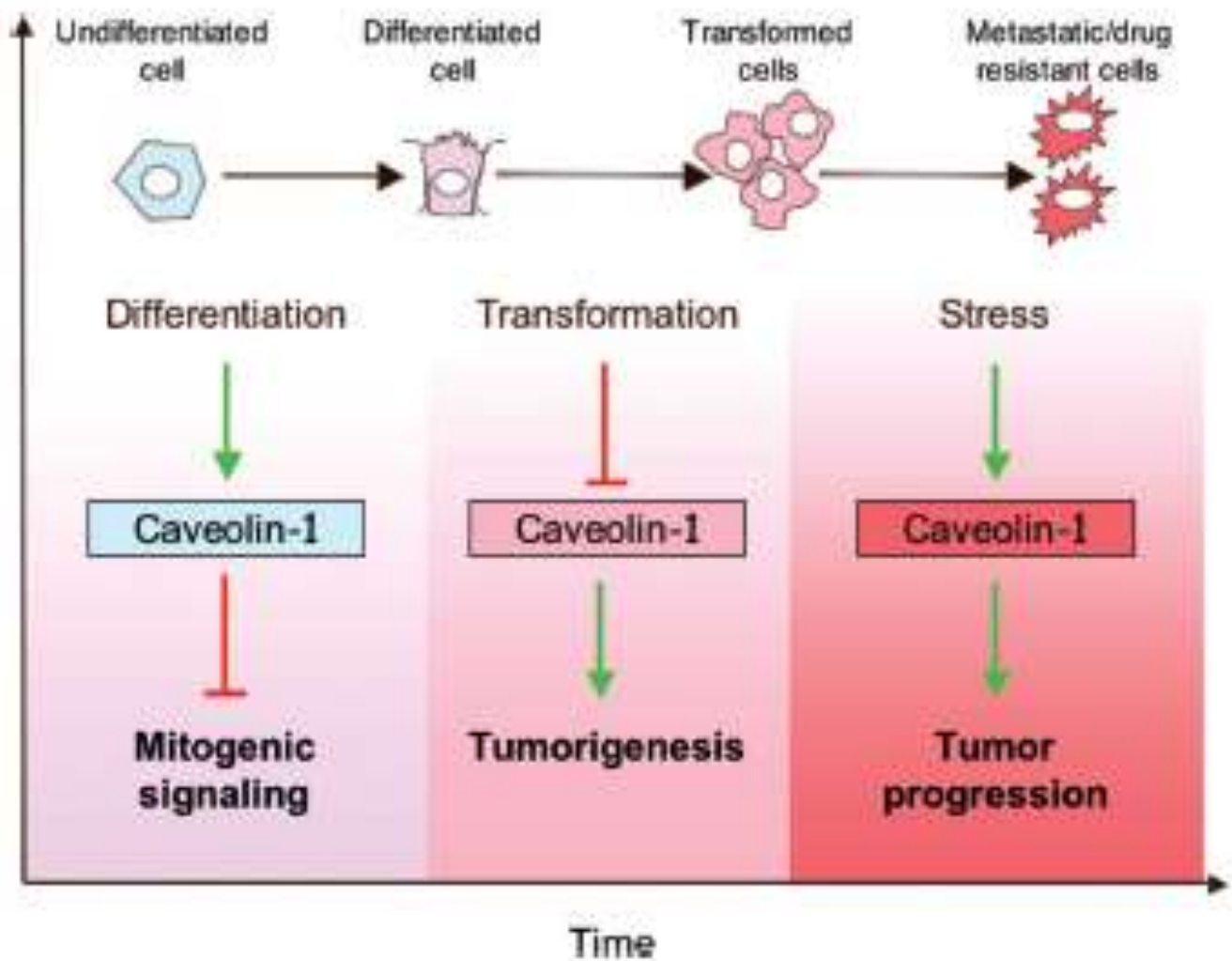
Η Caveolin-1 περιγράφηκε για 1^η φορά ως ένα υψηλά φωσφορυλιωμένο σε τυροσίνη υπόστρωμα σε ινοβλάστες μετασχηματισμένους σε σαρκώματα Rous, υποδεικνύοντας ένα ρόλο για της στη διαδικασία μετασχηματισμού [120-122]. Αργότερα, τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης της Caveolin-1 αποδείχθηκε ότι είναι καθοδικά ρυθμισμένα σε μετασχηματισμένους ινοβλάστες σε ογκογονίδια [123] και η επανέκφραση της ήταν επαρκής για την επιστροφή του μετασχηματισμένου φαινοτύπου, καθώς και για την πρόληψη της ανεξάρτητης από την αγκυροβόληση ανάπτυξης αυτών των κυττάρων [124]. Επιπλέον, η καθοδική ρύθμιση της χρησιμοποιώντας αντιονηματικά ολιγονουκλεοτίδια είναι επαρκής, για να οδηγήσει στο μετασχηματισμό κυττάρων NIH3T3 [125]. Η έκφραση της μειώνεται σε αρκετούς όγκους στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένων των πνευμόνων [126], του μαστού [127], του παχέος εντέρου [82,128], των καρκινωμάτων ωοθηκών [129], καθώς και των σαρκωμάτων [129]. Η επανέκφραση της Caveolin-1 συχνά (αλλά όχι πάντα) έχει ως αποτέλεσμα την αντιστροφή των χαρακτηριστικών, που σχετίζονται με το μετασχηματισμένο φαινότυπο. Έτσι λοιπόν, η υπερπλασία του πνεύμονα και η προδιάθεση στο μαστικό, καθώς και η προκαλούμενη από καρκινογόνα υπερπλασία του δέρματος και ο σχηματισμός όγκου παρατηρούνται σε αποσιώπηση της πρωτεΐνης [70-71, 130-132]. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η Caveolin-1 εμφανίζει ιδιότητες και χαρακτηριστικά ενός ογκοκατασταλτικού μορίου σε μία ποικιλία κυτταρικών ρυθμίσεων. Εντούτοις, υπάρχουν επίσης διαθέσιμα στοιχεία και για το αντίθετο.

Αρχικά, η απώλεια της Caveolin-1 στους όγκους συσχετίστηκε με την παρατήρηση ότι το γονίδιο της Caveolin-1 εντοπίζεται στον τόπο D7S522, μια περιοχή, που συχνά διαγράφεται σε ανθρώπινους καρκίνους [133]. Γενικά όμως, η απώλεια της έκφρασης της Caveolin-1 σε όγκους θεωρείται ότι πραγματοποιείται μέσω επιγενετικών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της μεθυλίωσης του DNA, και όχι των μεταλλακτικών μεταβολών [78]. Ωστόσο, μια μετάλλαξη P132L στην Caveolin-1 ανιχνεύθηκε στο 16% ασθενών με ανθρώπινο καρκίνο του μαστού, που αναλύθηκαν σε μία μελέτη [134]. Αυτή η μετάλλαξη έχει ως αποτέλεσμα μια πρωτεΐνη, που δρα ως επικρατητική αρνητική προωθώντας την αποικοδόμηση της

άγριου τύπου Caveolin-1 [135]. Πρόσθετες μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί από τότε στον καρκίνο του μαστού [136]. Επίσης, η έκφραση της Caveolin-1 ρυθμίζεται σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο με διαφορετικό τρόπο από τα είδη των ROS και επακόλουθη αποικοδόμηση, που προκαλείται από το πρωτεάσωμα [137]. Σε ποιο βαθμό, αυτό μπορεί να είναι ένας σχετικός μηχανισμός στο περιβάλλον του όγκου, μένει να καθοριστεί. Έχουν περιγραφεί διάφοροι μηχανισμοί, που μπορούν να συμβάλλουν στην απώλεια έκφρασης της Caveolin-1, χωρίς να ενέχουν τον κίνδυνο για μεταλλάξεις.

Η βιβλιογραφία, λοιπόν, αναδεικνύει την Caveolin-1 ως πρωτεΐνη, η οποία παίζει έναν έντονα διαφορούμενο ρόλο στον καρκίνο. Όπως απεικονίζεται στην Εικ.13, η έκφραση της συχνά μειώνεται ή καταστέλλεται στα πρώιμα στάδια του καρκίνου, με μηχανισμούς, που δεν είναι απολύτως σαφείς, παρόλο που έχει προταθεί η μεθυλίωση των CpG νησίδων στην περιοχή του υποκινητή. Όπως μπορεί να αναμένεται για ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, η εκ νέου έκφραση της πρωτεΐνης συχνά μειώνει την ανάπτυξη του όγκου *in vivo*, που παρατηρείται για έναν αριθμό διαφορετικών καρκινικών κυτταρικών σειρών. Παρά τα εν λόγω στοιχεία, η Caveolin-1 εμπλέκεται επίσης στην ανάπτυξη του όγκου, στην αντοχή σε πολλά φάρμακα, αλλά και στη μετάσταση. Επιπλέον, η παρουσία της πρωτεΐνης σε όγκους έχει συσχετιστεί με φτωχότερη πρόγνωση ασθενών. Σύμφωνα με αυτή την ασάφεια στη λειτουργία, υπάρχει σημαντική ποσότητα δεδομένων, που δείχνει ότι η Caveolin-1 μπορεί να ευνοήσει τόσο τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, όσο και την επιβίωση, καθώς και να ενισχύσει τις διαδικασίες, που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο. Ενώ τέτοια διακριτά αποτελέσματα μπορεί να αποδοθούν στη χρήση των διαφορετικών πειραματικών συστημάτων, μερικές αναφορές υποδηλώνουν ότι αυτός ο "διακόπτης" σε λειτουργία μπορεί να εμφανιστεί μέσα στο ίδιο κύτταρο. Για να επιλυθεί αυτή η φαινομενική διχοτόμηση, προτείνεται ότι τόσο οι ενδοκυττάριας, όσο και οι εξωκυττάριας αλλαγές βοηθούν στη δημιουργία ενός επιτρεπόμενου περιβάλλοντος. Η απώλεια της E-καντερίνης επισημαίνεται ως μια πιθανότητα. Επομένως, όταν επανεκφράζεται η Caveolin-1, με ασαφείς μηχανισμούς, οι περιορισμοί, που αρχικά υπάρχουν στα μη μετασχηματισμένα κύτταρα, δεν υπάρχουν πλέον, έτσι ώστε η πρωτεΐνη ευνοεί τώρα τις δραστηριότητες, που σχετίζονται με τη συμπεριφορά των κακοήθων όγκων. Μια πιθανότητα είναι η φωσφορυλίωση στην τυροσίνη-14, μία τροποποίηση που εμπλέκεται στην προαγωγή της κυτταρικής

μετανάστευσης και μετάστασης. Σε ποιο βαθμό αυτό μπορεί να συμβάλει σε άλλα χαρακτηριστικά, όπως η αντίσταση σε πολλά φάρμακα, μένει να καθοριστεί. Έτσι, μελέτες, που σχετίζονται με την Caveolin-1, αρχίζουν να αλλάζουν την κλασική άποψη, που υποδηλώνει ότι ο καρκίνος είναι συνέπεια μεταλλάξεων σε ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια (Εικ.15). Με αυτόν τον τρόπο, είναι πιθανό να αλλάξει και ο τρόπος αντιμετώπισης της νόσου.



Εικόνα 15. Δυναμικές αλλαγές στην έκφραση της caveolin-1 κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαφοροποίησης, του σχηματισμού, αλλά και της ανάπτυξης όγκου [302]

2.4.13 CAVEOLIN-1 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ

Στον καρκίνο του παγκρέατος, η Caveolin-1 μειώνεται στην προκαρκινική αλλοίωση, όπως τα παγκρεατικά ενδοπορικά θηλώδη βλεννώδη νεοπλάσματα, σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό, αλλά εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό σε διηθητικούς όγκους σε σύγκριση με τους μη διηθητικούς [238]. Επιπρόσθετα με τις επιγενετικές ή γενετικές μεταβολές και τους διαφορετικούς συν-τελεστές ή σηματοδοτικά μονοπάτια [239-242], η «λειτουργική διακύμανση» της, που παρατηρήθηκε στις τρέχουσες μελέτες θεωρείται ότι αποδίδεται στη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες “συνεργάτες” (δομικά μόρια). Ωστόσο, ο λεπτομερής μηχανισμός είναι ασαφής.

Ο διπλός ρόλος της Caveolin-1 στην ανάπτυξη του όγκου έχει αναγνωριστεί και πιστεύεται ότι είναι κυτταρικός και ιστοειδικός [243-244]. Επιβεβαιώνεται σε αρκετές μελέτες ο ογκογονικός ρόλος της στον καρκίνο του παγκρέατος, όπως αποδεικνύεται από τη συμβολή της στην επιθετικότητα των καρκινικών παγκρεατικών κυττάρων, καθώς και την αυξημένη προγνωστική ισχύ σε ασθενείς με υψηλή έκφραση. Πολύ σημαντικό το γεγονός ότι τα τρέχοντα δεδομένα δείχνουν για 1^η φορά ότι η Cavin-1, μια δομική πρωτεΐνη των caveolae [245], ρυθμίζει τη λειτουργία προαγωγής όγκου από την Caveolin-1 στον καρκίνο του παγκρέατος, παρέχοντας μια πιθανή εξήγηση για τις δυναμικές αλλαγές της Caveolin-1 εντός του ίδιου τύπου όγκου. Τόσο στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα, όσο και στα κλινικά δείγματα, η έκφραση της Cavin-1 αντικατοπτρίζει περισσότερο την κατανομή της Caveolin-1. Η αυξημένη προγνωστική ισχύς της Caveolin-1 αποδείχθηκε ότι εξαρτάται από τα υψηλά επίπεδα Cavin-1 στους ιστούς των όγκων.

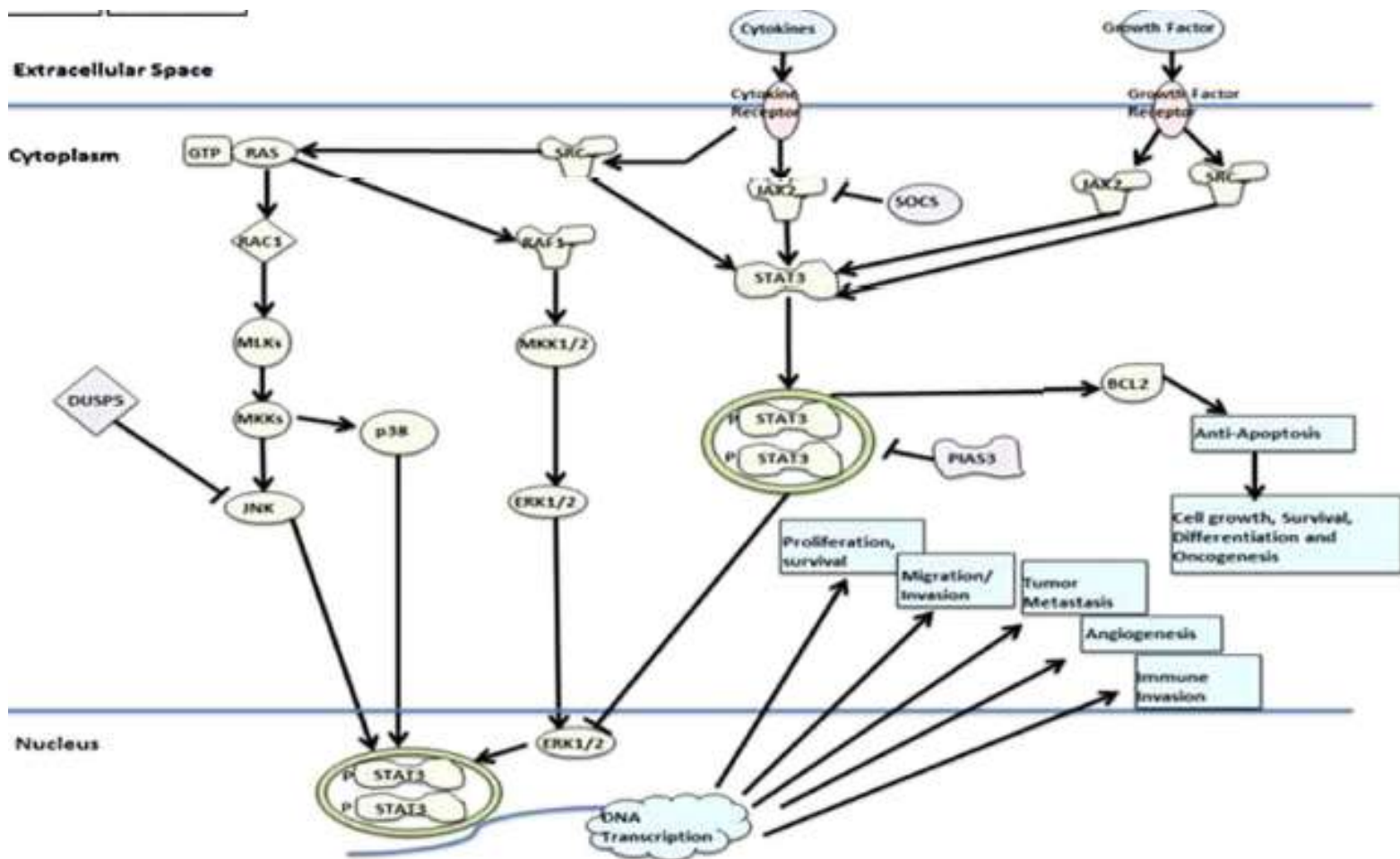
Η λειτουργική διακύμανση της Caveolin-1 εντός του ίδιου τύπου όγκου είναι διαφορετική από τη διακύμανση, που ορίζεται ως ειδικότητα κυττάρου/ιστού [243-244]. Αντικατοπτρίζεται σε ένα διφασικό μοντέλο έκφρασης Caveolin-1, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως [238]. Παρατηρήθηκε σε μελέτες μη φυσιολογική έκφραση Caveolin-1 σε μη μετασχηματισμένα παγκρεατικά κύτταρα και γειτονικούς μη νεοπλαστικούς ιστούς, στους οποίους ήταν ακόμη υψηλότερη από ότι σε χαμηλής κακοήθειας παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα ή ιστούς. Οι περισσότερες αναλύσεις υποδεικνύουν ότι ίσως περιλαμβάνει την κατάσταση ενεργοποίησης διαφόρων

περιοχών της Caveolin-1, όπως διάφοροι συν-τελεστές και καθοδικά σήματα μεταξύ καρκινικών και μη καρκινικών δειγμάτων [246-248]. Για παράδειγμα, η σηματοδότηση Erk ενεργοποιείται από την Caveolin-1 και στη συνέχεια προάγει την ανάπτυξη και επιβίωση του όγκου, ενώ η ενεργοποίηση της ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης p38, που ενεργοποιείται από μιτογόνο, προλαμβάνει την απώλεια της Caveolin-1, προκαλώντας κυτταρική μετανάστευση/εισβολή [244,246]. Με βάση τα παραπάνω προτείνεται ότι η απώλεια της προ-κακοήθους λειτουργίας της Caveolin-1 σε αυτά τα μη νεοπλασματικά κύτταρα/ ιστούς οφείλεται στην απουσία της Cavin-1, τουλάχιστον μερικώς.

Ο ρόλος των caveolae στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ Cavin-1 και Caveolin-1 χρειάζεται προσοχή γιατί οι caveolae είναι μια κύρια λειτουργική πλατφόρμα της Cavin-1 ή Caveolin-1 και αντανακλά εν μέρει τον ενεργό τύπο της δεύτερης [245,249]. Η μείωση της πυκνότητας των caveolae μετά την αποσιώπηση της Cavin-1 και/ή της Caveolin-1, ωστόσο, δεν υποδηλώνει ότι όλες οι δραστηριότητες προαγωγής του όγκου της μίας ή της άλλης βασίζονται στην παρουσία των caveolae.

Η ογκογονική λειτουργία της Caveolin-1 στην εξέλιξη του καρκίνου του παγκρέατος υποδεικνύει τη λειτουργική της διακύμανση με μεταβολές σε κάθε στάδιο. Υπογραμμίζεται ο απαραίτητος ρόλος της πρωτεΐνης Cavin-1, εξαρτημένης από την Caveolin, στην επιθετικότητα, που σχετίζεται με την Caveolin-1, υποδηλώνοντας ένα μηχανισμό, που εξαρτάται εν μέρει από τη δομή των caveolae και από τις υποκείμενες διακυμάνσεις της Caveolin-1 στην ανάπτυξη του καρκίνου του παγκρέατος.

Η Caveolin-1 υπερεκφράζεται σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές παγκρεατικού καρκίνου και σχετίζεται με χειρότερου βαθμού όγκο και κλινικά αποτελέσματα. Σε παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές, η διάσπαση/εξάντληση caveolae/Caveolin-1 μειώνει τον πολλαπλασιασμό, τον σχηματισμό αποικιών και τη μετάσταση. Η μείωση της οδηγεί σε μεταβολή της σηματοδότησης JAK / STAT, JNK και Src σε κύτταρα καρκίνου του παγκρέατος. Η υψηλότερη έκφραση συσχετίζεται με χειρότερα αποτελέσματα, είναι ουσιώδης στην ανάπτυξη όγκου και την εισβολή (τόσο in vitro όσο και in vivo), είναι υπεύθυνη για την προαγωγή της ανθεκτικότητας στις θεραπείες και μπορεί να χρησιμεύσει ως προγνωστικός /προληπτικός βιοδείκτης και στόχος στον καρκίνο του παγκρέατος (Εικ.16).



Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση των μονοπατιών, των οποίων η σηματοδότηση επηρεάζεται, όταν η Caveolin-1 ρυθμίζεται καθοδικά σε παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές [285]

Η Caveolin-1, επομένως, έχει εμπλακεί στην παθογένεση του ογκογονικού κυτταρικού μετασχηματισμού και της μετάστασης και έχει φαινομενικά αντίθετους ρόλους είτε είναι ογκοκατασταλτικό, είτε ογκογονίδιο, ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου (π.χ. μαστό ή προστάτη), αλλά και τον ιστό (π.χ. όγκος ή στρώμα) [250-253]. Στον καρκίνο του παγκρέατος, είναι ρυθμισμένη ανοδικά και έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση ή επιθετικότητα του όγκου [250,254]. Η καθοδική ρύθμιση της έχει αποδειχθεί προηγουμένως ότι ευαισθητοποιεί τα καρκινικά κύτταρα στην ιοντίζουσα ακτινοβολία [255]. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι μεσολαβεί στην αντοχή στην ακτινοβολία στα κύτταρα καρκίνου του παγκρέατος, που αναπτύσσονται σε τρισδιάστατη καλλιέργεια [256].

Εκτός από τη χειρουργική εκτομή, οι τρέχουσες θεραπευτικές στρατηγικές για τη θεραπεία του παγκρεατικού καρκίνου περιλαμβάνουν ακτινοβολία και

χημειοθεραπευτικά, όπως η γεμισιταβίνη, η 5-φθοροουρακίλη, η οξαλιπλατίνη, η nab-πακλιταξόλη και η ιρινοτεκάνη [257,258]. Τα επίπεδα Caveolin-1 στον καρκίνο του παγκρέατος θα μπορούσαν ενδεχομένως να χρησιμεύσουν ως προγνωστικός βιοδείκτης, αφού φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο, τόσο σε αποπτωτική, όσο και σε σηματοδότηση απόκρισης βλάβης DNA σε απάντηση στο θεραπευτικό στρες. Η στόχευση της μέσω γενετικής καθοδικής ρύθμισης στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος μπορεί να εξασθενήσει την ανάπτυξη του όγκου και να ευαισθητοποιήσει τα καρκινικά κύτταρα στη χημειοθεραπεία και τις ακτινοβολίες.

Μελέτες έχουν δείξει τη συνθάση των λιπαρών οξέων (FAS) και την Caveolin-1 συν-εκφρασμένες σε παγκρεατικό καρκίνο και σχετίζονται με κακή επιβίωση, παρέχοντας περαιτέρω στοιχεία για την Caveolin-1 ως πιθανό βιοδείκτη καρκίνου του παγκρέατος [259].

