

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΑΝ. ΚΑΘ. ΣΟΦΙΑ ΜΠΟΝΑΝΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΕΤΟΣ 2006-07

ΤΙΤΛΟΣ ΘΕΜΑΤΟΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΕΡΣΕΤΙΝΗΣ ΣΤΙΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ Rαs ΚΑΙ ΤΗΣ
ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ TRAIL ΑΠΟ ΤΗΝ
ΚΕΡΣΕΤΙΝΗ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΟΓΚΟΓΟΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ.

ΦΩΤΕΙΝΗ ΨΑΧΟΥΛΙΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2006



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7586/1
Ημερ. Εισ.: 07-10-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
616.994 06
ΨΑΧ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083724

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΑΝ. ΚΑΘ. ΣΟΦΙΑ ΜΠΟΝΑΝΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΕΤΟΣ 2006-07

ΤΙΤΛΟΣ ΘΕΜΑΤΟΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΕΡΣΕΤΙΝΗΣ ΣΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ Ras ΚΑΙ ΤΗΣ
ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ TRAIL ΑΠΟ ΤΗΝ
ΚΕΡΣΕΤΙΝΗ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΟΓΚΟΓΟΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ.

ΦΩΤΕΙΝΗ ΨΑΧΟΥΛΙΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

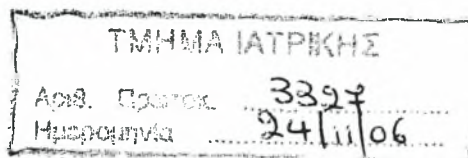
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2006



Προς:
Τη Γενική Συνέλευση
Ειδικής Σύθεσης
Του Ιατρικού Τμήματος
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας



Λάρισα 23-11-2006

Η επταμελής επιτροπή αποτελούμενη από τους:

- 1) Καθ. κ. Ν. Σακελλαρίδη
- 2) Καθ. κ. Α. Λ. Σκαλτσούνη
- 3) Καθ. κ. Σ. Χαρουτουγιάν
- 4) Αναπλ. Καθ. κ. Σ. Μπονάνου-Τζεδάκη
- 5) Επικ. Καθ. κ. Γ. Σίμο
- 6) Επικ. Καθ. κ. Ε. Γεωργάτσου
- 7) Λεκτ. κ. Π. Λιάκο

για την κρίση της διδακτορικής διατριβής της υποψήφιας διδάκτορα κ. Φωτεινής Ψαχούλια με θέμα: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΕΡΣΕΤΙΝΗΣ ΣΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ RAS ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ TRAIL ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΕΡΣΕΤΙΝΗ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΟΓΚΟΓΟΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ

αποφάσισε ΟΜΟΦΩΝΑ στις 23-11-2006 την αποδοχή της διατριβής της με βαθμό ΑΡΙΣΤΑ και εισηγείται στη Γενική Συνέλευση να καλέσει την υποψήφια να δώσει το νομομισμένο όρκο.

Η Επταμελής Επιτροπή:

1)

2)

3)

4)

5)

6)

7)

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΕΩΣ: 08-02-03

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 26-03-03

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

ΣΙΜΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, ΕΠ. ΚΑΘ. ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΓΕΩΡΓΑΤΣΟΥ ΕΛΕΝΑ, ΕΠ. ΚΑΘ. ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ- ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΠΙΝΤΖΑΣ, ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΒΕΒ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ

ΕΚΠΟΝΗΘΗΚΕ ΣΤΟ:

ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΕΡΕΥΝΩΝ: ΔΡ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΠΙΝΤΖΑΣ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ:

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΑΝ. ΚΑΘ. ΣΟΦΙΑ ΜΠΟΝΑΝΟΥ

ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ:
ΠΕΝΕΔ 2001, 01ΕΔ227

ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΔΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΚΑΘ. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΧΑΡΟΥΤΟΥΝΙΑΝ ΣΕΡΚΟ, ΚΑΘ. ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΚΑΛΤΣΟΥΝΗΣ ΑΛΕΞΙΟΣ-ΛΕΑΝΔΡΟΣ, ΚΑΘ. ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ, ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟ ΤΜΗΜΑ, ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΜΠΟΝΑΝΟΥ-ΤΖΕΔΑΚΗ ΣΟΦΙΑ, ΑΝ. ΚΑΘ. ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΙΜΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, ΕΠ. ΚΑΘ. ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΓΕΩΡΓΑΤΣΟΥ ΕΛΕΝΑ, ΕΠ. ΚΑΘ. ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΙΑΚΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

στην οικογένειά μου

ένα ευχαριστώ...

Κατ' αρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιστημονικό μου υπεύθυνο, Δρ. Αλέξανδρο Πίντζα, ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να ξεκινήσω τη διδακτορική μου διατριβή στο εργαστήριό του πριν από τέσσερα χρόνια. Η επιστημονική του καθοδήγηση ήταν ιδιαίτερα σημαντική για την πρόοδο και την ολοκλήρωση της εργασίας μου. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω όλα τα άτομα του εργαστηρίου για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε μου αλλά και τη συμπαράσταση που μου έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και τον Michael Roberts, πρώην μέλος του εργαστηρίου και πρώτο καθοδηγητή στα πειράματά μου. Η συμβολή των κ. Γ. Σίμο και κ. Ε. Γεωργάτσου, μελών της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματική για την ολοκλήρωση της διατριβής, τόσο λόγω των επισημάνσεών τους, όσο και της επικοινωνίας που διατηρήσαμε, γι' αυτό και τους ευχαριστώ. Επίσης, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τον Δρ. Μιχάλη Αλέξη, τόσο επειδή στο εργαστήριό του είχα την ευκαιρία να ασχοληθώ με την έρευνα για πρώτη φορά, σα διπλωματική φοιτήτρια, όσο και για το ότι με έφερε σε επαφή με τον Δρ. Πίντζα, στην ομάδα του οποίου τελικά και εργάστηκα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ τέλος, μέσα από την καρδιά μου σε όλους τους πολύ δικούς μου ανθρώπους που έμειναν κοντά μου και με ενθάρρυναν όλο αυτό το διάστημα και κυρίως στους γονείς μου, οι οποίοι πίστεψαν σε εμένα από την πρώτη στιγμή, όταν τους ανακοίνωσα την απόφασή μου να ξεκινήσω την ενασχόλησή μου με την έρευνα και δε σταμάτησαν να χαίρονται μαζί μου σε όλες τις καλές στιγμές και να με στηρίζουν σε όλες τις δυσκολίες.

π ε ρ ί λ η ψ η

Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε την ικανότητα της κερσετίνης, μιας πολυφαινόλης άφθονης στο καθημερινό μας διαιτολόγιο, να τροποποιεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση με το να στοχεύει μόρια-κλειδιά ή/και βιολογικές λειτουργίες υπεύθυνες για ογκογονικές ιδιότητες. Η επίδραση της κερσετίνης στην έκφραση των ογκοπρωτεϊνών Ras μελετήθηκε ειδικά με τη χρήση συστημάτων μόνιμης ή κατά συνθήκη έκφρασης του ογκογονιδίου *RAS* σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα. Τα αποτελέσματά μας προτείνουν ότι η κερσετίνη μειώνει την κυτταρική βιωσιμότητα και αναστέλλει καρκινικές ιδιότητες, όπως η δημιουργία αποικιών σε μαλακό άγαρ. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύθηκαν περαιτέρω σε μοριακό επίπεδο, εφόσον η κερσετίνη προκάλεσε κατά προτίμηση μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών Ras σε κυτταρικές σειρές οι οποίες εκφράζουν ογκογονικές μορφές των πρωτεϊνών αυτών. Πιο συγκεκριμένα, σε κύτταρα τα οποία εκφράζουν αποκλειστικά το ενδογενές, μη μεταλλαγμένο *RAS* ή σε κύτταρα στα οποία το ογκογονίδιο *RAS* είναι εξαλειμμένο, η κερσετίνη δεν είχε εμφανές αποτέλεσμα στα επίπεδα των πρωτεϊνών Ras. Δείξαμε επίσης ότι η κερσετίνη ελαττώνει το χρόνο ημιζωής της ογκοπρωτεΐνης Ras, δε φάνηκε όμως επίδραση όταν τα κύτταρα επώασθηκαν με αναστολέα του πρωτεασώματος. Επιπλέον, σε κύτταρα μετασχηματισμένα με το ογκογονίδιο *Ha-RAS* η κερσετίνη έδειξε να ενεργοποιεί αυτοφαγικούς μηχανισμούς. Η μείωση των επιπέδων της ογκοπρωτεΐνης Ras από την κερσετίνη δείχνει ότι η πολυφαινόλη θα μπορούσε να δράσει ως χημειοπροστατευτικός παράγοντας σε περιπτώσεις καρκίνων όπου οι μεταλλαγές στα ογκογονίδια *RAS* εμφανίζονται σε υψηλή συχνότητα.

Ένα επιπλέον εύρημα της έρευνάς μας είναι ότι η κερσετίνη ευαισθητοποιεί τα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου HT-29 στην απόπτωση που επάγεται από το TRAIL. Δείξαμε λοιπόν ότι η κερσετίνη ενισχύει την επαγόμενη από το TRAIL απόπτωση με το να προκαλεί την ανακατανομή των υποδοχέων DR4 και DR5 σε λιπιδικές μικροδομές της πλασματικής μεμβράνης. Επιπρόσθετα, δείξαμε ότι η κερσετίνη, σε συνδυασμό με το TRAIL, στοχεύει το μονοπάτι θανάτου που εξαρτάται από το μιτοχόνδριο, όπως αποδεικνύεται από την ενισχυμένη πρωτεόλυση της πρωτεΐνης Bid και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος-*c* στο κυτταρόπλασμα. Όλα αυτά τα προτείνουν ότι η κερσετίνη μπορεί να προκαλεί ανακατανομή των

υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια και με τον τρόπο αυτό να διευκολύνει τη δημιουργία του συμπλέγματος DISC και να οδηγεί στην ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών και στη μιτοχονδριακή ενεργοποίηση, σε απόκριση της ενεργοποίησης των υποδοχέων θανάτου από το TRAIL. Βασιζόμενη στα αποτελέσματα αυτά η παρούσα μελέτη παρέχει μία ενδιαφέρουσα προσέγγιση για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας των θεραπειών που βασίζονται στο TRAIL.

s u m m a r y

In this study, we have examined the effects of quercetin on cancer properties of colon adenocarcinoma cell lines and on the stability of Ras proteins. In addition, prompted by the observation that evading apoptosis induced by anticancer drugs characterizes many types of cancers and this could result in the need for combination therapy, we have studied the sensitization of the human colon adenocarcinoma cell-line HT-29 by quercetin on TRAIL-induced apoptosis.

We first have investigated whether quercetin can modulate cell proliferation and survival by targeting key molecules and/or biological processes responsible for tumor cell properties. The effect of quercetin on the expression of Ras oncoproteins was specifically studied using systems of either constitutive or conditional expression of oncogenic *RAS* in human epithelial cells. Our findings suggest that quercetin reduces cell viability and inhibits cancer cell properties like anchorage-independent growth. These findings were further supported at the molecular level, since quercetin treatment resulted in a preferential reduction of Ras protein levels in cell lines expressing oncogenic Ras proteins. Notably, in cells that only express wild-type *RAS* or in those where the oncogenic *RAS* allele was knocked out, quercetin had no evident effects upon Ras levels. In addition, we have shown that quercetin drastically reduces the half-life of oncogenic Ras but has no effect when the cells are treated with a proteasome inhibitor. Moreover, in Ha-*RAS* transformed cells quercetin induces autophagic processes. Since quercetin downregulates the levels of oncogenic Ras in cancer cells, we propose that this flavonoid could act as a chemopreventive agent for cancers with frequent mutations of *RAS* genes.

An additional finding of our research was that quercetin could sensitize the human colon adenocarcinoma cell-line HT-29 to TRAIL-induced apoptosis. We report that quercetin enhanced TRAIL-induced apoptosis by causing the redistribution of DR4 and DR5 into lipid rafts. Nystatin, a cholesterol sequestering agent, prevented quercetin-induced clustering of death receptors and sensitization to TRAIL-induced apoptosis in HT-29 cells. In addition, our experiments showed that quercetin, in combination with TRAIL, triggered the mitochondrial-dependent death pathway, as demonstrated by the cleavage of Bid and the release of cytochrome-*c* to the cytosol. Together our findings propose that quercetin redistributes death receptors at the cell

surface, and by this way facilitates the DISC formation and activation of caspases in response to death receptor stimulation. Based on these results, the present study provides a challenging approach to enhance the efficiency of TRAIL-based therapies.

Συντμήσεις

Q, quercetin (κερσετίνη)

MDC, monodansylcadaverin

3-MA, 3-μεθυλαδενίνη

Pon, ponasterone-A (ποναστερόνη-A)

N, νυστατίνη

MG132, z-leu-leu-leu CHO

ser, ορός (serum)

DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium

FBS, fetal bovine serum

DMSO, Dimethylsulfoxide

DTT: dithiothreitol

PI, propidium iodide (ιωδιούχο προπίδιο)

TBS, Tris-buffered saline PBS, phosphate-buffered saline

DISC, Death-Inducing Signalling Complex

ERK, extracellular-regulated kinase

LC3, microtubule-associated protein light chain 3

PARP, poly-(ADP-ribose) polymerase

TNF: Tumor Necrosis Factor

FACS, fluorescence-activated cell sorter

Casp-3, κασπάση-3

Casp-8, κασπάση-8

Cyt-c, κυτόχρωμα-c

Cav-1, καβεολίνη-1

FADD, Fas-interacting Death Domain protein

DR4-DR5, Death Receptor 4-5

π ε ρ ι ε χ ό μ ε ν α

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Ο καρκίνος.....	2
1.1.1 Αίτια.....	2
1.1.2 Η πολυσταδιακή φύση του καρκίνου.....	3
1.1.3 Η θεωρία των κλώνων.	4
1.1.4 Ιδιότητες καρκινικών κυττάρων	5
1.1.5 Γενετική βάση του καρκίνου	9
1.2 Ορθοκολικός καρκίνος στον άνθρωπο	13
1.2.1 Μεταλλάξεις σε βασικά ογκογονίδια στον καρκίνο του παχέος εντέρου- τα <i>Ki-RAS</i> και <i>BRAF</i> ογκογονίδια.	14
1.3 Καρκίνος και χημειοπροστασία.....	18
1.3.1 Επίπεδα αναστολής της καρκινογένεσης.....	19
1.3.2 Φλαβονοειδή.....	21
1.3.3 Κερσετίνη	23
1.4 Συνδυασμοί φαρμάκων.....	26
1.4.1 Ογκογονική ανθεκτικότητα και επανενεργοποίηση αποπτωτικών μονοπατιών	27
1.5 Πρωτεΐνες Ras.....	29
1.5.1 Κυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών Ha-Ras και Ki-Ras.....	30
1.5.2 Ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Ras	32
1.5.3 Μονοπάτια που σηματοδοτούνται από την ενεργοποίηση της Ras.....	33
1.5.4 Πρωτεΐνες Ras και κυτταρικός κύκλος.....	35
1.5.5 Πρωτεΐνες Ras και απόπτωση.....	37
1.5.6 Πρωτεΐνες Ras και καρκίνος.....	42
1.6 Οι Rho GTP-άσες	44
1.6.1 Ρύθμιση του κυτταροσκελετού από τις Rho GTPάσες.....	45
1.6.2 Rho GTP άσες και καρκίνος.....	47
1.7 Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου και αποικοδόμησης ενδοκυτταρικών συστατικών.	49
1.7.1 Απόπτωση	49
1.7.2 Αυτοφαγία.....	52
1.7.3 Το προτεάσωμα.....	57
1.8 Υποδοχείς θανάτου και απόπτωση	58
1.8.1 Το TRAIL	59
1.8.2 Υποδοχείς του TRAIL και απόπτωση μέσω του συμπλέγματος DISC...	60

1.8.3	Το μιτοχονδριακό μονοπάτι.....	61
1.9	Λιπιδικές «σχεδίες» (<i>lipid rafts</i>).....	63
1.10	Συστήματα-μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη	65

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... 69

2.1	Υλικά και εταιρείες προέλευσης.....	70
2.1.1	Κυτταροκαλλιέργεια	70
2.1.2	Χημικά για χρήση <i>in vitro</i> τεχνικών	70
2.1.3	Χημικά για παρασκευή διαλυμάτων	71
2.1.4	Αντισώματα	71
2.1.5	Εκκινητές	72
2.2	Διαλύματα.....	73
2.2.1	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	73
2.2.2	Διαλύματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.....	73
2.2.3	Διάλυμα λύσης για την απομόνωση μιτοχονδριακών κλασμάτων	75
2.2.4	Διάλυμα λύσης για τη μελέτη των πρωτεϊνών Ras.....	75
2.2.5	Απλό διάλυμα λύσης για την προετοιμασία ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.....	75
2.2.6	Διάλυμα λύσης για την κατακρήμιση του DISC	76
2.2.7	Διάλυμα επιμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA	76
2.3	Μέθοδοι	76
2.3.1	Κυτταροκαλλιέργεια	76
2.3.2	Μέθοδοι μέτρησης κυτταρικής βιωσιμότητας και κυτταροτοξικότητας	77
2.3.3	Κυτταρομετρία ροής (Fluorescence Activated Cell Sorting-FACS analysis)	78
2.3.4	Δημιουργία αποικιών σε μαλακό άγαρ.....	79
2.3.5	Μέτρηση <i>in vitro</i> μεταστατικότητας των κυττάρων.....	80
2.3.6	Παρασκευή ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.....	80
2.3.7	Προετοιμασία μιτοχονδριακών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων.....	81
2.3.8	Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοσύτρωμα κατά Western.....	81
2.3.9	Ανοσοκατακρήμιση του συμπλέγματος DISC.....	83
2.3.10	Απομόνωση λιπιδικών «σχεδίων» (<i>lipid rafts</i>)	84
2.3.11	Ανοσοφθορισμός	84
2.3.12	Παροδική έκφραση της πρωτεΐνης LC3 με επιμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA και παρατήρηση των αυτοφαγικών κυστιδίων	

μετά από χρώση με MDC	85
2.3.13 Απομόνωση mRNA και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR)	85
2.3.14 Στατιστική ανάλυση και αξιολόγηση	87
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	88
3.1 Κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου εμφανίζουν ευαισθησία στην επίδραση της κερσετίνης στην κυτταρική βιωσιμότητα.....	89
3.2 Η κερσετίνη αναστέλλει βασικές <i>in vitro</i> καρκινικές ιδιότητες των κυττάρων του παχέος εντέρου.	94
3.3 Ο μετασχηματισμός των κυττάρων από το ογκογονίδιο <i>RAS</i> τροποποιεί την επίδραση της κερσετίνης στην κυτταρική βιωσιμότητα.....	97
3.4 Η κερσετίνη προκαλεί κυτταροσκελετικές αλλαγές στα κύτταρα που υπερεκφράζουν τα ογκογονίδια <i>RAS</i>	101
3.5 Η κερσετίνη ελαττώνει τα επίπεδα των ογκοπρωτεϊνών Ras και τα επίπεδα της πρωτεΐνης Rho.	102
3.6 Η μείωση των επιπέδων της ογκοπρωτεΐνης Ras δεν οφείλεται σε ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής.....	106
3.7 Η κερσετίνη επιταχύνει την αποικοδόμηση των ογκοπρωτεϊνών Ras σε σύστημα επαγόμενης έκφρασης του <i>RAS</i>	107
3.8 Η επαγόμενη από την κερσετίνη αποικοδόμηση της ογκοπρωτεΐνης Ras αναστέλλεται από τον αναστολέα του πρωτεασώματος.....	110
3.9 Η κερσετίνη επάγει αυτοφαγία σε κύτταρα του παχέος εντέρου μετασχηματισμένα με το Ha- <i>RAS</i>	111
3.10 Διάφορες πολυφαινόλες ενισχύουν τα αποτελέσματα του TRAIL στον κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων HT-29.....	115
3.11 Η κερσετίνη και το TRAIL συνεργάζονται στην επαγωγή της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου.....	116
3.12 Η ενίσχυση της κυτταροτοξικότητας του TRAIL από την κερσετίνη δε συνδυάζεται με υπερέκφραση των υποδοχέων του.	119
3.13 Η κερσετίνη επάγει τη συσσώρευση των υποδοχέων του TRAIL σε λιπιδικές «σχεδίες» (<i>lipid rafts</i>).	121
3.14 Η κερσετίνη ενισχύει την πρωτεόλυση της κασπάσης-3.....	125
3.15 Η ενίσχυση της επαγόμενης από το TRAIL απόπτωσης από την κερσετίνη ακολουθείται από τροποποιήσεις στο μιτοχονδριακό μονοπάτι.....	127
3.16 Η κερσετίνη ενισχύει τη δημιουργία του συμπλέγματος DISC.....	128
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	131
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	143

Κ ε φ ά λ α ι ο 1

Ε ι σ α γ ω γ ή

1.1 Ο καρκίνος

Σε έναν υγιή άνθρωπο, καθημερινά εκατομμύρια κύτταρα διαιρούνται, πολλαπλασιάζονται και πεθαίνουν με το μηχανισμό της απόπτωσης. Νέα κύτταρα αντικαθιστούν αυτά που υφίστανται βλάβες και πεθαίνουν. Ο ασταμάτητος αυτός φυσιολογικός μηχανισμός επιτρέπει την επιδιόρθωση και την αναζωογόνηση των ιστών και των οργάνων του σώματος. Ο καρκίνος χαρακτηρίζεται από ένα ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό ανώμαλων κυττάρων. Τα παθολογικά κύτταρα, δεν υπακούν στους νόμους ελέγχου, ανάπτυξης και θανάτου που ρυθμίζουν τη ζωή των φυσιολογικών κυττάρων του οργανισμού. Ο καρκίνος, μαζί με τα νοσήματα του καρδιαγγειακού συστήματος, αποτελούν τις κύριες αιτίες θανάτου στις ανεπτυγμένες χώρες (1).