Έχουν αναφερθεί ασυνεπή αποτελέσματα, όσον αφορά τη συσχέτιση μεταξύ έκφρασης και πρόγνωσης Caveolin-1. Η υπερέκφραση της στους καρκίνους του χοληφόρου πόρου έχει συσχετιστεί με ευνοϊκή πρόγνωση. Ωστόσο, αν και είναι διαθέσιμες ελάχιστες πληροφορίες σχετικά με την έκφραση της στο αδενοκαρκίνωμα παγκρεατικού πόρου (PDAC), η υπερέκφραση της έχει συσχετιστεί με αυξημένη εξέλιξη του όγκου και με φτωχότερη πρόγνωση σε σύγκριση με τις περιτομογενείς περιοχές ή το φυσιολογικό πάγκρεας, καθώς και με το μη νεοπλαστικό επιθήλιο του πόρου. Προτείνεται επομένως και σε αυτή την περίπτωση η χρήση της ως βιοδείκτης για την εξέλιξη του PDAC.

Η υπερέκφραση της Caveolin-1 στο PDAC είναι σύμφωνη σε αρκετές μελέτες [260,261]. Επιπλέον, η έκφραση της συσχετίστηκε με την έκφραση κλασικών δεικτών για την πρόοδο του όγκου (Ki-67 και p53) (Πιν.3) σε δείγματα προερχόμενα από όγκο, περιτοναϊκό και φυσιολογικό παγκρεατικό ιστό. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκε αυξημένος δείκτης Ki-67 σε δείγματα με υψηλότερη έκφραση Caveolin-1. Το p53 εκφράζεται στα περισσότερα από τα δείγματα όγκου, αλλά όχι σε περιτοματικές περιοχές. Το μεταλλαγμένο p53 είναι θετικό στους περισσότερους παγκρεατικούς καρκίνους [262]. Η υπερέκφραση της Caveolin-1 συσχετίζεται επίσης με κλινικές και παθολογικές παραμέτρους, συμπεριλαμβανομένης της διαμέτρου του όγκου, της ιστοπαθολογικής κατάστασης και του σταδίου, αλλά δεν δείχνει καμία εξάρτηση από το φύλο ή την ηλικία.. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η

υπερέκφραση της Caveolin-1 μπορεί να συμβάλει στην επιθετικότητα του παγκρεατικού καρκίνου [263-265].

		Cav-1 < 50	Cav-1 ≥ 50	χ^2	P value
Gender	M	12	11	1.4	N.S.
	F	4	7		
Age	<60	9	13	0.946	N.S.
	≥60	7	5		
Diameter	<3	14	6	10.26	P = 0.001
	≥3	2	12		
Nodal factor (pN)	-	8	10	0.084	N.S.
	+	6	10		
Histopatological grade	G1	14	5	12.25	P < 0.0005
	G2	2	13		
Stage	1 + 2	16	3	23.8	P < 0.0001
	3 + 4	0	15		
Ki-67	<20	12	0	20.86	P < 0.0001
	≥20	4	18		
P53	-	7	0	9.91	P = 0.001
	+	9	18		

Πίνακας 3. Συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της Caveolin-1 και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών [286]

Η μεταλλαγμένη Caveolin-1 επάγει τον κυτταρικό μετασχηματισμό, που ενεργοποιείται από το σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποιούμενης από μιτογόνο πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK) [266]. Η ογκοκατασταλτική επίδραση της Caveolin-1 διαμεσολαβείται μέσω της περιοχής ικριώματος [267]. Το c-Src επάγει τη φωσφορυλίωση της στο υπόλειμμα τυροσίνη-14. Η φωσφορυλιωμένη τυροσίνη-14 στην Caveolin-1 προσδίδει δέσμευση στην πρωτεΐνη σύνδεσης του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα 7 (Grb7) και ενισχύει τόσο την ανεξάρτητη από την αγκυροβόληση ανάπτυξη, όσο και τον επιδερμικό παράγοντα ανάπτυξης (EGF), που διεγείρει την κυτταρική μετανάστευση [268]. Στο παγκρεατικό καρκίνωμα, έχει

αναφερθεί υπερέκφραση και ενεργοποίηση της Src κινάσης [269]. Έτσι, η caveolin-1 μπορεί να συνεργάζεται με άλλα μόρια, όπως c-Src και Grb7, για να διεγείρει την ανάπτυξη του όγκου στο παγκρεατικό καρκίνωμα.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

Από την εταιρεία Sigma-Aldrich το εργαστήριο προμηθεύτηκε τα αντιδραστήρια Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), Μεθανόλη (Methanol), Χλωριούχο Νάτριο (NaCl)[®], L-Γλουταμίνη, Γλυκίνη (Glycine), Ammonium Persulfate (APS) Trizma[®] και το δευτερογενές αντίσωμα Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-Peroxidase Produced in Goat (A 6154). Η αιθανόλη (ethanol) είναι της εταιρείας ACROS ORGANICS και το δευτερογενές αντίσωμα Goat Anti-Mouse IgG, HRP conjugate, Secondary Antibody Millipore[™] (12889615) της Upstate.

Από την εταιρεία Thermo Fisher Scientific είναι τα αντιδραστήρια Tween[®] 20, Υδροχλωρικό Οξύ (HCl), Pierce[®] ECL Western Blotting Substrate, Pierce[™] BCA Protein Assay Kit και η μεβράνη διφθοριούχου πολυβινυλιδενίου (PVDF), που χρησιμοποιήθηκε στη Western Blot Analysis, καθώς και τα 96-well plates.

Από την Applichem προέρχονται το TEMED, η χρωστική ουσία Ponceau S και το μπλε της βρομοφαινόλης (bromophenol blue sodium salt electrophoresis grade).

Στην εταιρεία Scharlab ανήκει το Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane και στη Nippon Genetics ο μάρτυρας (marker), που χρησιμοποιήθηκε κατά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών (BlueStar Prestained Protein Marker Plus).

Το αντίσωμα anti-Phospho-Caveolin-1 (Tyr14) (#3251), όπως επίσης και το RIPA 10x και ο phosphatase inhibitor προμηθευτήκε το εργαστήριο από την εταιρεία Cell Signaling, ενώ το αντίσωμα purified anti-GAPDH (649202 FF26A/F9) από την εταιρεία Biolegend. Το αντίσωμα anti-Caveolin-1 IgG (pAb N-20, rabbit, SC-894) είναι της εταιρείας Santa Cruz Biotechnology.

Στην εταιρεία BIORAD laboratories ανήκει η Acrylamide Bis 30%, ενώ στη Merck η β-Μερκαπτοαιθανόλη (β-Mercaptoethanol), στη Fluka Chemika το Οξικό Οξύ (Acetic Acid) και στην Carl Roth η Γλυκερίνη.

Τα αναλώσιμα (falcon, φλάσκες, πιπέτες) προμηθεύτηκε το εργαστήριο από την εταιρεία Corning®, ενώ τις πιπέτες τύπου Tipor-V από την Orange Scientific και τα κρυοφιαλίδια (cryovials) από τη Sarstedt.

Το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) ανήκει στην CALBIOCHEM και η χρωστική ουσία Trypan Blue, καθώς και το αντιβιοτικό διάλυμα Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (Penicillin/Streptomycin) και η Τρυψίνη (Trypsin/EDTA) στη BIOCHROM.

Τέλος, το PBS (Phosphate Buffered Saline, απαλλαγμένο ιόντων Ca^{2+} Mg^{2+} και φαινολοσουλφονοφθαλεΐνης ή PSP), η L-Γλουταμίνη (L-Glutamin), ο ορός εμβρύου βοοειδούς (Fetal Bovine Serm, FBS) και το θρεπτικό υλικό RPMI 1640 είναι από τη Gibco.

3.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

3.2.1 ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΕΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΙ ΠΑΓΚΡΕΑΤΙΚΟΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ

Η παρούσα διπλωματική εργασία υλοποιήθηκε με τη χρήση καρκινικών κυτταρικών σειρών του παγκρέατος, καθώς και παγκρεατικών δειγμάτων όγκων (καρκινικού/μη-καρκινικού ιστού), που προέκυψαν μετά από χειρουργικές αφαιρέσεις, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας. Επιλέχθηκαν 4 καρκινικές παγκρεατικές κυτταρικές σειρές οι οποίες είναι οι εξής: AsPC1, BxPC3, MIAPaCa-2 και Panc-1.

Αναφορικά με την προέλευση των παγκρεατικών καρκινικών κυτταρικών σειρών να αναφερθεί ότι: Η σειρά **AsPC-1** αφορά το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα και προέρχεται από μετάσταση στον ασκίτη. Προήλθε από Καυκάσια γυναίκα 62 ετών με αδενοκαρκίνωμα στην κεφαλή του παγκρέατος και μεταστάσεις σε διάφορα κοιλιακά όργανα μέσω ξενομοσχεύματος από nude ποντίκι και συγκεκριμένα από κύτταρα του ασκίτη. Η ασθενής έλαβε ακτινοβολία και χημειοθεραπεία, αλλά τελικά ανέπτυξε ασκίτη και πέθανε 2 εβδομάδες αργότερα. Η ασκίτικη κυτταρική σειρά

παρατηρήθηκε ότι παράγει άφθονη ποσότητα βλεννίνης, καθώς και καρκινοεμβρυικού αντιγόνου [293].

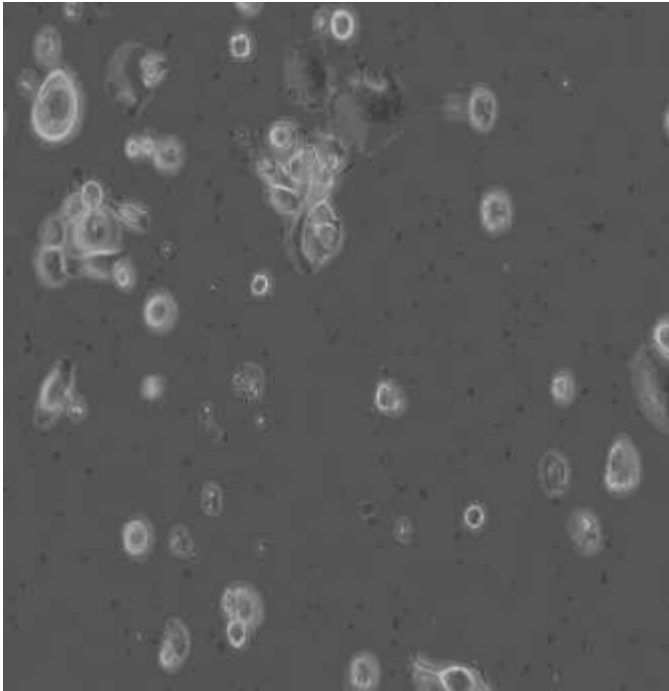
Τα **BxPC-3** είναι επίσης ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος και προήλθαν από γυναίκα 61 ετών από το σώμα του παγκρέατος. Η ασθενής πέθανε 6 μήνες μετά την ακτινοβολία και χημειοθεραπεία. Καμία ένδειξη μετάστασης δε βρέθηκε. Οι όγκοι που αναπτύσσονται σε nude ποντίκια μοιάζουν με τον πρωτογενή όγκο του ασθενούς και παράγουν καρκινοεμβρυικό αντιγόνο, ανθρώπινο αντιγόνο που σχετίζεται με τον καρκίνο του παγκρέατος, ειδικό αντιγόνο ανθρώπινου παγκρέατος και ίχνη βλεννίνης [294].

Τα **MIA PaCa-2** είναι επιθηλιακά κύτταρα παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος και απομονώθηκαν από Καυκάσιο άντρα ηλικίας 65 ετών, ο οποίος παρουσίαζε κοιλιακό πόνο για 6 μήνες και ψηλάφητη ανώτερη κοιλιακή μάζα. Ο όγκος βρισκόταν στο σώμα και την ουρά του παγκρέατος και είχε διεισδύσει στην περιαρτική περιοχή. Δεν εξέφραζε μετρήσιμες ποσότητες καρκινοεμβρυικού αντιγόνου [295].

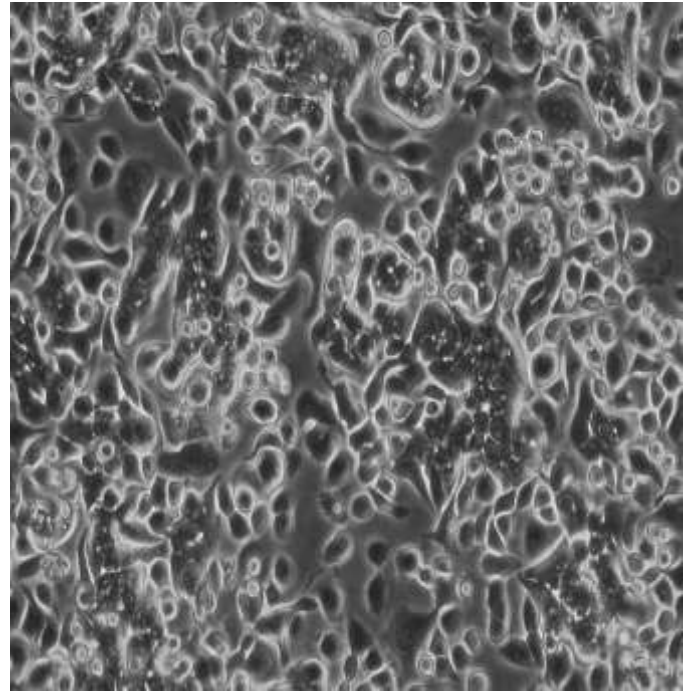
Τέλος, τα **PANC-1** αποτελούν ανθρώπινα κύτταρα επιθηλιώδους αδενοκαρκινώματος και απομονώθηκαν από Καυκάσιο άντρα ηλικίας 56 ετών στην κεφαλή του παγκρέατος, που εισέβαλε στο δωδεκαδακτυλικό τοίχωμα. Οι μεταστάσεις σε έναν περιπαγκρεατικό λεμφαδένα ανακαλύφθηκαν κατά τη διάρκεια παγκρεατικής δωδεκαδακτυλοτομής. Στην καλλιέργεια, η κυτταρική σειρά δε βρέθηκε να εκκρίνει σημαντικές ποσότητες καρκινοεμβρυικού αντιγόνου [296].

Όλα τα παραπάνω κύτταρα αναπτύσσονται προσκολλημένα σε φλάσκα (φιάλη καλλιέργειας), εκτός από τα **MIA PaCa-2**, τα οποία είναι ημι-προσκολλημένα και αναπτύσσονται τόσο στα τοιχώματα της φιάλης καλλιέργειας, όσο και στο υπερκείμενο, το οποίο αποτελεί το θρεπτικό υλικό των κυττάρων. Οι πληροφορίες για όλες τις παραπάνω κυτταρικές σειρές προήλθαν από την [ATCC: The Global Bioresource Center](#) [287].

AsPC-1

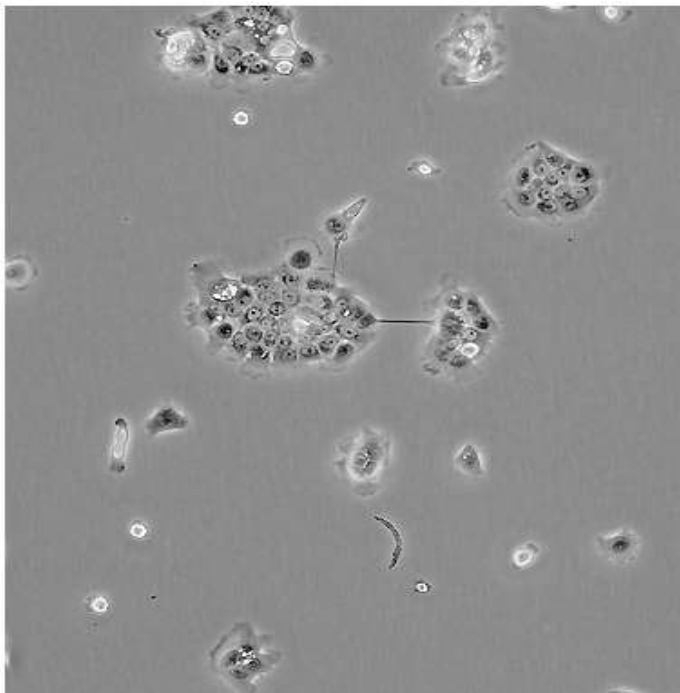


48 ώρες μετά το ξεπάγωμα

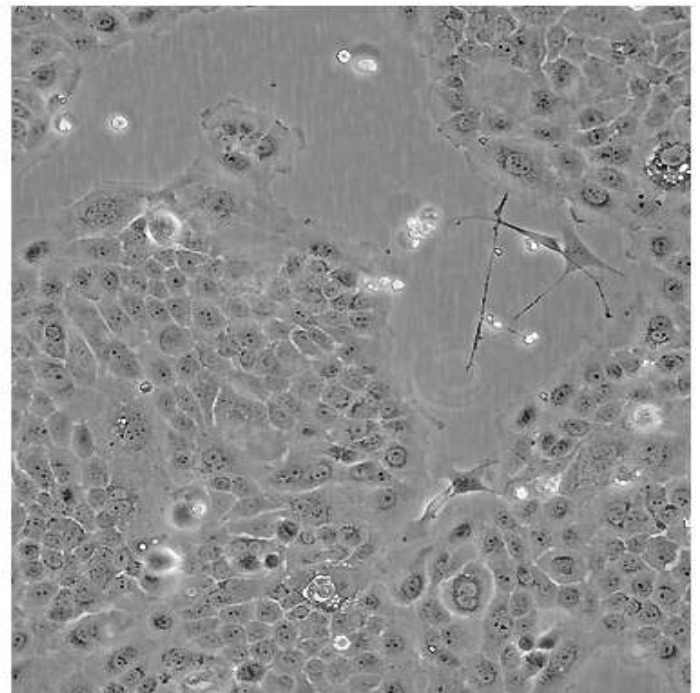


Πριν την κρυοσυντήρηση

BxPC-3

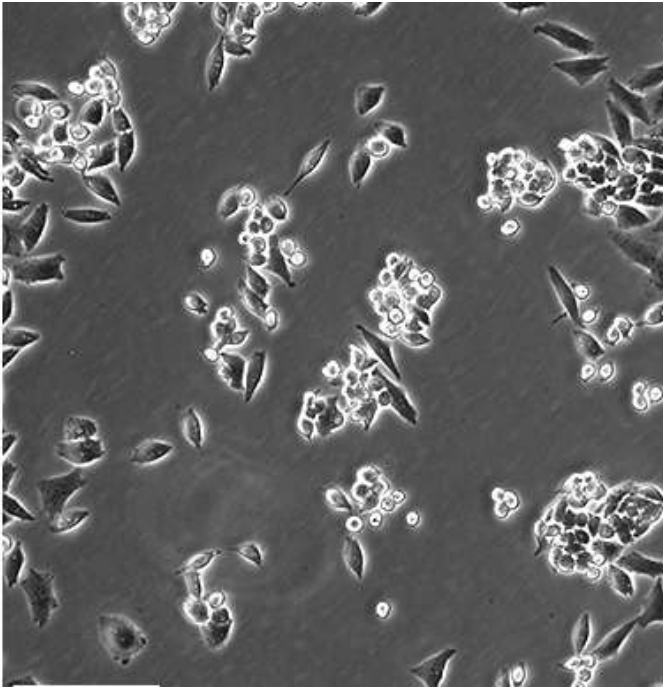


Χαμηλή Πυκνότητα

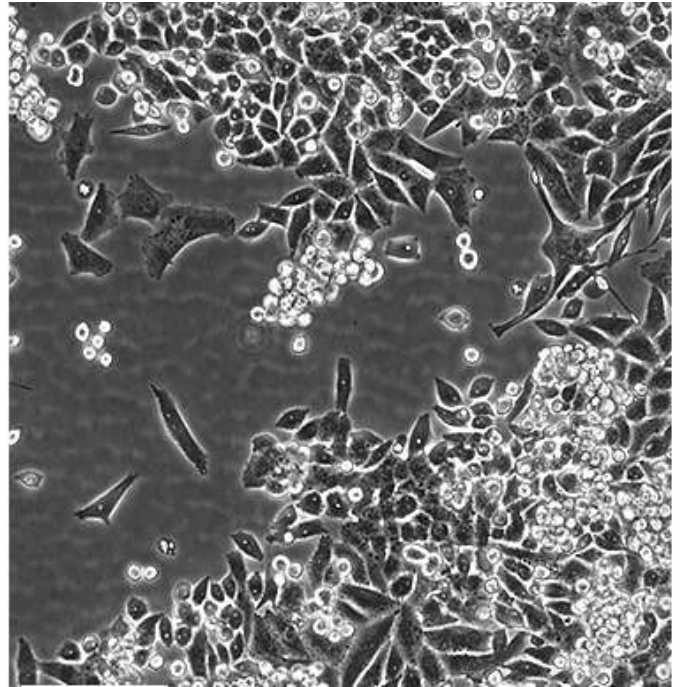


Υψηλή Πυκνότητα

MIA PaCa-2

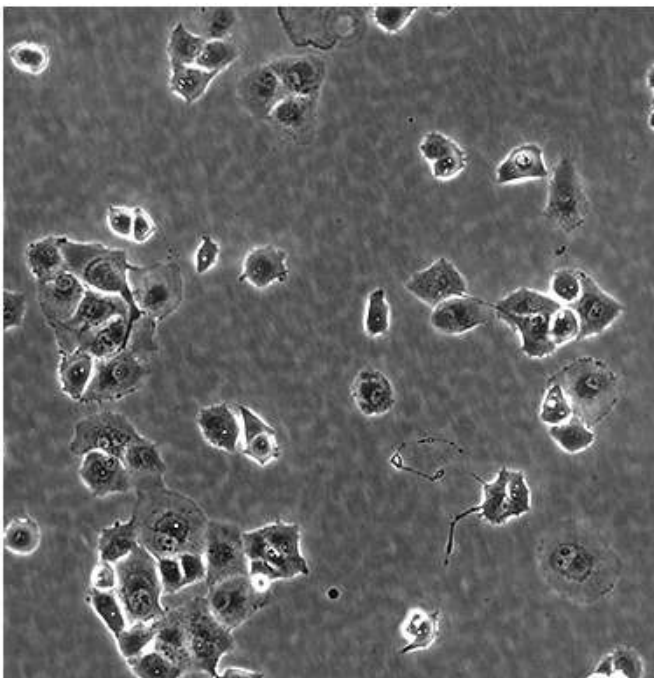


Χαμηλή Πυκνότητα

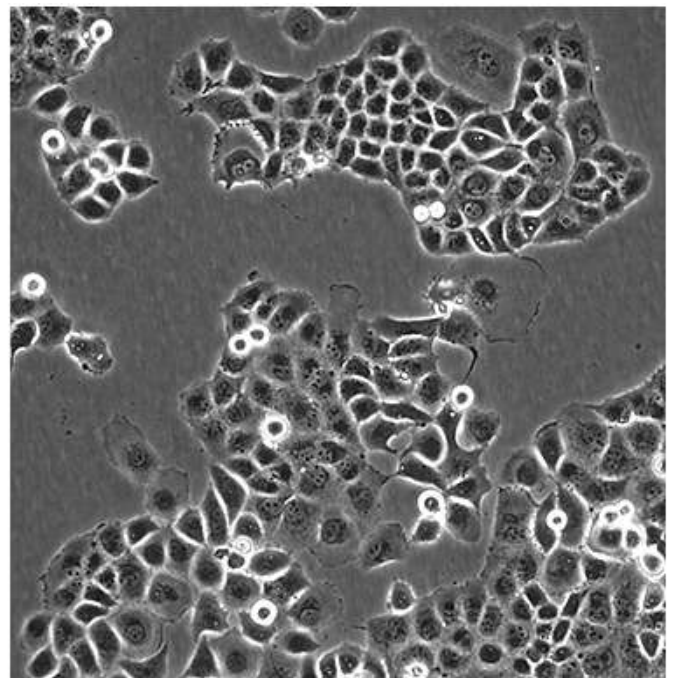


Υψηλή Πυκνότητα

PANC-1



Χαμηλή Πυκνότητα



Υψηλή Πυκνότητα

3.3 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Θρεπτικό μέσο των καρκινικών κυττάρων καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας τους αποτέλεσε το **RPMI 1640** (αρχικός όγκος 500ml), το οποίο προκειμένου να χρησιμοποιηθεί συμπληρώνονταν με 6ml Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (P/S), 6ml L-Γλουταμίνη (L-Glu) και ορό εμβρύου βοοειδούς (FBS) συγκέντρωσης 5% του αρχικού όγκου του RPMI. Ανάλογα βέβαια με τις ανάγκες των κυττάρων, το πόσο αργά ή γρήγορα αναπτύσσονταν, κυμαινόταν (προς τα επάνω) κάθε φορά η συγκέντρωση του ορού. Οπότε από εδώ και στο εξής, όπου αναφέρεται το θρεπτικό υλικό RPMI, θα θεωρείται ως δεδομένο πως περιέχει όλα τα παραπάνω.