Μία από τις πιο σημαντικές ανακαλύψεις της γενετικής κατά την περασμένη δεκαετία ήταν η απόδειξη ότι ο καρκίνος είναι μία γενετική ασθένεια (2). Ωστόσο, υπάρχουν δύο βασικές διαφορές ανάμεσα στον καρκίνο και στις περισσότερες από τις άλλες γενετικές ασθένειες. Πρώτον, ο καρκίνος προκαλείται κυρίως από μεταλλάξεις στα σωματικά κύτταρα, ενώ οι υπόλοιπες γενετικές ασθένειες των θηλαστικών (εκτός από αυτές για τις οποίες είναι υπεύθυνα γονίδια των μιτοχονδρίων) προκαλούνται αποκλειστικά από μεταλλάξεις στα γεννητικά κύτταρα. Δεύτερον, κάθε μορφή καρκίνου προκύπτει όχι από μία μεταλλαγή, αλλά από τη συσσώρευση διάφορων μεταλλαγών. Κάθε μεταλλαγή οδηγεί σε ένα κύμα κυτταρικού πολλαπλασιασμού συνοδευόμενου από βαθμιαία αύξηση στο μέγεθος του κυττάρου, κυτταρική αποδιοργάνωση και κακοήθεια. Τρία ως επτά «χτυπήματα» απαιτούνται συνήθως για την ολοκλήρωση της διαδικασίας σχηματισμού του καρκίνου και την εξαλλαγή των κυττάρων από φυσιολογικά σε καρκινικά (2,3). Τα κύτταρα αυτά δημιουργούν μία μάζα κυττάρων που ονομάζεται όγκος ή νεόπλασμα, που εισβάλλει σε φυσιολογικούς ιστούς και μπορεί να εξαπλώνεται με μεταστάσεις μέσω του λεμφικού συστήματος και των αιμοφόρων αγγείων σε όλους τους ιστούς του σώματος.

1.1.1 Αίτια

Η πολύπλοκη, συνεχής λειτουργία του πολλαπλασιασμού και αντικατάστασης των κυττάρων, ελέγχεται πολύ αυστηρά από το γενετικό κώδικα. Όμως οποιαδήποτε αλλοίωση ή ζημιά που θα υποστεί το DNA μπορεί να είναι η αιτία έναρξης της

παθολογικής διαδικασίας του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων. Δυστυχώς υπάρχουν πολλοί παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν ζημιά στο DNA. Το κάπνισμα, οι υπεριώδεις ακτίνες του ήλιου, η ιονίζουσα ακτινοβολία, νοσογόνες ουσίες που μολύνουν το περιβάλλον και τον αέρα, ορισμένοι ιοί, επηρεάζοντας με άμεσο ή χρόνιο τρόπο το DNA, μπορούν να είναι οι αιτίες γένεσης του καρκίνου. Σε μερικές περιπτώσεις μπορούν να συμβούν τυχαία αλλαγές στο γενετικό υλικό. Τέτοια λάθη μπορούν να συμβούν όταν για παράδειγμα τα κύτταρα διαιρούνται. Οι ανωμαλίες αυτές μπορούν να μεταφέρονται στους απογόνους κι έτσι υπάρχουν ορισμένες περιπτώσεις κληρονομικών καρκίνων. Η γενεσιουργός ανωμαλία στο DNA, στους κληρονομικούς καρκίνους, μεταδίδεται από γενεά σε γενεά. Κάποτε παρατηρείται μια οικογενειακή προδιάθεση για ορισμένους καρκίνους χωρίς όμως να αναγνωρίζεται μια συγκεκριμένη βλάβη στο DNA.

Οι ανωμαλίες του γενετικού υλικού του DNA που μπορούν να οδηγήσουν σε καρκίνο μπορεί να είναι διαφόρων τύπων. Οι μεταλλάξεις, οι μεταθέσεις τμημάτων του DNA μεταξύ χρωμοσωμάτων, η απώλεια μέρους του DNA, η ύπαρξη ογκογονιδίων, η αδρανοποίηση ή απώλεια των καταστολέων των ογκογονιδίων είναι ανωμαλίες του γενετικού υλικού που βρίσκονται στη γένεση του καρκίνου.

1.1.2 Η πολυσταδιακή φύση του καρκίνου

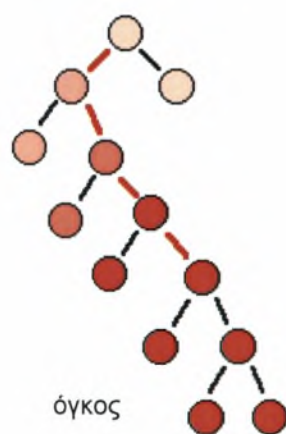
Όπως αναφέραμε, η ογκογένεση είναι μία πολυσταδιακή διαδικασία της οποίας τα στάδια στον άνθρωπο αντιπροσωπεύουν γενετικές αλλαγές που οδηγούν την προοδευτική εξαλλαγή φυσιολογικών κυττάρων σε κακοήγη παράγωγα. Αναλύσεις της παθολογίας οργάνων αποκαλύπτουν αλλοιώσεις λόγω βλαβών που αντιπροσωπεύουν ενδιάμεσα στάδια σε μία διαδικασία με την οποία τα κύτταρα εξελίσσονται από φυσιολογικά σε διηθητικούς καρκίνους. Τα κύρια στάδια της εξέλιξης ενός νεοπλασματος είναι τρία: η *έναρξη* (initiation), μία γρήγορη, μη ανατρέψιμη διαδικασία η οποία συμβαίνει όταν ένα φυσιολογικό κύτταρο υφίσταται μη επιδιορθούμενη αλλαγή στο DNA. Η *προαγωγή* (promotion), μία μακράς διάρκειας διαδικασία η οποία ίσως και να απαιτεί χρόνια ή δεκαετίες για να εδραιωθεί και η οποία συνίσταται από την επέκταση των εξαλλαγμένων κυττάρων τα οποία σχηματίζουν μία δραστικά πολλαπλασιαζόμενη πολυκύτταρη βλάβη. Τέλος, η *εξέλιξη* (progression), η οποία αποτελεί ακόμα ένα μη ανατρέψιμο γεγονός το οποίο συμβαίνει σε μία σχετικά σύντομη χρονική περίοδο κατά την οποία παράγονται νέοι

κλώνοι κυττάρων με αυξημένη διεισδυτική ικανότητα, ικανότητα πολλαπλασιασμού και μεταστατικό δυναμικό. Επειδή η έναρξη και η εξέλιξη είναι μη ανατρέψιμα και σύντομα γεγονότα, η φάση της προαγωγής αποτελεί έναν αρκετά καλό στόχο για την εφαρμογή μεθόδων πρόληψης του καρκίνου.

1.1.3 Η θεωρία των κλώνων.

Η μονοκλωνική προέλευση του καρκίνου υποστηρίζει ότι ο πρωταρχικός όγκος είναι αποτέλεσμα πολλαπλών κυτταρικών διαιρέσεων ενός προγονικού κυττάρου, το οποίο έχει υποστεί μια αρχική, κληρονομήσιμη μεταλλαγή, που του δίνει τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα, εις βάρος των γειτονικών του κυττάρων (3). Ο φαινότυπος του προγονικού κυττάρου για να είναι κληρονομήσιμος πρέπει να οφείλεται σε γενετικά αίτια, δηλαδή σε αλλαγές στην αλληλουχία του DNA.

Η αρχική γενετική βλάβη που θέτει τις βάσεις για την ανάπτυξη όγκου, μπορεί να προκληθεί από περιβαλλοντικούς παράγοντες (ιονίζουσες ουσίες, χημικά μεταλλαξογόνα, ιοί), αλλά και από εσωτερικούς παράγοντες, όπως γενετικές βλάβες τύπου αντιγραφής, ή επιδιορθωτικών μηχανισμών. Οι γενετικές βλάβες επηρεάζουν γονίδια που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην κυτταρική ανάπτυξη, και σε άλλες βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Η θεωρία των κλώνων περιγράφεται στο Σχήμα 1.

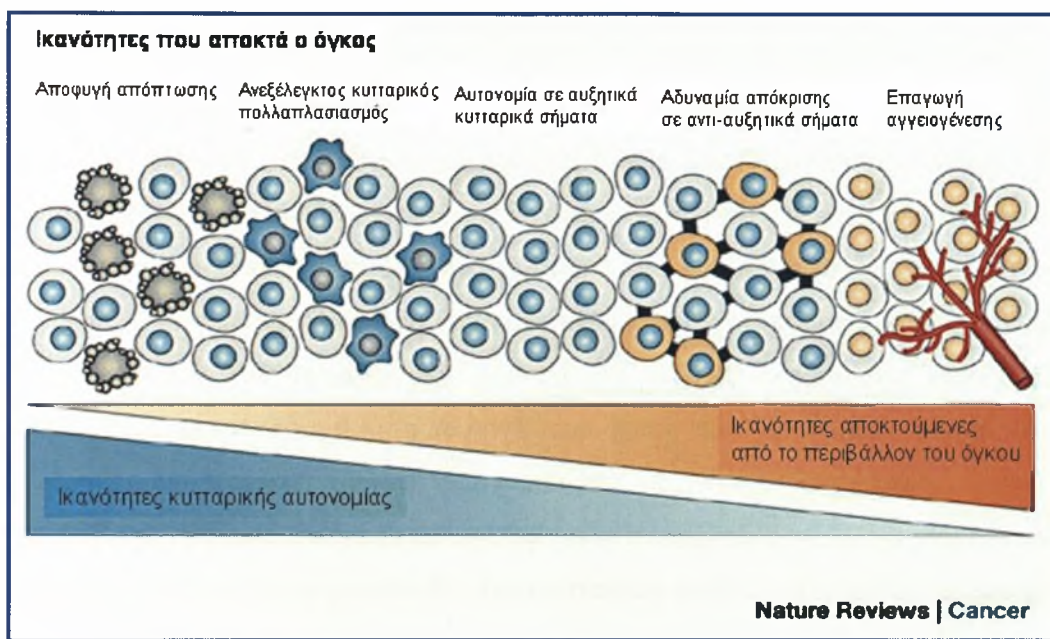


Σχήμα 1: Η θεωρία των κλώνων.

Ένα κύτταρο υφίσταται μία μεταλλαγή (κόκκινη γραμμή) σε ένα γονίδιο που εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο, πχ ένα πρωτοογκογονίδιο ή ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Αυτό οδηγεί σε γρηγορότερο πολλαπλασιασμό του κυττάρου σε σχέση με τα υπόλοιπα κύτταρα του ιστού. Καθώς το κύτταρο αυτό δημιουργεί έναν κλώνο, κάποια από τα κύτταρα υφίσταται κι άλλη μεταλλαγή σε κάποιο άλλο, η οποία απορυθμίζει περαιτέρω τον κυτταρικό κύκλο του κυττάρου και όσων προκύπτουν από αυτό. Καθώς οι μιτωτικοί ρυθμοί αυξάνονται στον κλώνο αυτό, αυξάνεται η πιθανότητα για περαιτέρω βλάβες στο DNA και τελικά, μετά από 6-8 μεταλλαγές ο έλεγχος της αύξησης του κλώνου χάνεται εντελώς.

1.1.4 Ιδιότητες καρκινικών κυττάρων

Κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης, οι καρκίνοι αποκτούν χαρακτηριστικά που προωθούν την ανάπτυξή τους. Τα χαρακτηριστικά αυτά συνοψίζονται γενικά σε ικανότητες κυτταρικής αυτονομίας αλλά και ταυτόχρονη απόκτηση ιδιοτήτων ανάπτυξης που παρέχονται από το περιβάλλον του όγκου (Σχήμα 2). Παρότι τα γενετικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων διαφέρουν, ακόμα και ανάμεσα σε ιστοειδικά ταυτόσημα κύτταρα, εντούτοις, τα καρκινικά κύτταρα έχουν αποκτήσει συγκεκριμένα κοινά χαρακτηριστικά που φαίνεται να προωθούν τον κακοήγη μετασχηματισμό (4).



Σχήμα 2: Οι γραμμές ζωής του καρκίνου.

Οι καρκίνοι αποκτούν ένα σύνολο χαρακτηριστικών γνωρισμάτων που προωθούν την ανάπτυξή τους. Κάποιες από αυτές είναι ιδιότητες κυτταρικής αυτονομίας (μπλε τρίγωνο), όπως η αποφυγή της απόπτωσης ή της κυτταρικής γήρανσης (δυνατότητα ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού). Επιπλέον, δυνατότητες που δε σχετίζονται με κυτταρική αυτονομία αντικατοπτρίζουν τη σταδιακή απόκτηση ιδιοτήτων αύξησης που παρέχονται από το περιβάλλον του όγκου, όπως αυτονομία σε αυξητικά σήματα και επαγωγή αγγειογένεσης (πορτοκαλί τρίγωνο). Ωστόσο, δεν είναι απαραίτητο να έχουν αποκτηθεί όλες οι παραπάνω ιδιότητες προκειμένου να εκδηλωθεί ο μετασχηματισμένος φαινότυπος. Προσαρμογή από *Smith et al., Cancer Res 1994, 54 (5527-30)*.

Αυτονομία σε αυξητικά και αντιαυξητικά σήματα- Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα κύτταρα απαιτούν αυξητικά σήματα για την ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ως αυξητικά σήματα χαρακτηρίζονται διάφοροι τύποι αυξητικών παραγόντων, στοιχεία του εξωκυττάρου υλικού, καθώς και παράγοντες που προέρχονται από τα γειτονικά κύτταρα. Οι παράγοντες αυτοί προσδένονται σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς πυροδοτώντας την ενεργοποίηση ποικίλων ενδοκυτταρικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος που ξεκινούν από την κυτταρική μεμβράνη και καταλήγουν στον πυρήνα ρυθμίζοντας τη γονιδιακή έκφραση.

Ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων φαίνεται να μην εξαρτάται από εξωγενή αυξητικά σήματα, δίδοντάς τους τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα (Σχήμα 3). Τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται να είναι ευαίσθητα σε αυξητικούς παράγοντες τους οποίους τα ίδια συνθέτουν, μια διαδικασία που ονομάζεται αυτοκρινική ενεργοποίηση. Την άποψη αυτή υποστηρίζει το γεγονός, ότι πολλές ογκοπρωτεΐνες είναι αυξητικοί παράγοντες. Μια άλλη άποψη, θέλει τα καρκινικά κύτταρα να υπερεκφράζουν υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης, μια ιδιότητα που τους παρέχει τη δυνατότητα να ανταποκρίνονται σε μικρές συγκεντρώσεις αυξητικών παραγόντων. Από την άλλη μεριά, τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζονται ικανά να επάγουν επιλεκτικά την έκφραση υποδοχέων που ενεργοποιούνται από προαυξητικά σήματα. Σε πολλές περιπτώσεις καρκινικών κυττάρων, η υπερέκφραση ή η αλλαγή της δομής των υποδοχέων οδηγεί στην ανεξάρτητη από αυξητικά σήματα ενεργοποίησή τους.

Τα αντιαυξητικά σήματα δρουν, όπως και τα αυξητικά, μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων συζευγμένων με ποικίλα ενδοκυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος και ρυθμίζουν την ομοιόσταση του ιστού. Η δράση τους σχετίζεται είτε με την παραμονή των κυττάρων στην G₀ φάση του κυτταρικού κύκλου, είτε με την είσοδό τους σε στάδια διαφοροποίησης. Τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται να έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς αποφυγής των τελικών σταδίων διαφοροποίησης και της αναστολής σε συγκεκριμένα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Σχήμα 3). Η επιτυχία τους αυτή, είναι αποτέλεσμα ποικίλων μεταλλάξεων σε υποδοχείς αντιαυξητικών παραγόντων, καθώς και σε παράγοντες ενδοκυτταρικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται από αυτούς.

Ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός- Κάθε κύτταρο έχει συγκεκριμένο αριθμό διαίρεσεων που καθορίζεται από τα τελομερή των χρωμοσωμάτων, τα οποία αποτελούνται από πολλές επαναλήψεις μιας αλληλουχίας έξι βάσεων. Σε κάθε

κυτταρική διαίρεση παρατηρείται μια έλλειψη 50-100 βάσεων από τα τελομερή κάθε χρωμοσώματος. Το επακόλουθο αποτέλεσμα αυτής της διαδοχικής έλλειψης είναι η σύνδεση των χρωμοσωμάτων στα άκρα τους, κάτι που οδηγεί τελικά σε θάνατο.

Από την άλλη μεριά, τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται να ανέπτυξαν μηχανισμούς που να τους επιτρέπουν να διατηρούν το τελομερικό DNA. Οι περισσότεροι τύποι καρκινικών κυττάρων προωθούν την έκφραση του γονιδίου της τελομεράσης, η οποία προσθέτει νουκλεοτιδικές επαναλήψεις στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Ένας δεύτερος μηχανισμός διατήρησης του τελομερικού DNA, ο ονομαζόμενος ALT, έχει περιγραφεί σε μερικούς τύπους καρκινικών κυττάρων. Η διατήρηση των τελομερών στην περίπτωση αυτή γίνεται μέσω κατάλληλου ανασυνδυασμού.

Σε καλλιέργεια κυττάρων, τα μετασχηματισμένα καρκινικά κύτταρα σχηματίζουν τη μια στοιβάδα πάνω στην άλλη καθώς πολλαπλασιάζονται, αφού σχηματίσουν αρχικά μια απλή μονοστοιβάδα (Σχήμα 3). Η ιδιότητα τους αυτή οφείλεται στην απώλεια της αναστολής εξ' επαφής, γεγονός που τους επιτρέπει να πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα από την κυτταρική πυκνότητα στο δοχείο καλλιέργειας. Η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων φαίνεται να μην εξαρτάται από τις επαφές τους με το υπόστρωμα και με τα γειτονικά κύτταρα. Το γεγονός αυτό υποστηρίζεται από την αυξημένη παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων του εξωκυτταρικού στρώματος.

Γονιδιακή αστάθεια- Τα κύτταρα κατέχουν μια σειρά επιδιορθωτικών μηχανισμών, οι οποίοι τα προστατεύουν από εκτεταμένες γονιδιακές αλλαγές. Τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται να παρακάμπτουν αυτούς τους ομοιοστατικούς μηχανισμούς ελέγχου του γονιδιώματος με μια ποικιλία τρόπων.

Για παράδειγμα, η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη P53 σε απόκριση σε βλάβη στο DNA επάγει είτε το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στο σημείο ελέγχου G1, έτσι ώστε να δράσουν οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί, είτε την ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού όταν η βλάβη αυτή είναι εκτεταμένη. Έλλειψη ή απενεργοποίηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης P53 στα καρκινικά κύτταρα, έχει ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που έχουν υποστεί γενετικές βλάβες καθώς και την επαγωγή περισσότερων γενετικών αλλαγών στο κύτταρο, γεγονός που οδηγεί στην εξέλιξη του καρκίνου.

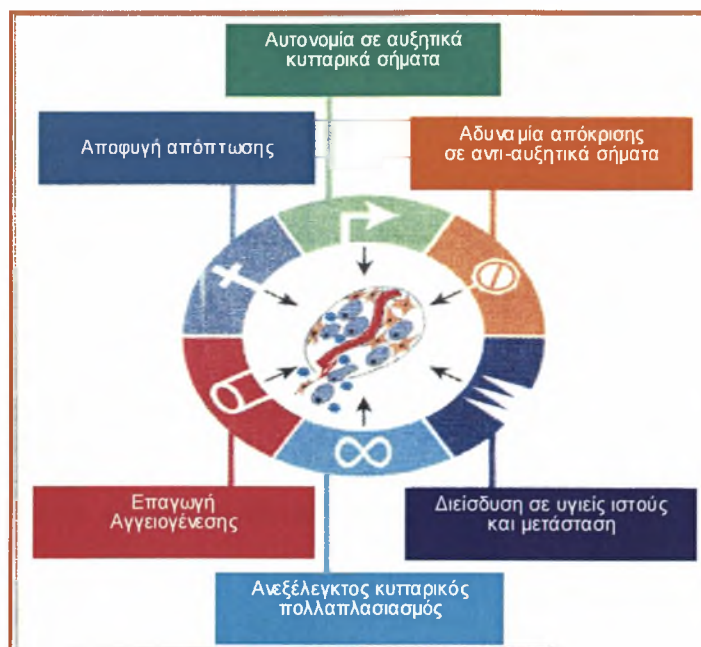
Μετάσταση και διείσδυση σε ιστούς- Τα νεοπλασματικά κύτταρα μετατρέπονται σε κακοήθη όταν αποκτήσουν την ικανότητα να εισβάλλουν

περιβάλλοντες ή περισσότερο απομακρυσμένους ιστούς και να σχηματίζουν δευτερεύοντες όγκους (Σχήμα 3). Η διαδικασία της μετάστασης χαρακτηρίζεται από μια σειρά γεγονότων λόγω των οποίων τα καρκινικά κύτταρα χάνουν την ικανότητα σύνδεσής τους με τα γειτονικά τους κύτταρα. Η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να αποσυνδέονται από τα γειτονικά τους κύτταρα σχετίζεται με την απουσία ή απενεργοποίηση της E-καδερίνης, η οποία σχηματίζει γέφυρες με τις οποίες συνδέονται τα γειτονικά κύτταρα. Τα καρκινικά κύτταρα στη συνέχεια εισβάλλουν σε γειτονικούς ιστούς μέχρι να φτάσουν σ' ένα αιμοφόρο ή λεμφικό αγγείο απ' όπου περνούν τη βασική μεμβράνη και τον υποκείμενο συνδετικό ιστό και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος, μέσω της οποίας μεταναστεύουν σ' άλλες περιοχές του σώματος όπου επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται σχηματίζοντας ένα δευτερεύοντα όγκο.

Αποφυγή απόπτωσης (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος)- Τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν ανθεκτικότητα στην απόπτωση με ποικίλους τρόπους (Σχήμα 3). Μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *P53* παρατηρούνται στο 50% των καρκίνων. Τα καρκινικά αυτά κύτταρα συνεχίζουν να διαιρούνται ανεξάρτητα από αποπτωτικά σήματα, όπως βλάβες στο DNA, γεγονότα υποξίας και υπερέκφρασης ενός ογκογονιδίου. Σε μερικές περιπτώσεις καρκίνου, το Ras-εξαρτώμενο μεταγωγικό μονοπάτι PI3-AKT/PKB το οποίο μεταβιβάζει αντιαποπτωτικά σήματα, φαίνεται να εμπλέκεται στην αποφυγή της απόπτωσης στους όγκους αυτούς. Το μεταγωγικό αυτό μονοπάτι ενεργοποιείται από εξωκυτταρικούς παράγοντες (IGF-1, IGF-2, IL-3), καθώς και από ενδοκυτταρικά σήματα.

Αγγειογένεση- Για την ομαλή κυτταρική λειτουργία και επιβίωση, τα κύτταρα απαιτούν οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, τα οποία μεταφέρονται σ' αυτά από τα αιμοφόρα αγγεία. Έτσι, τα κύτταρα σε κάθε ιστό βρίσκονται πλησίον αιμοφόρων αγγείων ώστε να προσλαμβάνουν τα απαιτούμενα συστατικά για την ανάπτυξή τους.

Τα καρκινικά κύτταρα που δημιουργούν όγκους, οργανώνουν παράλληλα και δίκτυα τροφοδότησής τους από αιμοφόρα αγγεία που τους παρέχουν όλα τα αναγκαία θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο για να επιβιώνουν. Αποκτούν δηλαδή αγγειογενετικές ικανότητες ώστε να μπορούν να αυξάνονται χωρίς περιορισμούς (Σχήμα 3). Μερικές νέες θεραπευτικές προσπάθειες κατά των καρκίνων, έχουν στόχο την καταστολή δημιουργίας δικτύων αιμοφόρων αγγείων, με τρόπο τέτοιο που τα καρκινικά κύτταρα στερούμενα θρεπτικών ουσιών, να καταστρέφονται.



Σχήμα 3: Ιδιότητες καρκινικών κυττάρων.

1.1.5 Γενετική βάση του καρκίνου

Ο καρκίνος είναι το αποτέλεσμα μίας σταδιακής διαδικασίας απορύθμισης γονιδίων τα οποία ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση. Όλοι οι καρκίνοι, παρότι δεν είναι γενετικά όμοιοι, εντούτοις περιλαμβάνουν μια διαταραχή των φυσικών περιοριστικών ορίων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Μεταλλάξεις σε ένα μικρό ποσοστό γονιδίων παρουσιάζονται υπεύθυνες για τις διαταραχές της κυτταρικής συμπεριφοράς σε όλες τις περιπτώσεις καρκίνων (2,3).

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ρυθμίζεται άμεσα ή έμμεσα από μια ομάδα γονιδίων που χωρίζεται σε δύο κατηγορίες:

α) τα γονίδια των οποίων τα προϊόντα διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τα ονομαζόμενα *πρωτοογκογονίδια*, και

β) τα γονίδια των οποίων τα προϊόντα καταστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τα ονομαζόμενα *ογκοκατασταλτικά γονίδια*.

Συγκεκριμένες μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά, που οδηγούν σε συνεχή ενεργοποίηση ενός πρωτοογκογονιδίου ή σε απενεργοποίηση ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου, έχουν σαν αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό

πολλαπλασιασμό.

Τα *πρωτοογκογονίδια* εμπλέκονται στην ρύθμιση της κυτταρικής συμπεριφοράς, και συγκεκριμένα στην ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης, διαφοροποίησης και θανάτου. Κωδικοποιούν για προϊόντα που εμπλέκονται σε ενδοκυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος, εξαρτώμενα από εξωκυτταρικά σήματα που προέρχονται από τα γειτονικά κύτταρα. Στα προϊόντα των πρωτοογκογονιδίων ανήκουν αυξητικοί παράγοντες, υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, G-πρωτείνες, και υποδοχείς κινάσης της τυροσίνης.

Όταν ένα πρωτοογκογονίδιο υπερεκφραστεί ως αποτέλεσμα μιας γενετικής αλλαγής, το κύτταρο οδηγείται σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μια ιδιότητα που χαρακτηρίζει τα καρκινικά κύτταρα. Μόνο το ένα από τα δύο αλληλόμορφα γονίδια χρειάζεται να υποστεί την γενετική αλλαγή ώστε να οδηγηθεί το κύτταρο σε ανυπακοή των περιοριστικών ορίων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Το γενετικά αλλαγμένο ανάλογο ενός πρωτοογκογονιδίου στο κύτταρο ονομάζεται *ογκογονίδιο*.

Η γενετική πληροφορία ενός RNA ιού (ρετροϊός) μπορεί να μετασχηματίσει ένα φυσιολογικό κύτταρο σε καρκινικό και να οδηγήσει στο σχηματισμό αποικιών από συνεχώς αυξανόμενα μετασχηματισμένα κύτταρα. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα παρουσιάζουν ιδιότητες χαρακτηριστικές των καρκινικών κυττάρων που οφείλονται σε ογκογονίδια που φέρει ο ιός στο γονιδιώμα του, αλλά δεν είναι απαραίτητα για την επιβίωση και αναπαραγωγή του ιού. Η ενσωμάτωση του ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή με τη μορφή δίκλωνου DNA, η οποία επιτυγχάνεται με διαδικασίες μετάθεσης μπορεί να έχει σα συνέπεια την αλλαγή των ιδιοτήτων του κυττάρου-ξενιστή και τη μετατροπή του σε καρκινικό. Παραδείγματα ρετροϊών που προκαλούν καρκίνο στον άνθρωπο είναι οι T-λεμφοτροπικοί ιοί (human T-cell leukemia viruses, HTLV-1) και ο ιός HPV.

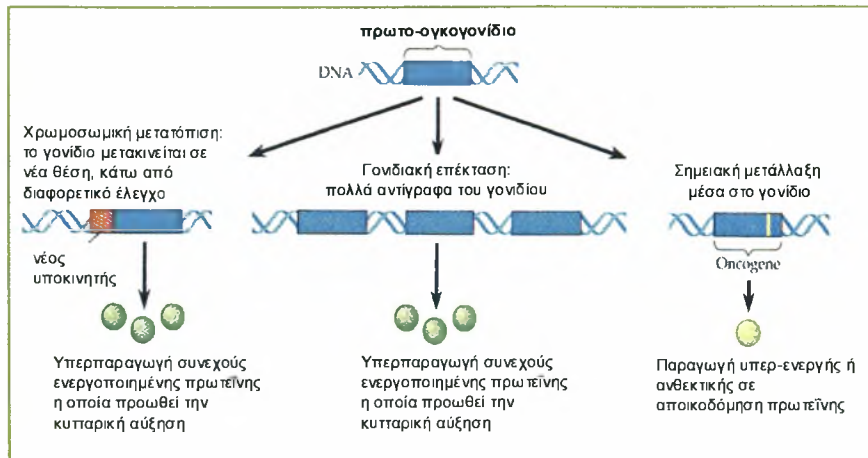
Πειράματα υβριδισμού DNA χρησιμοποιώντας ανιχνευτές DNA από ιικά ογκογονίδια, έδειξαν ότι υπάρχουν ομόλογα γονίδια των ικών ογκογονιδίων σε όλα τα φυσιολογικά κύτταρα. Αυτά είναι τα ονομαζόμενα πρωτοογκογονίδια, όπου κάτω υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν προκαλούν καρκινικό μετασχηματισμό. Τα πρωτοογκογονίδια αυτά, φαίνεται να ενσωματώθηκαν στο ικό γονιδίωμα με τη διαδικασία τους μεταγωγής, και κατά την διάρκεια τους εξέλιξης να υπέστησαν μια γενετική αλλαγή. Τα πρωτοογκογονίδια παρουσιάζουν την κλασική δομή των ευκαρυωτικών γονιδίων, ενώ τα αντίστοιχα ιικά έχουν διατηρήσει μόνο τα εξόνια.

Μέχρι σήμερα έχουν προταθεί ποικίλοι τρόποι όπου ένα πρωτοογκογονίδιο μετατρέπεται σε κυτταρικό ογκογονίδιο. Οι τρόποι αυτοί, χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τους ποσοτικούς και τους ποιοτικούς. Ποιοτικοί, αναφέρονται ως οι τρόποι που οδηγούν σε παραγωγή του συνεχώς ενεργοποιημένου προϊόντος και ποσοτικοί, αυτοί που οδηγούν σε υπερέκφραση του πρωτοογκογονιδίου, δηλαδή σε υπερπαραγωγή του πρωτεϊνικού προϊόντος.

Στην πρώτη κατηγορία εντάσσονται οι *σημειακές μεταλλάξεις*, οι οποίες οφείλονται σε αντικατάσταση, προσθήκη ή έλλειψη βάσεων στην κωδικοποιούσα περιοχή, αλλά και οι *χρωμοσωμικές μετατοπίσεις* που οδηγούν σε συγχώνευση ενός ενεργού μεταγραφικά γονιδίου και του πρωτοογκογονιδίου που τελικά οδηγούν στην συνεχή ενεργοποίηση της χμαιοτικής πρωτεΐνης (Σχήμα 4). Σε πολλές περιπτώσεις καρκίνων παρατηρείται μια σημειακή μετάλλαξη στο πρωτοογκογονίδιο *RAS*, που οδηγεί στην παραγωγή μιας πρωτεΐνης Ras, η οποία αποτυγχάνει να υδρολύσει το συνδεδεμένο σ' αυτήν GTP, και έτσι παραμένει στην ενεργό της κατάσταση, με επακόλουθο αποτέλεσμα την μεταβίβαση ενδοκυτταρικών σημάτων για κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ακόμα και όταν δεν χρειάζεται.

Στη δεύτερη κατηγορία των μοντέλων ενεργοποίησης (ποσοτικός τρόπος ενεργοποίησης) ανήκει η *γονιδιακή επέκταση*, ένας μηχανισμός κατά τον οποίο ο αριθμός των αντιγράφων του πρωτοογκογονιδίου μπορεί να αυξηθεί αρκετές εκατοντάδες φορές, με αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων της αντίστοιχης ογκοπρωτεΐνης, αλλά και οι *μετατροπές στον αριθμό των χρωμοσωμάτων* και οι *χρωμοσωμικές μετατοπίσεις* που μπορεί να τοποθετήσουν το πρωτοογκογονίδιο κάτω από τον έλεγχο ισχυρών υποκινητών ή ενισχυτών του γονιδιώματος, με αποτέλεσμα την υπερέκφρασή του (Σχήμα 4).

Ενώ ένα ογκογονίδιο μπορεί να προκαλέσει καρκινικό μετασχηματισμό και δημιουργία αποικιών σε μια καλλιέργεια φυσιολογικών κυττάρων, εντούτοις σε ένα πολυκύτταρο οργανισμό ένα ογκογονίδιο δεν είναι αρκετό για να προκαλέσει καρκίνο. Ακόμα κι αν ένα ογκογονίδιο προκαλέσει ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τα κύτταρα λόγω ανώμαλης διαίρεσης είναι προγραμματισμένα να πεθάνουν. Από το γεγονός αυτό, συμπεραίνεται η ύπαρξη πολλαπλών μηχανισμών ελέγχου που λειτουργούν παράλληλα σε ένα κύτταρο, ώστε ένα μεταλλαγμένο συστατικό αυτών να μην είναι αρκετό να προκαλέσει κυτταρική διαταραχή.



Σχήμα 4: Τρεις τρόποι όπου ένα πρωτοογκογονίδιο μετατρέπεται σε κυτταρικό ογκογονίδιο.

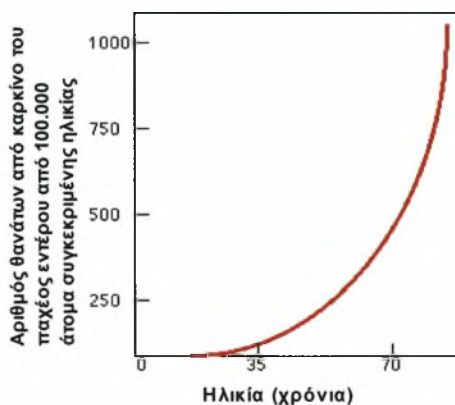
Η μόλυνση του κυττάρου από ένα ρετροϊό οδηγεί σε μετατροπή ενός πρωτοογκογονιδίου σε ογκογονίδιο με τρόπο ανάλογο αυτού των χρωμοσωμικών μετατοπίσεων. Τα πρωτοογκογονίδια οδηγούνται κάτω από τον έλεγχο ιικών υποκινητών και ενισχυτών ή συγχωνεύονται με ένα ιικό γονίδιο, το οποίο υπερεκφράζεται.

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια εμπλέκονται σε επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA, σε μηχανισμούς ελέγχου της σύνδεσης των κυττάρων μεταξύ τους αλλά και με το εξωκυττάριο στρώμα, και σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος που ρυθμίζουν την κυτταρική διαίρεση. Ο ρόλος των ογκοκατασταλτικών γονιδίων στη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης φαίνεται να είναι αντίθετος αυτού των ογκογονιδίων, αφού τα ογκοκατασταλτικά γονίδια εμποδίζουν τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον καρκινικό μετασχηματισμό. Μεταλλάξεις που οδηγούν στην καταστολή της δράσης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, ελευθερώνουν τα κύτταρα από τους αναστολές που φυσιολογικά διατηρούσαν τον αριθμό των κυττάρων σε φυσιολογικά επίπεδα.

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια προωθούν τον καρκινικό μετασχηματισμό μόνο με την απουσία ή απενεργοποίηση και των δύο αλληλομόρφων γονιδίων. Οι μεταλλάξεις των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι δηλαδή υπολειπόμενες σ' αντίθεση με τις μεταλλάξεις των πρωτοογκογονιδίων που είναι επικρατείς. Είναι πολύ σπάνιο να συμβούν στο ίδιο κύτταρο δύο μεταλλάξεις που να απενεργοποιούν και τα δύο αντίγραφα του γονιδίου. Ακόμα κι αν και τα δύο αλληλόμορφα γονίδια υποστούν μια γενετική αλλαγή, το γεγονός αυτό δεν είναι από μόνο του αρκετό για να προκαλέσει καρκίνο. Ποικίλα, τυχαία και ανεξάρτητα γενετικά γεγονότα πρέπει να συμβούν στο ίδιο κύτταρο ώστε να προκαλέσουν κακοήγη μετασχηματισμό.

1.2 Ορθοκολικός καρκίνος στον άνθρωπο

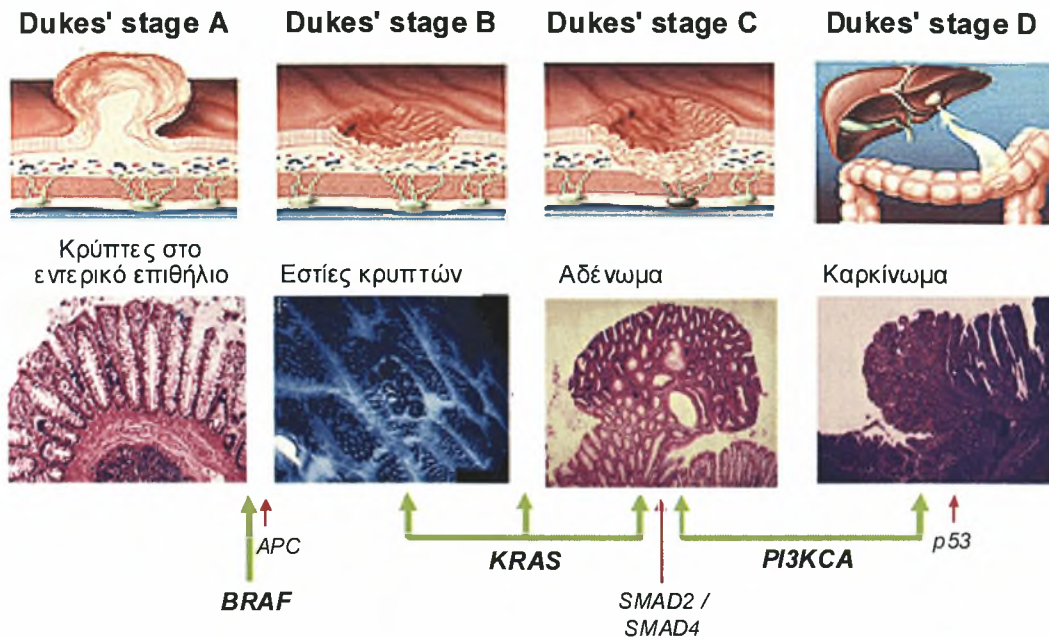
Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί μια από τους κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Στις Ηνωμένες Πολιτείες και στη δυτική Ευρώπη αναφέρονται τα περισσότερα κρούσματα ορθοκολικού καρκίνου. Η μέση πιθανότητα ανάπτυξης ορθοκολικού καρκίνου είναι 5% των περιπτώσεων καρκίνου, αλλά η πιθανότητα αυτή αυξάνει δραματικά με την ηλικία του οργανισμού (Σχήμα 5).



Σχήμα 5: Τα ποσοστά εμφάνισης ορθοκολικού καρκίνου αυξάνονται εκθετικά με την ηλικία.

Ο ορθοκολικός καρκίνος αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα της πολυσταδιακής εξέλιξης του καρκίνου και παρέχει ένα σύστημα-μοντέλο για τη μελέτη της εξέλιξης του καρκίνου. Στις περισσότερες περιπτώσεις σποραδικού καρκίνου του παχέος εντέρου, η ασθένεια είναι το αποτέλεσμα της εξέλιξης του αρχικού αδενώματος. Ταυτοποίηση των γενετικών ανωμαλιών που συσσωρεύονται σταδιακά έχει οδηγήσει στον προσδιορισμό του καλά μελετημένου μοντέλου αδενώματος-καρκινώματος, χαρακτηρισμένο αρχικά από τους Fearon και Vogelstein (3). Το μοντέλο συσχετίζει συγκεκριμένα γενετικά γεγονότα με χαρακτηριστικές ιστοειδικές αλλαγές (Σχήμα 6). Η προαγωγή από το κανονικό επιθήλιο μέσω του αδενώματος προς το καρκίνωμα χαρακτηρίζεται από συσσωρευμένες αλλοιώσεις σε συγκεκριμένα γονίδια. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία εξαλλαγμένων κυττάρων τα οποία είναι ικανά να διεισδύουν σε γύρω ιστούς και να μεταναστεύουν. Παράγοντες που ενοχοποιούνται για τον καρκίνο του παχέος εντέρου είναι η ηλικία, η διατροφή, οι πολύποδες, το βεβαρημένο προσωπικό και οικογενειακό ιστορικό, το κάπνισμα, η παχυσαρκία, η έλλειψη φυσικής άσκησης

και η κληρονομικότητα.



Σχήμα 6: Το πολυσταδιακό σύστημα της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου.

Διαδοχή σταδίων η οποία ξεκινά από το πρώτο αδένωμα και εξελίσσεται μέχρι το καρκίνωμα, περνώντας μέσα από μία σειρά γενετικών εξαλλαγών στις οποίες περιλαμβάνεται η ενεργοποίηση του γονιδίου *RAS*. Η μεταλλαγή στο ογκογονίδιο *RAS* εμφανίζεται πιο συχνά σαν ένα πρώτο γεγονός το οποίο συμβαίνει στο υπερπλαστικό επιθήλιο, ακολουθώντας την απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *APC* (Adenomatous Polyposis Coli). Το αρχικό αδένωμα εξελίσσεται τελικά σε καρκίνο επειδή κάποιο από τα κύτταρά του συσσωρεύσει επαρκή αριθμό μεταλλαγών (όπως στα γονίδια *BRAF* και *PI3KCA*) ώστε να αποκτήσει την ικανότητα μετάστασης και διεξόδου σε υγιείς ιστούς.

1.2.1 Μεταλλαγές σε βασικά ογκογονίδια στον καρκίνο του παχέος εντέρου- τα *Ki-RAS* και *BRAF* ογκογονίδια.

- Η πρώτη γενετική εξαλλαγή στην εξελικτική διαδικασία που οδηγεί στην ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι η μεταλλαγή ή/ και απώλεια του ογκοκατασταλτικού γονιδίου adenomatous polyposis coli (*APC*). Το γεγονός αυτό, οδηγεί στην αύξηση του ρυθμού της κυτταρικής διαίρεσης σε σχέση με το ρυθμό του κυτταρικού θανάτου, χωρίς να επηρεάζει τους μηχανισμούς διαφοροποίησης του κυττάρου ή να οδηγεί σε ιστολογικές διαφοροποιήσεις (5,6). Περισσότερο από το 70% των περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου περιλαμβάνουν ελλείψεις ή μεταλλάξεις απενεργοποίησης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *APC*, γεγονός που οδηγεί στη σύνδεση του γονιδίου αυτού με την ανάπτυξη του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου. Οι γενετικές αλλαγές που συμβαίνουν στο γονίδιο αυτό φαίνεται να

σχετίζονται με την ανάπτυξη καλοηθών πολυπόδων παρά με την πρόοδο σε περισσότερο καρκινικά στάδια.

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *APC* εδράζεται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 5 στον άνθρωπο και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 310kDa, η οποία φέρει περιοχές σύνδεσης για τις β-κατενίνη, γ-κατενίνη, αξίνη και τουμπουλίνη. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *APC* οδηγούν στον μη σχηματισμό του συμπλόκου APC - β-κατενίνης, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση των κυτταρικών επιπέδων της β-κατενίνης. Η σύνδεση του γονιδίου *APC* με τη β-κατενίνη οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο *APC* εμπλέκεται σε μηχανισμούς που ελέγχουν τις θέσεις σύνδεσης του κυττάρου με τα γειτονικά κύτταρα. Σημαντικός φαίνεται να είναι ο ρόλος της πρωτεΐνης APC στην μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων μέσω της ρύθμισης του κυτταροσκελετού. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από την παρουσία της πρωτεΐνης APC στα άκρα των μικροσωληνίσκων (7,8).

- Οι μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *P53* είναι σπάνιες σε αδενωματικούς πολύποδες αλλά συνήθεις σε κακοήθεις όγκους που αναπτύσσονται από αυτούς. Η απουσία της λειτουργίας της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης *P53* εξαιτίας γενετικών βλαβών επιτρέπει στο κύτταρο όχι μόνο να πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα, αλλά και να συσσωρεύει επιπλέον μεταλλάξεις σε μεγάλο βαθμό και είναι πιθανό να συμβαίνει πριν τη μετάσταση.
- Μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο *RAS* συμβαίνουν συχνά σε ένα από τα αρχικά κύτταρα του νεοσχηματιζόμενου όγκου και οδηγούν σε περαιτέρω κλωνική εξάπλωση (2). Οι πρωτεΐνες Ras προσδένουν κυρίως τρεις κατηγορίες μορίων-στόχων: κινάσες της οικογένειας Raf, κινάσες φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI-3K) και πρωτεΐνες RalGDS. Όσο αφορά στο ποιο από τα τρία μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τις παραπάνω προσδέσεις είναι πιο βασικό για τον ογκογονικό μετασχηματισμό που επάγεται από το *RAS*, έχει προταθεί ότι τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται από το *RAS* αλληλεπιδρούν συνεργιστικά, τουλάχιστον σε πρότυπα κυτταρικού μετασχηματισμού σε κυτταροκαλλιέργειες (9).