Ο λόγος για τον οποίο γίνονται στο θρεπτικό υλικό οι συγκεκριμένες προσθήκες είναι πως Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη συμβάλλουν στην πρόληψη βακτηριακής μόλυνσης των κυτταρικών καλλιεργειών, λόγω της αποτελεσματικής τους δράσης κατά των gram-θετικών και gram-αρνητικών βακτηρίων, ενώ η L-Γλουταμίνη υποστηρίζει την ανάπτυξη των κυττάρων με υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια και αποτελεί εναλλακτική πηγή ενέργειας για τα κύτταρα εκείνα, που διαιρούνται ταχύτατα και δε δύνανται να χρησιμοποιήσουν αποτελεσματικά τη γλυκόζη. Η L-Γλουταμίνη θεωρείται ως ένα από τα άμεσα διαθέσιμα αμινοξέα, που χρησιμοποιούνται για αρκετούς ταχέως διαιρούμενους κυτταρικούς πληθυσμούς *in vitro*.

Όλες οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο με τις εξής συνθήκες: θερμοκρασία 37°C, συγκέντρωση CO₂ 5% και υγρασία 95%.

3.4 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Οι κυτταρικές σειρές αναπτύχθηκαν σε ειδικές φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας (25 ή 75 cm²) με ή χωρίς φίλτρο ή σε τρυβλία μεγέθους 60 και 100mm.

Γίνεται καθημερινή παρατήρηση του ρυθμού ανάπτυξης και της μορφολογίας των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Κύτταρα, τα οποία είναι προσκολλημένα στην κάτω επιφάνεια της φλάσκας ή του τριβλίου, θεωρούνται ζωντανά και υγιή. Αντίθετα, όσα κύτταρα επιπλέουν στο θρεπτικό υλικό θεωρούνται νεκρά. Εξαίρεση στην παραπάνω παρατήρηση αποτελεί η κυτταρική σειρά MIA PaCa-2, αλλά και οποιαδήποτε άλλη

ανήκει στην ίδια κατηγορία με αυτή, αφού όπως προαναφέρθηκε πρόκειται για κύτταρα, που αναπτύσσονται τόσο στον πυθμένα της φλάσκας ή του τριβλίου, όσο και στην επιφάνεια του θρεπτικού μέσου.

Η μέθοδος, που ακολουθήθηκε, βασίστηκε στο πρωτόκολλο της Mary C. Phelan (1998) [270]. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γίνεται στην περίπτωση, που αυτά έχουν καλύψει το 80% της φλάσκας ή του τριβλίου, στα οποία καλλιεργούνται. Η μέθοδος, που ακολουθείται, σε βήματα είναι η ακόλουθη:

1. Όλα τα υλικά, προκειμένου να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν, πρέπει να βρίσκονται στη θερμοκρασία των 37°C (ίδια με αυτή που έχουν τα κύτταρα μέσα στον επωαστικό κλίβανο), κάτι το οποίο επιτυγχάνεται με τη βοήθεια υδατόλουτρου.
2. Μεταφέρονται σε θάλαμο νηματικής ροής (Cell Culture Hood), ώστε οποιαδήποτε εργασία να πραγματοποιείται υπό στείρες συνθήκες. Πριν τη μεταφορά απαραίτητος είναι ο επιμελής καθαρισμός τους με αιθανόλη συγκέντρωσης 70%, προκειμένου να αποφευχθεί οποιαδήποτε μόλυνση.
3. Γίνεται αναρρόφηση όλου του θρεπτικού υλικού, με τη βοήθεια αποστειρωμένης πλαστικής ορολογικής πιπέτας, το οποίο στη συνέχεια και απομακρύνεται.
4. Τα κύτταρα “πλένονται” με ήπιες κινήσεις 1-2 φορές με διάλυμα PBS (Phosphate Buffered Saline, απαλλαγμένο ιόντων Ca^{2+} , Mg^{2+} και φαινολοσουλφονοφθαλεΐνης ή PSP) συγκέντρωσης 1% v/v, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν εναπομείναντα ίχνη ορού, τα οποία μπορεί να αναστείλουν τη δραστηριότητα της θρυψίνης.
5. Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα θρυψίνης (1-2 ml ανάλογα με την επιφάνεια καλλιέργειας) συγκέντρωσης 1% v/v, με στόχο να καλυφθεί όλη η επιφάνεια, στην οποία βρίσκονται προσκολλημένα τα κύτταρα.
6. Η φλάσκα (ή το τριβλίο) τοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο για 3-7min, ώστε να δράσει η θρυψίνη και να ξεκολλήσουν τα κύτταρα από την επιφάνεια. Η αποκόλληση των κυττάρων ελέγχεται στο μικροσκόπιο, ώστε αν δεν έχει ολοκληρωθεί, να τοποθετηθούν ξανά για 1-2 min στον κλίβανο.
7. Αμέσως μόλις ολοκληρωθεί η αποκόλληση, τα κύτταρα μεταφέρονται και πάλι στο θάλαμο νηματικής ροής, όπου και προστίθεται, και πάλι με τη βοήθεια αποστειρωμένης πλαστικής ορολογικής πιπέτας, θρεπτικό υλικό (4 ml

σε φλάσκα καλλιέργειας 25cm², 8 σε 75 cm², ενώ αντίστοιχα στο τριβλίο 60mm 8 και στα 100mm 13), ώστε να ανασταλεί η δράση της θρυψίνης. Γίνεται αναρρόφηση όλου του υλικού και αφήνεται πάλι πίσω 2-3 φορές, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κύτταρα, που έχουν μείνει προσκολλημένα στα τοιχώματα.

8. Στην περίπτωση που κατά την ανακαλλιέργεια απαιτείται η δημιουργία μιας διαφορετικής αραιώσης, μετά το βήμα 7 όλο το υλικό μεταφέρεται σε πλαστικά σωληνάρια (falcons) των 15 ή των 50ml , ανακινείται καλά και επιστρέφεται πίσω στη φλάσκα μόνο εκείνη η ποσότητα, που έχει υπολογιστεί με βάση την επιθυμητή αραιώση π.χ. 1:3 ή 1:4. Στη συνέχεια συμπληρώνεται στη φλάσκα (ή στο τριβλίο) θρεπτικό υλικό, τόσο, ώστε ο συνολικός όγκος να είναι 5ml στη φλάσκα των 25cm², 10ml στη φλάσκα των 75cm² και στο τριβλίο των 50mm αντίστοιχα και 15ml στο τριβλίο των 100mm.
9. Μόλις ολοκληρωθούν οι παραπάνω διαδικασίες, τα κύτταρα επιστρέφονται στον επωαστικό κλίβανο και κάθε 2 ημέρες γίνεται ανανέωση του θρεπτικού υλικού με “νέο”, μέχρι και πάλι η πληρότητα τους να φτάσει ~80%.

Σημείωση: Στην περίπτωση των ημι-προσκολλημένων κυττάρων η αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού, που γίνεται κατά το 3^ο βήμα, δεν απομακρύνεται τελείως αφού περιέχει επίσης κύτταρα, αλλά μεταφέρεται σε πλαστικό σωληνάριο (falcon) και φυγοκεντρείται για 7min στις 1200rpm. Η διαδικασία που ακολουθείται για τα κύτταρα, που είναι προσκολλημένα στην επιφάνεια, είναι η ίδια με αυτή που αναφέρθηκε παραπάνω, με τη διαφορά πως μετά το στάδιο της αποκόλλησης των κυττάρων με τη θρυψίνη και πριν προστεθεί νέο θρεπτικό υλικό, για να αναστείλει τη δράση της, αφαιρείται το “παλιό” θρεπτικό υλικό από το falcon , επαναιωρείται το pellet, προστίθεται σ’ αυτό “νέο” θρεπτικό υλικό και στη συνέχεια αναρροφάται όλο το περιεχόμενο και το αποχύνεται στη φλάσκα (ή στο τριβλίο), που περιέχει τα υπόλοιπα κύτταρα.

Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας ονομάζεται διαφορετικά πέρασμα (passage) και μέσω του αριθμού των περασμάτων αντλούνται σημαντικές πληροφορίες για την εκάστοτε κυτταρική σειρά.

3.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ NEUBAUER HEMACYTOMETER ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ TRYPAN BLUE

Ο αριθμός των κυττάρων μπορεί να μετρηθεί σε ένα δείγμα γνωστού όγκου και στη συνέχεια να υπολογιστεί αναλογικά στο αρχικό εναιώρημα, από το οποίο και προήλθε το συγκεκριμένο δείγμα. Αυτή η διαδικασία μπορεί να γίνει με τη βοήθεια ειδικής αντικειμενοφόρου πλάκας, το αιμοκυτταρόμετρο, ή όπως είναι ευρέως γνωστό πλάκα Neubauer (Εικ.17). Η μέθοδος, που ακολουθήθηκε, για τη μέτρηση των κυττάρων με αυτή την πλάκα, βασίστηκε στο πρωτόκολλο της Phelan MC (1998) [270].

Ο σχεδιασμός του αιμοκυτταρόμετρου μπορεί να διαφέρει. Στο εργαστήριο στο οποίο και υλοποιήθηκε η παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η βελτιωμένη Neubauer. Το κεντρικό τμήμα της αντικειμενοφόρου πλάκας είναι η πλατφόρμα καταμέτρησης, η οποία οριοθετείται από ένα αυλάκι 1mm. Η κεντρική πλατφόρμα χωρίζεται σε 2 θαλάμους καταμέτρησης από ένα εγκάρσιο αυλάκι. Κάθε θάλαμος αποτελείται από έναν υποθάλαμο, στον οποίο είναι χαραγμένο ένα πλέγμα 3×3mm. Το πλέγμα αυτό με τη σειρά του διακρίνεται σε 9 δευτερογενή τετράγωνα μεγέθους 1×1mm το καθένα.

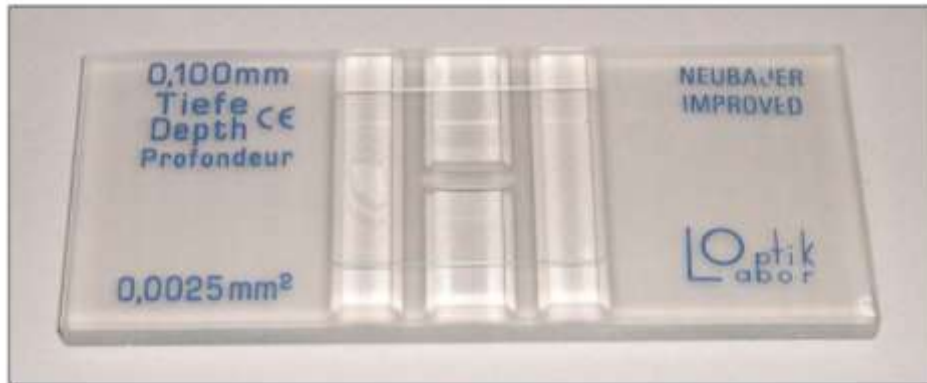
Για τον προσδιορισμό του αριθμού των κυττάρων χρησιμοποιούνται τα 4 γωνιακά τετράγωνα, τα οποία διαχωρίζονται περαιτέρω σε 16 τριτοβάθμια τετράγωνα (Εικ.18), ώστε να βοηθήσουν στην ακριβέστερη μέτρηση του αριθμού των κυττάρων. Στην επάνω πλευρά του αιμοκυτταρομέτρου τοποθετείται μια γυάλινη καλυπτρίδα. Το κυτταρικό εναιώρημα, τέλος, τοποθετείται σε μια καθορισμένη περιοχή, ώστε να μπορεί να γίνει ακριβής μέτρηση των κυττάρων και να υπολογιστεί η πυκνότητα τους.

Η διαδικασία που ακολουθείται για τη μέτρηση του αριθμού των κυττάρων αναλυτικά είναι η εξής:

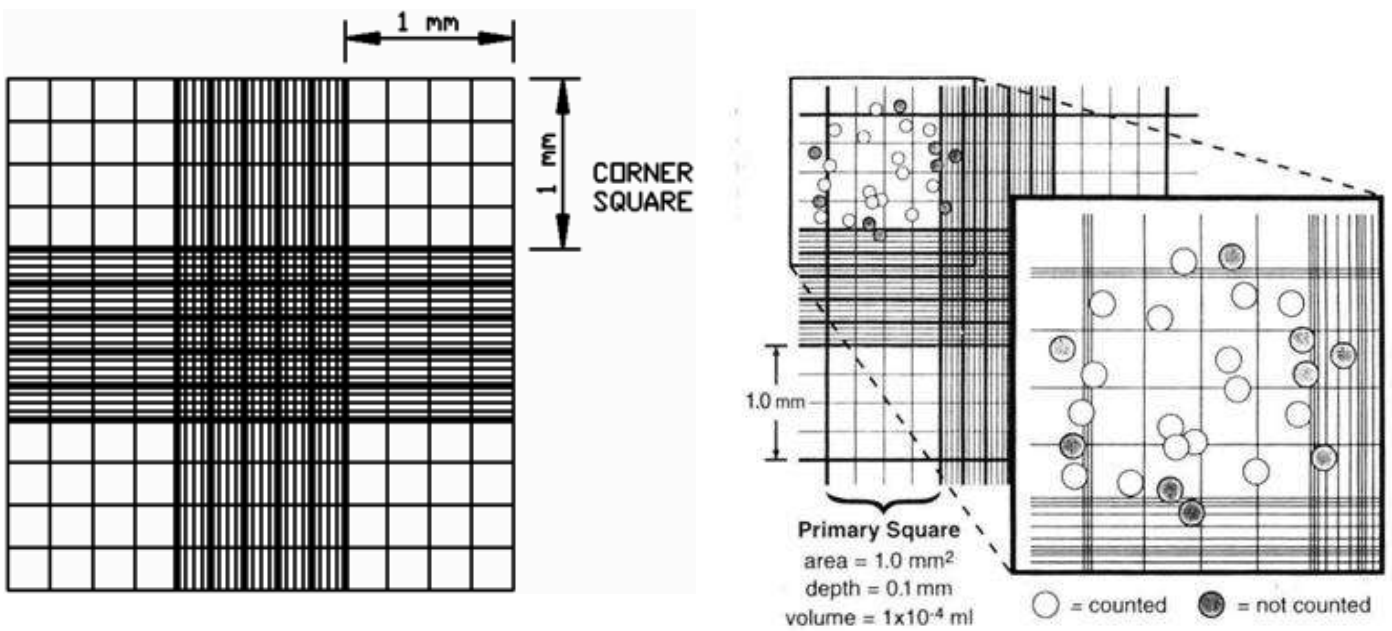
1. Τόσο η επιφάνεια του αιμοκυτταρομέτρου, όσο και η καλυπτρίδα καθαρίζονται προσεκτικά αρχικά με νερό RO και στη συνέχεια με αιθανόλη συγκέντρωσης 70% v/v. Θα πρέπει αμφοτέρω να είναι καθαρά, στεγνά και απαλλαγμένα από τυχόν βρωμιές και δακτυλικά αποτυπώματα. Έπειτα η καλυπτρίδα τοποθετείται στο επάνω μέρος του αιμοκυτταρομέτρου.

2. Ακολουθεί η προετοιμασία του εναιωρήματος των κυττάρων. Πρόκειται για τα στάδια 1-8 του Κεφ. 3.4.
3. Σε ένα erpendorf tube προστίθενται 10μl χρωστικής «κυανό του τρυπανίου» (trypan blue) και 90μl από το εναιώρημα των κυττάρων, τα οποία βρίσκονται σε falcon, πάντα μετά από πολύ καλή ανάδευση, ώστε το δείγμα να είναι αντιπροσωπευτικό. Στη συνέχεια γίνεται προσεκτική ανάδευση της χρωστικής με το δείγμα, ώστε όλο το περιεχόμενο να ομογενοποιηθεί.
4. Το περιεχόμενο του erpendorf tube μεταφέρεται με μία μονοκάναλη πιπέτα στην άκρη του θαλάμου καταμέτρησης του αιμοκυτταρομέτρου, κρατώντας το άκρο της πιπέτας κάτω από την καλυπτρίδα, ώστε να διανεμηθεί όλο το εναιώρημα. Αφήνεται για λίγα δευτερόλεπτα, προκειμένου τα κύτταρα να έλθουν σε ηρεμία.
5. Με τη βοήθεια ενός φορητού μετρητή χειρός αλλά και του μικροσκοπίου γίνεται η καταμέτρηση των κυττάρων σε καθένα από τα 4 τετράγωνα, τα οποία βρίσκονται περιμετρικά του “σταυρού”.
6. Ο αριθμός των κυττάρων και η αναγωγή στο δείγμα, που διαθέτουμε, γίνεται με βάση τους παρακάτω υπολογισμούς:
 - α. $\text{Κύτταρα/ml} = (\text{μέσος αριθμός κυττάρων ανά τετράγωνο}) \times 10^4$
 - β. $\text{Συνολικός αριθμός κυττάρων} = (\text{Κύτταρα/ml}) \times (\text{Συνολικός αρχικός όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος, από το οποίο προήλθε το δείγμα})$

*Ο αριθμός 10^4 αποτελεί συντελεστή διόρθωσης όγκου για το αιμοκυτταρόμετρο, διότι κάθε τετράγωνο έχει μέγεθος $1 \times 1\text{mm}$ και βάθος $0,1\text{mm}$.
7. Εφόσον ολοκληρωθεί η διαδικασία της μέτρησης και γίνουν οι υπολογισμοί, τόσο το αιμοκυτταρόμετρο όσο και η καλυπτρίδα καθαρίζονται και πάλι αρχικά με νερό RO και στη συνέχεια με αιθανόλη συγκέντρωσης 70% v/v, στεγνώνονται προσεκτικά και αποθηκεύονται για μελλοντική χρήση.



Εικόνα 17. Neubauer Hemacytometer [288]



Εικόνα 18. Τα 4 τεταρτημόρια μέτρησης κυττάρων της πλάκας Neubauer και σχηματική απεικόνιση υπολογισμού των κυττάρων [289,290]

3.6 ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η αποθήκευση των κυττάρων κρίνεται απαραίτητη, μετά το πέρας της καλλιέργειας για τα εκάστοτε πειράματα, προκειμένου να επαναχρησιμοποιηθούν μελλοντικά. Για το πάγωμα των κυττάρων χρησιμοποιείται ένας κρυοπροστατευτικός παράγοντας, διότι χωρίς την παρουσία αυτού, η κατάψυξη θα μπορούσε να αποβεί μοιραία έως και θανατηφόρα για τα κύτταρα. Έναν τέτοιο παράγοντα αποτελεί και το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Το DMSO χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με ορό εμβρύου βοοειδούς (FBS) με αναλογία 1:9 αντίστοιχα και αποτελούν μαζί το λεγόμενο freezing medium. Η δράση του DMSO στοχεύει στη μείωση του σημείου πήξεως και βοηθά τα κύτταρα να ψυχθούν με πιο αργό ρυθμό, με αποτέλεσμα τη μείωση της ανάπτυξης παγοκρυστάλλων και τελικά την αποφυγή της καταστροφής των κυττάρων.

Το DMSO, λοιπόν, χρησιμοποιείται σε ποσοστό 10% και σ'αυτό προστίθεται 90% FBS. Τα 2 αυτά συστατικά αναμειγνύονται καλά κι έτσι το θρεπτικό μέσο παγώματος των κυττάρων ή αλλιώς freezing medium αποθηκεύεται στους 4°C, ώστε να παραμένει κρύο πριν από κάθε χρήση. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε βασίστηκε στο πρωτόκολλο της Phelan MC (1998) [270].

Όλη η διαδικασία, και σε αυτό το στάδιο, πραγματοποιείται σε στείρες συνθήκες στο θάλαμο νηματικής ροής. Τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής:

1. Προηγούνται τα βήματα 1-7 του Κεφ. 3.4.
2. Το πλαστικό σωληνάριο (falcon), το οποίο περιέχει το κυτταρικό εναιώρημα, μεταφέρεται στη φυγόκεντρο και φυγοκεντρείται για 10min στις 1200rpm.
3. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και γίνεται επαναιώρηση του pellet.
4. Για κάθε 3×10^6 κύτταρα προστίθεται 1ml freezing medium. Οπότε ανάλογα με το συνολικό αριθμό των κυττάρων, προστίθεται και η ανάλογη ποσότητα freezing medium στο falcon.
5. Το περιεχόμενο μεταφέρεται σε κρυοφιαλίδια (cryovials), μετά από καλή ανάδευση της ποσότητας, που υπάρχει στο falcon.
6. Τέλος, το κρυοφιαλίδιο μεταφέρεται στους -80°C για μέγιστο χρονικό διάστημα 6 μήνες. Στην περίπτωση, που τα κύτταρα πρέπει να αποθηκευτούν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα του προαναφερθέντος, μεταφέρονται σε καταψύκτη, ο οποίος περιέχει υγρό άζωτο (N_2).

3.7 ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Όταν παρουσιάζεται η ανάγκη απόψυξης κυττάρων, τα οποία έχουν καταψυχθεί παλαιότερα, η διαδικασία οφείλει να είναι ταχύτατη, προκειμένου να αποφευχθεί ο όποιος σχηματισμός παγοκρυστάλλων, που μπορεί να οδηγήσει ακόμη και στην κυτταρική λύση. Κατά τη διαδικασία της απόψυξης χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον θρεπτικό υλικό με συγκέντρωση ορού εμβρύου βοοειδούς (FBS) 10% v/v. Η μέθοδος που ακολουθείται και σε αυτή την περίπτωση βασίζεται στο πρωτόκολλο της Phelan MC (1998) [270].

Η διαδικασία αναλυτικά είναι η εξής:

1. Το επιθυμητό κρυοφιαλίδιο μεταφέρεται από τους -80°C ή τον καταψύκτη υγρού αζώτου σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C , όπου και αφήνεται μέχρι να ξεπαγώσει πλήρως το freezing medium ($<1\text{ min}$).
2. Έπειτα το κρυοφιαλίδιο μετακινείται στο θάλαμο νηματικής ροής, αφού πρώτα όμως καθαριστεί με αιθανόλη συγκέντρωσης 70% v/v .
3. Το περιεχόμενο του κρυοφιαλιδίου μεταφέρεται προσεκτικά σε πλαστικό σωληνάριο (falcon), ενώ στη συνέχεια μέσα σ' αυτό τοποθετούνται άλλα 4ml θρεπτικού υλικού με ήπιες κινήσεις, καθώς τα κύτταρα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα μετά το ξεπάγωμα.
4. Το falcon μεταφέρεται στη φυγόκεντρο, όπου και φυγοκεντρείται για 10min στις 1200rpm.
5. Στη συνέχεια, οδηγείται και πάλι στο θάλαμο νηματικής ροής, όπου και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Γίνεται επαναιώρηση του pellet και προστίθενται 5ml θρεπτικό υλικό, αν πρόκειται να μεταφερθεί σε φλάσκα 25cm^2 , 10ml σε φλάσκα 75cm^2 ή τριβλίο 60mm και 15ml σε τριβλίο 100mm.
6. Μεταφέρεται όλο το περιεχόμενο του falcon στη φλάσκα (ή το τριβλίο), στην εξωτερική πλευρά της οποίας και αναγράφονται τα απαραίτητα στοιχεία.
7. Γίνεται έλεγχος-παρατήρηση της κυτταροκαλλιέργειας στο μικροσκόπιο μετά το πέρας των 24h, για να διασφαλιστεί ότι τα κύτταρα έχουν προσκολληθεί στο κάτω μέρος της φλάσκας (ή του τριβλίου) και ανανεώνεται το θρεπτικό υλικό, ώστε να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα από το υπερκείμενο.

Τα κύτταρα συνήθως αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό με 10% ή 20% v/v FBS, μέχρι να σταθεροποιηθεί η κατάσταση τους και στη συνέχεια η συγκέντρωση γίνεται 5% v/v.