Μελέτη της ανάλυσης μεταλλαγών σε ανθρώπινους καρκίνους παχέος εντέρου εντόπισε μεταλλαγές στο ογκογονίδιο *RAS* σε 11 από 27 όγκους που αναλύθηκαν, ενώ σε 10 από τις 11 περιπτώσεις οι μεταλλαγές εντοπίστηκαν στο γονίδιο *Ki-RAS* και 9 από αυτές στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου. Επιπλέον, σε 5 από τους 6 όγκους με μεταλλαγή στο ογκογονίδιο *RAS*, η ίδια μεταλλαγή βρέθηκε τόσο σε

αδενώματα (πρώιμα στάδια του όγκου) όσο και σε καρκινώματα (πλήρως μετασχηματισμένοι όγκοι), προτείνοντας ότι η μεταλλαγή είναι υπεύθυνη για την εξέλιξη του όγκου. Επίσης, η παρατήρηση αυτή συσχετίστηκε με το γεγονός ότι οι περισσότεροι ορθοκολικοί καρκίνοι προκύπτουν από πρώιμα αδενώματα και ότι οι μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο *RAS* προηγούνται συνήθως της εξέλιξης ενός καρκινώματος από ένα προϋπάρχον αδένωμα και ως εκ τούτου πιθανώς το ογκογονίδιο *RAS* να εμπλέκεται στα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης στο ανθρώπινο παχύ έντερο (10). Ακολούθησαν επιπρόσθετες μελέτες οι οποίες ανέδειξαν τις μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο *Ki-RAS* ως τις πιο συχνά απαντώμενες στον καρκίνο του παχέος εντέρου, και ιδιαίτερα αυτές που συμβαίνουν στα κωδικόνια 12, 13 και 61 (2) (Πίνακας 1).

Μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRAF* εμφανίζονται επίσης σε αρκετά μεγάλο ποσοστό περιπτώσεων ορθοκολικού καρκίνου. Μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό αποσταθεροποιούν τις φυσιολογικές αλληλεπιδράσεις του γονιδίου και καταστρέφουν τις ανενεργές μορφές του. Περισσότερες από 40 μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο έχουν εντοπισθεί, οι μισές από τις οποίες (περιλαμβάνοντας τη *BRAF-V599E*) έχει βρεθεί ότι έχουν υψηλή ενεργότητα κινάσης. Είναι ενδιαφέρον ότι η πλειοψηφία των μεταλλάξεων αυτών μπορεί να ενεργοποιεί την ERK με την ίδια ισχύ μέσω ενεργοποίησης του *CRAF*. Ο μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει αυτό δεν είναι γνωστός, παρόλο που έχει δειχθεί ότι οι *BRAF* και *CRAF* σχηματίζουν ετεροδιμερή (11). Οι μεταλλάξεις στα ογκογονίδια *BRAF* και *RAS* φαίνεται πως η μία αποκλείει την εμφάνιση της άλλης, καθώς δεν έχουν βρεθεί να συνυπάρχουν σε κανέναν τύπο καρκίνου (12).

		κωδικόνιο	
		12	61
Ha-RAS-1	Φυσιολογικό	gly	gln
	καρκίνος αίματος	val	
	καρκίνος πνεύμονα		leu
	καρκίνος μαστού	asp	
Ki-RAS-2	Φυσιολογικό	gly	gln
	καρκίνος πνεύμονα	arg	
	καρκίνος πνεύμονα	cys	
	καρκίνος πνεύμονα	lys	
	καρκίνος πνεύμονα		his
	καρκίνος παχέος εντέρου	val	
	καρκίνος αίματος	arg	
	νευροβλάστωμα	cys	
N-RAS	Φυσιολογικό	gly	gln
	νευροβλάστωμα		lys
	τερατοκαρκίνωμα	asp	
	ινοσάρκωμα		lys
	μελάνωμα		lys
	καρκίνος πνεύμονα		arg
	λευχαιμία	asp	
	ραβδομυοσάρκωμα		his

Πίνακας 1: Μεταλλάξεις σε γονίδια *RAS* σε ανθρώπινους καρκίνους

1.3 Καρκίνος και χημειοπροστασία

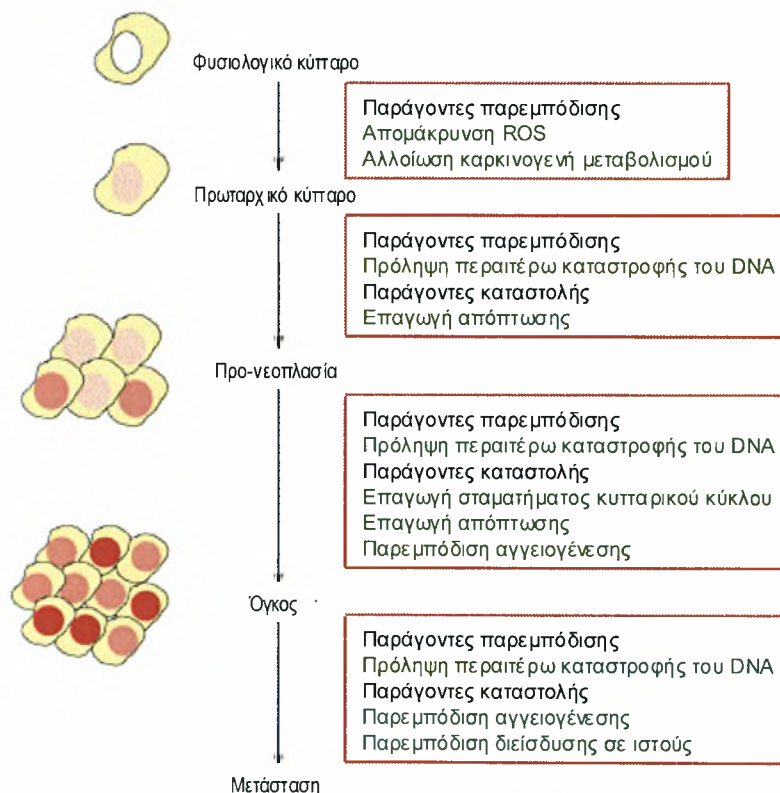
Καθώς η εξερεύνηση και κατανόηση όσον αφορά στις διαδικασίες που εμπλέκονται στην εξέλιξη του καρκίνου και στην πολυπλοκότητα των μηχανισμών μεταγωγής σημάτων βελτιώνονται συνεχώς, το ενδιαφέρον έχει ξεκινήσει να στρέφεται στη μελέτη και τον προσδιορισμό διαδικασιών που μπορούν να προλάβουν ή να καθυστερήσουν τη διαδικασία του ογκογονικού μετασχηματισμού. Παρόλο που ένα μεγάλο κομμάτι της έρευνας έχει ασχοληθεί με τη δημιουργία φαρμάκων που στοχεύουν μόρια-κλειδιά, υπεύθυνα για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, συστατικά της καθημερινής διατροφής επιδεικνύουν τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες. Εξάλλου, έχει προταθεί ότι η υιοθέτηση μιας σωστής διατροφής σε συνδυασμό με τη διατήρηση της φυσικής κατάστασης και σωστού βάρους θα μπορούσαν να μειώσουν το ενδεχόμενο εμφάνισης καρκίνου κατά 30-40% (13).

Η διαπίστωση ότι η διατροφή μπορεί να επιδρά τόσο σημαντικά στην υγεία και, ακόμα πιο συγκεκριμένα, στην καρκινογένεση, είναι το αποτέλεσμα συνδυασμού επιδημιολογικών μελετών και βασικής έρευνας (14). Συστατικά της καθημερινής διατροφής όπως φρούτα, λαχανικά, δημητριακά και όσπρια περιέχουν, εκτός από βιταμίνες και μεταλλικά ιόντα, μικροστοιχεία τα οποία χαρακτηρίζονται ως «βιολογικά ενεργά» (15). Ωστόσο, η εκτίμηση της πραγματικής επίδρασης των συστατικών αυτών στην ανθρώπινη υγεία δεν είναι πάντα εύκολη. Για παράδειγμα, σε πολλές περιπτώσεις η ακριβής σύσταση των τροφίμων σε τέτοια ενεργά μόρια δεν είναι γνωστή. Επιπλέον, το περιεχόμενο σε ωφέλιμα συστατικά ποικίλλει ανάλογα με το είδος, τις συνθήκες ανάπτυξης και φύλαξης του προϊόντος και τη διαδικασία προετοιμασίας του για κατανάλωση. Κλινικές δοκιμές που να επιχειρούν να συσχετίσουν τη διατροφή με την πρόληψη συγκεκριμένου τύπου καρκίνου είναι δύσκολο να πραγματοποιηθούν, εξαιτίας του κόστους, της μακράς διάρκειας που απαιτείται και το μεγάλο αριθμό συμμετεχόντων που θα απαιτούνταν ώστε τα αποτελέσματα της μελέτης να είναι στατιστικά σημαντικά. Τα ζωικά μοντέλα παρέχουν τη δυνατότητα μελέτης του ευεργετικού ρόλου συγκεκριμένων τροφών ή μεμονωμένων συστατικών. Ωστόσο, καθώς *in vitro* μελέτες έχουν αρχίσει να εντοπίζουν μόρια-στόχους τα οποία μπορούν να τροποποιούνται από συστατικά της

διατροφής μέσα σε καρκινικά κύτταρα, μικρές κλινικές έρευνες στις οποίες η κατανάλωση συγκεκριμένης τροφής να συσχετίζεται με επίδραση σε συγκεκριμένους δείκτες γίνονται περισσότερο εφικτές.

1.3.1 Επίπεδα αναστολής της καρκινογένεσης

Το πρότυπο κατά Fearon και Vogelstein, το οποίο περιγράφει τη διαδικασία κατά την οποία ένα φυσιολογικό κύτταρο αποκτά μετασχηματισμένο φαινότυπο μέσα από μία πολυσταδιακή διαδικασία συσσώρευσης μεταλλάξεων και αλλαγής ιδιοτήτων, παρέχει επιπλέον ένα μοντέλο που παρουσιάζει επίπεδα μεσολάβησης των χημειοπροστατευτικών ουσιών (Σχήμα 7). Οι ουσίες αυτές θα μπορούσαν να επιβραδύνουν ή να ανατρέψουν πλήρως τη διαδικασία του κυτταρικού μετασχηματισμού (15).



TRENDS in Molecular Medicine

Σχήμα 7: Επίπεδα αναστολής της καρκινογένεσης.

Η έννοια της χημειοπροστασίας μπορεί να αναφέρεται: Στην αποφυγή της διαδικασίας σε ένα αρχικό στάδιο, με το να προλαμβάνει τη δημιουργία προ-νεοπλαστικών σχηματισμών, αλλά και τη στόχευση μορίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση ή την κυτταρική αθανατοποίηση. Προσαρμογή από *Manson M., Trends Mol Med 2003, 9 (11-18)*.

Τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου διατροφικού παράγοντα εξαρτώνται πιθανώς από τον κυτταρικό τύπο και διαφέρουν ανάλογα με τη δόση. Ωστόσο, έχουν περιγραφεί διάφοροι μηχανισμοί μέσω των οποίων μπορούν τα συστατικά αυτά να μεσολαβούν. Για παράδειγμα: (α) αλλαγή σε μονοπάτια μεταγωγής σημάτων των MAPK (mitogen-activated protein kinase), [ERK (extracellular-signal regulated kinase), JNK (JUN N-terminal kinase και p38], των PI-3K (phosphoinositide-3-kinase) και PKB (protein kinase B), (β) τροποποίηση της ενεργότητας μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο AP-1 (activator protein-1), NF-κB (nuclear factor κB) και (γ) τροποποίηση μορίων –κλειδιών που εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση (Ras πρωτεΐνες, μέλη της οικογένειας Bcl-2).

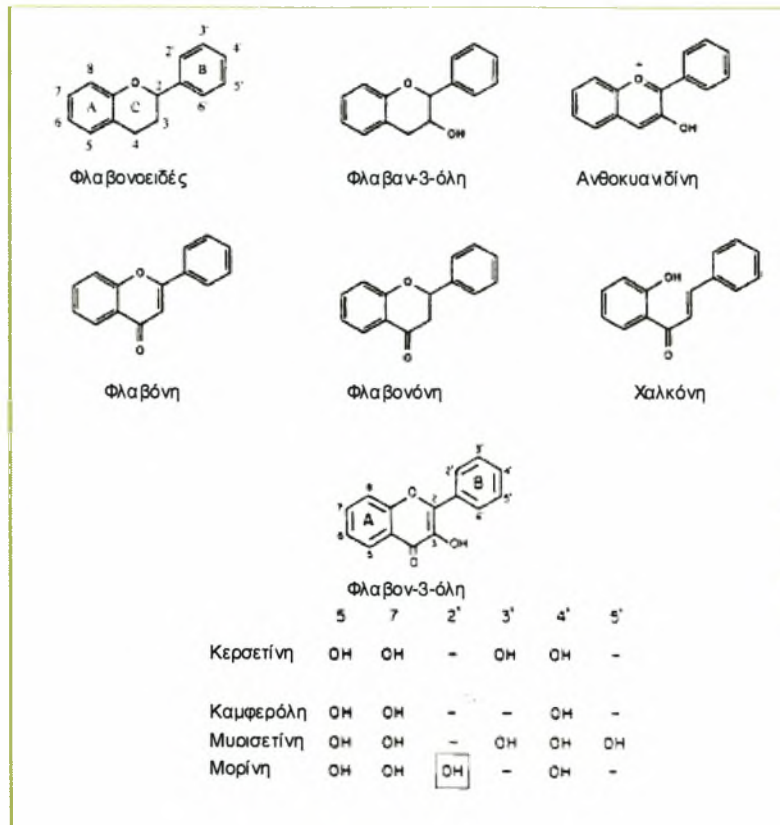
Παρεμπόδιση της έναρξης- Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος πρόληψης του καρκίνου είναι η παρεμπόδιση της έναρξης, ίσως και η αποτροπή δημιουργίας νεοπλαστικών σχηματισμών. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με την πρόληψη της δημιουργίας βλάβης στο DNA που προκαλείται από καρκινογόνα ή ROS (reactive oxygen species). Έτσι, ο μεταβολισμός των προκαρκινικών μορίων θα μπορεί να αλλάξει έτσι ώστε αυτά να μη μετατραπούν σε καρκινικά ή να απομακρυνθούν ασφαλώς από το κύτταρο (16,17).

Παρεμπόδιση του κυτταρικού μετασχηματισμού και της εξέλιξης της καρκινογένεσης- Φαίνεται αδύνατο να μπορούσαν σε όλες τις περιπτώσεις να προληφθούν όλα τα γεγονότα που σχετίζονται με την έναρξη. Δεδομένου ότι η καρκινογένεση είναι μία πολυσταδιακή διαδικασία η οποία συχνά προχωρά αργά στα πρώιμα στάδια, υπάρχει πιθανότητα να σταματήσει ή να καθυστερήσει. Επειδή η δημιουργία όγκων είναι το αποτέλεσμα μιας ανισορροπίας ανάμεσα σε διαδικασίες κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αποπτωτικών διαδικασιών, οποιοσδήποτε μηχανισμός ο οποίος σταματά ή καθυστερεί τη μη ελεγχόμενη κυτταρική διαίρεση ή ο οποίος οδηγεί σε απόπτωση τα αλλοιωμένα κύτταρα έχει πιθανότητες να αποβεί χρήσιμος (18–22). Επομένως, αποτελεσματικοί χημειοπροστατευτικοί παράγοντες θα μπορούσαν να στοχεύουν μόρια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση ή την κυτταρική γήρανση. Σημαντικό στην όλη διαδικασία είναι οι παράγοντες αυτοί να μπορούν να μην επηρεάζουν τα φυσιολογικά κύτταρα. Σε περισσότερο προχωρημένα στάδια της ογκογένεσης, αποτελεσματική θα ήταν η παρεμπόδιση της αγγειογένεσης ή η πρόληψη τους απομάκρυνσης των μετασχηματισμένων κυττάρων

από την αρχική τους τοποθεσία και της διεύθυνσής τους σε γειτονικούς ιστούς.

1.3.2 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις που εντοπίζονται σε φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, καθώς και στο πράσινο τσάι και το κόκκινο κρασί και είναι άφθονες στην ανθρώπινη διατροφή ως ακέραια συστατικά. Περισσότερα από 4.000 δομικά διαφορετικά φλαβονοειδή έχουν εντοπισθεί σε διάφορα φυτά (23). Αυτά τα χαμηλού μοριακού βάρους συστατικά είναι φαινολοβενζοπυρένια με μία βασική δομή ενός πυρήνα που αποτελείται από τρεις δακτυλίους. Με βάση τις πλευρικές ομάδες τους, διακρίνονται συνήθως σε φλαβονόλες, ανθοκυανιδίνες, φλαβόνες, φλαβονόνες και χαλκόνες (Σχήμα 8, Πίνακας 2). Η βασική αυτή δομή αποτελείται από δύο βενζοϊκούς δακτυλίους (Α και Β) οι οποίοι συνδέονται μέσω ενός ετεροκυκλικού πυρανικού ή πυρονικού δακτυλίου (C) στο μέσο (Σχήμα 8). Η υποδιαίρεση αυτή βασίζεται πρωταρχικά στην παρουσία ή απουσία διπλού δεσμού στη θέση 4 του C δακτυλίου (μέσο), την παρουσία ή απουσία διπλού δεσμού ανάμεσα στα 2- και 3- άτομα άνθρακα του C δακτυλίου και την παρουσία υδροξυλομάδων στο δακτύλιο Β. Οι προσπάθειες προσδιορισμού των περιεκτικοτήτων των διάφορων φλαβονοειδών στα φυτά που καταναλώνονται έχουν βοηθήσει τους επιστήμονες στην εκτίμηση του αν οι ποσότητες που καταναλώνονται φτάνουν σε ικανοποιητικά επίπεδα. Ωστόσο, αυτό ποικίλλει στις διάφορες χώρες, αν και η μεσογειακή διατροφή κατέχει κυρίαρχη θέση, εξαιτίας των υψηλών επιπέδων κατανάλωσης ελαιόλαδου, εσπεριδοειδών και πράσινων λαχανικών.



Σχήμα 8: Χημικές δομές γνωστών φλαβονοειδών.

Στο κάτω μέρος φαίνεται η γενική δομή των φλαβον-3-ολών και οι θέσεις των υδροξυλομάδων του Β-δακτυλίου γνωστών συστατικών. Προσαρμογή από *Middleton et al., Pharm Rev 2000, 52 (673-751)*.

τάξη	φλαβονοειδή	υποκατάστατα					
		α	β	γ	δ'	ε'	ς'
Φλαβον-3-όλες Ανθοκυανιδίνες	(+)- Κατεχίνη	OH	OH	OH	OH	OH	H
	Κυανιδίνη	OH	OH	OH	OH	OH	H
	Πελαργονιδίνη	OH	OH	OH	OH	H	H
Φλαβόνες	Απιγενίνη	H	OH	OH	H	OH	H
	Διοσμίνη	H	OH	OH	OH	OH	H
	Λουτεολίνη	H	OH	OH	OH	OH	H
Φλαβονόλες	Ναριγενίνη	H	OH	OH	H	OH	H
	Ναριγίνη	H	OH	OH	H	OH	H
	Εσπερετίνη	H	OH	OH	OH	OH	H
Χαλκόνες	Εσπερεδίνη	H	OH	OH	OH	OH	H
	Φλορετίνη	OH (2)ᵃ	OH (4)	OH (6)	H	H	OH (6')
	Φλοριδζίνη	Og1 (2)	H (4)	OH (6)	H	H	OH (6')
Φλαβον-3-όλες	Κερσετίνη	OH	OH	OH	H	OH	H
	Καμπερόλη	OH	OH	OH	H	OH	H
	Μυισετίνη	OH	OH	OH	OH	OH	OH
	Φισετίνη	OH	H	OH	OH	OH	H
	Μορίνηᵇ	OH	OH	OH	H	OH	H

ᵃ Οι αριθμοί στην παρένθεση δείχνουν επιπρόσθετο παρόμοιο υποκατάστατο στη θέση που δείχνει το νούμερο
ᵇ Η μορίνη έχει ακόμα ένα υδροξύλιο στη θέση 2'

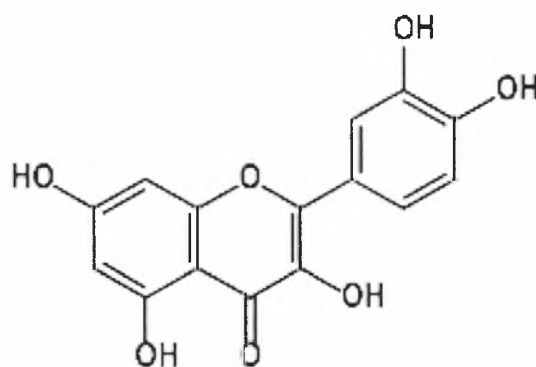
Πίνακας 2: Παραδείγματα υποκατηγοριών φλαβονοειδών στη φύση

Προσαρμογή από *Middleton et al., Pharm Rev 2000, 52 (673-751)*.

1.3.3 Κερσετίνη

Η κερσετίνη (3,3',4',5,7-πενταϋδροξυφλαβόνη) ανήκει σε μία εκτεταμένη ομάδα πολυφαινολικών φλαβονοειδών συστατικών άφθονων σε φυτά και πηγές τροφής που προέρχονται από φυτά. Συνήθως η κερσετίνη εμφανίζεται ως γλυκοζίτης, όπως η μορφή ρουτίνη, στην οποία το υδρογόνο της 4^{ης} υδροξυλομάδας αντικαθίσταται από έναν δισακχαρίτη.

Η κερσετίνη αποτελεί το κύριο βιοφλαβονοειδές της ανθρώπινης διατροφής. Ο χαρακτηρισμός τους ως αντιοξειδωτικός παράγοντας προκύπτει από αλληλεπίδραση της πολυφαινόλης με ελεύθερες ρίζες προς σχηματισμό φαινοξυ-ενώσεων οι οποίες είναι λιγότερο δραστικές.



Σχήμα 9: Χημική δομή της κερσετίνης

1.3.3.1 Βασικοί μηχανισμοί δράσης της κερσετίνης

Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα γύρω από την κερσετίνη έχει στραφεί στην ιδιότητά της ως αντικαρκινικό παράγοντα. Έχουν εντοπισθεί μοριακοί μηχανισμοί οι οποίοι ρυθμίζονται από την κερσετίνη και σε αυτούς περιλαμβάνονται:

Η παρεμπόδιση της έκφρασης του ογκογονιδίου P53- Σε ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του μαστού, η κερσετίνη μπορεί να μειώνει τα επίπεδα της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης P53 σε σχεδόν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα (24). Η μείωση αυτή της έκφρασης του ογκογονιδίου βρέθηκε ότι σταματά τον κυτταρικό κύκλο στη G1/M

φάση και εντοπίστηκε λιγότερο έντονα σε κύτταρα με φυσιολογικό, άγριου τύπου γονίδιο *P53* (25).

Το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου- Το σημείο ελέγχου G1 του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται έντονα από το γονίδιο *P53* και είναι βασικό σημείο ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η κερσετίνη έχει βρεθεί ότι σταματά τα T-λευχαιμικά κύτταρα στο τέλος τους G1 φάσης, κάτι το οποίο γίνεται εμφανές και στα καρκινικά κύτταρα στομάχου (26). Επιπλέον, σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου προκαλούμενο από την κερσετίνη έχει δείχθει και στη G2/M φάση σε καρκινικά κύτταρα στήθους και λάρυγγα.

Αναστολή κινασών τυροσίνης- Οι κινάσες τυροσίνης αποτελούν οικογένεια πρωτεϊνών που εντοπίζεται μέσα ή κοντά στην κυτταρική μεμβράνη και εμπλέκεται στη μεταγωγή σημάτων από υποδοχείς αυξητικών παραγόντων στον πυρήνα. Η έκφραση των κινασών τυροσίνης θεωρείται ότι εμπλέκεται στην ογκογένεση, μέσω της ιδιότητας των κινασών να εμποδίζουν το φυσιολογικό έλεγχο της ανάπτυξης. Φάρμακα τα οποία στοχεύουν την ενεργότητα των κινασών τυροσίνης θεωρούνται πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες οι οποίοι δεν προκαλούν τις παρενέργειες που εμφανίζονται κατά την τυπική χημειοθεραπεία. Σε ασθενείς με προχωρημένες μορφές καρκίνου, ενδοφλέβια χορήγηση κερσετίνης οδήγησε, μέσα σε μία ώρα, σε μείωση των επιπέδων κινασών τυροσίνης σε λεμφοκύτταρα σε 9 από τους 11 περιπτώσεις. Τα αποτελέσματα αυτά έχουν επιβεβαιωθεί από *in vitro* πειράματα, τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε μετασχηματισμένα κύτταρα αρουραίου (27).

Ικανότητα πρόσδεσης των υποδοχέων οιστρογόνων- Παρόλο που ο ERII (type-II estrogen receptor) δεν προσδένει οιστρογόνα *in vitro*, είναι πιθανό οι θέσεις αυτές να είναι κατειλημμένες από κάποιον άλλο συνδέτη. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι οι θέσεις πρόσδεσης του ERII προορίζονται για φλαβονοειδούς δομής υπόστρωμα με ικανότητα παρεμπόδισης κυτταρικής αύξησης (28). Η κερσετίνη έχει δείχθει να επάγει την έκφραση του ERII τόσο σε θετικά (ER+) όσο και σε αρνητικά (ER-) για τον υποδοχέα ER I κύτταρα καρκίνου στήθους. Η επαγωγή της έκφρασης του ERII επιτρέπει γρηγορότερη παρεμπόδιση της αύξησης των ER-κυττάρων μετά από επώαση με κερσετίνη (29).

Παρεμπόδιση της έκφρασης των πρωτεϊνών του θερμικού σοκ- Έχει βρεθεί ότι η κερσετίνη εμποδίζει την παραγωγή πρωτεϊνών του θερμικού σοκ σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές, περιλαμβάνοντας λευχαιμικές, καρκίνου στήθους και

καρκίνου του παχέος εντέρου (30–32). Οι πρωτεΐνες του θερμικού σοκ σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα με το μεταλλαγμένο P53, το οποίο επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να παρεκκτρέπουν από τους φυσιολογικούς μηχανισμούς του σταματήματος του κυτταρικού κύκλου.

Μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών Ras - 10μM κερσετίνης μπορούν να εμποδίσουν την έκφραση των ογκογονιδίων p-21RAS σε καρκινικές σειρές ανθρώπινου παχέος εντέρου (33).

In vivo μελέτες- Μελέτες σε ζωικά συστήματα καρκινογένεσης έχουν αναδείξει την αντικαρκινική δράση της κερσετίνης. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι κατανάλωση κερσετίνης εμπόδισε την επαγόμενη από το αζοξυμεθάνιο αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού και την τοπική δυσπλασία σε ποντίκια (34). Η κερσετίνη επίσης ελάττωσε την εμφάνιση όγκων κατά 76%. Ωστόσο, η κερσετίνη δεν εμπόδισε τη δημιουργία όγκων σε ποντίκια APC^{min} (35). Επιπλέον, παρόλο που η κερσετίνη εμπόδισε την τοπική, επαγόμενη από UVB ανοσοκαταστολή σε SKH-1 ποντίκια χωρίς τρίχωμα δεν επέδρασε στην καρκινογένεση του δέρματος (36). Η κερσετίνη επίσης εμπόδισε την επαγόμενη από τη Ν-νιτροζοδιαιθυλαμίνη καρκινογένεση του πνεύμονα σε ποντίκια όταν χορηγήθηκε κατά τη διάρκεια της φάσης έναρξης (37).

Μέχρι τώρα, η κερσετίνη έχει χρησιμοποιηθεί στη φάση-I κλινικών δοκιμών σε ασθενείς με προχωρημένες μορφές καρκίνου που σταμάτησαν να είναι δεκτικοί σε χημειοθεραπείες. Σε ασθενή με ηπατοκαρκίνωμα παρουσιάστηκε πτώση στα επίπεδα της άλφα-φετοπρωτεΐνης και της αλκαλικής φωσφατάσης κατά τη διάρκεια ή μετά από χορήγηση 4 χαμηλών δόσεων (60mg/m²) κερσετίνης για 3 εβδομάδες. Ασθενής με καρκίνο ωοθηκών σταδίου-4 ο οποίος δεν αποκρινόταν σε 6 δόσεις χημειοθεραπείας με κυκλοφωσφαμίδιο/cis-πλατίνα έδειξε πτώση στον καρκινικό δείκτη CA125 από τις 290 στις 55 μονάδες/ml μετά από 2 ενδοφλέβιες θεραπείες με κερσετίνη (240mg/m²) μετά από 3 εβδομάδες. Στη φάση-I κλινικών δοκιμών, οι ερευνητές εξετάζουν κυρίως τη φαρμακοκινητική και την τοξικότητα της ουσίας (38).

1.4 Συνδυασμοί φαρμάκων

Υπάρχουν αρκετοί τύποι καρκίνου οι οποίοι είναι θεραπεύσιμοι και επιρρεπείς στην απόπτωση, όπως κάποιες λευχαιμίες, χοριοκαρκινώματα, καρκίνοι των όρχεων και όγκοι του Wilm (39–42). Οι όγκοι αυτοί, σε απόκριση χημειοθεραπευτικών παραγόντων οδηγούνται σε γρήγορη απόπτωση. Ωστόσο, οι πιο κοινοί τύποι καρκίνου δεν είναι εύκολο να οδηγηθούν σε απόπτωση ή γήρανση ή να παρεμποδιστεί η αύξησή τους και επομένως είναι ανθεκτικοί στη χημειοθεραπεία (1,43). Δηλαδή, παρόλο που η απόπτωση είναι στόχος της καρκινικής θεραπείας (44,45), η αποφυγή της απόπτωσης είναι χαρακτηριστική ιδιότητα των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, το δυναμικό πολλών θεραπευτικών προσεγγίσεων έγκειται στην ικανότητα της επιλεκτικής παρεμπόδισης αντιαποπτωτικών μονοπατιών, αντιαγγειογενετικής δράσης ή επιλεκτικής δράσης σε ιστούς. Η δράση ενός μόνο φαρμάκου μπορεί να έχει πολύ μικρό ή κανένα αποτέλεσμα στα παραπάνω, έτσι προκύπτει η ανάγκη για συνδυασμούς φαρμάκων, προκειμένου να ικανοποιούνται οι επικαλυπτόμενες ή συμπληρωματικές προσεγγίσεις που προαναφέρθηκαν. Ακόμα πιο σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι δόσεις των φαρμάκων που απαιτούνται για την επαγωγή της απόπτωσης στους ανθεκτικούς καρκίνους παρουσιάζουν αρκετά αυξημένη κυτταροτοξικότητα ακόμα και σε φυσιολογικούς ιστούς και, συνεπώς, ένα μεγάλο αριθμό από παρενέργειες. Για να εξασφαλιστεί ο επιλεκτικός θάνατος των καρκινικών κυττάρων, θα μπορούσαν να συνδυαστούν παράγοντες που επάγουν απόπτωση ή κυτταρική γήρανση με παράγοντες που παρεμποδίζουν την απόπτωση (προκειμένου να προστατευτούν τα φυσιολογικά κύτταρα), αναστολείς μεταγωγής κυτταρικών σημάτων με χημειοθεραπεία εξαρτώμενη από τον κυτταρικό κύκλο, αγγειογενετικοί παράγοντες με αναστολείς του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα HIF-1 (hypoxia inducible factor-1), ιστοειδική θεραπεία με παράγοντες διαφοροποίησης, ενεργοποιητές των υποδοχέων θανάτου με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Θεωρητικά, συνεχής χρήση των παραγόντων αυτών θα μπορούσε να βοηθήσει στον έλεγχο του καρκίνου.

1.4.1 Ογκογονική ανθεκτικότητα και επανενεργοποίηση αποπτωτικών μονοπατιών

Η ανθεκτικότητα ενός όγκου σε ένα φάρμακο διακρίνεται σε μη ογκογονική, όπου εμποδίζεται η αλληλεπίδραση ενός φαρμάκου με το στόχο του και ογκογονική, κατά την οποία το φάρμακο αλληλεπιδρά με το στόχο του αλλά όλοι οι μηχανισμοί που επάγουν απόπτωση ή παρεμπόδιση της κυτταρικής αύξησης κάτω από αυτόν είναι ανενεργοί (46).

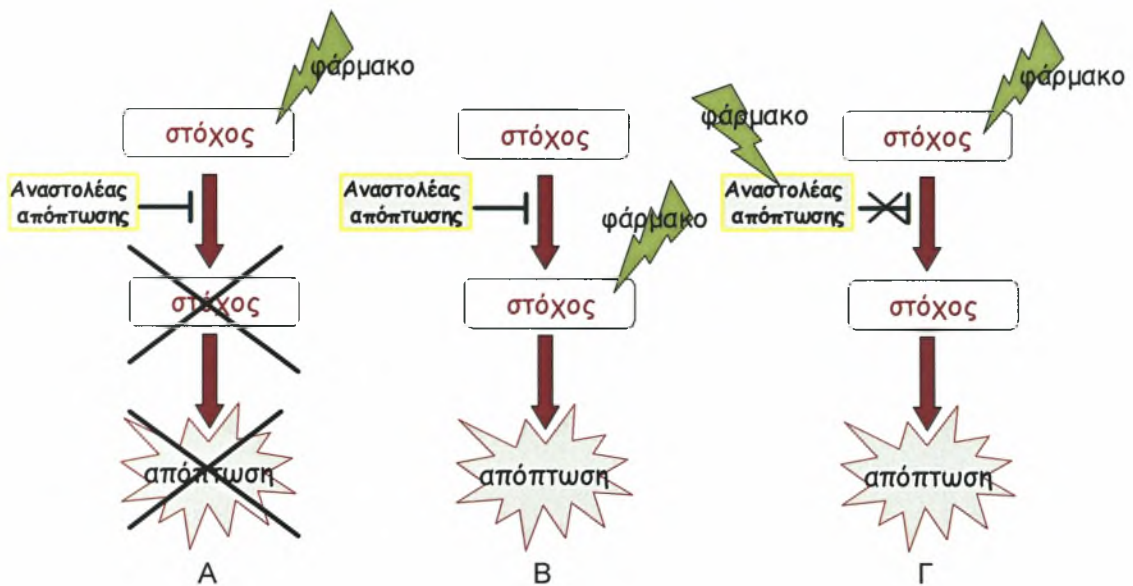
Σε κύτταρα ανθεκτικά στη απόπτωση, η επανενεργοποίηση αποπτωτικών μονοπατιών μπορεί να κάνει τα κύτταρα επιρρεπή στην απόπτωση. Στη συνέχεια, ένας κυτταροτοξικός ενεργοποιητής θα επάγει απόπτωση (Σχήμα 10). Έτσι:

- Αναστολείς αντιαποπτωτικών κινασών (αναστολείς Raf-1, MEK, PI-3K, Akt) αυξάνουν την ευαισθησία στη χημειοθεραπεία (47,48).
- Αναστολείς του NF-κB αυξάνουν την ευαισθησία στο TRAIL και τη χημειοθεραπεία (49,50).
- Συνδυασμοί ενεργοποιητών εξωτερικών (κασπάση-8) και εσωτερικών (κασπάση-9) μονοπατιών όπου και τα δύο καταλήγουν στην κασπάση-3, μπορούν να ενισχύσουν το ένα το άλλο (51). Ο TNF, ο Fas-L και το TRAIL (ενεργοποιητές της κασπάσης-8) ενισχύουν το δυναμικό φαρμάκων που προκαλούν βλάβες στο DNA κι έτσι επάγουν την απελευθέρωση αναστολέων των IAP (inhibitors of apoptosis) από τα μιτοχόνδρια έτσι ώστε να ενεργοποιηθεί η κασπάση-3. Αυτό και πάλι θα ευαισθητοποιήσει τα κύτταρα στο TRAIL (52). Ο αναστολέας του πρωτεασώματος PS-341 ευαισθητοποιεί τα νεοπλαστικά κύτταρα στην επαγόμενη από το TRAIL απόπτωση ελαττώνοντας τα επίπεδα του c-FLIP (53).
- Συνεργιστικοί συνδυασμοί μπορεί να περιλαμβάνουν δύο παράγοντες με πολλαπλούς και διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης και διάφορους αναστολείς μεταγωγής κυτταρικών σημάτων (54). Σε τέτοιους συνδυασμούς, το ένα φάρμακο μπορεί να θεωρηθεί ως ενεργοποιητής απόπτωσης και το άλλο ως κυτταροτοξικό φάρμακο. Ο μηχανισμός της συνέργιας ενός συγκεκριμένου συνδυασμού μπορεί να ποικίλλει σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές (55).

Σε ένα συνεργιστικό συνδυασμό, το ένα φάρμακο καταργεί ένα αντιαποπτωτικό παράγοντα, επιτρέποντας σε ένα άλλο φάρμακο να ενεργοποιήσει το αντίστοιχο αποπτωτικό μονοπάτι (Σχήμα 10). Σε πολλές περιπτώσεις, αναστολείς απόπτωσης (NF-κB, PI-3, cAIP, cFLIP) εκφράζονται και είναι μόνιμα ενεργοί σε

καρκινικά κύτταρα και ένα φάρμακο μόνο του δεν μπορεί να ενεργοποιήσει σήματα μετά από το σημείο αναστολής, εκτός και αν ένα άλλο φάρμακο καταργήσει τον αναστολέα.

Άλλος μηχανισμός συνέργειας περιλαμβάνει παράγοντες οι οποίοι σκοτώνουν τα κύτταρα σε μία συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου (cytotoxicity) (56). Για παράδειγμα, αναστολείς της τοποϊσομεράσης-1 και φάρμακα που δρουν στη μίτωση σκοτώνουν τα κύτταρα κυρίως στην S-φάση του κυτταρικού κύκλου και τη μίτωση, αντίστοιχα.



Σχήμα 10: Δύο τρόποι να ξεπερασθεί η αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στον κυτταρικό θάνατο.

(A) Αντίσταση των καρκινικών κυττάρων. Αναστολείς απόπτωσης προλαμβάνουν τον κυτταρικό θάνατο ακόμα και αν ένα αντικαρκινικό φάρμακο δεσμεύεται με το στόχο του. (B) Στοχεύοντας αποπτωτικά μονοπάτια μετά το σημείο αναστολής επάγεται απόπτωση. (Γ) Κατάργηση του αναστολέα του αποπτωτικού μονοπατιού οδηγεί σε ανάκτηση της ευαισθησίας σε αντικαρκινικά φάρμακα. Προσαρμογή από *Blagosklonny MV, Oncogene 2004, 23 (2967-75)*.

1.5 Πρωτεΐνες Ras

Οι πρωτεΐνες Ras ανήκουν στην υπερικογένεια των G πρωτεϊνών, και όπως οι G πρωτεΐνες, έτσι και οι Ras εναλλάσσονται μεταξύ μίας ενεργής μορφής, προσδεμένης με GTP και μίας ανενεργής, προσδεμένης με GDP μορφής. Οι πρωτεΐνες Ras έχουν μοριακό βάρος 21kDa, εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη και λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες για ποικίλα μεταγωγικά μονοπάτια, ρυθμίζοντας έτσι διάφορες πλευρές της κυτταρικής συμπεριφοράς, όπως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τη γήρανση, την απόπτωση και την επιβίωση. Το τελικό αποτέλεσμα της Ras-εξαρτώμενης ενεργοποίησης εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο και το περιεχόμενο του κυττάρου. Σε κάθε περίπτωση, το τελικό αποτέλεσμα καθορίζεται από το μέγεθος και τη διάρκεια της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Ras, τη σταθερότητα των πρωτεϊνών, καθώς και από την ισορροπία των θετικών και αρνητικών μεταγωγικών σημάτων (57–59).

Η ενεργότητα των μελών της οικογένειας Ras καθορίζεται από την αναλογία των προσδεμένων με GTP/GDP μορφών στα κύτταρα. Η αναλογία των δύο μορφών ρυθμίζεται από τους παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (Guanine Exchange Nucleotide Factors, GEFs), που προωθούν την ανταλλαγή προσδεμένων GDP με GTP και τις πρωτεΐνες ενεργοποίησης GTPάσης (GTPase Activating Proteins, GAPs) που αυξάνουν την ταχύτητα υδρόλυσης του προσδεμένου GTP. Επιπλέον, οι Ras GTPάσες ρυθμίζονται από τους αναστολείς της αποσύνδεσης των νουκλεοτιδίων γουανίνης (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors, GDIs) που μπορούν να καταστέλλουν τόσο την ανταλλαγή του GTP όσο και την υδρόλυση του προσδεμένου GTP.

Έχουν εντοπισθεί τρία διαφορετικά πρωτοογκογονίδια *RAS*, τα οποία κωδικοποιούν για τέσσερις συγγενείς αλλά όχι ταυτόσημες πρωτεΐνες, τις Ha-Ras, N-Ras, και Ki-Ras (K-Ras4A και K-Ras4B, μέσω της διαδικασίας του εναλλακτικού ματίσματος). Κάθε πρωτεΐνη Ras αποτελείται από περίπου 190 αμινοξικά κατάλοιπα, με υψηλό βαθμό ομολογίας. Οι περισσότερες διαφορές μεταξύ των Ras πρωτεϊνών εντοπίζονται σε μια περιοχή 25 αμινοξέων στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου, η οποία πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη για τις διαφορετικές λειτουργίες των πρωτεϊνών αυτών. Κρυσταλλογραφικές, μοριακές και βιοχημικές μελέτες της δομής των Ras

πρωτεϊνών αποκάλυψαν τρεις σημαντικές περιοχές (60–62) :

α) η περιοχή μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 5-22 και 109-120, η οποία απαιτείται για την πρόσδεση νουκλεοτιδίων γουανίνης,

β) η περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου, η οποία είναι προϊόν μετα-μεταφραστικής τροποποίησης και η οποία είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση στην κυτταρική μεμβράνη, και

γ) η περιοχή μεταξύ των 35-40 αμινοξικών καταλοίπων, η οποία απαιτείται για την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες.

1.5.1 Κυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών Ha-Ras και Ki-Ras

Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να τονισθεί η διαφορά μεταξύ των πρωτεϊνών Ha-Ras και Ki-Ras ως προς τη δομή και τον εντοπισμό τους στο κύτταρο. Οι δύο ισομορφές της πρωτεΐνης Ras εμφανίζουν διαφορές στο καρβοξυτελικό άκρο και στη θέση αγκυροβόλησής τους στη μεμβράνη.

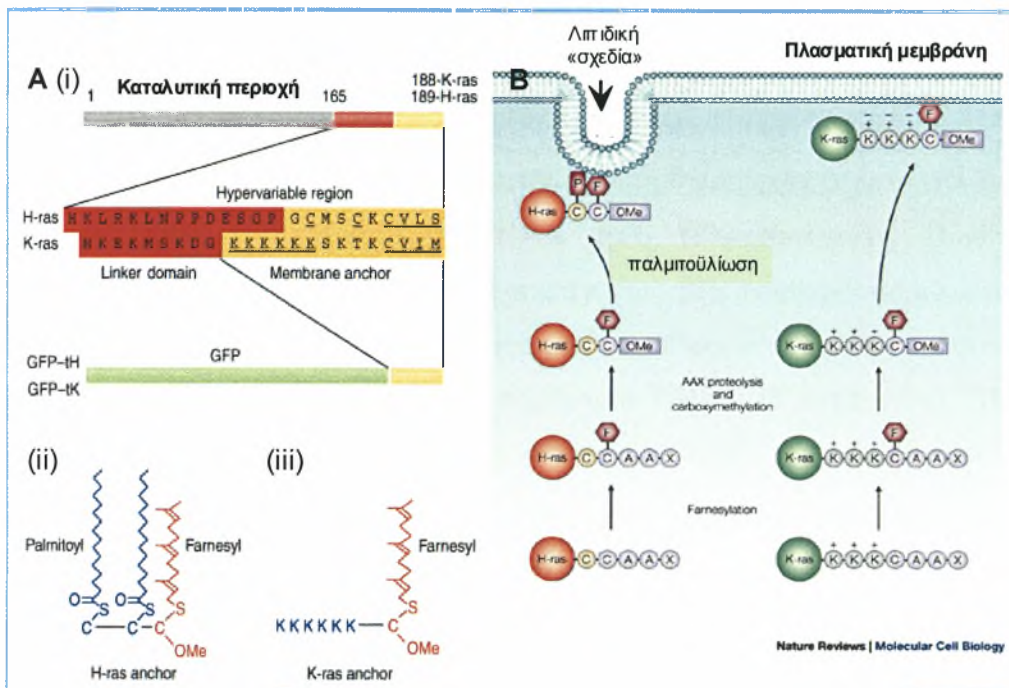
Η αμινοτελική περιοχή των 165 αμινοξέων στις δύο πρωτεΐνες είναι αρκετά συντηρημένη, όμως η περιοχή 24-45 αμινοξικών καταλοίπων στο αμινοτελικό άκρο της μη συντηρημένης περιοχής διαφέρει σημαντικά στις δύο πρωτεΐνες. Το καρβοξυτελικό άκρο της μη συντηρημένης περιοχής κωδικοποιεί αλληλουχίες που κατευθύνουν την πρόσδεση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη. Οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες οι οποίες είναι υπεύθυνες για την άμεση αγκυροβόληση των καρβοξυτελικών περιοχών των Ha- και Ki-Ras, οδηγούν τις δύο πρωτεΐνες σε περιοχές πλούσιες σε χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια (λιπιδικές σχεδιές, «*lipid rafts*») και σε περιοχές όπου απουσιάζουν οι δομές αυτές, αντίστοιχα (Σχήμα 11Α).