3.8 ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΟΓΚΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΓΚΩΝ

Η λύση των κυττάρων γίνεται, προκειμένου να απομονωθούν οι πρωτεΐνες και να μελετηθεί η έκφραση τους. Πρόκειται για μια διαδικασία καθ' όλη τη διάρκεια της οποίας απαιτείται χαμηλή θερμοκρασία, οπότε και πραγματοποιείται σε πάγο. Τα βήματα που ακολουθούνται αναλυτικά είναι τα εξής:

1. Προηγούνται τα βήματα 1-7 του Κεφ. 3.4.
2. Από αυτό το στάδιο και έπειτα, όλο το περιεχόμενο της φλάσκας (ή του τριβλίου) μεταφέρεται σε πλαστικό σωληνάριο (falcon) των 15ml και έπειτα στη φυγόκεντρο, όπου και φυγοκεντρείται για 10min στις 1200rpm.
3. Έπειτα αφαιρείται το υπερκείμενο και επαναιωρείται το pellet, στο οποίο και προστίθενται 5ml διαλύματος PBS συγκέντρωσης 1% v/v και ξαναφυγοκεντρείται για 5min στις 1200rpm.
4. Και πάλι αφαιρείται το υπερκείμενο, επαναιωρείται το pellet και σ' αυτό προστίθεται διάλυμα PBS, φυγοκεντρείται, επαναιωρείται το pellet κ.ο.κ. Το συγκεκριμένο βήμα επαναλαμβάνεται 3φορές, προκειμένου το διάλυμα PBS να "καθαρίσει" τα κύτταρα από οποιοδήποτε υπόλειμμα θρεπτικού υλικού.
5. Το πλαστικό σωληνάριο (falcon), που περιέχει το κυτταρικό δείγμα, αφήνεται για 10min γυρισμένο ανάποδα και χωρίς το καπάκι του, προκειμένου να "στεγνώσει" και να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του υγρού, που τυχόν έχει μείνει στα τοιχώματα.
6. Στη συνέχεια, παρασκευάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα της λύσης (lysis buffer) συγκέντρωσης 1% v/v, το οποίο περιέχει:
 - I. RIPA Buffer 10% v/v
 - II. H₂O
 - III. Phosphatase Inhibitor

7. Αφού γίνει επαναιώρηση του ιζήματος στο σωληνάριο, προστίθεται ανάλογη ποσότητα lysis buffer και όλο το περιεχόμενο μεταφέρεται σε eppendorf tube. Γενικά, ισχύει ότι για κάθε 10^6 κύτταρα, προστίθενται 60μl lysis buffer.
8. Το lysis buffer αφήνεται να δράσει για το διάστημα των 30min μέσα στον πάγο, ενώ κάθε 5min γίνεται πολύ καλή ανάδευση με αναδευτήρα vortex.
9. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20min στις 1200rpm στους 4°C .
10. Αμέσως μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο eppendorf tube και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για ακόμη 2 φορές, προκειμένου το εναιώρημα να φτάσει στο σημείο να είναι απόλυτα διαυγές. Στην περίπτωση που δε διαυγάζει εύκολα μέσω των φυγοκεντρήσεων, η διαδικασία υποβοηθάται με 3 κύκλους sonication των 10sec.
11. Μόλις το εναιώρημα είναι απολύτως διαυγές και καθαρό, πράγμα που υποδηλώνει πως είναι απαλλαγμένο από το “σύννεφο” του DNA, σημαίνει ότι περιέχει αποκλειστικά πρωτεΐνες, οπότε και αποθηκεύεται στους -80°C έτοιμο για χρήση.

Η ίδια ακριβώς διαδικασία με αυτή των κυττάρων ακολουθείται και στην περίπτωση της λύσης των όγκων, με τη διαφορά πως παραλείπονται τα βήματα 1-5.

1. Τα δείγματα των όγκων μεταφέρονται από τους -80°C σε πάγο.
2. Ζυγίζονται με τη βοήθεια κάποιας βάσης σε ζυγό ακριβείας.
3. Έπειτα με ένα νυστεράκι τεμαχίζονται προσεκτικά μέσα στον πάγο, μέχρι να ομογενοποιηθούν και μεταφέρονται σε eppendorf tube.
4. Προστίθεται το lysis buffer και η διαδικασία συνεχίζεται, όπως και παραπάνω.

Γενικότερα, η διαδικασία της λύσης είτε πρόκειται για κύτταρα, είτε για όγκους, οφείλει να γίνεται μέσα στον πάγο.

3.9 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ (BRADFORD ANALYSIS)

Με τη μέθοδο Bradford προσδιορίζεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών σ' ένα διάλυμα μέσω ενός μετρητή οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων σε μήκος κύματος 515nm. Αποτελεί μία από τις πιο σύντομες και αξιόπιστες μεθόδους.

Για τον ακριβή υπολογισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με βάση την οπτική απορρόφηση, κατασκευάζεται μία πρότυπη καμπύλη με γνωστές συγκεντρώσεις αλβουμίνης βόειου ορού (Bovine Serum Albumin, BSA). Η αλβουμίνη οφείλει να διαλύεται στο ίδιο διάλυμα με αυτό που θα χρησιμοποιηθεί και για τις πρωτεΐνες, των οποίων θα υπολογιστεί η συγκέντρωση.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, που πραγματοποιείται στο εργαστήριο, ακολουθεί το πρωτόκολλο της Thermofisher Pierce™ BCA Protein Assay Kit [271].

Τα βήματα που ακολουθούνται αναλυτικά αναφέρονται παρακάτω:

1. Σε μια στήλη ενός 96 well plate κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη δειγμάτων αλβουμίνης βοοειδούς (BSA) γνωστής συγκέντρωσης με τιμές 2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.50, 0.25 και 0.125mg/ml.
2. Σε μια 2^η στήλη του ίδιου plate πραγματοποιείται η προετοιμασία των δειγμάτων. Παρασκευάζεται το BCA Working Reagent (Reagent A:B=50:1) και προστίθεται η ίδια ποσότητα σε κάθε μικροκυψελίδα των δειγμάτων αλβουμίνης βοοειδούς, αλλά και των προς προσδιορισμό δειγμάτων. Γίνονται 2 αραιώσεις στα δείγματα: 1:5 και μία βοηθητική 1:10.
3. Το 96 well plate στη συνέχεια τοποθετείται στον κλίβανο για 30min.
4. Αμέσως μετά αφήνεται στη μπαλαρίνα σε θερμοκρασία δωματίου για 10min.
5. Γίνεται φωτομέτρηση στα 515nm και υπολογίζεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών, σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη.

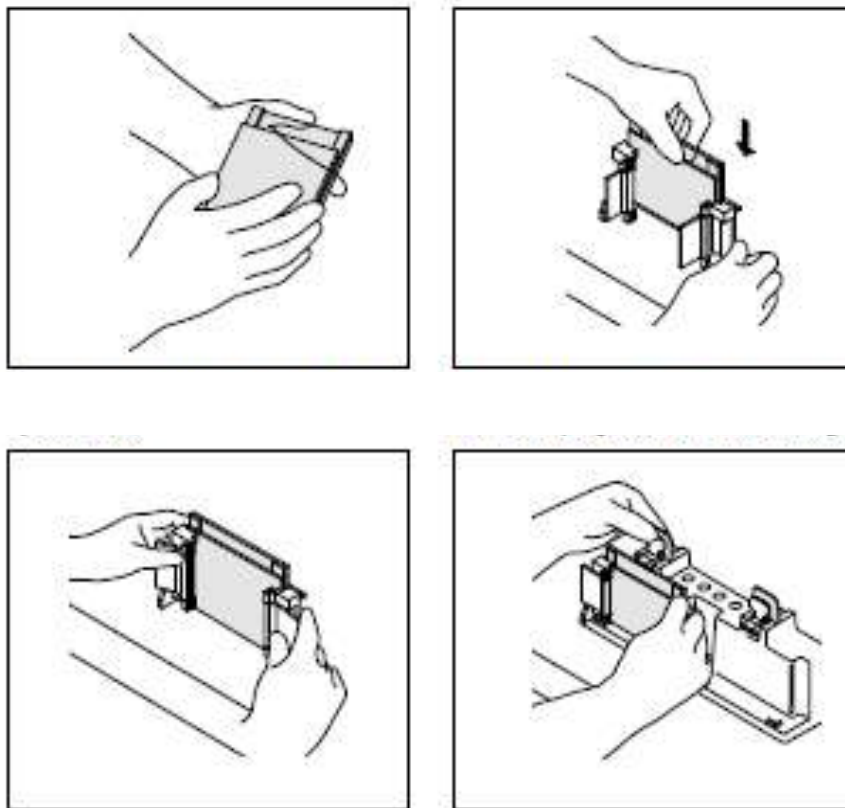
3.10 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ WESTERN BLOT ANALYSIS

Η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών με το σύστημα Tris-Γλυκίνη-SDS περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1970 από τον Laemmli [272].

Μια μέθοδος για την ανίχνευση πρωτεϊνών στο κύτταρο ή σε ένα κυτταρικό υγρό είναι η ανοσοαποτύπωση ή αποτύπωση Ουέστερν (Western blotting). Συνοπτικά, σε αυτή τη τεχνική το διάλυμα ηλεκτροφορείται σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου και για να αντιδράσει πιο εύκολα με το αντίσωμα μεταφέρεται σε μια άλλη επιφάνεια. Έπειτα, ένα 2^ο ιχνηθετημένο αντίσωμα συνδέεται με το 1^ο και βοηθά στον εντοπισμό του. Για την παρατήρηση πρωτεϊνών μέσα στα κύτταρα χρησιμοποιείται ο ανοσοφθορισμός. Φθορίζοντα αντισώματα προσδένονται στη πρωτεΐνη-στόχο και στη συνέχεια ένα μικροσκόπιο φθορισμού αποκαλύπτει τη θέση τους (άρα και τη θέση της πρωτεΐνης) μέσα στο κύτταρο.

Η διαδικασία, που ακολουθείται στο συγκεκριμένο εργαστήριο, και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών βασίζονται στα πρωτόκολλα της Biorad (Εγχειρίδιο οδηγιών Mini-PROTEAN® 3 Cell [273] και Mini Trans-Blot®Electrophoretic Transfer Cell [274]). Τα βήματα που ακολουθούνται αναλυτικά είναι τα εξής:

1. Συναρμολογείται η συσκευή παρασκευής πηκτωμάτων (Εικ.19), προστίθεται ποσότητα H₂O με τη βοήθεια ενός fintip ανάμεσα στα τζαμάκια, η οποία και παραμένει τουλάχιστον για 15min, προκειμένου να εξασφαλίσει ότι δεν θα υπάρξει απώλεια κατά την προσθήκη των πηκτωμάτων μετέπειτα. Στη συνέχεια το H₂O αφαιρείται με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού.



Εικόνα 19. Συναρμολόγηση συσκευής για την παρασκευή πηκτωμάτων [291]

2. Παρασκευάζονται τα πηκτώματα διαχωρισμού των πρωτεϊνών. Κάθε πήκτωμα αποτελείται από 2 επιμέρους πηκτώματα, εκ των οποίων η κατώτερη στιβάδα καλείται πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel) και το πήκτωμα, που τοποθετείται άνωθεν, πήκτωμα επισωρεύσεως (stacking gel). Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά το resolving gel, η συγκέντρωση της ακρυλαμίδης ποικίλλει ανάλογα με το μοριακό βάρος της υπό εξέταση πρωτεΐνης, ενώ για το stacking gel είναι σταθερή και ίση με 5% v/v. Για το resolving gel ισχύει ότι η συγκέντρωση της ακρυλαμίδης αυξάνει, όσο μειώνεται το μοριακό βάρος της εκάστοτε πρωτεΐνης. Για τα πειράματα της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, για τις ανάγκες της Caveolin-1 αλλά και της Phospho-caveolin-1 (Tyr14), που εντοπίζονται στα 21-24 kDa, η συγκέντρωση ακρυλαμίδης του resolving gel ήταν 12% v/v. Τα πηκτώματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα, που ακολουθεί.

Σημείωση: Τα αντιδραστήρια APS και TEMED προστίθενται τελευταία, αφού επιβεβαιώσουμε ότι δεν υπάρχει κάποια απώλεια μεταξύ των τζαμιών, και μάλιστα ταυτόχρονα και τη στιγμή, που επιθυμούμε να χρησιμοποιήσουμε τα πηκτώματα, καθώς αποτελούν τα συστατικά έναρξης πολυμερισμού, που βασικά χρησιμοποιούνται στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

3. Αρχικά παρασκευάζεται το resolving gel, προστίθεται μέχρι την ενδεδειγμένη ένδειξη και στη συνέχεια τοποθετείται προσεκτικά και με ήπιες κινήσεις με τη βοήθεια ενός finitip ποσότητα H₂O, τόση ώστε να καλύψει όλη την επιφάνεια του τζαμιού. Με αυτό τον τρόπο σταθεροποιείται το πήκτωμα. Αφήνεται 30-40min, μέχρις ότου πήξει καλά. Έπειτα το H₂O αφαιρείται με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού.
4. Στη συνέχεια προστίθεται το stacking gel και τοποθετούνται τα ειδικά χτενάκια, τα οποία και θα δημιουργήσουν τις θέσεις για την προσθήκη των δειγμάτων (πηγαδάκια). Και σε αυτή την περίπτωση το πήκτωμα αφήνεται 30-40min, για να πήξει.

Αντιδραστήρια	Stacking gel 5%	Resolving gel 12%
DDI H ₂ O (ml)	5.7	3.4
30% Degassed Acrylamide/Bis (ml)	1.7	4.0
1.5M TrisCl pH=8.8 (ml)	-	2.5
0.5M TrisCl pH=6.8 (ml)	2.5	-
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 10% w/v (ml)	0.1	0.1
APS 10% w/v (μl)	50	50
TEMED (μl)	10	5

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια και οι αντίστοιχες ποσότητές τους για την παρασκευή πηκτωμάτων

5. Όσο το πήκτωμα αφήνεται για να πήξει, παράλληλα πραγματοποιείται η προετοιμασία των δειγμάτων, τα οποία μετά τη λύση φυλάσσονται στους -80°C . Καθ' όλη τη διάρκεια της προετοιμασίας, τα δείγματα βρίσκονται στον πάγο. Σε eppendorf tubes τοποθετείται η επιθυμητή ποσότητα δείγματος, η οποία έχει προκύψει μέσω της Bradford Analysis και της πρότυπης καμπύλης, που κατασκευάστηκε. Έπειτα, προστίθεται η ανάλογη ποσότητα διαλύματος PBS συγκέντρωσης 1% v/v, με δεδομένο πως τα πηγαδάκια που διαθέτει το εργαστήριο έχουν μέγιστη χωρητικότητα 25μg πρωτεΐνης, καθώς και το ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (Loading Buffer) σε ποσότητα ίση με το 1:3 του συνολικού όγκου του δείγματος. Το Loading Buffer προστίθεται διότι καθένα από τα συστατικά του παίζουν κρίσιμο ρόλο στην υπό εξέταση πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, η β-μερκαπτοαιθανόλη συντελεί στη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών και το SDS είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό, που καταστρέφει τις μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις φυσικών πρωτεϊνών, τις φορτίζει αρνητικά και τις αποδιατάσσει με θέρμανση. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες, σε αναλογία ενός μορίου SDS ανα 2 αμινοξέα, που δίνει στο σύμπλοκο του SDS με την αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη ένα μεγάλο φορτίο, περίπου ανάλογο της μάζας της. Το μπλε της βρομοφαινόλης συμβάλλει στην παρακολούθηση της ηλεκτροφόρησης, ενώ το TrisCl 0.5M αποτελεί οργανική ουσία, η οποία προσδίδει το κατάλληλο pH (6.8) για τη διατήρηση των πρωτεϊνών καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Τέλος, η γλυκερίνη είναι ένα παχύρευστο υγρό, το οποίο βοηθά το δείγμα να βυθιστεί στον πυθμένα της οπής της πηκτής, ώστε τελικά να σχηματιστούν οι “μπάντες”.

Σημείωση: Πάντα πριν προστεθεί οποιαδήποτε ποσότητα δείγματος, γίνεται καλή ανάδευση με συσκευή vortex 2-3 φορές.

- Για την παρασκευή του Loading Buffer απαιτούνται τα εξής αντιδραστήρια:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (μl)
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 20%	100
0.5M TrisCl pH=6.8	100
Γλυκερίνη (Glycerin)	400
Μπλε της Βρομοφαινόλης (Bromophenol Blue) 0.5% (w/v)	100
β-Μερκαπτοαιθανόλη (β-Mercaptoethanol)	100

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια για την παρασκευή του Loading Buffer

Σημείωση: Προστίθενται όλα τα συστατικά, πλην της β-Μερκαπτοαιθανόλης, η οποία και προστίθεται τελευταία και μάλιστα μέσα στον απαγωγό, καθώς είναι καρκινογόνος και ιδιαίτερα τοξική.

- Εφόσον, λοιπόν, τα δείγματα στα eppendorf tubes είναι έτοιμα, με τη βοήθεια σύριγγας ανοίγεται μια τρύπα στο καπάκι (για να μη σκάσουν) και τοποθετούνται σε θερμαντική εστία, η οποία διαθέτει δοχείο με H₂O, που βράζει στους 95°C για το χρονικό διάστημα των 5min, ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών.
- Μετά το πέρας των 5min, τα δείγματα αποσπώνται από το H₂O και υποβάλλονται σε spin λίγων δευτερολέπτων. Είναι πλέον έτοιμα, για να φορτωθούν.
- Γίνεται έλεγχος του πηκτώματος και εφόσον έχει πήξει, απομακρύνονται τα ειδικά χτενάκια και η συσκευή παρασκευής πηκτώματος μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία και συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης συγκέντρωσης 1% v/v (Running Buffer) και μάλιστα γίνεται προσπάθεια, ώστε να μην απομείνει καμία φουσκάλα μέσα στη συσκευή, αφού επηρεάζει την ηλεκτροφόρηση.

- Για την παρασκευή του Running Buffer χρειάστηκαν τα εξής:

Αντιδραστήρια	Running Buffer 10% (pH=8,3)
Tris base (g)	30.3
Γλυκίνη (Glycine) (g)	144
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (g)	10
ddH ₂ O (ml)	up to 1000

Πίνακας 6. Αντιδραστήρια για την παρασκευή του Running Buffer

Από το παραπάνω διάλυμα, προκειμένου να παρασκευαστεί το Running Buffer 1% v/v, προσθέτουμε σε ογκομετρικό κύλινδρο 900ml ddH₂O και 100ml Running Buffer 10%.

9. Στα πηγαδάκια του stacking gel, στην 1^η και στην τελευταία θέση επιστιβάζεται ο μάρτυρας (marker), ο οποίος είναι μίγμα έγχρωμων πρότυπων μοριακών μεγεθών (BlueStar Prestained Protein Marker Plus), ώστε να προσδιορίζεται εύκολα το Μοριακό Βάρος των προς ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, φορτώνεται στα ενδιάμεσα πηγαδάκια, που υπολείπονται, η επιθυμητή ποσότητα δείγματος.
10. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται κάθετα (τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης ηλεκτροφορούνται κάθετα σε σταθερό ηλεκτρικό πεδίο) σε ηλεκτροφορητική συσκευή της BIORAD υπό τάση 100V για 20min περίπου (μέχρι τα δείγματα να περάσουν από το stacking gel στο resolving) και στη συνέχεια υπό τάση 200V για 40min περίπου. Το αποτέλεσμα είναι η μετακίνηση των δειγμάτων από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο, καθώς το αρνητικό φορτίο, που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS, είναι συνήθως πολύ μεγαλύτερο απ' ό

το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης, επομένως αυτό το αρχικό φορτίο καθίσταται αμελητέο. Το SDS, που υπάρχει στην πηκτή, μεταδίδει στις πρωτεΐνες καθαρό θετικό φορτίο κι έτσι κατευθύνονται από το επάνω μέρος της συσκευής προς τον αρνητικά φορτισμένο κάτω πόλο. Η μετακίνηση γίνεται σε λεπτή κατακόρυφη στιβάδα και με αυτόν τον τρόπο ηλεκτροφόρησης η μετακίνηση των περισσότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων κάτω από αυτές τις συνθήκες είναι απολύτως ανάλογη με το λογάριθμο της μάζας τους. Συνεπώς, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται μόνο βάση του μοριακού τους βάρους

11. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης τα πηκτώματα αποσπώνται από τη συσκευή. Το stacking gel αποκόπτεται και απομακρύνεται, ενώ το resolving χρησιμοποιείται για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF. Η μεμβράνη PVDF είναι υδρόφοβη, επομένως για να καταστεί υδρόφιλη, εμβαπτίζεται σε μεθανόλη για 1 min και στη συνέχεια σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς συγκέντρωσης 1% v/v (Transfer Buffer) πάντα υπό ανάδευση στη μπαλαρίνα.
- Για την παρασκευή του Transfer Buffer χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

Αντιδραστήρια	Transfer Buffer 10%
Trizma (g)	30.3
Γλυκίνη (Glycine) (g)	144
ddH ₂ O (ml)	up to 1000

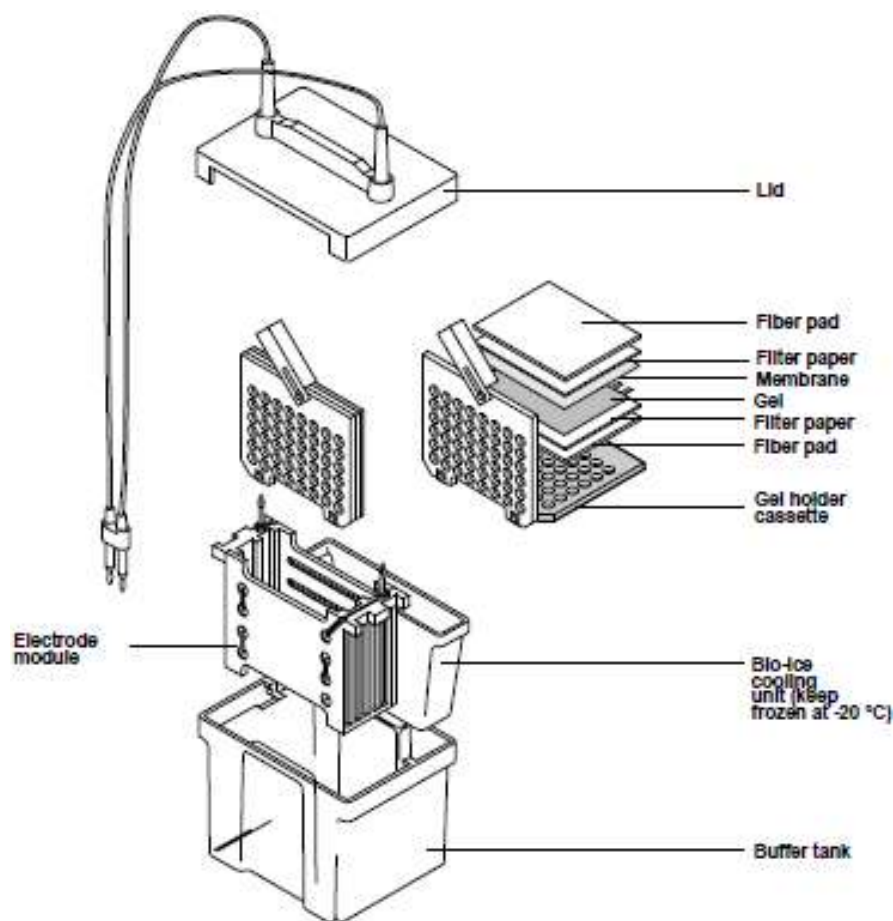
Πίνακας 7. Αντιδραστήρια για την παρασκευή του Transfer Buffer

Από το παραπάνω διάλυμα, προκειμένου να παρασκευαστεί το Transfer Buffer 1% v/v, προσθέτουμε σε ογκομετρικό κύλινδρο 700ml ddH₂O, 200ml Μεθανόλη (Methanol) και 100ml Transfer Buffer 10%v/v.

12. Σε Transfer Buffer εμβαπτίζονται όλα όσα θα χρειαστούν για τη δημιουργία του “σάντουιτς μεταφοράς”. Από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο τοποθετούνται 2 εμβαπτισμένα σφουγγάρια το ένα να εφάπτεται στο άλλο, επάνω από αυτά ένα εμβαπτισμένο διηθητικό χαρτί Whatman, με το οποίο έχει γίνει η μεταφορά του πηκτώματος, η μεμβράνη PVDF, έπειτα ένα στεγνό διηθητικό χαρτί και τέλος ένα εμβαπτισμένο σφουγγάρι. Μετά την

τοποθέτηση της μεμβράνης, γίνεται καλό και προσεκτικό ρολλάρισμα, μέχρι να ολοκληρωθεί το σάντουιτς. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην μόνιμη εμφύση των σφουγγαριών, της μεμβράνης και του διηθητικού χαρτιού σε Transfer Buffer κατά τη διαδικασία δημιουργίας του “σάντουιτς μεταφοράς”. Κλείνεται στη συνέχεια το σάντουιτς και τοποθετείται μαζί με μια παγοκύστη, για να κρατά σταθερή τη θερμοκρασία, και ένα μαγνήτη, ο οποίος συντελεί στη διατήρηση της χαμηλής θερμοκρασίας στο σύστημα, στη συσκευή μεταφοράς Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIORAD), στην οποία και περιέχεται Transfer Buffer (Εικ.20).