Καθώς οι πρωτεΐνες Ras διασχίζουν τις εσωτερικές μεμβράνες στο κύτταρο κατευθυνόμενες προς την κυτταρική επιφάνεια, το καρβοξυτελικό άκρο το οποίο εμφανίζει το μοτίβο CAAX (A: αλειφατικό αμινοξύ, X: μεθειονίνη ή σερίνη) υπόκειται σε τρεις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις με καθορισμένη χρονική ακολουθία: φαρνεζυλίωση, πρωτεόλυση της AAX και καρβοξυ-μεθυλίωση. Η δεύτερη τροποποίηση, η οποία συνοδεύεται είτε από προσθήκη παλμιτικού οξέος είτε από προσθήκη πολυβασικής περιοχής πλούσιας σε λυσίνες δίπλα σε κατάλοιπο κυστεΐνης, κατευθύνει την τοποθέτηση της πρωτεΐνης στην κυτταρική μεμβράνη και υπαγορεύει την τοποθέτησή της σε ειδικές περιοχές της μεμβράνης (61) .

Στην πρωτεΐνη Ha-Ras, η καρβοξυτελική περιοχή η οποία εμφανίζει το μοτίβο

CAAX υπόκειται σε φαρνεζυλίωση, πρωτεολυτική απομάκρυνση τριών αμινοξέων από το καρβοξυτελικό άκρο και μεθυλίωση των καταλοίπων κυστεΐνης. Ακολουθεί παλμιτοϋλίωση δύο κυστεΐνών. Η παλμιτοϋλίωση της Ha-Ras σχετίζεται με την πρόσδεσή της σε λειτουργικές διακριτές μικροδομές (λιπιδικές σχεδίες) (60,62).

Αντίθετα, η Ki-Ras, η οποία περιέχει μία πολυβασική περιοχή πλούσια σε λυσίνες αλλά δεν υφίσταται παλμιτοϋλίωση στο καρβοξυτελικό της άκρο, εντοπίζεται αποκλειστικά σε περιοχές της μεμβράνης όπου απουσιάζουν οι λιπιδικές «σχεδίες». Η διαφορά αυτή στην τοποθέτηση στη μεμβράνη θα μπορούσε να σχετίζεται με τη λειτουργική εξειδίκευση των πρωτεϊνών της οικογένειας των Ras (Σχήμα 11B).



Σχήμα 11: Τροποποιήσεις και κυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών Ras.

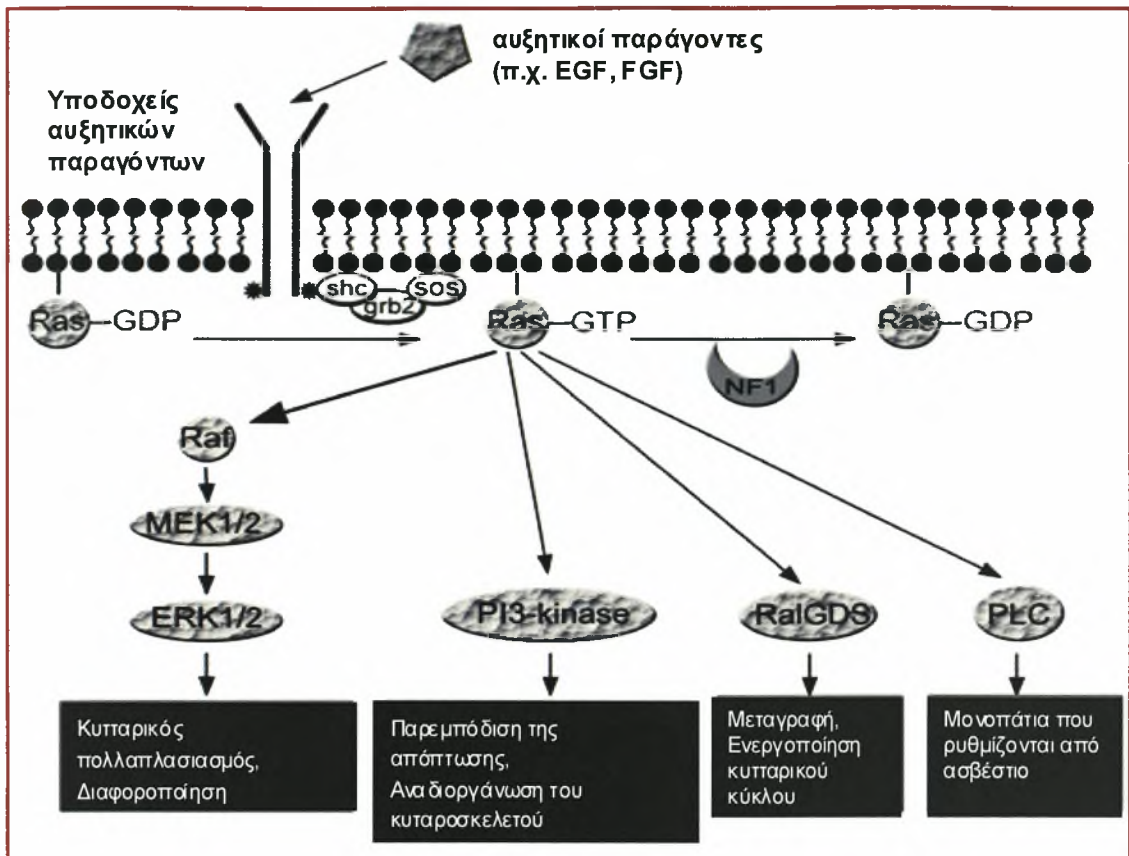
(A) Οι δύο isoμορφές του Ras εμφανίζουν διαφορές στο καρβοξυτελικό τους άκρο και στην αγκυροβόλησή τους στην κυτταρική μεμβράνη (i) Η περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης Ras διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στις δύο isoμορφές και κωδικοποιεί αλληλουχίες που κατευθύνουν την πρόσδεση της καρβοξυτελικής περιοχής (κίτρινο) των H- και K-Ras σε περιοχές που περιέχουν ή όχι λιπιδικές σχεδίες, αντίστοιχα. Η παρακείμενη αλληλουχία (πορτοκαλί) και η αμινοτελική περιοχή της H-Ras πρωτεΐνης τροποποιεί τις αλληλεπιδράσεις της καρβοξυτελικής περιοχής. (ii) Μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις στην αλληλουχία CAAX που εντοπίζεται στην καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης H-Ras (iii) Μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις στην αλληλουχία CAAX στην πρωτεΐνη K-Ras. (B) Κινητικότητα και εντοπισμός των H-Ras και K-Ras πρωτεϊνών στην κυτταρική μεμβράνη. Καθώς οι Ras πρωτεΐνες διατρέχουν το δίκτυο των ενδοκυτταρικών μεμβρανών οδεύοντας προς την κυτταρική επιφάνεια, η αλληλουχία CAAX που εντοπίζεται στην καρβοξυτελική περιοχή υφίσταται μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις οι οποίες διαφέρουν ανάμεσα στις H-Ras και K-Ras πρωτεΐνες (επεξηγήσεις στο κείμενο). Προσαρμογή από Hancock JF, Nat Rev Mol Cell Biol 2003, 4 (373-84).

1.5.2 Ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Ras

Σε συνθήκες ηρεμίας οι πρωτεΐνες Ras βρίσκονται ως συμπλέγματα με GDP. Εξωκυτταρικά σήματα, όπως αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες, ορμόνες, νευροδιαβιβαστές, ενεργοποιούν υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, όπως υποδοχείς κινάσης της τυροσίνης (RTK, Receptor Tyrosine Kinase), υποδοχείς χωρίς δράση κινάσης της τυροσίνης, καθώς και διαμεμβρανικούς υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες (SR).

Το καλύτερα μελετημένο μονοπάτι μεταγωγής σήματος περιλαμβάνει την ενεργοποίηση ενός υποδοχέα RTK, όπως ο EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). Η πρόσδεση του παράγοντα EGF στον υποδοχέα του, έχει ως αποτέλεσμα το διμερισμό του υποδοχέα και την ενεργοποίηση της κινάσης της τυροσίνης. Ακολουθεί αυτοφωσφορλίωση συγκεκριμένων καταλοίπων τυροσίνης στο ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία θέσεων σύνδεσης για περιοχές SH2 (Src Homology 2) και PTB (PhosphoTyrosyl Binding), παραγόντων, όπως οι GRB2 και SHC. Ο παράγοντας SHC αυτοφωσφορυλιώνεται συνδεόμενος με τον ενεργοποιημένο υποδοχέα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία θέσεων αναγνώρισης για την περιοχή SH2 του παράγοντα GRB2. Ο παράγοντας GRB2 βρίσκεται μόνιμως συνδεδεμένος με τον παράγοντα SOS. Ως αποτέλεσμα της δημιουργίας στον υποδοχέα κατάλληλων θέσεων αναγνώρισης, ο παράγοντας SOS μετατοπίζεται από το κυτόπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη μέσω των μορίων GRB2. Η μετατόπιση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αποσύνδεση της πρωτεΐνης Ras από το GDP. Μόρια με ανάλογη δράση όπως ο παράγοντας SOS ονομάζονται GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factors).

Η ενεργή Ras πρωτεΐνη (Ras-GTP), στη συνέχεια, ρυθμίζει διάφορους τελεστές, οι οποίοι συνδέονται με μονοπάτια μεταγωγής σήματος, τα οποία καταλήγουν στη μεταγραφική ρύθμιση διαφόρων γονιδίων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η ενεργοποίηση των μονοπατιών μεταγωγής σήματος είναι παροδική, καθώς η πρωτεΐνη Ras επανέρχεται στην ανενεργή μορφή της μέσω υδρόλυσης του προσδεδεμένου GTP μορίου, η οποία καταλύεται από τους παράγοντες GAPs (GTPase Activating Proteins) (Σχήμα 12).



Σχήμα 12: Ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras και μονοπάτια που σηματοδοτεί.

Ογκογονικές μεταλλάξεις, συγκεκριμένα στις θέσεις 12, 13, και 61, οδηγούν σε μη ευαίσθησια των Ras πρωτεϊνών στην αρνητική ρύθμιση από τους παράγοντες GAPs, με αποτέλεσμα να παραμένουν «κλειδωμένες» στην ενεργή GTP μορφή τους. Η συνεχώς ενεργή Ras πρωτεΐνη αυξάνει την τάση των κυττάρων για καρκινικό μετασχηματισμό διότι απορρυθμίζει σημαντικά μεταγωγικά μονοπάτια, τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης.

1.5.3 Μονοπάτια που σηματοδοτούνται από την ενεργοποίηση της Ras

Μονοπάτι μεταγωγής σήματος Raf/MEK/ERK- Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης Raf, η οποία είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης, στην πλασματική μεμβράνη. Επιπλέον γεγονότα συντελούν στην ενεργοποίηση της δράσης της κινάσης μέσω

φωσφορυλίωσης. Η Raf κινάση, στη συνέχεια, ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης δύο MAPK κινάσες (MEK1 και MEK2), οι οποίες λειτουργούν ως διπλής ειδικότητας κινάσες, φωσφορυλιώνοντας κατάλοιπα θρεονίνης και τυροσίνης δύο MAP κινασών που αναφέρονται ως ERKs (p42^{MAPK}/ERK-2, p44^{MAPK}/ERK-1). Μετά την ενεργοποίησή τους οι MAP κινάσες μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου ενεργοποιούν μέσω φωσφορυλίωσης μια ποικιλία μεταγραφικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του μεταγραφικού παράγοντα Elk-1. Οι παράγοντες αυτοί προσδένονται σε χαρακτηριστικές αλληλουχίες υποκινητών, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας ομάδας γονιδίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο παράγοντας Elk-1, ο οποίος σχηματίζει σύμπλεγμα με τον παράγοντα SRF (Serum Response Factor) στο στοιχείο SRE, το οποίο αποτελεί χαρακτηριστική ακολουθία πολλών υποκινητών, συμπεριλαμβανομένου του υποκινητή του γονιδίου *c-fos*.

Μονοπάτι μεταγωγής σήματος PI3-K- Η πρωτεΐνη PI3-K (Phosphoinositol 3 Kinase) αποτελεί σύμπλοκο δύο υπομονάδων, της καταλυτικής υπομονάδας 110kDa (p110) και της ρυθμιστικής υπομονάδας 85kDa (p85). Η πρωτεΐνη αυτή εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Η ενεργή πρωτεΐνη Ras-GTP συνδέεται με την καταλυτική υπομονάδα p110 του μορίου, γεγονός που οδηγεί σε μια αύξηση της ενεργότητας της PI3-K κινάσης, με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης 3' φωσφορυλιωμένων ινοσιτολικών λιπιδίων. Ένα από τα προϊόντα αυτά, το PIP3 ενεργοποιεί την πρωτεΐνη Rac, με αποτέλεσμα την παραγωγή του προϊόντος PIP2, μέσω ενεργοποίησης των P14/P15 κινασών. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν στην αναδιοργάνωση των νηματίων ακτίνης και τελικά στην πύκνωση της μεμβράνης.

Η πρωτεΐνη PI-3K εμπλέκεται στη ρύθμιση διαφόρων λειτουργιών του κυττάρου, όπως αναστολή της απόπτωσης, αύξηση της κινητικότητας του κυττάρου και μετάσταση. Ξεκάθαρες ενδείξεις για τα μόρια που ενεργοποιούνται μετά την PI-3K κινάση υπάρχουν μόνο για την κινάση AKT (πρωτεϊνική κινάση B). Οι καταρροϊκοί στόχοι της AKT κινάσης περιλαμβάνουν παράγοντες επιβίωσης και θανάτου, όπως οι κασπάσες και οι προαποπτωτικές πρωτεΐνες Bad, των οποίων η έκφραση καταστέλλεται από την AKT κινάση. Μόριο-στόχος της AKT αποτελεί η κινάση mTOR, η οποία εμπλέκεται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου μέσω της ρύθμισης των p70^{S6kinase} και PHAS-1 πρωτεϊνών (63).

Μονοπάτι μεταγωγής σήματος RalGDS- Η οικογένεια RalGDS αποτελείται από δύο συγγενικές πρωτεΐνες της Ras, τις RalA και RalB, στις οποίες λειτουργεί ως

παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEF) (64). Τα τρία αυτά μόρια ανταγωνίζονται την πρωτεΐνη Raf-1 για σύνδεση στην πρωτεΐνη Ras. Η πρωτεΐνη RalBP1 αλληλεπιδρά με τη Ral με τρόπο εξαρτώμενο από την πρόσδεση σε GTP. Περιέχει μία περιοχή ομόλογη της RhoGAP, η οποία παρουσιάζει ενεργότητα GAP για τις Rac-1 και cdc-42 αλλά όχι για τη RhoA. Ένας στόχος της πρωτεΐνης Ral είναι η φωσφολιπάση D1 (PLD1), η οποία επάγει τη μετατροπή της φωσφατιδυλοχολίνης σε φωσφατιδικό οξύ. Ωστόσο η πρωτεΐνη RalGDS φαίνεται να έχει επιπλέον λειτουργίες. Θεωρείται ότι το μονοπάτι RalGDS συμμετέχει στον κυτταρικό μετασχηματισμό που επάγεται από την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras.

1.5.4 Πρωτεΐνες Ras και κυτταρικός κύκλος

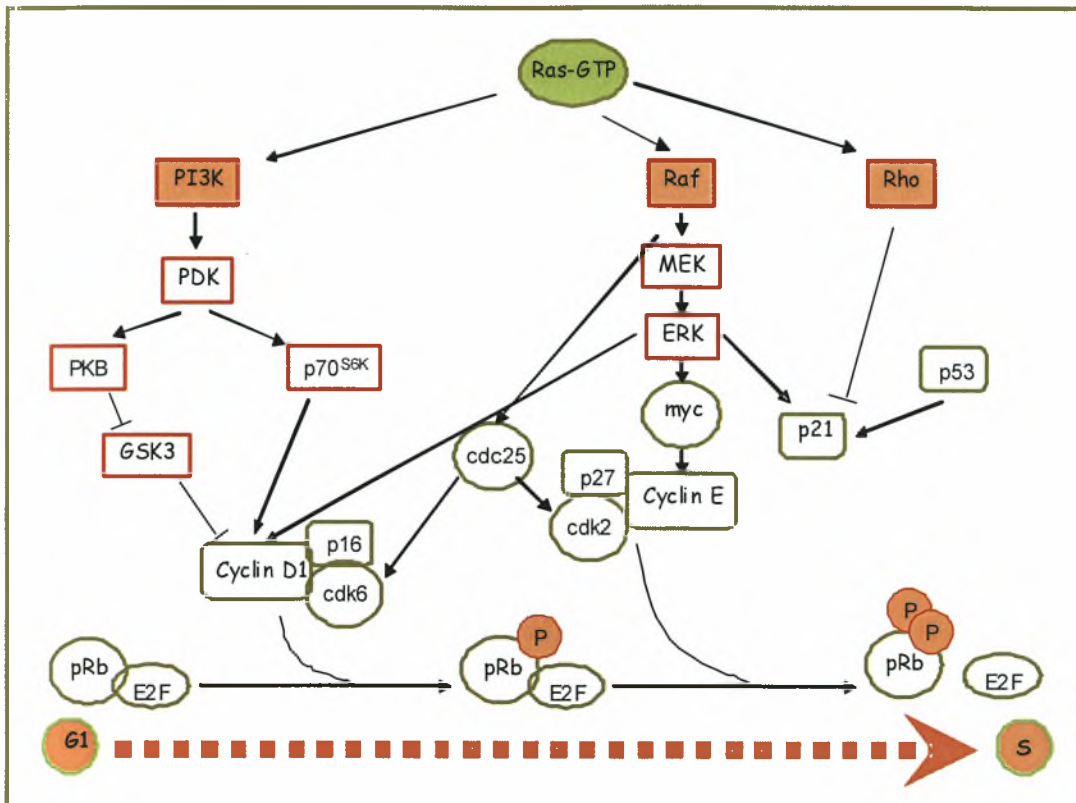
Η λειτουργικότητα των πρωτεϊνών Ras είναι απαραίτητη τόσο για το ξεκίνημα όσο και για το τέλος της G1 φάσης και την είσοδο στην S φάση της μεσόφασης. Η κύρια λειτουργία της πρωτεΐνης Ras σε ότι αφορά τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, είναι ο έλεγχος της μετάβασης από τη G1 στη S φάση. Βασική προϋπόθεση είναι η απενεργοποίηση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb) μέσω κινασών εξαρτώμενων από κυκλίνες (cdks). Οι κινάσες αυτές ενεργοποιούνται μέσω της αλληλεπίδρασης με μια κυκλίνη, της φωσφορυλίωσης σε ένα κεντρικό κατάλοιπο από ειδικές κινάσες, καθώς και με αποφωσφορυλίωση σε ειδικές θέσεις στο αμινοτελικό άκρο μέσω φωσφατασών cdc25. Τα πλέον τυπικά σύμπλοκα κυκλίνης – cdk κινάσης είναι: κυκλίνη D1/cdk4 ή 6 και κυκλίνη E/cdk2. Ειδικοί αναστολείς προσδένονται στα σύμπλοκα αυτά ρυθμίζοντας τη σταθερότητα και τη δράση τους. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η πρωτεΐνη Ras διεγείρει τη μεταγραφή ενός ενεργοποιητή (κυκλίνη D1), αλλά και αρνητικών ρυθμιστών (p21 και p16) των συμπλόκων κυκλίνης/cdk κινάσης (65).

Η ρύθμιση των κυτταρικών επιπέδων της κυκλίνης D1 από την πρωτεΐνη Ras αποτελεί ένα εξαιρετο παράδειγμα της πολυπλοκότητας των σημάτων, που απαιτούνται για τον έλεγχο ενός μόνο μορίου, το οποίο εμπλέκεται στην μετάβαση από τη G1 στη S φάση του κυτταρικού κύκλου. Η ενεργοποίηση των μορίων Raf, ERK και PI3-K διεγείρει την έκφραση του γονιδίου της κυκλίνης D1, αλλά για μέγιστη διέγερση απαιτείται η συνεργατική δράση πολλαπλών στόχων της πρωτεΐνης Ras.

Η πρωτεΐνη PI-3K ρυθμίζει τη σταθερότητα της κυκλίνης D1 μέσω των μορίων PKB (AKT) και p70^{S6K}. Φωσφορυλίωση της κυκλίνης D1 στη θέση T286 μέσω της κινάσης GSK3, οδηγεί σε αποικοδόμησή της. Η GSK3 κινάση απενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης από την πρωτεΐνη PKB με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η φωσφορυλίωση της κυκλίνης D1 στο σημείο αυτό. Η πρωτεΐνη p70^{S6K} ρυθμίζει θετικά την κυκλίνη D1 σε μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο.

Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, οδηγεί σε σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στο σημείο ελέγχου G1, μέσω επαγωγής των cdk αναστολέων p21 και p16. Η ενεργοποίηση του Ras-εξαρτώμενου μονοπατιού μεταγωγής σήματος Raf/MEK/ERK φαίνεται να συνδέεται με την αύξηση της έκφρασης του γονιδίου p21. Αντίθετα, η ενεργοποίηση του παράγοντα Rho οδηγεί σε καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου p21, με αποτέλεσμα τη μετάβαση στη S-φάση του κυτταρικού κύκλου. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης Ras οδηγεί σε επαγωγή του cdk αναστολέα p16, μέσω αδιευκρίνιστων μέχρι σήμερα μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Οι δύο αυτοί cdk αναστολείς φαίνεται να σχετίζονται με την αναστολή της αύξησης και την επαγωγή της γήρανσης υπό συγκεκριμένες συνθήκες.