Σημείωση: Τόσο το Transfer Buffer, όσο και τα εμφύσητα σε Transfer Buffer σφουγγαράκια να χρησιμοποιούνται παγωμένα από τους 4°C τη στιγμή παρασκευής του “σάντουιτς”.



Εικόνα 20. Συναρμολόγηση συσκευής για τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη PVDF [292]

13. Η μεταφορά των πρωτεϊνών σε PVDF μεμβράνη γίνεται με την εφαρμογή ομογενούς ηλεκτρικού πεδίου (ηλεκτρομεταφορά) ρεύματος 100V για περίπου 1h σε συνθήκες ελεγχόμενης θερμοκρασίας και υπό συνεχή ανάδευση, μέχρις ότου τα mA αυξηθούν κατά 100 μονάδες. Μετά το πέρας της 1h, αφαιρείται το σάντουιτς από τη συσκευή μεταφοράς και αποσυναρμολογείται, όπως συναρμολογήθηκε. Αφαιρείται από το σάντουιτς η μεμβράνη και γίνεται προσωρινή χρώση με χρωστική Ponceau S (διάλυμα 0,1% w/v Ponceau S σε 5% v/v Οξικό Οξύ (Acetic Acid)) για 1min, προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι “μπάντες” και αμέσως μετά ξεπλένεται 2-3 φορές με απεσταγμένο H₂O (το H₂O να μην πέφτει απευθείας πάνω στη μεμβράνη, καθώς είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη).
14. Η μεμβράνη κόβεται στα επιθυμητά τμήματα, ανάλογα με το Μοριακό Βάρος των υπό εξέταση πρωτεϊνών.
15. Ακολουθεί το blocking των μη εξειδικευμένων θέσεων των πρωτεϊνών της μεμβράνης με επώαση σε διάλυμα TBS-T, που περιέχει 5% FBS, για 1h σε θερμοκρασία δωματίου, υπο συνεχή ανάδευση στη μπαλαρίνα.

Για την παρασκευή του διαλύματος TBS-T 1% χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

Αντιδραστήρια	TBS-T 1%
1M TrisCl (pH=7,4) (ml)	50
NaCl 0.9% w/v	450
Tween 20 (μl)	500

Πίνακας 8. Αντιδραστήρια για την παρασκευή του διαλύματος TBS-T 1% v/v

- Για την παρασκευή του TrisCl 1M ζυγίστηκαν 121g Tris base, τα οποία διαλύθηκαν σε dH₂O μέχρι τελικού όγκου 1L.
- Για την παρασκευή του διαλύματος NaCl 0.9% w/v ζυγίστηκαν 9g NaCl, τα οποία διαλύθηκαν σε dH₂O μέχρι τελικού όγκου 1L.

Για την παρασκευή του διαλύματος TBS-T 5% v/v, προστέθηκαν σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο οι παραπάνω ποσότητες, που αναγράφονται στον πίνακα, και σε αυτές διαλύθηκαν 25ml FBS συγκέντρωσης 10% v/v.

16. Μετά το πέρας της 1h απομακρύνεται το διάλυμα TBS-T 5% v/v και γίνονται 3 εκπλύσεις των 5min με διάλυμα TBS-T 1% v/v υπό συνεχή και έντονη ανάδευση στη μπαλαρίνα και σε θερμοκρασία δωματίου.
17. Ακολουθεί επώαση με TBS-T 5% v/v, στο οποίο περιέχεται το πρωτογενές αντίσωμα σε κατάλληλη αραίωση. Το πρωτογενές αντίσωμα αναγνωρίζει τη θέση του στόχου του και προσδέεται, αναγνωρίζει δηλαδή την πρωτεΐνη σαν αντιγόνο και δεσμεύεται σε αυτή. Η επώαση πραγματοποιείται όλη τη νύχτα (overnight) υπό συνεχή και ήπια ανάδευση στους 4°C.
18. Την επόμενη ημέρα απομακρύνεται το διάλυμα, που περιέχει το πρωτογενές αντίσωμα, και γίνονται 3 εκπλύσεις των 5min με διάλυμα TBS-T 1% v/v υπό συνεχή και έντονη ανάδευση στη μπαλαρίνα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πρωτογενή αντισώματα αποθηκεύονται στους -80°C και ξαναχρησιμοποιούνται.
19. Ακολουθεί επώαση με διάλυμα TBS-T 5% v/v, στο οποίο αυτή τη φορά περιέχεται το δευτερογενές αντίσωμα στην επιθυμητή αραίωση. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με υπεροξειδάση και αναγνωρίζει το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος, ειδικό για το 1^ο αντίσωμα. Η επώαση πραγματοποιείται για 1h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια και συνεχή ανάδευση στη μπαλαρίνα.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι τα εξής:

Πρωτεΐνη	1^ο Αντίσωμα	2^ο Αντίσωμα
GAPDH	GAPDH Antibody 1:5000	Goat Anti-Mouse IgG, HRP, 1:6000
Caveolin-1	Caveolin-1 Antibody 1:1000	Anti-Rabbit IgG 1:6000
Phospho-Caveolin-1 (Tyr14)	Phospho-Caveolin-1 (Tyr14) Antibody 1:1000	Anti-Rabbit IgG 1:6000

Πίνακας 10. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και οι αντίστοιχες αραιώσεις τους

20. Αφαιρείται το διάλυμα με το δευτερογενές αντίσωμα και γίνονται 3 εκπλύσεις των 5min με διάλυμα TBS-T 1% v/v υπό συνεχή και ήπια ανάδευση στη μπαλαρίνα σε θερμοκρασία δωματίου.

Σημείωση: Οι εκπλύσεις στην περίπτωση των αντισωμάτων Caveolin-1 και Phospho-Caveolin-1 (Tyr14) (23kDa) καλό είναι να γίνονται για 10min.

21. Η ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη εμφανίζεται με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωτάυγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL). Η μεμβράνη επωάζεται με το υπόστρωμα χημειοφωτάυγειας για 1min σε θερμοκρασία δωματίου και το αποτέλεσμα γίνεται ορατό με τη βοήθεια του μηχανήματος Uvitec Cambridge και του λογισμικού Uvitec Alliance 4.7 [275].

Σημείωση: Το διάλυμα TBS-T 5% v/v να παρασκευάζεται πάντα πριν από τη στιγμή της χρήσης του.

3.11 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η ποσοτικοποίηση των ανοσοαποτυπωμένων πρωτεϊνών γίνεται, όπου κρίνεται απαραίτητο, με τη χρήση του λογισμικού UVIssoft-UVIBAND [275] και του iMAGEj 1.50i. Όλες οι ανοσοαποτυπωμένες πρωτεΐνες βαθμονομούνται σύμφωνα με την πρωτεΐνη GAPDH (38kDa).

3.12 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΗΝ PVDF MEMBRANE (STRIPPING)

Η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιείται, όταν απαιτείται η αποδέσμευση της μεμβράνης PVDF από ένα αντίσωμα, προκειμένου να γίνει επώαση με νέο, στην περίπτωση, που για τα 2 αντισώματα χρησιμοποιείται το ίδιο δευτερογενές αντίσωμα. Η διαδικασία, που ακολουθείται, βασίστηκε σε πρωτόκολλο της Abcam [276] και αναφέρεται παρακάτω:

1. Γίνεται προετοιμασία του Stripping Buffer (mild stripping) με τα ακόλουθα χημικά αντιδραστήρια:
 - I. 15g Γλυκίνη (Glycine)
 - II. 1g Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)
 - III. 10ml Tween 20

Τα παραπάνω συμπληρώνονται με 800ml dH₂O, προσαρμόζεται το pH στην τιμή 2.2 και στη συνέχεια ο τελικός όγκος προσαρμόζεται στο 1L.

2. Σε ειδική θήκη τοποθετείται η μεμβράνη, στην οποία θα γίνει το Stripping, και προστίθεται τόσος όγκος Buffer, όσος να καλύπτει ολόκληρη τη μεμβράνη και επώάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10min.
3. Αφαιρείται το Buffer.
4. Επαναλαμβάνεται η επώαση για 5-10min με νέο Stripping Buffer.
5. Αφαιρείται το Buffer.
6. Γίνεται έκπλυση για 10min με διάλυμα PBS συγκέντρωσης 1% v/v.
7. Γίνεται έκπλυση για 10min με διάλυμα PBS συγκέντρωσης 1% v/v.
8. Γίνεται έκπλυση για 5min με διάλυμα TBS-T συγκέντρωσης 1% v/v.
9. Γίνεται έκπλυση για 5min με διάλυμα TBS-T συγκέντρωσης 1% v/v .

Η μεμβράνη είναι έτοιμη για blocking.

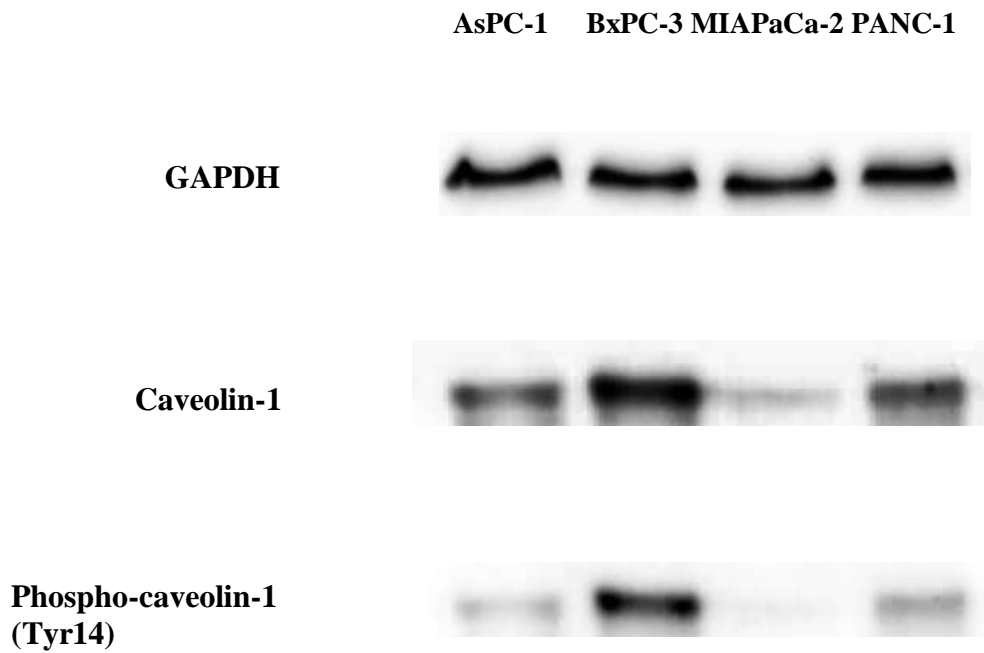
- ✓ Οπότε στη συνέχεια γίνεται επώαση με διάλυμα TBS-T 5% v/v σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή και ήπια ανάδευση για 1h στη μπαλαρίνα.
- ✓ Αφαιρείται το διάλυμα TBS-T 5% v/v και προστίθεται το αντίσωμα, με το οποίο θα γίνει η επώαση. Αφήνεται όλη τη νύχτα (overnight) στους 4°C υπό συνεχή και ήπια ανάδευση στη μπαλαρίνα.
- ✓ Ακολουθούν τα βήματα 18-21, που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο του Κεφ. 3.10.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ CAVEOLIN-1 ΜΕ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ

Στα αποτελέσματα, που προκύπτουν από τη Western Blot, και φαίνονται παρακάτω (Εικ.21), μεγαλύτερη έκφραση Caveolin-1 φαίνεται να έχουν τα BxPC-3, ακολουθούν τα PANC-1 και τα AsPC-1. Τα ΜΙΑ PaCa-2 έχουν τη μικρότερη έκφραση. Πιο συγκεκριμένα τα BxPC-3 έχουν 7 φορές μεγαλύτερη έκφραση από τα ΜΙΑ PaCa-2 και 2 φορές από τα PANC-1. Τα PANC-1, από την άλλη, έχουν 3 φορές μεγαλύτερη έκφραση από τα ΜΙΑ PaCa-2. Τέλος, τα AsPC-1 έχουν 3,5 φορές μικρότερη έκφραση από τα BxPC-3, 1,5 φορές από τα PANC-1, αλλά 2 φορές μεγαλύτερη από τα ΜΙΑ PaCa-2 (Γραφ.1).

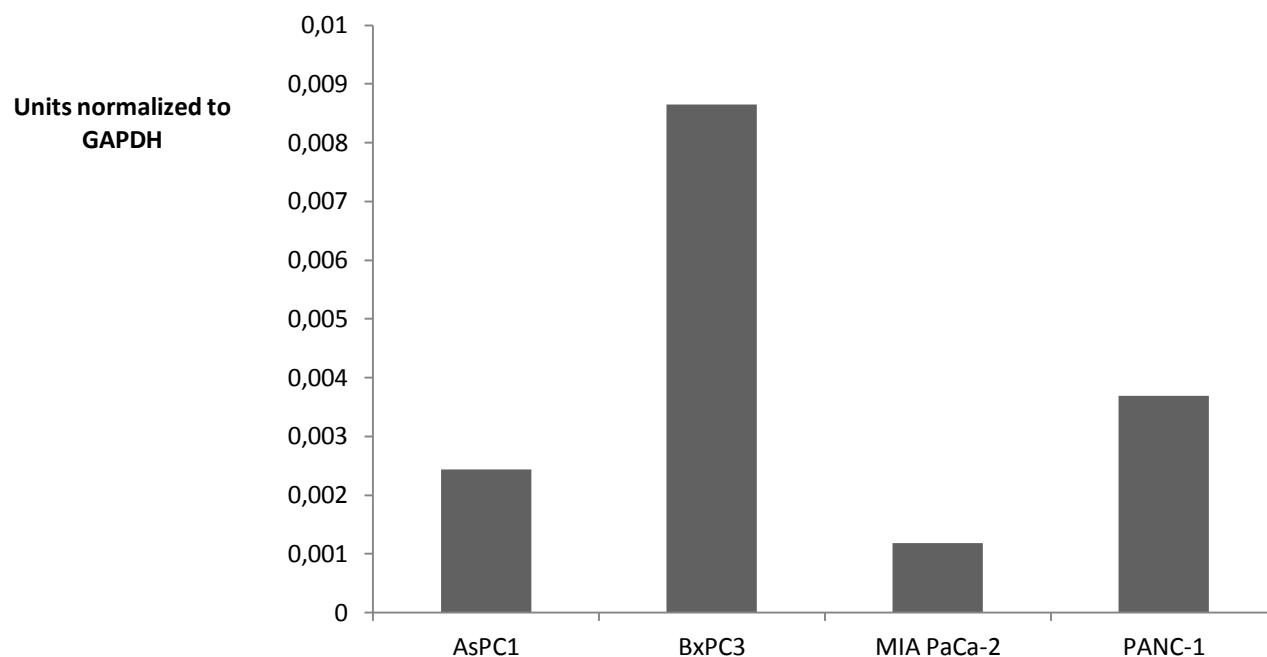
Όσον αφορά τα αποτελέσματα για τη Phospho-caveolin-1 και πάλι πρώτα έρχονται τα BxPC-3 και 2^α ακολουθούν τα PANC-1. Σε αυτή την περίπτωση, 3^α είναι τα ΜΙΑ PaCa-2 και τελευταία τα AsPC-1. Πιο συγκεκριμένα, τα BxPC-3 παρουσιάζουν 2,4 φορές μεγαλύτερη έκφραση από τα PANC-1 και 4,3 φορές από τα ΜΙΑ PaCa-2. Από την άλλη, τα PANC-1 έχουν 1,8 φορές μεγαλύτερη έκφραση από τα ΜΙΑ PaCa-2. Τέλος, τα AsPC-1 έχουν 5,3 φορές μικρότερη έκφραση από τα BxPC-3, 2,2 φορές από τα PANC-1 και 1,2 φορές μικρότερη από τα ΜΙΑ PaCa-2 (Γραφ.2).



Εικόνα 21. Έκφραση των ανοσοαποτυπωμένων πρωτεϊνών: **GAPDH**, **Caveolin-1** και **Phospho-caveolin-1 (Tyr14)** για τις 4 παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές σε συγκέντρωση 15μΜ. Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική από 2 ανεξάρτητα πειράματα.

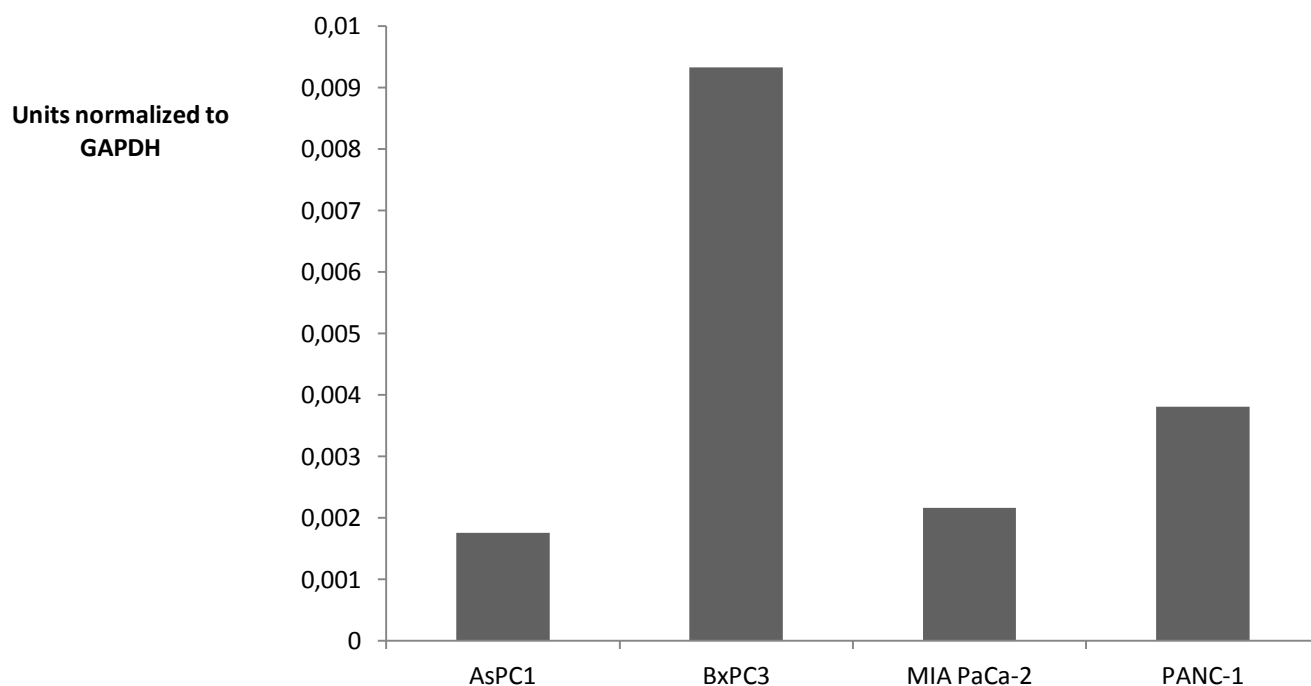
Δε φαίνεται από την ποσοτικοποίηση να υπάρχουν μεγάλες διαφορές έκφρασης μεταξύ της πρωτεΐνης και της φωσφορυλιωμένης μορφής της για την εκάστοτε κυτταρική σειρά. Παρουσιάζουν την ίδια εικόνα.

Έκφραση της Caveolin-1



Γράφημα 1. Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της πρωτεΐνης Caveolin-1 (15µM)

Έκφραση της Phospho-caveolin-1 (Tyr14)



Γράφημα 2. Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της πρωτεΐνης Phospho-caveolin-1 (Tyr14) (15µM)

4.2 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ PHOSPHO-CAVEOLIN-1 (TYR14) ΜΕ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ

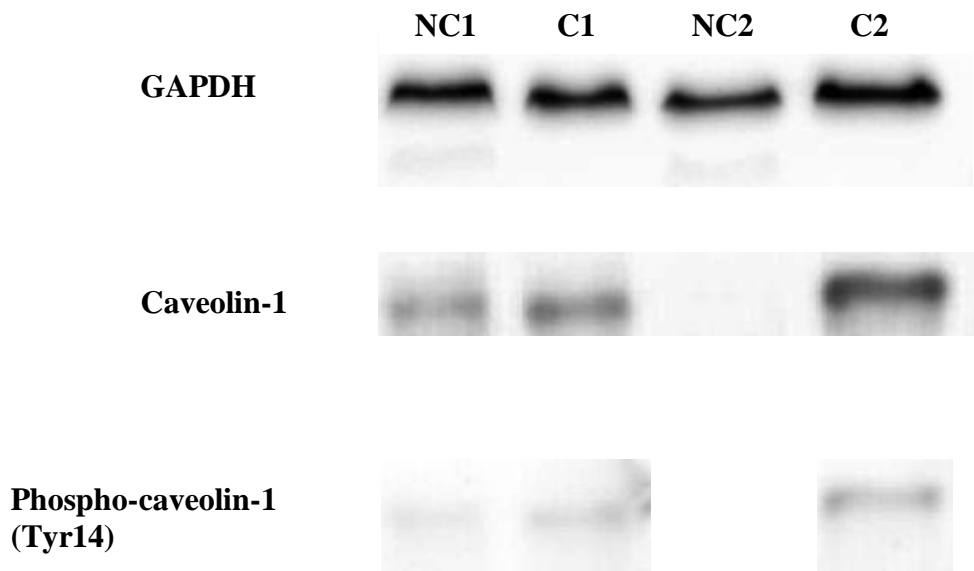
Μετά το 1^ο μέρος των πειραμάτων στις κυτταρικές σειρές, ακολούθησε μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης και της φωσφορυλίωσης της στη θέση Tyr14 σε ανθρώπινους παγκρεατικούς όγκους. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη καρκινικού/μη-καρκινικού ιστού, τα οποία και παρέλαβε το Εργαστήριο από το Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Μετά από ειδική επεξεργασία των δειγμάτων με βάση τα ακολουθούμενα πρωτόκολλα, πραγματοποιήθηκε λύση των όγκων για την απομόνωση των πρωτεϊνών και Bradford Analysis για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης τους σε διάλυμα. Ακολούθησε η διαδικασία της Western Blot για τη μελέτη έκφρασης της Caveolin-1 και Phospho-caveolin-1 (Tyr14).

Τα αποτελέσματα, που προέκυψαν, δείχνουν ότι η έκφραση της πρωτεΐνης, αλλά και της φωσφορυλιωμένης μορφής της είναι μεγαλύτερη στους όγκους, συγκριτικά με τους μη-καρκινικούς ιστούς, κάτι που φαίνεται και παρακάτω (Εικ.22). Πιο συγκεκριμένα, στο 1^ο ζεύγος η έκφραση της Caveolin-1 στον καρκινικό ιστό είναι 1 φορά μεγαλύτερη από το μη-καρκινικό, ενώ στο 2^ο η διαφορά είναι εμφανώς μεγαλύτερη, αφού στο μη-καρκινικό ιστό φαίνεται πως η έκφραση είναι μηδενική (Γραφ.3). Πρόκειται, βέβαια, για προκαταρκτικά πειράματα, που οφείλουν να επαναληφθούν σε μεγαλύτερο εύρος, προκειμένου να εξαχθούν στατιστικά σημαντικά συμπεράσματα.

Η ίδια εικόνα παρατηρείται στο Γράφ.4, που προκύπτει από την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων για τη Phospho-caveolin-1 (Tyr14). Εδώ, βέβαια, η διαφορά στο 1^ο ζεύγος είναι μεγαλύτερη, αφού ο καρκινικός ιστός έχει 1,7 φορές μεγαλύτερη έκφραση από το μη-καρκινικό. Στο 2^ο ζεύγος επαναλαμβάνεται το ίδιο σκηνικό, με την έκφραση στο μη-καρκινικό ιστό να είναι και πάλι μηδενική, οπότε και η διαφορά τους να εκτοξεύεται.

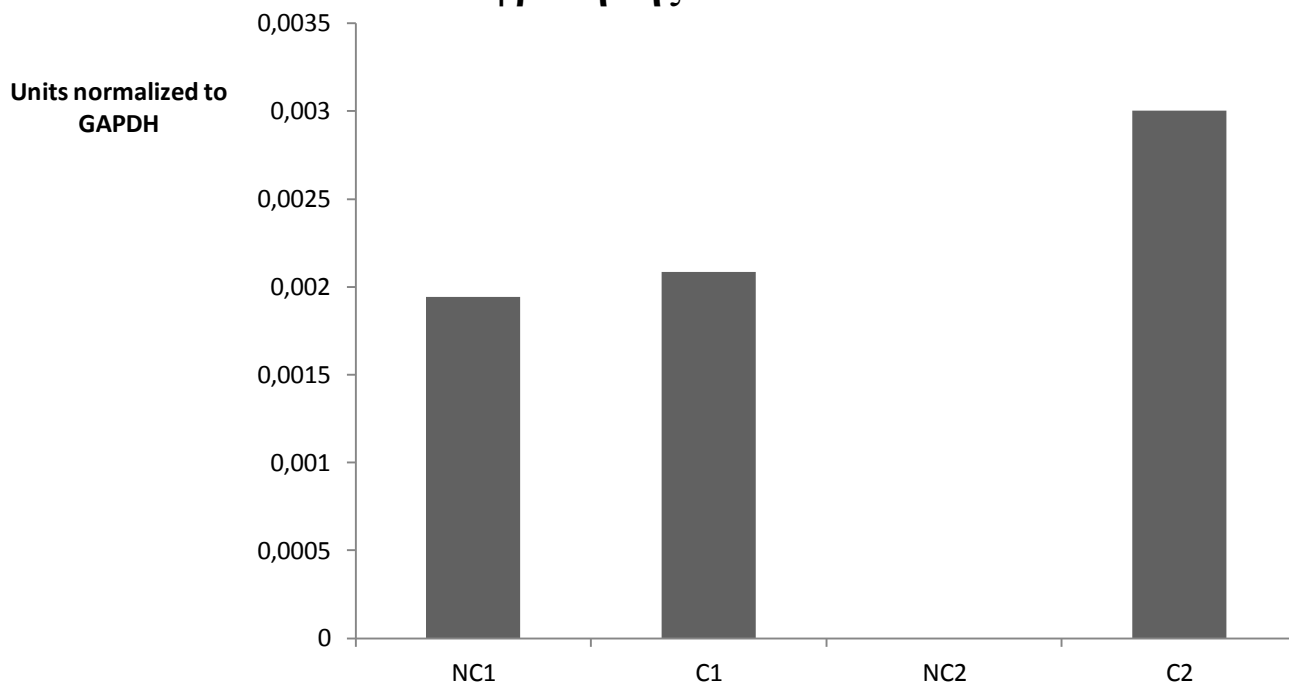
Στην περίπτωση των όγκων και των μη-καρκινικών ιστών, πέρα από το NC2, που παρατηρείται ακριβώς η ίδια εικόνα, η διαφορά μεταξύ της πρωτεΐνης και της φωσφορυλίωσης της για το κάθε δείγμα είναι υπαρκτή. Παρατηρείται, δηλαδή, στο NC1, με μικρή διαφορά, μεγαλύτερη έκφραση (1,1 φορές) Caveolin-1, απ' ότι Phospho-caveolin-1. Το δείγμα C1 έχει κατά 1,5 φορές μεγαλύτερη έκφραση

Phospho-caveolin-1 συγκριτικά με την Caveolin-1. Τέλος, το C2 εμφανίζει μεγαλύτερη έκφραση Caveolin-1, και μάλιστα κατά 1,2 φορές, ως προς τη Phospho-caveolin-1.



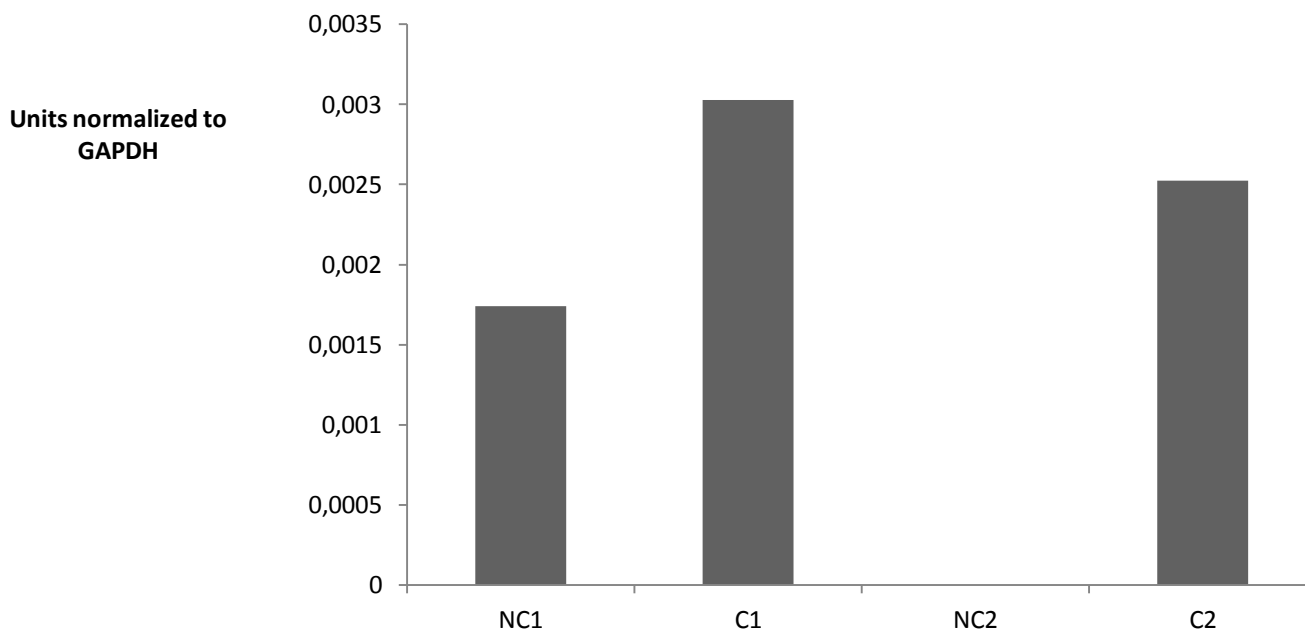
Εικόνα 22. Έκφραση των ανοσοαποτυπωμένων πρωτεϊνών του GAPDH, της Caveolin-1 και της Phospho-caveolin-1 (Tyr14) για τα 2 ζεύγη καρκινικού/μη-καρκινικού [cancer (C)/non-cancer (NC)] ιστού από ασθενείς με παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα σε συγκέντρωση 15μΜ. Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική από 2 ανεξάρτητα πειράματα.

Έκφραση της Caveolin-1



Γράφημα 3. Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της πρωτεΐνης Caveolin-1 (15μM)

Έκφραση της Phospho-caveolin-1 (Tyr14)



Γράφημα 4. Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της πρωτεΐνης Phospho-caveolin-1

(Tyr14) σε συγκέντρωση 15μM

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η Caveolin-1, πρωτεΐνη 21-24 kDa, αποτελεί συστατικό των caveolae, οι οποίες αντιστοιχούν σε μικρές σπηλαιώδεις διογκώσεις της μεμβράνης του πλάσματος, παρούσες στα περισσότερα θηλαστικά κύτταρα. Η οικογένεια των πρωτεϊνών αποτελείται από 3 μέλη: Caveolin-1, 2 & 3. Παρ' όλα αυτά, η Caveolin-1 έχει περιγραφεί ως η κύρια δομική πρωτεΐνη των caveolae και θεωρείται μόριο-κλειδί στην ανάπτυξη κακοήθειας. Παίζει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, σημαντικά για την κυτταρική μεταλλαγή, συμπεριλαμβανομένων αυτών, που μεσολαβούνται μέσω της οικογένειας κινασών Src, του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), του Neu/HER2, της πρωτεϊνικής κινάσης C, του TGF-β/SMAD, του Wnt και του Erk1/2. Έχει προταθεί ότι δρα είτε ως ογκοκατασταλτικό, είτε ως ογκογονίδιο, γεγονός που εξαρτάται από τον τύπο και/ή το στάδιο και την ιστοπαθολογία του όγκου. Αυτές οι ποικίλες επιδράσεις ίσως μπορούν να εξηγηθούν από την κατάσταση ενεργοποίησης των διαφόρων περιοχών ή των επιπέδων έκφρασης άλλων μορίων, που αλληλεπιδρούν με την Caveolin-1 σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια.

Διάφορες μελέτες έχουν πρόσφατα εκτιμήσει ενδεχόμενο ρόλο της πρωτεΐνης στην ανάπτυξη όγκων, αλλά η σχέση ανάμεσα στην έκφραση της Caveolin-1 και την ανάπτυξη καρκίνου παραμένει ασαφής.

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η μελέτη έκφρασης τόσο της ίδιας της πρωτεΐνης, όσο και της φωσφορυλιωμένης μορφής της στην τυροσίνη-14, η οποία προκαλεί διέγερση του πολλαπλασιασμού και επάγει την απόπτωση, τόσο σε εγκαθιδρυμένες παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές, όσο και σε ζεύγη καρκινικού/μη-καρκινικού ιστού, μέσω της ανοσοαποτύπωσης κατά Western Blot. Το panel των παγκρεατικών καρκινικών κυτταρικών σειρών, που χρησιμοποιήθηκε, αποτελείται από τα AsPC-1, BxPC-3, MIA PaCa-2 και PANC-1. Στόχος είναι να αναδειχθεί ο πιθανός ρόλος της Caveolin-1 ως διαγνωστικός δείκτης ανάπτυξης όγκου, αλλά και επιθετικότητας.

Σκόπιμο κρίνεται να συγκριθούν οι συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές ως προς 3 βασικά χαρακτηριστικά: 1)ογκογένεση, 2)επιθετικότητα αλλά και 3)έκφραση της Caveolin-1/Phospho-caveolin-1 (Tyr14).

Όσον αφορά την ογκογένεση, από τις λίγες μελέτες με ποσοτικές μετρήσεις μεγέθους όγκου σε μοντέλο υποδόριας ένεσης, μια μικρή ομοφωνία είναι εμφανής. Σε 2 από τις 3 μελέτες, που πραγματοποιήθηκαν, οι BxPC-3 όγκοι ήταν σταθερά μεγαλύτεροι από τους PANC-1 [297,298], ενώ μια 3^η έδειξε το αντίθετο [299]. Ο χρόνος για την ανάπτυξη όγκου φαίνεται να είναι ένας κρίσιμος παράγοντας στο μοντέλο της υποδόριας ένεσης και μπορεί να συμβάλλει στις αναφερόμενες αποκλίσεις στο μέγεθος του όγκου (Πιν.11). Γενικότερα, έχει παρατηρηθεί στα συγκεκριμένα πειράματα μεγάλος χρόνος αναμονής ανάπτυξης όγκου σε ποντίκια κυρίως για τα BxPC-3 και δευτερευόντως για τα PANC-1, σε αντίθεση με τα AsPC-1. Από κοινού τα αποτελέσματα των παρακάτω μελετών υποδηλώνουν μια συναίνεση, στην οποία τα BxPC-3 και τα PANC-1 έχουν υψηλές λανθάνουσες περιόδους πριν την ανάπτυξη όγκου, μετά από υποδόρια ένεση.

# Cells Injected	Relative Effect (Tumor Size, mm ³)	Time (Days)	Ref.
1 × 10 ⁶	BxPC-3 (~2000) > PANC-1 (~500)	54	78
1 × 10 ⁶	PANC-1 (~570) > BxPC-3 (~155)	42	80
1 × 10 ⁶	BxPC-3 (~2000) > AsPC-1 (~1450) > PANC-1 (~750) > MIA PaCa-2 (~525)	21	79
3 × 10 ⁶	AsPC-1 (~2250) > HPAC (~1300)	24	126

Πίνακας 11. Διαφορική ογκογένεση των PA κυτταρικών σειρών . Σε όλα τα πειράματα, οι ποντικοί έλαβαν υποδόριες ενέσεις PA κυτταρικών σειρών. Η αναφερόμενη μέτρηση του μεγέθους του όγκου (mm³) δίδεται σε παρενθέσεις μετά από κάθε κυτταρική σειρά [303].

Η επιθετικότητα των PA κυτταρικών σειρών μπορεί να συνδέεται με την αγγειογένεση, καθώς πολλοί υπέρ-αγγειογόνοι παράγοντες, που εκφράζονται σε PA κυτταρικές σειρές είναι επίσης μιτογόνοι. Η έκφραση των προ-αγγειογενετικών κυτοκινών, χημειοκινών, ενζύμων και των προϊόντων τους έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση του αγγειογενετικού δυναμικού των PA κυτταρικών σειρών. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στο επαγωγίμο ένζυμο κυκλοοξυγενάση-2 (COX-2), γνωστό και ως συνθάση προσταγλανδίνης-ενδοπεροξειδίου 2 (PTGS2), το οποίο εκφράζεται σε πολλές κακοήθειες συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του παγκρέατος. Η έκφραση

σε κυτταρικές σειρές PA των κυτοκινών IL-1α και IL-8 έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ως αναπληρωματικός δείκτης αγγειογένεσης. Η IL-8 είναι γνωστό ότι επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη χημειοταξία αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων και προάγει την ανάπτυξη παγκρεατικών όγκων. Αν και αρκετές ομάδες έχουν αναφέρει διαφορεική έκφραση COX-2 στις PA κυτταρικές σειρές, είναι διαθέσιμες πολύ λίγες ποσοτικές πληροφορίες. Τα BxPC-3 έδειξαν σταθερά υψηλά επίπεδα προ-αγγειογενετικών παραγόντων, που υποδηλώνουν υψηλό αγγειογενετικό δυναμικό, ενώ 2^α έρχονται τα PANC-1. Αντίθετα, τα AsPC-1 και τα MIA PaCa-2 έδειξαν σταθερά χαμηλά επίπεδα προ-αγγειογενετικών παραγόντων.

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν μεγαλύτερη έκφραση Caveolin-1 αλλά και Phospho-caveolin-1 (Tyr14) στα BxPC-3. Ακολουθούν τα PANC-1 και 3^α τα AsPC-1, στην περίπτωση της Caveolin-1, αλλά όχι στη Phospho-caveolin-1 (Tyr14), αφού 3^α έρχονται τα MIA PaCa-2. Τα MIA PaCa-2 φαίνεται να έχουν μικρή έκφραση και στις 2 περιπτώσεις, κάτι που δε συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, που θέλουν την πρωτεΐνη να υπερεκφράζεται σε όλες τις παγκρεατικές καρκινικές σειρές. Η κυτταρική σειρά MIA PaCa-2, που χρησιμοποιήθηκε για τα συγκεκριμένα πειράματα, δεν είναι αυθεντική, αλλά έχει περάσει από xenografts (xMIA PaCa-2), γεγονός που πιθανόν έχει επηρεάσει τα χαρακτηριστικά και τη συμπεριφορά της, με τρόπο που όμως δεν μας είναι γνωστός. Στις 4 κυτταρικές σειρές ανιχνεύονται μεταλλάξεις σε 4 βασικά γονίδια (Πίν.12). Επομένως, αυτό που τελικά προκύπτει είναι πως αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης και της φωσφορυλιωμένης μορφής της έχουν οι πιο επιθετικοί όγκοι.

Cell Line	KRAS ^a	TP53	CDKN2A/p16	SMAD4/DPC4
A5PC-1	12 Asp ⁸⁸ , 101, 107, 110, 114, 127, 128	135 Δ1 bp ⁸⁸ , 101, 107, 108 Intron 4 Δ200 bp splice site ¹⁰¹ HD exon 5 ¹¹⁰	WT ⁸⁸ Δ2 bp ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ HD ¹¹⁰	WT ⁸⁸ , 107, 114 HD ¹¹⁰ 100Thr ¹¹³
BxPC-3	WT ⁸⁸ , 101, 110, 114	220 Cys ⁸⁸ , 101, 108, 110	WT ^{88b} HD ¹⁰⁸⁻¹¹⁰	HD ⁸⁸ , 110, 112, 114
Capan-1	12 Val ⁸⁸ , 101, 127, 128	159 Val ⁸⁸ , 101, 108	HD ⁸⁸ , 108, 109	577 Leu ⁸⁸ 343 STOP ¹¹³
Capan-2	12 Val ⁸⁸ , 101, 114	WT ⁸⁸ , 108 Intron 4 Δ200 bp splice site ¹⁰¹	WT ⁸⁸ 6 bp ins ¹⁰⁸ 7 bp ins ¹⁰⁹	WT ⁸⁸
CFPAC-1	12 Val ⁸⁸ , 107	242 Arg ⁸⁸ , 107, 108	WT ¹⁰⁸ , 109 WT ^{88b} Promoter methylation ¹⁰⁷	HD ⁸⁸ , 107, 112
HPAC	12 Asp ⁸⁸	WT ⁸⁸	112 amber STOP ⁸⁸	WT ⁸⁸
HPAF-II	12 Asp ⁸⁸ , 101, 107	151 Ser ⁸⁸ , 101, 107	Δ20-25 ⁸⁸ Δ26-27 ¹⁰⁹ Δ29-34 ¹⁰⁷	WT ⁸⁸ , 101, 107
Hs 766T	WT ⁸⁸ , 101, 114 61 His ^{102d}	WT ⁸⁸ , 108 Mut 225-282 ^{101c} Δexons 2-4 ^e	WT ⁸⁸ Intron 2 splice site ¹⁰⁸ , 109	HD ⁸⁸ , 112, 114
MIA PaCa-2	12 Cys ¹⁰¹ , 107, 110, 128	248 Trp ¹⁰¹ , 107, 108, 110	HD ¹⁰⁷⁻¹¹⁰	WT ¹⁰⁷ , 110
PANC-1	12 Asp ⁸⁸ , 101, 107, 110, 127, 128	273 His ⁸⁸ , 107, 108, 110, 127 273 Cys ¹⁰¹	HD ⁸⁸ , 107-110	WT ⁸⁸ , 107, 110
SU.86.86	12 Asp ¹¹⁰	245 Ser ¹⁰⁸ , 110	HD ¹⁰⁸⁻¹¹⁰	WT ¹¹⁰

Πίνακας 12. Οι 4 πιο κοινές μεταλλάξεις στον καρκίνο του παγκρέατος [303]

Όσον αφορά τα 2 ζεύγη καρκινικού/μη-καρκινικού ιστού, που χρησιμοποιήθηκαν στα προκαταρκτικά αυτά πειράματα μελέτης έκφρασης της Caveolin-1, προέκυψε μεγαλύτερη έκφραση της και στις 2 περιπτώσεις στους όγκους. Στους μη καρκινικούς ιστούς η έκφραση ήταν μικρότερη, με το NC2 να εμφανίζει μηδενική έκφραση και στις 2 περιπτώσεις.

Η υπερέκφραση της Caveolin-1 έχει συσχετισθεί με κλινικές και παθολογικές παραμέτρους, συμπεριλαμβανομένης της διαμέτρου του όγκου, του ιστοπαθολογικού βαθμού και σταδίου, αλλά δεν έδειξε κάποια εξάρτηση από το φύλο ή την ηλικία. Επιπλέον, πιο άσχημη πρόγνωση έχει συσχετισθεί με αυξημένη έκφραση Caveolin-1. Αυτά τα ευρήματα προτείνουν ότι η πρωτεΐνη αποτελεί έναν καλό υποψήφιο βιοδείκτη στην ανάπτυξη παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος (PDAC).

Εν κατακλείδι, τα προκαταρκτικά αυτά ευρήματα της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας επιβεβαιώνουν τα μέχρι στιγμής βιβλιογραφικά δεδομένα. Έτσι μελλοντικά προτείνεται πιο ενδελεχής μελέτη του ακριβούς μηχανισμού δράσης της Caveolin-1 με επιπλέον πειράματα, τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*, για την εξαγωγή στατιστικά σημαντικών συμπερασμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition. Molecular Biology* (p. 1616). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>
2. [http://www.cell.com/abstract/S00928674\(11\)00127-9](http://www.cell.com/abstract/S00928674(11)00127-9)
3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>
4. <https://www.cdc.gov/nchs/data/hus/hus15.pdf> Health United States, 2015 Table 19, Data are for 2014.
5. Gannon M, Wright C: Endodermal patterning and organogenesis. In Cell Lineage and Fate Determination. Moody SA (ed.). San Diego: Academic Press, 1999, pp. 583–615.
6. Gilbert SF: Developmental Biology, 7th ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc., 2003.
7. Apelqvist A, Ahlgren U, Edlund H: Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Curr Biol* 1997; 7:801–804.
8. Hebrok M, Kim S, Melton DA: Notochord repression of endodermal sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev* 1998;12:1705–1713.
9. Ahlgren U, Jonsson J, Edlund H: The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF/PDX1-deficient mice. *Development* 1996;122:1409–1416.
10. Githens S: Differentiation and development of the pancreas in animals, Chapter 3. In *The Pancreas: Biology, Pathobiology, and Disease*, 2nd ed. Go VLW et al. (ed.). Raven Press, New York: 1993, pp. 21–55.
11. Αλέξανδρος Ε. Άγιος. Πάγκρεας. Περιγραφική και εφαρμοσμένη ανατομική. Εκδόσεις University Studio Press, Θεσσαλονίκη 1997. Τόμος Β. Τα σπλάγχνα. σελ. 244-254.
12. John. E. Skandalakis. Πάγκρεας. Χειρουργική ανατομική και τεχνική. Ιατρικές εκδόσεις Σιώκης, Θεσσαλονίκη 2000. Κεφάλαιο 9. σελ. 393-405.
13. Schwartz-Howard A. Reber. Pancreas. Principles of Surgery. Mc Graw-Hill. I.N.C. 6th International edition, New York. 1994. Chapter 30. pp1401-1404.
14. Α.Π.Σάββας. Πάγκρεας. Επίτομη ανατομική του ανθρώπου και άτλας. Εκδόσεις Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη 1985. τόμος Ι. σελ. 340-342.

15. Κεραμέως-Φόρογλου Χ. Πάγκρεας. Ιστολογία-Εμβρυολογία του ανθρώπου. Θεσσαλονίκη 1987, Τόμος ΙΙ: σελ 162-165.
16. Eynard AR, Valentich MA, Rovasio RA: Histology and Embryology of the Human Being: Cell and Molecular Bases (in Spanish), 4th ed., Buenos Aires: Editorial Me´dica Panamericana, 2008, pp. 394–496.
17. Klover PJ, Mooney RA: Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:753–758.
18. Le Douarin NM, Kalcheim C: The Neural Crest. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
19. Genuth SM. Hormones of the pancreatic Islets. In: Berne R, Levy M Physiology Third Edition, St Louis, Mosby Yearbook Inc, 1993,pp 851-875.
20. R.Greger U.Windhorst (Eds) Comprehensive Human Physiology- From Cellular Mechanisms to Integration. Volume 2 pp 1329-1341.
21. Harper AA, Hood AJC, et al. Pancreatone, an inhibitor of pancreatic secretion in extracts of ileal and colonic mucosa. *J Physiol* 1979; 292: pp 445-9.
22. Francis S. Greenspan and David G. Gardner. Basic and Clinical Endocrinology Lange Medical Books/Mc Graw-Hill Medical Publishing Division. Sixth Edition. 2001.p.623-624.
23. Guyton and Hall. Textbook of medical physiology.Harcourt International Edition. Tenth Edition. pp.745-748.
24. Guyton. Ιατρική Φυσιολογία. Αθήνα 1992.Εκδόσεις Παρισσιανού 8^η Έκδοση Τόμος Γ' σελ.941-945.
25. Αικατερίνη Μαδένα-Πυργάκη: Σημειώσεις φυσιολογίας πεπτικού συστήματος. Θεσσαλονίκη 1986. σελ.29-32.
26. Shimizu I, Hirota M, Ohboshi C, Mizumo a, Shima K. Effect of the enteroinsular axis on both the a and b cell response to arginine after oral glucose man. *Diabetologia* 1987;30:846-50.
27. *N. Engl. J. Med.* 371 (11): 1039–49. September 2014.
28. Anderson K, Potter JD, Mack TM: Pancreatic cancer. In *Cancer Epidemiology and Prevention*. Schottenfeld, D Fraumeni, JF Jr., (eds.). New York: Oxford University Press, 2006, pp. 721–762.
29. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK, Jr., Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo

G, Post JC: Ehrlich GD, Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 1996;14(2):141–145.