Ο cdk αναστολέας p27 επάγει το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στο G1 σημείο ελέγχου. Σε αντίθεση με τους αναστολείς p16 και p21, φαίνεται να ρυθμίζεται αρνητικά από την Ras πρωτεΐνη, μέσω των μονοπατιών μεταγωγής σήματος Raf/MEK/ERK και PI-3K. Το γεγονός αυτό επιτυγχάνεται μέσω μείωσης του ρυθμού μετάφρασης και της σταθερότητας του αναστολέα p27. Η ERK κινάση επάγει τη φωσφορυλίωση του αναστολέα, με αποτέλεσμα να καθίσταται ανίκανος να προσδεθεί και να καταστείλει την ενεργότητα κινάσης του συμπλόκου cdk2 (66). Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος που ενεργοποιείται από την PI-3K φαίνεται να παίζει τον πιο σημαντικό ρόλο στην απενεργοποίηση του αναστολέα p27, κάτι το οποίο υποστηρίζεται από το γεγονός ότι, το μέγιστο της δράσης της πρωτεΐνης Ras στο τέλος της G1 φάσης, όπου παρατηρείται δραματική μείωση των επιπέδων του αναστολέα, δεν συμπίπτει με την ενεργοποίηση του μονοπατιού μεταγωγής σήματος Raf/MEK/ERK. Αυτό είναι πιθανώς το σημείο, όπου τα σήματα από αυξητικούς παράγοντες και γειτονικά κύτταρα συνεργάζονται και μεταβιβάζονται μέσω των πρωτεϊνών Ras και PI-3K, για τον τελικό έλεγχο πριν την μετάβαση στην S-φάση του κυτταρικού κύκλου (57).

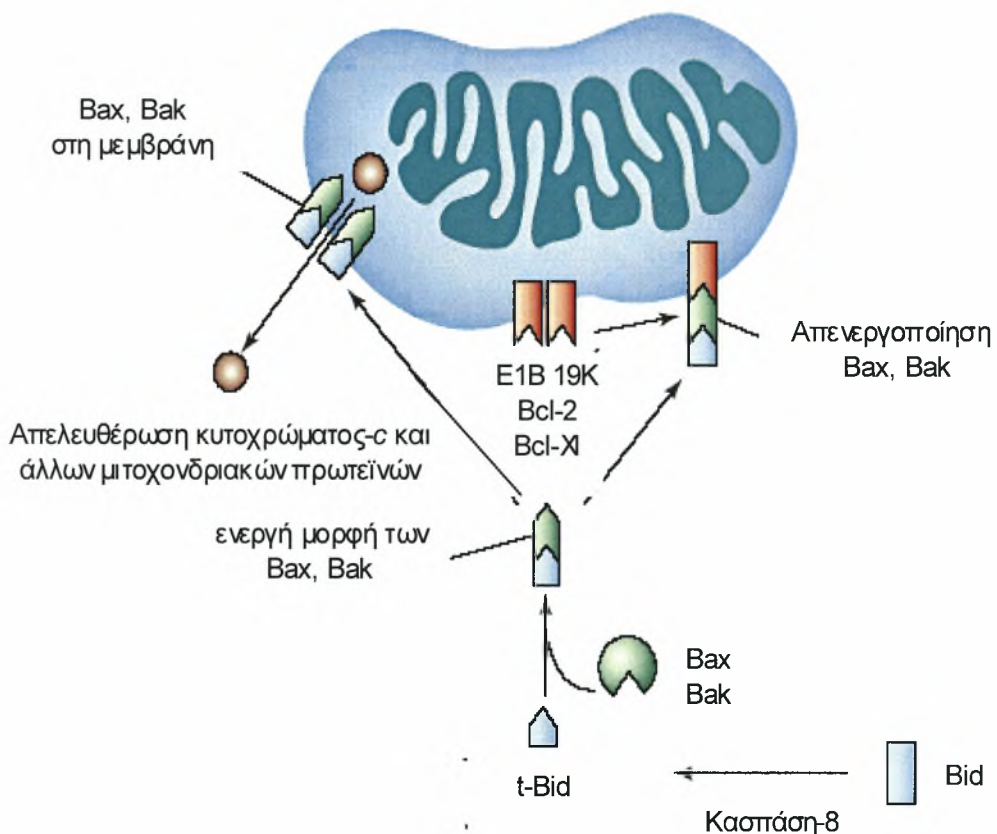


Σχήμα 13: Ras-εξαρτώμενα μονοπάτια που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

1.5.5 Πρωτεΐνες Ras και απόπτωση

Η πρωτεΐνη PI-3K αποτελεί ένα σημαντικό τελεστή της πρωτεΐνης Ras σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, και φαίνεται να προωθεί σήματα επιβίωσης καταρροϊκά της Ras. Η πρωτεΐνη PI-3K ενεργοποιεί την AKT (PKB) κινάση σερίνης/θρεονίνης, μέσω προώθησης του δευτέρου μηνύματος PIP3. Η AKT κινάση επάγει τη φωσφορυλίωση μιας ομάδας πρωτεϊνών, οι οποίες εμπλέκονται στη ρύθμιση του αποπτωτικού μηχανισμού, η πιο σημαντική από τις οποίες είναι η πρωτεΐνη Bad. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί προαποπτωτικό μέλος της οικογένειας των αποπτωτικών ρυθμιστών Bcl-2. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Bad οδηγεί σε ειδική πρόσδεσή της με το μόριο 14-3-3 κι έτσι απελευθερώνεται από τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL. Με την ενεργοποίηση προαποπτωτικών πρωτεϊνών (Bad, Bax, Bak) ο λόγος προαποπτωτικών / αντιαποπτωτικών μορίων μεγαλώνει, επιτρέποντας τη δημιουργία καναλιών στη μιτοχονδριακή μεμβράνη από προαποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2, την αλλαγή του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και την

απελευθέρωση του κυτοχρώματος-*c* και άλλων πρωτεϊνών (SMAC/DIABLO) από τα μιτοχόνδρια, γεγονός που έχουν ως αποτέλεσμα την επαγωγή του αποπτωτικού μηχανισμού. Από την άλλη, ενεργοποίηση της κασπάσης-8 προκαλεί διάσπαση της πρωτεΐνης Bid και το πρωτεολυτικό τμήμα που δημιουργείται από το καρβοξυτελικό της άκρο (t-Bid) μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια με επακόλουθη μεταβολή του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και της απελευθέρωση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών (Σχήμα 14) (22,67).



Σχήμα 14: Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 και η απόπτωση.

Προσαρμογή από Kaufmann and Hengartner, *Trends Cell Biol* 2001, 11 (526-534).

Η πρωτεΐνη AKT εμποδίζει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος-*c*, με αποτέλεσμα την καταστολή της απόπτωσης. Ένα δεύτερο μεταγωγικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από την πρωτεΐνη PI-3K, το οποίο οδηγεί σε καταστολή της απόπτωσης, είναι το Rac (Ras-related GTPase) και η επερχόμενη ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Εναλλακτικά, η Ras ενεργοποιεί την πρωτεΐνη Rac μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (Rac GEF), Tiam1. Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB παράγει σήματα επιβίωσης, προωθώντας τη μεταγραφή αντιαποπτωτικών γονιδίων, όπως αναστολείς της απόπτωσης (IAPs). Επιπλέον, η AKT κινάση μέσω του μονοπατιού μεταγωγής σήματος PI-3K επάγει την ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κB. Η AKT κινάση διεγείρει μέσω φωσφορυλίωσης την I-κB κινάση (IKK), με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του παράγοντα NF-κB, ο οποίος στη συνέχεια μεταφέρεται στον πυρήνα και προωθεί τη μεταγραφή αντιαποπτωτικών γονιδίων.

Το Ras-εξαρτώμενο μονοπάτι μεταγωγής σήματος Raf/MEK/ERK μπορεί να επηρεάσει θετικά ή αρνητικά την απόπτωση, γεγονός που εξαρτάται από το βαθμό ενεργοποίησης. Έτσι, μια ογκογονική μετάλλαξη στην πρωτεΐνη Ras οδηγεί σε μια δυνατή και σταθερή ενεργοποίηση του Raf-εξαρτώμενου μονοπατιού, με αποτέλεσμα την μεταβίβαση προαποπτωτικών σημάτων. Αντίθετα, μια ασθενής ενεργοποίησή του, ως απάντηση σε μιτογόνα σήματα, δεν αναμένεται να προκαλέσει την έναρξη του αποπτωτικού μηχανισμού, αλλά την προώθηση σημάτων επιβίωσης.

Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος PI-3K/AKT δρα συνεργατικά με το Raf-εξαρτώμενο μονοπάτι, προωθώντας αντιαποπτωτικά σήματα. Η απενεργοποίηση της AKT κινάσης, ως απόκριση στην απομάκρυνση του αυξητικού παράγοντα, οδηγεί σε καταστολή της ικανότητας της πρωτεΐνης Raf να προωθεί σήματα επιβίωσης.

Η ογκογονική πρωτεΐνη Ras επάγει την αποικοδόμηση του ογκοκατασταλτικού παράγοντα P53 μέσω ενεργοποίησης του Raf-εξαρτώμενου μονοπατιού μεταγωγής σήματος, γεγονός που προσδίδει ανθεκτικότητα στα καρκινικά κύτταρα από την P53-επαγόμενη απόπτωση. Το Raf-εξαρτώμενο μονοπάτι μεταγωγής σήματος οδηγεί σε αρνητική ρύθμιση της μεταγραφής του προαποπτωτικού μεταγραφικού ρυθμιστή Par-4, αυξάνοντας την ικανότητα της ογκογονικής πρωτεΐνης Ras να προωθεί σήματα επιβίωσης, και έτσι να επάγει το μετασχηματισμό των κυττάρων. Η αρνητική ρύθμιση του παράγοντα Par-4 οδηγεί σε ενεργοποίηση της μεταγραφής του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, με αποτέλεσμα τη διέγερση της μεταγραφής αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών (Bcl-2). Η πρωτεΐνη Raf

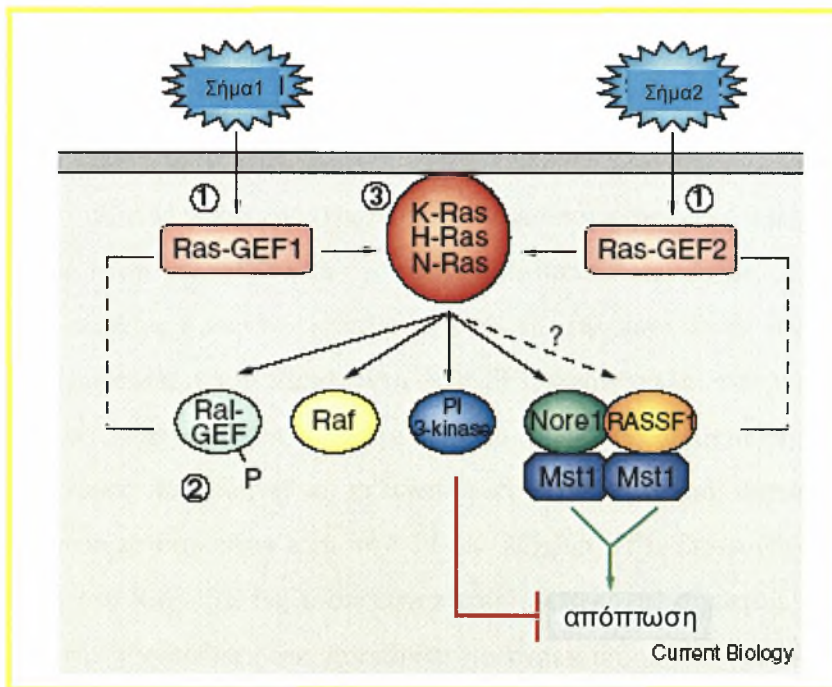
μεταφέρεται στο μιτοχόνδριο και αλληλεπιδρά άμεσα με την πρωτεΐνη Bcl-2, γεγονός που οδηγεί σε καταστολή της απόπτωσης μέσω απενεργοποίησης της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bad, η οποία ανήκει στην οικογένεια Bcl-2. Τα Raf- και PI-3K-εξαρτώμενα μονοπάτια μεταγωγής σήματος φαίνεται να συγκλίνουν σε αποτέλεσμα ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Ras, επάγοντας την καταστολή της απόπτωσης. Τόσο οι AKT, όσο και οι RSK κινάσες, οι οποίες αποτελούν υποστρώματα της ERK κινάσης, καταστέλλουν την προαποπτωτική δράση της πρωτεΐνης Bad μέσω φωσφορυλίωσης. Επιπλέον, οι AKT και RSK κινάσες φωσφορυλιώνουν τον μεταγραφικό παράγοντα CREB, αυξάνοντας έτσι την ικανότητά του να διεγείρει τη μεταγραφή γονιδίων επιβίωσης. Άρα, η πρωτεΐνη Ras προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση μέσω ενεργοποίησης των PI-3K- και Raf-εξαρτώμενων μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Η επιλογή του μεταγωγικού μονοπατιού εξαρτάται από τη φύση του αποπτωτικού σήματος.

Ο παράγοντας p120RasGAP αποτελεί ένα αρνητικό ρυθμιστή της πρωτεΐνης Ras, καταλύοντας την υδρόλυση του προσδεδεμένου μορίου GTP και επαναφέροντας την πρωτεΐνη Ras στην ανενεργή της κατάσταση. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα προσδίδουν ένα ρόλο στον παράγοντα p120RasGAP, στη ρύθμιση της απόπτωσης καταρροϊκά της πρωτεΐνης Ras. Ο παράγοντας αυτός κόβεται από τις κασπάσες, ως απόκριση σε αποπτωτικά σήματα. Μικρή ενεργότητα κασπάσης οδηγεί σε κόψιμο του παράγοντα στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο. Τα αμινοτελικά κομμάτια προωθούν αντιαποπτωτικά σήματα μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού μεταγωγής σήματος PI-3K/AKT. Ωστόσο, μεγάλη ενεργότητα κασπάσης οδηγεί σε επιπλέον κόψιμο του αμινοτελικού άκρου, με αποτέλεσμα την προώθηση προαποπτωτικών σημάτων.

Ενώ, η ενεργοποίηση του Ras-εξαρτώμενου μονοπατιού μεταγωγής σήματος PI-3K προωθεί την ογκογένεση μέσω καταστολής της απόπτωσης, το Ras-εξαρτώμενο μονοπάτι μεταγωγής σήματος Nore1 (novel Ras effector 1)/Mst1 (mammalian Ste20-like kinase) καταστέλλει την Ras-επαγόμενη ογκογένεση, εμποδίζοντας την επιβίωση των μετασχηματισμένων κυττάρων μέσω της διέγερσης του αποπτωτικού μηχανισμού. Η πρωτεΐνη Nore1 παρουσιάζει εκπληκτική ομοιότητα με μια οικογένεια πρωτεϊνών, οι οποίες παράγονται από το εναλλακτικό μάτισμα ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου, *RASSF1* (Ras associated domain family). Οι Nore1 και *RASSF1* πρωτεΐνες προσδένονται ειδικά στην ενεργή Ras-GTP πρωτεΐνη, αλλά και στην Mst1 κινάση, η οποία έχει δείχθει ότι εμπλέκεται στη διαδικασία της απόπτωσης

(68) (Σχήμα 15). Η Mst1 κινάση ενεργοποιεί την κασπάση-3, η οποία στη συνέχεια διεγείρει την ενεργότητα κινάσης της Mst1, μέσω απομάκρυνσης της κατασταλτικής περιοχής διμερισμού της πρωτεΐνης στο καρβοξυτελικό της άκρο (68,69).

Όπως έχει δειχθεί, η πρωτεΐνη Ras μπορεί να επάγει αλλά και να καταστέλλει την απόπτωση μέσω πολλαπλών μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα έχουν φέρει στο φως διάφορους μηχανισμούς, οι οποίοι επάγουν την εκλεκτική ενεργοποίηση ειδικών Ras-τελεστών ως απόκριση σε εξωκυτταρικά σήματα.



Σχήμα 15: Πρωτεΐνες Ras και απόπτωση.

Η πρωτεΐνη Ras μπορεί να προάγει απόπτωση μέσω του συμπλέγματος Nore1-RASSF1-Mst1 ή να καταστέλλει την απόπτωση μέσω της ενεργοποίησης της PI-3K. Προσαρμογή από Feig LA and Buchsbaum RJ, *Curr Biol* 2002, 12 (R259-R261).

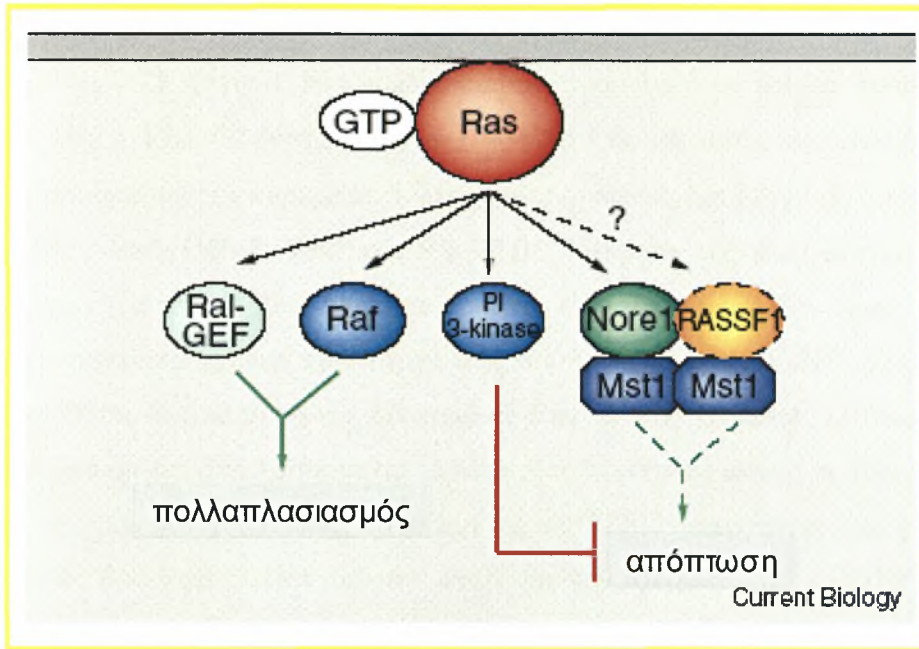
1.5.6 Πρωτεΐνες Ras και καρκίνος

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ογκογονικές μεταλλάξεις του *RAS* γονιδίου καταργούν την επαγόμενη από τα GAP υδρόλυση του GTP με το οποίο είναι προσδεμένη η Ras και οδηγούν σε συνεχή ενεργοποίησή της. Οι μεταλλάξεις αυτές έχουν εντοπισθεί σε μεγάλο ποσοστό όγκων (περίπου 50%), γεγονός το οποίο προτείνει ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου, ειδικά στο επιθήλιο του παχέος εντέρου. Από τις 3 ισομορφές (Ki-, Ha- και N-*RAS*), οι μεταλλάξεις στο γονίδιο Ki-*RAS* και ιδιαίτερα στο δωδέκατο κωδικόνιο αντιπροσωπεύουν το 90% όλων των περιπτώσεων μετάλλαξης των *RAS* στους όγκους αυτούς. Η ικανότητα της ογκογονικής πρωτεΐνης Ras να προκαλεί ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μέσω απορύθμισης του κυτταρικού κύκλου, έχει θεωρηθεί ουσιώδης για τον Ras-επαγόμενο καρκινικό μετασχηματισμό. Ωστόσο, η καρκινική εξέλιξη και η ανάπτυξη κακοήθους όγκου απαιτεί την αποφυγή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων, η οποία επάγεται από την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras. Κατά πόσο η ογκογονική Ras πρωτεΐνη θα προωθήσει τον πολλαπλασιασμό ή την απόπτωση των μετασχηματισμένων κυττάρων, εξαρτάται από την ένταση του σήματος ή από τον κυτταρικό τύπο και την προέλευση του ιστού.

Η απενεργοποίηση του παράγοντα RASSF1 καταστέλλει την ικανότητα της Ras πρωτεΐνης να επάγει απόπτωση, μέσω του μονοπατιού μεταγωγής σήματος Nore1/Mst1, γεγονός που οδηγεί σε εκλεκτική ενεργοποίηση του αντιαποπτωτικού μονοπατιού που ενεργοποιείται από την PI-3K (Σχήμα 16). Σε συνδυασμό με τη μιτογόνο δράση του Raf-εξαρτώμενου μονοπατιού μεταγωγής σήματος, τα γεγονότα αυτά αυξάνουν την προδιάθεση των κυττάρων για καρκινικό μετασχηματισμό (68).

Η απώλεια των cdk αναστολέων p21 και p16, αυξάνει την προδιάθεση των κυττάρων για ογκογένεση, ενώ η παρουσία του αναστολέα p27 ανταγωνίζεται τον Ras-επαγόμενο καρκινικό μετασχηματισμό. Η ανάπτυξη κακοήθους όγκου από τα μετασχηματισμένα κύτταρα, τα οποία φέρουν την αρχική ογκογονική μετάλλαξη της πρωτεΐνης Ras, απαιτεί την απενεργοποίηση ή απώλεια των Ras-επαγόμενων ανασταλτικών σημάτων, που φυσιολογικά θα οδηγούσαν σε σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου ή θάνατο μέσω της απόπτωσης (18). Η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών παραγόντων *P53* και *P16* μπορεί να είναι το αποτέλεσμα διαφόρων πιέσεων, όπως της απαίτησης για γενετική αστάθεια ή της ανάπτυξης μεταστατικής ικανότητας.

Μια θεραπευτική στρατηγική, περιλαμβάνει την αναστολή των Ras-επαγόμενων σημάτων επιβίωσης, συγχρόνως με τη διατήρηση, ή ακόμα τη διέγερση της Ras-επαγόμενης απόπτωσης. Αυτό θα επιτρέψει τη δημιουργία περισσότερο αποτελεσματικών φαρμάκων, τα οποία θα στοχεύουν Ras-μεταλλαγμένους όγκους, που αντιπροσωπεύουν το ένα τρίτο όλων των ανθρώπινων καρκίνων.



Σχήμα 16: Πρωτεΐνες Ras και καρκίνος.

Η απώλεια του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *RASSF1* μπορεί να καταστείλει την ικανότητα της ενεργής πρωτεΐνης Ras να επάγει απόπτωση μέσω των Nore1-Mst1, οπότε η Ras ενεργοποιεί το αντιαποπτωτικό μονοπάτι μέσω της PI-3K. Προσαρμογή από Feig LA and Buchsbaum RJ, *Curr Biol* 2002, 12 (R259-R261).