30. Fisher WE: Diabetes: risk factor for the development of pancreatic cancer or manifestation of the disease? *World J Surg* 2001;25:503–508.

31. Gullo L, Pezzilli R, Morselli-Labate AM: Diabetes and the risk of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 1994;331:81–84.

32. Berrington de Gonzalez A, Sweetland S, Spencer E: A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2003;89:519–523.

33. Larsson SC, Orsini N, Wolk A: Body mass index and pancreatic cancer risk: A meta-analysis of prospective studies. *Int J Cancer* 2007;120:1993–1998.

34. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M: Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008;371:569–578.

35. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*. Washington DC: AICR, 2007, pp. 271–274.

36. Raderer M, Wrba F, Kornek G, et al.: Association between *Helicobacter pylori* infection and pancreatic cancer. *Oncology* 1998;55:16–19.

37. Stolzenberg-Solomon RZ, Blaser MJ, Limburg PJ, et al.: *Helicobacter pylori* seropositivity as a risk factor for pancreatic cancer. *J Nat Cancer Inst* 2001;93:927–941.

38. Hassan MM, Li D, El-Deeb A, Wolff RA, Bondy ML, Davila M, Abbruzzese JL: Hepatitis B Virus and pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2008;26 (28):4557–4562.

39. *World Cancer Report 2014*. World Health Organization. 2014, Chapter 5.7. [ISBN92-832-0429-8](#).

40. Jones S, Zhang X, Parsons DW, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 2008; 321: 1801–06.

41. Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, et al. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 1731–34.

42. van Heek NT, Meeker AK, Kern SE, et al. Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol* 2002; 161: 1541–47.

43. Hong SM, Heaphy CM, Shi C, et al. Telomeres are shortened in acinar-to-ductal metaplasia lesions associated with pancreatic intraepithelial neoplasia but not

in isolated acinar-to-ductal metaplasias. *Mod Pathol* (published online Sept 24, 2010). DOI:10.1038/modpathol.2010.181.

44. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2969–72.
45. Hruban RH, Maitra A, Goggins M. Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *Int J Clin Exp Pathol* 2008; 1: 306–16.
46. Carter H, Samayoa J, Hruban RH, Karchin R. Prioritization of driver mutations in pancreatic cancer using cancer-specific high-throughput annotation of somatic mutations (CHASM). *Cancer Biol Ther* 2010; 10: 582–87.
47. Hingorani SR, Wang LF, Multani AS, et al. Trp53(R172H) and Kras(G12D) cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 2005; 7: 469–83.
48. Omura N, Goggins M. Epigenetics and epigenetic alterations in pancreatic cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2009; 2: 310–26.
49. Schutte M, Hruban RH, Geradts J, et al. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57: 3126–30.
50. Sato N, Matsubayashi H, Abe T, Fukushima N, Goggins M. Epigenetic down-regulation of CDKN1C/p57KIP2 in pancreatic ductal neoplasms identified by gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4681–88.
51. Sato N, Fukushima N, Hruban RH, Goggins M. CpG island methylation profile of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol* 2008; 21: 238–44.
52. Sato N, Fukushima N, Maitra A, et al. Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays. *Cancer Res* 2003; 63: 3735–42.
53. Sato N, Fukushima N, Chang R, Matsubayashi H, Goggins M. Differential and epigenetic gene expression profiling identifies frequent disruption of the RELN pathway in pancreatic cancers. *Gastroenterology* 2006; 130: 548–65.
54. Sato N, Fukushima N, Maehara N, et al. SPARC/osteonectin is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor-stromal interactions. *Oncogene* 2003; 22: 5021–30.
55. Matsubayashi H, Canto M, Sato N, et al. DNA methylation alterations in the pancreatic juice of patients with suspected pancreatic disease. *Cancer Res* 2006; 66: 1208–17.

56. Parsi MA, Li A, Li CP, Goggins M. DNA methylation alterations in endoscopic retrograde cholangiopancreatography brush samples of patients with suspected pancreaticobiliary disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 1270–78.
57. Sato N, Maitra A, Fukushima N, et al. Frequent hypomethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 4158–66.
58. Vincent A, Ducourouble MP, Van Seuning I. Epigenetic regulation of the human mucin gene MUC4 in epithelial cancer cell lines involves both DNA methylation and histone modifications mediated by DNA methyltransferases and histone deacetylases. *FASEB J* 2008; 22: 3035–45.
59. Szafranska AE, Doleshal M, Edmunds HS, et al. Analysis of microRNAs in pancreatic fine-needle aspirates can classify benign and malignant tissues. *Clin Chem* 2008; 54: 1716–24.
60. Li A, Omura N, Hong SM, et al. Pancreatic cancers epigenetically silence SIP1 and hypomethylate and overexpress miR-200a/200b in association with elevated circulating miR-200a and miR-200b levels. *Cancer Res* 2010; 70: 5226–37.
61. Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 2007; 297: 1901–08.
62. Kent OA, Mullendore M, Wentzel EA, et al. A resource for analysis of microRNA expression and function in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 2013–24.
63. Yachida S, Jones S, Bozic I, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* 2010; 467: 1114–17.
64. Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ, et al. The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* 2010; 467: 1109–13.
65. Scharpf RB, Iacobuzio-Donahue CA, Cope L, et al. Cross-platform comparison of two pancreatic cancer phenotypes. *Cancer Inform* 2010; 9: 257–64.
66. Anderson RG. The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 199–225.
67. Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, et al. Molecular cloning of Caveolin-3, a novel member of the Caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 1996; 271(4): 2255–61.

68. Li, W. P., Liu, P., Pilcher, B. K., and Anderson, R. G. (2001) *J. Cell Sci.* 114, 1397–1408.
69. Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* 1998; 273(10): 5419-22.
70. Drab M, Verkade P, Elger M, *et al.* Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in Caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 2001; 293(5539): 2449-52.
71. Razani B, Engelman JA, Wang XB, *et al.* Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem* 2001; 276(41): 38121-38.
72. Parolini, I., Sargiacomo, M., Galbiati, F., Rizzo, G., Grignani, F., Engelman, J. A., Okamoto, T., Ikezu, T., Scherer, P. E., Mora, R., Rodriguez-Boulant, E., Peschle, C., and Lisanti, M. P. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 25718–25725.
73. Liu L, Pilch PF. A critical role of cavin (polymerase I and transcript release factor) in caveolae formation and organization. *J Biol Chem* 2008; 283(7): 4314-22.
74. Hill MM, Bastiani M, Luetterforst R, *et al.* PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell* 2008; 132(1): 113-24.
75. McMahon KA, Zajicek H, Li WP, *et al.* SRBC/cavin-3 is a Caveolin adapter protein that regulates caveolae function. *EMBO J* 2009; 28(8): 1001-15.
76. Hansen CG, Bright NA, Howard G, Nichols BJ. SDPR induces membrane curvature and functions in the formation of caveolae. *Nat Cell Biol* 2009; 11(7): 807-14.
77. Lajoie P, Goetz JG, Dennis JW, Nabi IR. Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *J Cell Biol* 2009; 185(3): 381-5.
78. Quest AF, Gutierrez-Pajares JL, Torres VA. Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer. *J Cell Mol zMed* 2008; 12(4): 1130-50.
79. Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM. Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of Caveolin to caveolae. *J Biol Chem* 1995; 270(12): 6838-42.

80. Monier S, Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM, Kurzchalia TV. Oligomerization of VIP21-Caveolin *in vitro* is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol. FEBS Lett 1996; 388(2-3): 143-9.
81. Sotgia F, Lee JK, Das K, *et al.* Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of beta -dystroglycan. Identification of a central WW-like domain within Caveolin family members. J Biol Chem 2000; 275(48): 38048-58.
82. Bender F, Montoya M, Monardes V, Leyton L, Quest AF. Caveolae and caveolae-like membrane domains in cellular signaling and disease: identification of downstream targets for the tumor suppressor protein Caveolin-1. Biol Res 2002; 35(2): 151-67.
83. Kogo H, Aiba T, Fujimoto T. Cell type-specific occurrence of Caveolin-1alpha and -1beta in the lung caused by expression of distinct mRNAs. J Biol Chem 2004; 279(24): 25574-81.
84. H. Cao, W.E. Courchesne, C.C. Mastick, A phosphotyrosine-dependent protein interaction screen reveals a role for phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14: recruitment of C-terminal Src kinase, J. Biol. Chem. 277 (2002) 8771-8774.
85. S. Li, R. Seitz, M.P. Lisanti, Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src *in vivo*, J. Biol. Chem. 271 (1996) 3863-3868.
86. S. Li, J. Couet, M.P. Lisanti, Src kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases, J. Biol. Chem. 271 (1996) 29182-29190.
87. A.R. Sanguinetti, C.C. Mastick, c-Abl is required for oxidative stress-induced phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14, Cell. Signal. 15 (2003) 289-298.
88. D. Volonte, F. Galbiati, R.G. Pestell, M.P. Lisanti, Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr(14)) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress, J. Biol. Chem. 276 (2001) 8094-8103.
89. D.B. Chen, S.M. Li, X.X. Qian, C. Moon, J. Zheng, Tyrosine phosphorylation of caveolin 1 by oxidative stress is reversible and dependent on the c-src tyrosine kinase but not mitogen-activated protein kinase pathways in placental artery endothelial cells, Biol. Reprod. 73 (2005) 761-772.

90. H. Kim, C. Moon, M. Ahn, Y. Matsumoto, C.S. Koh, M.D. Kim, T. Shin, Increased phosphorylation of caveolin-1 in the sciatic nerves of Lewis rats with experimental autoimmune neuritis, *Brain Res.* 1137 (2007) 153-160.
91. A.N. Shajahan, A. Wang, M. Decker, R.D. Minshall, M.C. Liu, R. Clarke, Caveolin-1 tyrosine phosphorylation enhances paclitaxel-mediated cytotoxicity, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 5934-5943.
92. P. Palozza, R. Sestito, N. Picci, P. Lanza, G. Monego, F.O. Ranelletti, The sensitivity to beta-carotene growth-inhibitory and proapoptotic effects is regulated by Caveolin-1 expression in human colon and prostate cancer cells, *Carcinogenesis* 29 (2008) 2153-2161.
93. S. Shack, X.T. Wang, G.C. Kokkonen, M. Gorospe, D.L. Longo, N. J. Holbrook, Caveolin induced activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways increases arsenite cytotoxicity, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 2407-2414.
94. H.L. Yang, W.Q. Chen, X. Cao, A. Worschech, L.F. Du, W.Y. Fang, Y.Y. Xu, D.F. Stroncek, X. Li, E. Wang, F.M. Marincola, Caveolin-1 enhances resveratrol-mediated cytotoxicity and transport in a hepatocellular carcinoma model, *J. Transl. Med.* 7 (2009) 22.
95. Y.N. Jiang, Y.H. Li, M.W. Ke, T.Y. Tseng, Y.B. Tang, M.C. Huang, W.T. Cheng, Y.T. Ju, Caveolin-1 sensitizes rat pituitary adenoma GH3 cells to bromocriptine induced apoptosis, *Cancer Cell. Int.* 7 (2007) 1.
96. A.K. Nevins, D.C. Thumond, Caveolin-1 functions as a novel Cdc42 guanine nucleotide dissociation inhibitor in pancreatic beta-cells, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 18961-18972.
97. E.M. Kepner, S.M. Yoder, E. Oh, M.A. Kalwat, Z. Wang, L.A. Quilliam, D.C. Thumond, Cool-1/betaPIX functions as a guanine nucleotide exchange factor in the cycling of Cdc42 to regulate insulin secretion, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301 (2011) E1072-E1080.
98. Park DS, Cohen AW, Frank PG, *et al.* Caveolin-1 null (-/-) mice show dramatic reductions in life span. *Biochemistry* 2003; 42(51): 15124-31.
99. Fernandez MA, Albor C, Ingelmo-Torres M, *et al.* Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science* 2006; 313(5793): 1628-32.
100. Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, Nabi IR. Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev* 2008; 27(4): 715-35.

101. Parton RG, Hanzal-Bayer M, Hancock JF. Biogenesis of caveolae: a structural model for Caveolin-induced domain formation. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 5): 787-96.
102. Parton RG, Howes MT. Revisiting Caveolin trafficking: the end of the caveosome. *J Cell Biol*; 191(3): 439-41.
103. Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *J Cell Biol* 2010; 191(3): 615-29.
104. Smart, E. J., Graf, G. A., McNiven, M. A., Sessa, W. C., Engelman, J. A., Scherer, P. E., Okamoto, T., and Lisanti, M. P. (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19, 7289–7304.
105. Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R., and Anderson, R. G. (1992) *Cell* 68, 673–682.
106. Thomsen, P., Roepstorff, K., Stahlhut, M., and van Deurs, B. (2002) *Mol. Biol. Cell* 13, 238–250.
107. Smart, E. J., Ying, Y. S., Conrad, P. A., and Anderson, R. G. (1994) *J. Cell Biol.* 127, 1185–1197.
108. Uittenbogaard, A., Ying, Y., and Smart, E. J. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 6525–6532.
109. Li, W. P., Liu, P., Pilcher, B. K., and Anderson, R. G. (2001) *J. Cell Sci.* 114, 1397–1408.
110. Liu, P., Li, W. P., Machleidt, T., and Anderson, R. G. (1999) *Nat. Cell Biol.* 1, 369–375.
111. Glenney, J. R. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 20163–20166.
112. Kurzchalia, T. V., Dupree, P., Parton, R. G., Kellner, R., Virta, H., Lehnert, M., and Simons, K. (1992) *J. Cell Biol.* 118, 1003–1014.
113. Anderson, R. G. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* 67, 199–225.
114. Fernandez, I., Ying, Y.-S., Albanesi, J., and Anderson, R. G. W. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11193–11198.
115. Anderson, R. G., and Jacobson, K. (2002) *Science* 296, 1821–1825.
116. Machleidt, T., Li, W. P., Liu, P., and Anderson, R. G. (2000) *J. Cell Biol.* 148, 17–28.
117. Lisanti, M. P., Tang, Z. L., and Sargiacomo, M. (1993) *J. Cell Biol.* 123, 595–604.
118. Uittenbogaard, A., and Smart, E. J. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 25595–25599.
119. Pol, A., Luetterforst, R., Lindsay, M., Heino, S., Ikonen, E., and Parton, R. G. (2001) *J. Cell Biol.* 152, 1057–1070.

120. Glenney JR, Jr. Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J Biol Chem* 1989; 264(34): 20163-6.
121. Glenney JR, Jr., Zokas L. Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J Cell Biol* 1989; 108(6): 2401-8.
122. Glenney JR, Jr., Soppet D. Sequence and expression of Caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(21): 10517-21.
123. Koleske AJ, Baltimore D, Lisanti MP. Reduction of Caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(5): 1381-5.
124. Engelman JA, Wykoff CC, Yasuhara S, Song KS, Okamoto T, Lisanti MP. Recombinant expression of Caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J Biol Chem* 1997; 272(26): 16374-81.
125. Galbiati F, Volonte D, Brown AM, *et al.* Caveolin-1 expression inhibits Wnt/beta-catenin/Lef-1 signaling by recruiting beta-catenin to caveolae membrane domains. *J Biol Chem* 2000; 275(30): 23368-77.
126. Racine C, Belanger M, Hirabayashi H, Boucher M, Chakir J, Couet J. Reduction of Caveolin 1 gene expression in lung carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 255(3): 580-6.
127. Lee SW, Reimer CL, Oh P, Campbell DB, Schnitzer JE. Tumor cell growth inhibition by Caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene* 1998; 16(11): 1391-7.
128. Bender FC, Raymond MA, Bron C, Quest AF. Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of Caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity. *Cancer Res* 2000; 60(20): 5870-8.
129. Wiechen K, Diatchenko L, Agoulnik A, *et al.* Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 2001; 159(5): 1635-43.
130. Capozza F, Williams TM, Schubert W, *et al.* Absence of Caveolin-1 sensitizes mouse skin to carcinogen-induced epidermal hyperplasia and tumor formation. *Am J Pathol* 2003; 162(6): 2029-39.

131. Williams TM, Cheung MW, Park DS, *et al.* Loss of Caveolin-1 gene expression accelerates the development of dysplastic mammary lesions in tumor-prone transgenic mice. *Mol Biol Cell* 2003; 14(3): 1027-42.
132. Lin MI, Yu J, Murata T, Sessa WC. Caveolin-1-deficient mice have increased tumor microvascular permeability, angiogenesis, and growth. *Cancer Res* 2007; 67(6): 2849-56.
133. Engelman JA, Lee RJ, Karnezis A, *et al.* Reciprocal regulation of neu tyrosine kinase activity and Caveolin-1 protein expression *in vitro* and *in vivo*. Implications for human breast cancer. *J Biol Chem* 1998; 273(32): 20448-55.
134. Hayashi K, Matsuda S, Machida K, *et al.* Invasion activating Caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers. *Cancer Res* 2001; 61(6): 2361-4.
135. Lee H, Park DS, Razani B, Russell RG, Pestell RG, Lisanti MP. Caveolin-1 mutations (P132L and null) and the pathogenesis of breast cancer: Caveolin-1 (P132L) behaves in a dominant-negative manner and Caveolin-1 (-/-) null mice show mammary epithelial cell hyperplasia. *Am J Pathol* 2002; 161(4): 1357-69.
136. Li T, Sotgia F, Vuolo MA, *et al.* Caveolin-1 mutations in human breast cancer: functional association with estrogen receptor alpha-positive status. *Am J Pathol* 2006; 168(6): 1998-2013.
137. Luanpitpong S, Talbott SJ, Rojanasakul Y, *et al.* Regulation of lung cancer cell migration and invasion by reactive oxygen species and Caveolin-1. *J Biol Chem* 2010; 285(50): 38832-40.
138. Bartz R, Zhou J, Hsieh JT, Ying Y, Li W, Liu P. Caveolin-1 secreting LNCaP cells induce tumor growth of Caveolin-1 negative LNCaP cells *in vivo*. *Int J Cancer* 2008; 122(3): 520-5.
139. Karam JA, Lotan Y, Roehrborn CG, Ashfaq R, Karakiewicz PI, Shariat SF. Caveolin-1 overexpression is associated with aggressive prostate cancer recurrence. *Prostate* 2007; 67(6): 614-22.
140. Yang CP, Galbiati F, Volonte D, Horwitz SB, Lisanti MP. Upregulation of Caveolin-1 and caveolae organelles in Taxolresistant A549 cells. *FEBS Lett* 1998; 439(3): 368-72.
141. Yang G, Truong LD, Timme TL, *et al.* Elevated expression of Caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4(8): 1873-80.

142. Li WP, Liu P, Pilcher BK, Anderson RG. Cell-specific targeting of Caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 7): 1397-408.
143. Tahir SA, Yang G, Ebara S, *et al.* Secreted Caveolin-1 stimulates cell survival/clonal growth and contributes to metastasis in androgen-insensitive prostate cancer. *Cancer Res* 2001; 61(10): 3882-5.
144. Lavie Y, Fiucci G, Liscovitch M. Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells. *J Biol Chem* 1998; 273(49): 32380-3.
145. Lavie Y, Fiucci G, Liscovitch M. Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells. *J Biol Chem* 1998; 273(49): 32380-3.
146. Ravid D, Maor S, Werner H, Liscovitch M. Caveolin-1 inhibits anoikis and promotes survival signaling in cancer cells. *Adv Enzyme Regul* 2006; 46: 163-75.
147. Ando T, Ishiguro H, Kimura M, *et al.* The overexpression of Caveolin-1 and Caveolin-2 correlates with a poor prognosis and tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2007; 18(3): 601-9.
148. Ho CC, Kuo SH, Huang PH, Huang HY, Yang CH, Yang PC. Caveolin-1 expression is significantly associated with drug resistance and poor prognosis in advanced non-small cell lung cancer patients treated with gemcitabine-based chemotherapy. *Lung Cancer* 2008; 59(1): 105-10.
149. Savage K, Lambros MB, Robertson D, *et al.* Caveolin 1 is overexpressed and amplified in a subset of basal-like and metaplastic breast carcinomas: a morphologic, ultrastructural, immunohistochemical, and in situ hybridization analysis. *Clin Cancer Res* 2007; 13(1): 90-101.
150. Parat MO, Anand-Apte B, Fox PL. Differential Caveolin-1 polarization in endothelial cells during migration in two and three dimensions. *Mol Biol Cell* 2003; 14(8): 3156-68.
151. Beardsley A, Fang K, Mertz H, Castranova V, Friend S, Liu J. Loss of Caveolin-1 polarity impedes endothelial cell polarization and directional movement. *J Biol Chem* 2005; 280(5): 3541-7.
152. Santilman V, Baran J, Anand-Apte B, Evans RM, Parat MO. Caveolin-1 polarization in transmigrating endothelial cells requires binding to intermediate filaments. *Angiogenesis* 2007; 10(4): 297-305.

153. Ho CC, Huang PH, Huang HY, Chen YH, Yang PC, Hsu SM. Up-regulated Caveolin-1 accentuates the metastasis capability of lung adenocarcinoma by inducing filopodia formation. *Am J Pathol* 2002; 161(5): 1647-56.
154. Lee H, Volonte D, Galbiati F, *et al.* Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of Caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) *in vivo*: identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette. *Mol Endocrinol* 2000; 14(11): 1750-75.
155. Hatanaka M, Maeda T, Ikemoto T, Mori H, Seya T, Shimizu A. Expression of Caveolin-1 in human T cell leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253(2): 382-7.
156. Li L, Yang G, Ebara S, *et al.* Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61(11): 4386-92.
157. Garcia S, Dales JP, Charafe-Jauffret E, *et al.* Poor prognosis in breast carcinomas correlates with increased expression of targetable CD146 and c-Met and with proteomic basal-like phenotype. *Hum Pathol* 2007; 38(6): 830-41.
158. Galbiati F, Volonte D, Liu J, *et al.* Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest *via* a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 2001; 12(8): 2229-44.
159. Volonte D, Zhang K, Lisanti MP, Galbiati F. Expression of Caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. *Mol Biol Cell* 2002; 13(7): 2502-17.
160. Dasari A, Bartholomew JN, Volonte D, Galbiati F. Oxidative stress induces premature senescence by stimulating Caveolin-1 gene transcription through p38 mitogen-activated protein kinase/Sp1-mediated activation of two GC-rich promoter elements. *Cancer Res* 2006; 66(22): 10805-14.
161. Galbiati F, Volonte D, Engelman JA, *et al.* Targeted downregulation of Caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. *EMBO J* 1998; 17(22): 6633-48.
162. Volonte D, Galbiati F, Lisanti MP. Visualization of Caveolin-1, a caveolar marker protein, in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras. The subcellular distribution of Caveolin-1 is modulated by cell-cell contact. *FEBS Lett* 1999; 445(2-3): 431-9.

163. Lu Z, Ghosh S, Wang Z, Hunter T. Downregulation of Caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell* 2003; 4(6): 499-515.
164. Torres VA, Tapia JC, Rodriguez DA, *et al.* Caveolin-1 controls cell proliferation and cell death by suppressing expression of the inhibitor of apoptosis protein survivin. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 9): 1812-23.
165. Rodriguez DA, Tapia JC, Fernandez JG, *et al.* Caveolin-1-mediated suppression of cyclooxygenase-2 *via* a betacatenin- Tcf/Lef-dependent transcriptional mechanism reduced prostaglandin E2 production and surviving expression. *Mol Biol Cell* 2009; 20(8): 2297-310.
166. Hult J, Bash T, Fu M, *et al.* The cyclin D1 gene is transcriptionally repressed by Caveolin-1. *J Biol Chem* 2000; 275(28): 21203-9.
167. Wang F, Bhat K, Doucette M, *et al.* Docosahexaenoic acid (DHA) sensitizes brain tumor cells to etoposide-induced apoptosis. *Curr Mol Med* 2011; 11(6): 503-11.
168. Li J, Hassan GS, Williams TM, *et al.* Loss of Caveolin-1 causes the hyperproliferation of intestinal crypt stem cells, with increased sensitivity to whole body gamma-radiation. *Cell Cycle* 2005; 4(12): 1817-25.
169. Sotgia F, Williams TM, Cohen AW, Minetti C, Pestell RG, Lisanti MP. Caveolin-1-deficient mice have an increased mammary stem cell population with upregulation of Wnt/betacatenin signaling. *Cell Cycle* 2005; 4(12): 1808-16.
170. Felley-Bosco E, Bender FC, Courjault-Gautier F, Bron C, Quest AF. Caveolin-1 down-regulates inducible nitric oxide synthase *via* the proteasome pathway in human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(26): 14334-9.
171. Felley-Bosco E, Bender F, Quest AF. Caveolin-1-mediated post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase in human colon carcinoma cells. *Biol Res* 2002; 35(2): 169-76.
172. Mastick CC, Brady MJ, Saltiel AR. Insulin stimulates the tyrosine phosphorylation of Caveolin. *J Cell Biol* 1995; 129(6): 1523-31.
173. Mastick CC, Saltiel AR. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of Caveolin is specific for the differentiated adipocyte phenotype in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 1997; 272(33): 20706-14.

174. Kimura A, Mora S, Shigematsu S, Pessin JE, Saltiel AR. The insulin receptor catalyzes the tyrosine phosphorylation of Caveolin-1. *J Biol Chem* 2002; 277(33): 30153-8.
175. Cao H, Courchesne WE, Mastick CC. A phosphotyrosine-dependent protein interaction screen reveals a role for phosphorylation of Caveolin-1 on tyrosine 14: recruitment of C-terminal Src kinase. *J Biol Chem* 2002; 277(11): 8771-4.
176. Cao H, Sanguinetti AR, Mastick CC. Oxidative stress activates both Src-kinases and their negative regulator Csk and induces phosphorylation of two targeting proteins for Csk: Caveolin-1 and paxillin. *Exp Cell Res* 2004; 294(1): 159-71.
177. Volonte D, Galbiati F, Pestell RG, Lisanti MP. Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of Caveolin-1 (Tyr(14)) *via* activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress. *J Biol Chem* 2001; 276(11): 8094-103.
178. Labrecque L, Nyalendo C, Langlois S, *et al.* Src-mediated tyrosine phosphorylation of Caveolin-1 induces its association with membrane type 1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 2004; 279(50): 52132-40.
179. Del Pozo MA, Balasubramanian N, Alderson NB, *et al.* Phospho-Caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat Cell Biol* 2005; 7(9): 901-8.
180. Del Pozo MA, Schwartz MA. Rac, membrane heterogeneity, Caveolin and regulation of growth by integrins. *Trends Cell Biol* 2007; 17(5): 246-50.
181. Orlichenko L, Huang B, Krueger E, McNiven MA. Epithelial growth factor-induced phosphorylation of Caveolin 1 at tyrosine 14 stimulates caveolae formation in epithelial cells. *J Biol Chem* 2006; 281(8): 4570-9.
182. Fang PK, Solomon KR, Zhuang L, *et al.* Caveolin-1 α and -1 β perform nonredundant roles in early vertebrate development. *Am J Pathol* 2006; 169(6): 2209-22.
183. Yamamoto M, Toya Y, Schwencke C, Lisanti MP, Myers MG, Jr., Ishikawa Y. Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J Biol Chem* 1998; 273(41): 26962-8.
184. Galbiati F, Razani B, Lisanti MP. Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* 2001; 106(4): 403-11.

185. Salani B, Briatore L, Garibaldi S, Cordera R, Maggi D. Caveolin-1 down-regulation inhibits insulin-like growth factor-I receptor signal transduction in H9C2 rat cardiomyoblasts. *Endocrinology* 2008; 149(2): 461-5.
186. Repetto S, Salani B, Maggi D, Cordera R. Insulin and IGF-I phosphorylate eNOS in HUVECs by a Caveolin-1 dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337(3): 849-52.
187. Li L, Ren CH, Tahir SA, Ren C, Thompson TC. Caveolin-maintains activated Akt in prostate cancer cells through scaffolding domain binding site interactions with and inhibition of serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A. *Mol Cell Biol* 2003; 23(24): 9389-404.
188. Timme TL, Goltsov A, Tahir S, *et al.* Caveolin-1 is regulated by c-myc and suppresses c-myc-induced apoptosis. *Oncogene* 2000; 19(29): 3256-65.
189. Williams TM, Hassan GS, Li J, *et al.* Caveolin-1 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer: genetic ablation of Cav-1 delays advanced prostate tumor development in tramp mice. *J Biol Chem* 2005; 280(26): 25134-45.
190. Zhang X, Ling MT, Wang Q, *et al.* Identification of a novel inhibitor of differentiation-1 (ID-1) binding partner, Caveolin-1, and its role in epithelial-mesenchymal transition and resistance to apoptosis in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2007; 282(46): 33284-94.
191. Head BP, Patel HH, Tsutsumi YM, *et al.* Caveolin-1 expression is essential for N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Src and extracellular signal-regulated kinase $\frac{1}{2}$ activation and protection of primary neurons from ischemic cell death. *FASEB J* 2008; 22(3): 828-40.
192. Barzan D, Maier P, Zeller WJ, Wenz F, Herskind C. Overexpression of Caveolin-1 in lymphoblastoid TK6 cells enhances proliferation after irradiation with clinically relevant doses. *Strahlenther Onkol* 2010; 186(2): 99-106.
193. Cordes N, Frick S, Brunner TB, *et al.* Human pancreatic tumor cells are sensitized to ionizing radiation by knockdown of Caveolin-1. *Oncogene* 2007; 26(48): 6851-62.
194. Chanvorachote P, Nimmannit U, Lu Y, Talbott S, Jiang BH, Rojanasakul Y. Nitric oxide regulates lung carcinoma cell anoikis through inhibition of ubiquitin-proteasomal degradation of Caveolin-1. *J Biol Chem* 2009; 284(41): 28476-84.

195. Tang Y, Zeng X, He F, Liao Y, Qian N, Toi M. Caveolin-1 is related to invasion, survival, and poor prognosis in hepatocellular cancer. *Med Oncol* 2012; 29(2): 977-84.
196. Zhang Z, Yao K, Jin C. Apoptosis of lens epithelial cells induced by high concentration of glucose is associated with a decrease in Caveolin-1 levels. *Mol Vis* 2009; 15: 2008-17.
197. Shen J, Lee W, Li Y, *et al.* Interaction of Caveolin-1, nitric oxide, and nitric oxide synthases in hypoxic human SK-N-MC neuroblastoma cells. *J Neurochem* 2008; 107(2): 478-87.
198. Senou M, Costa MJ, Massart C, *et al.* Role of Caveolin-1 in thyroid phenotype, cell homeostasis, and hormone synthesis: *in vivo* study of Caveolin-1 knockout mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297(2): E438-51.
199. Jasmin JF, Malhotra S, Singh Dhallu M, Mercier I, Rosenbaum DM, Lisanti MP. Caveolin-1 deficiency increases cerebral ischemic injury. *Circ Res* 2007; 100(5): 721-9.
200. Hellwig CT, Passante E, Rehm M. The molecular machinery regulating apoptosis signal transduction and its implication in human physiology and pathophysiologies. *Curr Mol Med* 2011; 11(1): 31-47.
201. Zhang W, Yokota H, Xu Z, *et al.* Hyperoxia Therapy of Preproliferative Ischemic Retinopathy in a Mouse Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(9): 6384-95.
202. Ryter SW, Lee SJ, Choi AM. Autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Rev Respir Med* 2010; 4(5): 573-84.
203. Ryter SW, Lam HC, Chen ZH, Choi AM. Deadly triplex: smoke, autophagy and apoptosis. *Autophagy* 2011; 7(4): 436-7.
204. Zhang XJ, Yang L, Zhao Q, *et al.* Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. *Cell Death Differ* 2002; 9(8): 790-800.
205. Jin QH, He HY, Shi YF, Lu H, Zhang XJ. Overexpression of acetylcholinesterase inhibited cell proliferation and promoted apoptosis in NRK cells. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25(8): 1013-21.
206. Park SE, Jeong SH, Yee SB, *et al.* Interactions of acetylcholinesterase with Caveolin-1 and subsequently with cytochrome c are required for apoptosome formation. *Carcinogenesis* 2008; 29(4): 729-37.

207. Henriquez M, Armisen R, Stutzin A, Quest AF. Cell death by necrosis, a regulated way to go. *Curr Mol Med* 2008; 8(3): 187-206.
208. Gargalovic P, Dory L. Cellular apoptosis is associated with increased Caveolin-1 expression in macrophages. *J Lipid Res* 2003; 44(9): 1622-32.
209. Chang, W. J., Rothberg, K. G., Kamen, B. A., and Anderson, R. G. (1992) *J. Cell Biol.* 118, 63–69.
210. Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T. V., and Simons, K. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10339–10343.
211. Trigatti, B. L., Anderson, R. G., and Gerber, G. E. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 34–39.
212. Fra, A. M., Masserini, M., Palestini, P., Sonnino, S., and Simons, K. (1995) *FEBS Lett.* 375, 11–14.
213. Smart, E. J., Ying, Y., Donzell, W. C., and Anderson, R. G. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 29427–29435.
214. Roy, S., Luetterforst, R., Harding, A., Apolloni, A., Etheridge, M., Stang, E., Rolls, B., Hancock, J. F., and Parton, R. G. (1999) *Nat. Cell Biol.* 1, 98–105.
215. Lange, Y. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 3411–3414.
216. Graf, G. A., Matveev, S. V., and Smart, E. J. (1999) *Trends Cardiovasc. Med.* 9, 221–225.
217. Fielding, C. J., and Fielding, P. E. (1997) *J. Lipid Res.* 38, 1503-1521.
218. Ito, J., Nagayasu, Y., Kato, K., Sato, R., and Yokoyama, S. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 7929–7935.
219. Razani, B., Combs, T. P., Wang, X. B., Frank, P. G., Park, D. S., Russell, R. G., Li, M., Tang, B., Jelicks, L. A., Scherer, P. E., and Lisanti, M. P. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 8635–8647.
220. Yamabhai, M., and Anderson, R. G. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 24843–24846.
221. Le, P. U., Guay, G., Altschuler, Y., and Nabi, I. R. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 3371–3379.
222. Nichols, B. J. (2002) *Nat. Cell Biol.* 4, 374–378.
223. Razani, B., Engelman, J. A., Wang, X. B., Schubert, W., Zhang, X. L., Marks, C. B., Macaluso, F., Russell, R. G., Li, M., Pestell, R. G., Di Vizio, D., Hou, H., Jr., Kneitz, B., Lagaud, G., Christ, G. J., Edelmann, W., and Lisanti, M. P. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 38121–38138.

224. Pelkmans, L., Kartenbeck, J., and Helenius, A. (2001) *Nat. Cell Biol.* 3, 473–483.
225. Mineo, C., James, G. L., Smart, E. J., and Anderson, R. G. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 11930–11935.
226. Liu, P., Ying, Y., and Anderson, R. G. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 13666–13670.
227. Lisanti, M. P., Scherer, P., Tang, Z. L., and Sargiacomo, M. (1994) *Trends Cell Biol.* 4, 231–235.
228. Sargiacomo, M., Scherer, P. E., Tang, Z., Kubler, E., Song, K. S., Sanders, M. C., and Lisanti, M. P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 9407–9411.
229. Li, S., Couet, J., and Lisanti, M. P. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 29182–29190.
230. Couet, J., Li, S., Okamoto, T., Ikezu, T., and Lisanti, M. P. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 6525–6533.
231. Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P. E., and Lisanti, M. P. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 5419–5422.
232. Czarny, M., Lavie, Y., Fiucci, G., and Liscovitch, M. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 2717–2724.
233. Liou, J. Y., Deng, W. G., Gilroy, D. W., Shyue, S. K., and Wu, K. K. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 34975–34982.
234. Bucci, M., Gratton, J. P., Rudic, R. D., Acevedo, L., Roviezzo, F., Cirino, G., and Sessa, W. C. (2000) *Nat. Med.* 6, 1362–1367.
235. Schlegel, A., Schwab, R. B., Scherer, P. E., and Lisanti, M. P. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 22660–22667.
236. Minetti, C., Sotgia, F., Bruno, C., Scartezzini, P., Broda, P., Bado, M., Masetti, E., Mazzocco, M., Egeo, A., Donati, M. A., Volonte, D., Galbiati, F., Cordone, G., Bricarelli, F. D., Lisanti, M. P., and Zara, F. (1998) *Nat. Genet.* 18, 365–368.
237. Liu, P., Wang, P., Michaely, P., Zhu, M., and Anderson, R. G. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 31648–31654.
238. Terris B, Blaveri E, Crnogorac-Jurcevic T, Jones M, Missiaglia E, Ruzniewski P et al. Characterization of gene expression profiles in intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. *Am J Pathol* 2002; 160: 1745–1754.

239. Chen ST, Lin SY, Yeh KT, Kuo SJ, Chan WL, Chu YP et al. Mutational, epigenetic and expressional analyses of caveolin-1 gene in breast cancers. *Int J Mol Med* 2004; 14: 577–582.
240. Lin M, DiVito MM, Merajver SD, Boyanapalli M, van GKL. Regulation of pancreatic cancer cell migration and invasion by RhoC GTPase and caveolin-1. *Mol Cancer* 2005; 4: 21.
241. Rao X, Evans J, Chae H, Pilrose J, Kim S, Yan P et al. CpG island shore methylation regulates caveolin-1 expression in breast cancer. *Oncogene* 2013; 32: 4519–4528.
242. Huang C, Qiu Z, Wang L, Peng Z, Jia Z, Logsdon CD et al. A novel FoxM1-caveolin signaling pathway promotes pancreatic cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 2012; 72: 655–665.
243. Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, Nabi IR. Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev* 2008; 27: 715–735.
244. Quest AF, Gutierrez-Pajares JL, Torres VA. Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 1130–1150.
245. Hansen CG, Nichols BJ. Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol* 2010; 20: 177–186.
246. Lin M, DiVito MM, Merajver SD, Boyanapalli M, van GKL. Regulation of pancreatic cancer cell migration and invasion by RhoC GTPase and caveolin-1. *Mol Cancer* 2005; 4: 21.
247. Rao X, Evans J, Chae H, Pilrose J, Kim S, Yan P et al. CpG island shore methylation regulates caveolin-1 expression in breast cancer. *Oncogene* 2013; 32: 4519–4528.
248. Huang C, Qiu Z, Wang L, Peng Z, Jia Z, Logsdon CD et al. A novel FoxM1-caveolin signaling pathway promotes pancreatic cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 2012; 72: 655–665.
249. Hill MM, Bastiani M, Luetterforst R, Kirkham M, Kirkham A, Nixon SJ et al. PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveolae formation and function. *Cell* 2008; 132: 113–124.
250. Lin, M., DiVito, M. M., Merajver, S. D., Boyanapalli, M. & van Golen, K. L. Regulation of pancreatic cancer cell migration and invasion by RhoC GTPase and caveolin-1. *Mol Cancer* 4, 21, doi:10.1186/1476-4598-4-21 (2005).

251. Ayala, G. *et al.* Loss of caveolin-1 in prostate cancer stroma correlates with reduced relapse-free survival and is functionally relevant to tumour progression. *J Pathol* 231, 77–87, doi:10.1002/path.4217 (2013).
252. Ma, X. *et al.* Prognostic role of caveolin in breast cancer: a meta-analysis. *Breast* 22, 462–469, doi:10.1016/j.breast.2013.03.005 (2013).
253. Williams, T. M. *et al.* Stromal and epithelial caveolin-1 both confer a protective effect against mammary hyperplasia and tumorigenesis: Caveolin-1 antagonizes cyclin D1 function in mammary epithelial cells. *Am J Pathol* 169, 1784–1801, doi:10.2353/ajpath.2006.060590 (2006).
254. Liu, L. *et al.* Cavin-1 is essential for the tumor-promoting effect of caveolin-1 and enhances its prognostic potency in pancreatic cancer. *Oncogene*, doi:10.1038/onc.2013.223 (2013).
255. Cordes, N. *et al.* Human pancreatic tumor cells are sensitized to ionizing radiation by knockdown of caveolin-1. *Oncogene* 26, 6851–6862, doi:10.1038/sj.onc.1210498 (2007).
256. Hehlhans, S. *et al.* Caveolin-1 mediated radioresistance of 3D grown pancreatic cancer cells. *Radiother Oncol* 92, 362–370, doi:10.1016/j.radonc.2009.07.004 (2009).
257. Chiorean, E. G. & Von Hoff, D. D. Taxanes: impact on pancreatic cancer. *Anticancer Drugs* 25, 584–592, doi:10.1097/cad.0000000000000073 (2014).
258. Jamieson, N. B., Chang, D. K., Grimmond, S. M. & Biankin, A. V. Can we move towards personalised pancreatic cancer therapy? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, doi:10.1586/17474124.2014.893820 (2014).
259. Witkiewicz, A. K. *et al.* Co-expression of fatty acid synthase and caveolin-1 in pancreatic ductal adenocarcinoma: implications for tumor progression and clinical outcome. *Cell Cycle* 7, 3021–3025 (2008).
260. Suzuoki M, Miyamoto M, Kato K, Hiraoka K, Oshikiri T, Nakakubo Y, Fukunaga A, Shichinohe T, Shinohara T, Itoh T, Kondo S, Katoh H (2002) Impact of caveolin-1 expression on prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 87:1140–1144. doi:[10.1038/sj.bjc.6600619](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600619)
261. Witkiewicz AK, Nguyen K, Dasgupta A, Kennedy EP, Yeo CJ, Lisanti MP, Brody JR (2008) Co-expression of fatty acid synthase and caveolin-1 in pancreatic ductal adenocarcinoma: Implications for tumor progression and clinical outcome. *Cell Cycle* 7(19):3021–3025.

262. Jeong S, Lee DH, Lee JI, Lee JW, Kwon KS, Kim PS, Kim HG, Shin YW, Kim YS, Kim YB (2005) Expression of Ki-67, p53, and Kras in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 11:6765–6769.
263. Liedtke C, Kersting C, Burger H, Kiesel L, Wulfing P (2007) Caveolin-1 expression in benign and malignant lesions of the breast. *World J Surg Oncol* 5:110. doi:[10.1186/1477-7819-5-110](https://doi.org/10.1186/1477-7819-5-110)
264. Barresi V, Cerasoli S, Paioli G, Vitarelli E, Giuffre G, Guiducci G, Tuccari G, Barresi G (2006) Caveolin-1 in meningiomas: expression and clinico-pathological correlations. *Acta Neuropathol* 112:617–626. doi:[10.1007/s00401-006-0097-1](https://doi.org/10.1007/s00401-006-0097-1)
265. Cassoni P, Senetta R, Castellano I, Ortolan E, Bosco M, Magnani I, Ducati A (2007) Caveolin-1 expression is variably displayed in astroglial-derived tumors and absent in oligodendrogliomas: concrete premises for a new reliable diagnostic marker in gliomas. *Am J Surg Pathol* 31:760–769. doi:[10.1097/01.pas.0000213433.14740.5d](https://doi.org/10.1097/01.pas.0000213433.14740.5d)
266. Hayashi K, Matsuda S, Machida K, Yamamoto T, Fukuda Y, Nimura Y, Hayakawa T, Hamaguchi M (2001) Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers. *Cancer Res* 61: 2361 – 2364.
267. Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing ‘preassembled signaling complexes’ at the plasma membrane. *J Biol Chem* 273: 5419 – 5422.
268. Lee H, Volonte D, Galbiati F, Iyengar P, Lublin DM, Bregman DB, Wilson MT, Campos-Gonzalez R, Bouzahzah B, Pestell RG, Scherer PE, Lisanti MP (2000) Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) in vivo: identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette. *Mol Endocrinol* 14: 1750 – 1775.
269. Lutz MP, Esser IB, Flossmann-Kast BB, Vogelmann R, Luhrs H, Friess H, Buchler MW, Adler G (1998) Overexpression and activation of the tyrosine kinase Src in human pancreatic carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 243: 503 – 508.
270. Mary C. Phelan, *Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture, Current Protocols in Cell Biology* (1998) 1.1.1-1.1.10.
271. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23227?ICID=search-23227>
272. Laemni U.K., 1970, *Nature*, 227: 680-685.
273. <http://www.ergo.berkeley.edu/be115/protean3.pdf>
274. <http://www.ergo.berkeley.edu/be115/transblot.pdf>

275. <http://www.uvitec.co.uk/>
276. <http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/stripping%20for%20reprobing.pdf>
277. John P Neoptolemos, Raul A Urrutia, James L Abbruzzese, Markus W Buchler (2009) *Pancreatic Cancer*, Springer.
278. http://www.smyrlis-laparoscopic.gr/com/77_Pathhseis---pagkreatos
279. <http://www.surgery.gr/surgeries/felekouras/pancreas/responsive/pancreas-cancer>
280. CP Tanase - Expert review of molecular diagnostics, 2008 - Taylor & Francis
281. Razani, B., Woodman, S. E., & Lisanti, M. P. (2002). Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacological Reviews*, 54(3), 431–467. <https://doi.org/10.1124/pr.54.3.431>
282. Williams TM and Lisanti MP. The caveolin proteins. *Genome Biol* 2004; 5: 214.
283. Liu P¹, Rudick M, Anderson RG., Multiple functions of caveolin-1, *J Biol Chem*. 2002 Nov 1;277(44):41295-8. Epub 2002 Aug 19.
284. Quest AF¹, Lobos-González L, Nuñez S, Sanhueza C, Fernández JG, Aguirre A, Rodríguez D, Leyton L, Torres V., The caveolin-1 connection to cell death and survival, *Curr Mol Med*. 2013 Feb;13(2):266-81.
285. Chatterjee, M., Ben-Josef, E., Thomas, D. G., Morgan, M. a, Zalupski, M. M., Khan, G., Williams, T. M. (2015). Caveolin-1 is Associated with Tumor Progression and Confers a Multi-Modality Resistance Phenotype in Pancreatic Cancer. *Scientific Reports*, 5(June), 10867. <https://doi.org/10.1038/srep10867>
286. Huang C, Qiu Z, Wang L, Peng Z, Jia Z, Logsdon CD et al. A novel FoxM1-caveolin signaling pathway promotes pancreatic cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 2012; 72: 655–665.
287. https://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=gr
288. <http://azizulsadik.blogspot.gr/2012/04/lab-2-measurement-counting-of-cells.html>
289. <http://www.nexcelom.com/Products/Disposable-Hemacytometer.html>
290. <http://tkn5520.blogspot.gr/2010/05/>
291. <http://studylib.net/doc/18414573/mini-protean%C2%AE-3-cell-instruction-manual>
292. <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1703930.pdf>

293. Chen WH, Horoszewicz JS, Leong SS, et al. Human pancreatic adenocarcinoma: in vitro and in vivo morphology of a new tumor line established from ascites. *In Vitro* 1982;18:24–34. [PubMed:7182348]
294. Tan MH, Nowak NJ, Loor R, et al. Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest* 1986;4:15–23. [PubMed: 3754176]
295. Yunis AA, Arimura GK, Russin DJ. Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *Int J Cancer* 1977;19:218–235.
296. Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, et al. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer* 1975;15:741–747. [PubMed: 1140870]
297. Aubert M, Crotte C, Bernard JP, et al. Decrease of human pancreatic cancer cell tumorigenicity by alpha1,3galactosyltransferase gene transfer. *Int J Cancer* 2003;107:910–918. [PubMed: 14601050]
298. Miknyoczki SJ, Chang H, Klein-Szanto A, et al. The Trk tyrosine kinase inhibitor CEP-701 (KT-5555) exhibits significant antitumor efficacy in preclinical xenograft models of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 1999;5:2205–2212. [PubMed: 10473107]
299. Fukasawa M, Korc M. Vascular endothelial growth factor-trap suppresses tumorigenicity of multiple pancreatic cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2004;10:3327–3332. [PubMed: 15161686]
300. Wehinger, S., Ortiz, R., Díaz, M. I., Aguirre, A., Valenzuela, M., Llanos, P., Quest, A. F. G. (2015). Phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine-14 induced by ROS enhances palmitate-induced death of beta-pancreatic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(5), 693–708. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.12.021>
301. Goral, V. (2015). Pancreatic Cancer: Pathogenesis and Diagnosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 16(14), 5619–5624. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.14.5619>
302. Liscovitch M, Burgermeister E, Jain N, Ravid D, Shatz M, Tencer L. 2005. Caveolin and cancer: A complex relationship. In: Mattson MP, editor. *Membrane microdomain signaling: Lipid rafts in biology and medicine*. Totowa, New Jersey: Humana Press. pp 161 – 190.

303. Deer, E. L., Gonzalez-Hernandez, J., Coursen, J. D., Shea, J. E., Ngatia, J., Scaife, C. L., Mulvihill, S. J. (2010). Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines. *Pancreas*, 39(4), 425–435.
<https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3181c15963.Phenotype>