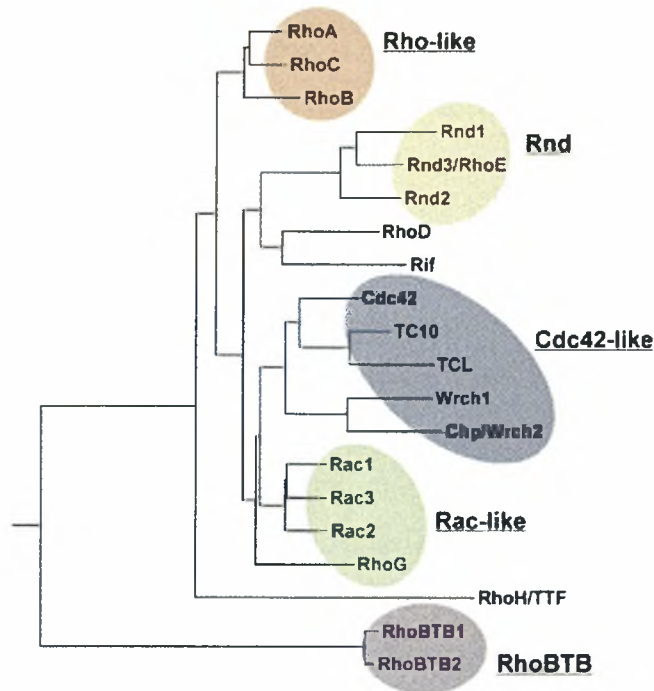
1.6 Οι Rho GTP-άσες

O

ι Rho GTP-άσες αποτελούν μία υποομάδα της οικογένειας των πρωτεϊνών Ras (**Rho=Ras homologous**) με μέγεθος 20 ως 30-kDa.

Όπως και οι Ras πρωτεΐνες, στην ενεργή τους, προσδεμένη σε GTP μορφή, ρυθμίζουν ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών λειτουργιών. Οι πρωτεΐνες Rho εκφράζονται σε όλα τα είδη, από το ζυμομύκητα μέχρι τον άνθρωπο. Στον άνθρωπο, έχουν περιγραφεί 20 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν αλληλουχία τύπου Rho GTPάσης (Σχήμα 17) (70). Οι 20 αυτές πρωτεΐνες Rho μπορούν να ομαδοποιηθούν κυρίως σε 5 κατηγορίες οι οποίες περιέχουν τις όμοιες με πρωτεΐνες Rho, Rac, Cdc42, Rnd και RhoBTB. Σύγκριση της αλληλουχίας των αμινοξέων των πρωτεϊνών Rho από διαφορετικά είδη έχει δείξει ότι εμφανίζουν υψηλό βαθμό συντήρησης στην πρωτοταγή τους δομή και περίπου 50-55% ομολογία μεταξύ τους. Όπως όλα τα μέλη της οικογένειας Ras, οι Rho GTPάσες λειτουργούν σε μοριακοί διακόπτες, εναλλασσόμενες μεταξύ μίας ανενεργής φάσης προσδεμένης με το GDP και μιας ενεργής φάσης, προσδεμένης με GTP. Η ενεργότητα των μελών της οικογένειας Rho καθορίζεται από την αναλογία των προσδεμένων με GTP/GDP μορφών στα κύτταρα η οποία ρυθμίζεται από τα αντίθετα αποτελέσματα των παραγόντων GEF και GAP (η δράση τους περιγράφηκε στην παράγραφο 1.5). Μέλη της οικογένειας θεωρούνταν αρχικά ότι εμπλέκονταν στη ρύθμιση της οργάνωσης του κυτταροσκελετού ως απόκριση σε εξωκυτταρικούς αυξητικούς παράγοντες. Τα τελευταία χρόνια οι έρευνες έχουν δείξει ότι οι Rho GTPάσες παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα κυτταρικά γεγονότα, όπως κυκλοφορία μέσω μεμβρανών, μεταγραφική ρύθμιση, έλεγχος κυτταρικής αύξησης και ανάπτυξης (71,72).

Σε ινοβλάστες Swiss3T3, οι Cdc42, Rac και Rho έχουν τοποθετηθεί ιεραρχικά σε έναν καταρράκτη όπου η Cdc42 ενεργοποιεί τη Rac, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τη Rho. Επιπλέον, η Ras ενεργοποιεί τη Rac. Οι μοριακοί σύνδεσμοι μεταξύ αυτών των GTPασών σε κύτταρα θηλαστικών δεν είναι ξεκάθαροι. Φαίνεται όμως πως οι GTPάσες της οικογένειας Rho εμπλέκουν τους υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης στη συγκρότηση και την οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης.



Σχήμα 17: Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Rho

Από *Burridge K and Wennerbeg K, Cell 2004, 116 (167-179)*.

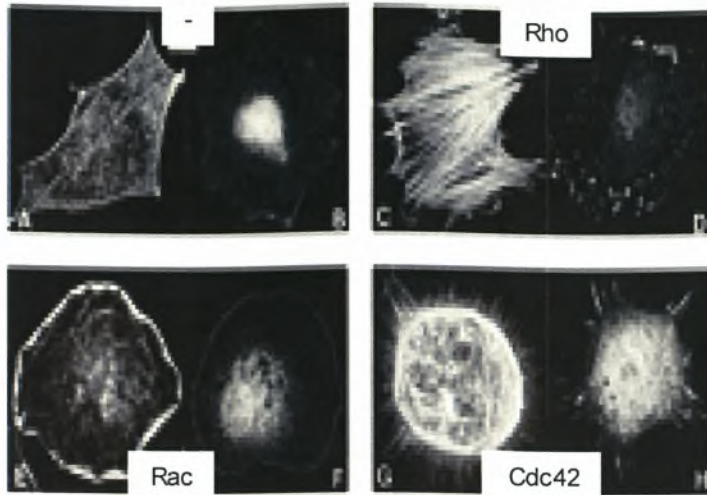
Ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών έχουν χαρακτηριστεί ως στόχοι της Rho (73). Οι στόχοι αυτοί περιλαμβάνουν τη Rho-κινάση/ROK/ROCK, την υπομονάδα πρόσδεσης της μυσίνης (MBS) της φωσφατάσης της μυσίνης, την πρωτεϊνική κινάση N (PKN)/PRK1, τη ροφιλίνη, τη ροτεκίνη και την p140 mDia.

1.6.1 Ρύθμιση του κυτταροσκελετού από τις Rho GTPάσες

Η δυναμική αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και της κυτταρικής προσκόλλησης απαιτούνται για διάφορες κυτταρικές διεργασίες όπως οι αλλαγές του κυτταρικού σχήματος, η μετανάστευση και η κυτταροκίνηση. Αυτές οι παροδικές αναδιοργανώσεις της κυτταρικής δομής και των κυτταρικών επαφών μπορούν να διεγείρονται από εξωκυτταρικά σήματα που περιλαμβάνουν αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες και άλλες βιολογικά ενεργές ουσίες.

Ο κυτταροσκελετός αποτελείται κυρίως από ινίδια ακτίνης, μικροσωληνίσκους και ενδιάμεσα ινίδια. Η ινώδης ακτίνη γενικά οργανώνεται σε μία σειρά διακριτών δομών: τα *φιλοπόδια*, που αποτελούν ινώδεις προεκβολές που περιλαμβάνουν στενά συνδεδεμένες δέσμες ινιδίων ακτίνης προσανατολισμένες κατά τη διεύθυνση της προεκβολής, τα *ελασματοπόδια*, τα οποία είναι προεκβολές με τη μορφή φύλλων ακτίνης και παρατηρούνται κατά κύριο λόγο στις άκρες του κυτταροπλάσματος και, τέλος, τα *ινίδια τάσης*, που συγκροτούνται από δεσμίδες νηματίων ακτίνης που διατρέχουν το κύτταρο και συνδέονται με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία μέσω τοπικών δομών προσκόλλησης (focal adhesions). Οι κυτταρικές επαφές επιτυγχάνονται με τη μεσολάβηση μορίων προσκόλλησης όπως οι καδερίνες και οι σχετιζόμενες με αυτές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες α- και β- κατενίνες. Η επαφή κυττάρου-υποστρώματος επιτυγχάνεται με τη μεσολάβηση διαφορετικών τύπων μορίων προσκόλλησης όπως οι ιντεγκρίνες και τα μόρια που αλληλεπιδρούν με αυτές, ταλίνη και βινκουλίνη.

Οι GTPάσες της οικογένειας Rho παίρνουν μέρος στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού ακτίνης και σε ποικίλα γεγονότα κυτταρικής προσκόλλησης (*Σχήμα 1/8*). Η Rho εμπλέκεται στη δημιουργία νηματίων stress και την κυτταρική μορφολογία, την κινητικότητα του κυττάρου, τη δημιουργία μεμβρανικών πτυχώσεων, τη σύσπαση λείων μυών και την κυτταροκίνηση. Η Rac εμπλέκεται στη δημιουργία μεμβρανικών πτυχώσεων, την κινητικότητα του κυττάρου, τον πολυμερισμό της ακτίνης και την προσκόλληση μεταξύ των κυττάρων με τη μεσολάβηση καδερίνης. Η Cdc42 τέλος, παίρνει μέρος στη δημιουργία φιλοποδίων και την προσκόλληση μεταξύ των κυττάρων (73-78). Τα γεγονότα αυτά παίζουν σίγουρα σημαντικό ρόλο στη συμπεριφορά ενός καρκινικού κυττάρου, καθώς οι ανενεργές μορφές των τριών πρωτεϊνών μπορούν να εμποδίσουν τη διεισδυτικότητα των ινοβλαστών *in vitro* (78,79).



Σχήμα 18: Οι Rho, Rac και Cdc42 ελέγχουν την οργάνωση του κυτταροσκελετού.

Οι A, C, E, G φαίνονται με χρώση ροδαμίνης φαλλοϊδίνης ενώ οι B, D, F, H με χρώση βινκουλίνης. *A.Hall, 1998*

Επιπλέον, η ισορροπία μεταξύ των ενεργοτήτων των διάφορων Rho GTPασών ρυθμίζει τη μεταναστευτικότητα των κυττάρων καθώς και τη μετάβαση από τον επιθηλιακό στον μεσεγχυματικό φαινότυπο (EMT), μέσω της ικανότητάς τους να ρυθμίζουν τις μεσολαβούμενες από τις καδερίνες προσδέσεις μεταξύ των κυττάρων αλλά και την κυτταρική προσκόλληση στο εξωκυττάριο υλικό.

1.6.2 Rho GTP άσες και καρκίνος

Σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες Ras, δεν έχουν βρεθεί μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της οικογένειας Rho και που να σχετίζονται με τον καρκίνο. Έχει δειχθεί όμως ότι οι RhoA, Rac και RhoB υπερεκφράζονται σε ανθρώπινους καρκίνους (80) και συμμετέχουν ενεργά στη διαδικασία του ογκογονικού μετασχηματισμού που επάγεται από το Ras (81–83). Επιπλέον, το γεγονός ότι οι Rho GTPάσες συμμετέχουν, όπως αναφέρθηκε, στις μεσολαβούμενες από τις καδερίνες διακυτταρικές επαφές και τις μεσολαβούμενες από τις ιντεγκρίνες επαφές των κυττάρων με το εξωκυττάριο υλικό, τους προσδίδει έναν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου. Έχει επίσης δειχθεί ο ρόλος της Cdc42 στη δημιουργία ενός πολωμένου άκρου στο κύτταρο και κατ' επέκταση την

κυτταρική μετανάστευση (84). Παρεμπόδιση της ενεργότητας της Cdc42 σε κύτταρα ινοβλαστών αρουραίου είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια της κυτταρικής πολικότητας καθώς και τη μείωση της μεταναστευτικότητας κατά 50%. Ενεργές μορφές της Cdc42 και της Rac προσδίδουν στα κύτταρα την ικανότητα να αναπτύσσονται ανεξάρτητα από την παρουσία σταθερού υποστρώματος, ενώ απενεργοποιημένες μορφές παρεμποδίζουν την επαγόμενη από το ενεργό *RAS* δημιουργία κρυπών αλλά και την ανάπτυξη σε μη σταθερό υπόστρωμα. Τέλος, είναι γνωστό ότι οι Rho GTPάσες, ειδικά η RhoA, υπερεκφράζονται σε διάφορους τύπους ανθρώπινων καρκίνων, συγκρινόμενων με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς (85).

1.7 Μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου και αποικοδόμησης ενδοκυτταρικών συστατικών.

Ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να διακριθεί σε δύο κατηγορίες, τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και τον μη προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Η νέκρωση συνήθως αποτελεί μορφή μη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, ως μία «ακατάστατη», μη ρυθμιζόμενη διαδικασία καταστροφής τραυματισμένων κυττάρων η οποία ακολουθείται από απελευθέρωση των συστατικών τους.

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (programmed cell death, PCD) διακρίνεται κυρίως σε δύο καλά μελετημένες κατηγορίες, με βάση την κυτταρική και πυρηνική μορφολογία. Την απόπτωση (τύπος I προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου) και την αυτοφαγία (τύπος II προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου) (86,87).

1.7.1 Απόπτωση

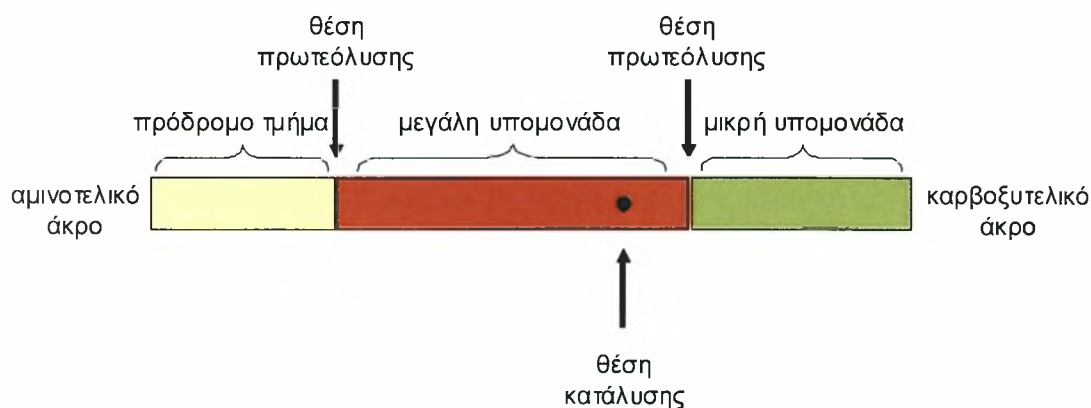
Ο πιο κοινός, καλά μελετημένος και προσδιορισμένος τύπος προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου είναι η απόπτωση, η οποία αποτελεί ένα φυσιολογικό πρόγραμμα κυτταρικής αυτοκτονίας, ουσιώδες στην εμβρυονική ανάπτυξη, τη λειτουργία του ανοσοβιολογικού συστήματος και τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης στους πολυκύτταρους οργανισμούς (88–90). Η απορύθμιση της απόπτωσης εμπλέκεται σε ποικίλες παθολογικές καταστάσεις, όπως στην περίπτωση επαγωγής της απόπτωσης σε βασικά κύτταρα του οργανισμού (π.χ. AIDS και εκφυλισμός του νευρικού συστήματος) και στην περίπτωση αποφυγής της απόπτωσης σε γενετικά μεταλλαγμένα κύτταρα (ογκογένεση).

Η απόπτωση χαρακτηρίζεται από διακριτές μορφολογικές αλλαγές και ρυθμίζεται από μία καθορισμένη σειρά βιοχημικών γεγονότων που οδηγούν στο κυτταρικό θάνατο. Σε επίπεδο κυτταρικής μορφολογίας, η απόπτωση χαρακτηρίζεται από συμπύκνωση του πυρήνα, διάσπαση της χρωματίνης σε κομμάτια, συρρίκνωση του κυττάρου και αλλοιώσεις στην κυτταρική μεμβράνη, (Πίνακας 3), οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την αναγνώριση των αποπτωτικών κυττάρων και την καταστροφή τους από τα φαγοκύτταρα, έτσι ώστε να προλαμβάνεται η ανοσοβιολογική απόκριση

(91). Τα βιοχημικά γεγονότα της απόπτωσης χωρίζονται σε δύο διακριτές φάσεις: αρχικά, τα κύτταρα δέχονται ένα σήμα το οποίο αποτελεί μία «δέσμευση» στον κυτταρικό θάνατο και στη συνέχεια τα κύτταρα εισέρχονται στη φάση θανάτου, όπου συμβαίνουν όλα τα χαρακτηριστικά μορφολογικά και βιοχημικά γεγονότα της απόπτωσης. Οι κασπάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δεύτερη φάση της απόπτωσης.

1.7.1.1 Κασπάσες και κυτταρικός θάνατος

Οι κασπάσες είναι ένζυμα με ενεργότητα πρωτεάσης κυστεΐνης οι οποίες κόβουν τα υποστρώματά τους μετά από συγκεκριμένα κατάλοιπα ασπαρτικού. Το όνομά τους απαρτίζεται από τα «κ» (κυστεΐνη) και «ασπάση» (πρωτεολυτικό κόψιμο μετά από ασπαρτικό οξύ). Υπάρχουν στο κύτταρο ως ανενεργά ζυμογόνα, τα οποία ενεργοποιούνται μέσω πρωτεόλυσης σε εσωτερικά κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος από άλλες κασπάσες (Σχήμα 19). Ωστόσο, οι κασπάσες είναι δυνατό να παρουσιάζουν ασθενή καταλυτική ενεργότητα στην πρόδρομη μορφή τους. Οι προκασπάσες ανήκουν κυρίως σε δύο κατηγορίες: σε αυτές με εκτεταμένη αμινοτελική αλληλουχία, οι οποίες ονομάζονται «εναρκτήριες κασπάσες» και αυτές με μικρή αμινοτελική αλληλουχία, οι οποίες ονομάζονται «κασπάσες-τελεστές». Το πρωτεολυτικό κόψιμο μιας εναρκτήριας κασπάσης-ρυθμιστή όπως οι κασπάσες-8, -9 και -10, οδηγεί σε ενεργοποίηση κασπασών-τελεστών, όπως η κασπάση-3, -6 και -7, οι οποίες επάγουν την πρωτεολυτική διάσπαση μιας ποικιλίας υποστρωμάτων (92).



Σχήμα 19: Κασπάσες και ενεργοποίησή τους

1.7.1.2 Πρωτεολυτική διάσπαση του παράγοντα PARP

Ο παράγοντας PARP είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη με δομή δακτύλων ψευδαργύρου, η οποία ενεργοποιείται από τη διάσπαση της αλυσίδας του DNA. Ο παράγοντας PARP φέρει τρεις διαφορετικές, λειτουργικές περιοχές. Η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD, 46kDa), η οποία εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο του μορίου, περιέχει μια αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και δύο δάκτυλα ψευδαργύρου (zinc-fingers), και είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση της διάσπασης της αλυσίδας του DNA. Η κεντρική περιοχή του μορίου (22kDa) αντιπροσωπεύει την περιοχή αυτοριβοζυλίωσης. Η περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος NAD^+ (καταλυτική περιοχή, 54kDa) εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου, και είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή του NAD^+ σε μονομερές ADP-ριβόζης.

Οι κασπάσες-3 και -7 καταλύουν το πρωτεολυτικό κόψιμο του παράγοντα PARP στην αλληλουχία NLS, η οποία εδράζεται στην περιοχή πρόσδεσης του DNA (DBD). Το αποτέλεσμα είναι η απενεργοποίηση της αντίδρασης πολυ-ριβοζυλίωσης, η οποία καταλύεται από τον παράγοντα PARP. Το πρωτεολυτικό κόψιμο του παράγοντα PARP οδηγεί σε παραγωγή ενός θραύσματος 89kDa με μειωμένη καταλυτική ενεργότητα και ενός θραύσματος 24kDa, το οποίο περιέχει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA, DBD, με κατεστραμμένη την αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού, NLS. Το θραύσμα 24kDa διατηρεί την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA και καταστέλλει την καταλυτική ενεργότητα του άθικτου μορίου. Το γεγονός αυτό, οδηγεί σε μια ισχυρή καταστολή της σύνθεσης πολυμερών ADP-ριβόζης, καθώς και σε καταστολή της επιδιόρθωσης του DNA. Το θραύσμα των 89kDa αλληλεπιδρά με το άθικτο μόριο εμποδίζοντας τον ομοδιμερισμό του, ο οποίος είναι ουσιώδης για την ενζυμική του ενεργότητα. Συμπερασματικά, το πρωτεολυτικό κόψιμο του παράγοντα PARP από τις κασπάσες οδηγεί σε επαγωγή της απόπτωσης του κυττάρου μέσω αναστολής της επιδιόρθωσης του DNA, η οποία θα προωθούσε σήματα επιβίωσης. Αντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν τα θραύσματα του παράγοντα PARP, μετά το πρωτεολυτικό κόψιμό του από τις κασπάσες, χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες αποπτωτικών κυττάρων.

Οι κασπάσες-τελεστές, εκτός από την πρωτεΐνη PARP κόβουν και άλλα ενδοκυτταρικά υποστρώματα, στα οποία περιλαμβάνονται δομικές και ρυθμιστικές πρωτεΐνες όπως οι λαμίνες και οι κυτοκερατίνες (όπως η κυτοκερατίνη-18, η οποία αποτελεί υπόστρωμα της κασπάσης-3) και είναι υπεύθυνες για πολλά από τις χαρακτηριστικά μορφολογικά γνωρίσματα της απόπτωσης.

1.7.2 Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι ένας συντηρημένος μηχανισμός από τη ζύμη μέχρι τα θηλαστικά και έχει χαρακτηριστεί ως μία κρίσιμη διαδικασία με την οποία αποικοδομούνται οι πρωτεΐνες που έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής αλλά και ολόκληρα οργανίδια από το λυσοσωμικό σύστημα του ίδιου του κυττάρου. Έχει ιδιαίτερη σημασία για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης και της βιωσιμότητας του κυττάρου (93–95) μέσω της ικανότητάς της να προάγει την ανανέωση των οργανιδίων, τη διαφοροποίηση κατά τη διάρκεια ιστοειδικών λειτουργιών και την κυτταρική επιβίωση κατά τη διάρκεια περιόδων έλλειψης θρεπτικών. Η αυτοφαγία επάγεται από την έλλειψη αμινοξέων στο περιβάλλον του κυττάρου. Αποτελεί επίσης μηχανισμό κυτταρικής «αυτοκτονίας».

1.7.2.1 Χαρακτηριστικά της αυτοφαγίας

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της αυτοφαγίας διακρίνονται από αυτά της απόπτωσης, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3. Στον τύπο αυτό προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, είναι εμφανή στο κυτταρόπλασμα κυστίδια τα οποία περιβάλλονται από διπλή ή πολλαπλή μεμβράνη και περιέχουν μεγάλες ποσότητες τμημάτων του κυτταροπλάσματος ή/ και κυτταροπλασματικών οργανιδίων όπως μιτοχονδρίων και ενδοπλασματικού δικτύου (96). Τα αυτοφαγικά κύτταρα χαρακτηρίζονται επίσης από μερική συμπύκνωση χρωματίνης και σε ορισμένες μόνο περιπτώσεις πυκνωση του πυρήνα. Η αυτοφαγία είναι ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση των κασπασών και δεν αναστέλλεται από το γενικό αναστολέα τους z-VAD. Δεν εμποδίζεται επίσης από τη δράση της αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2.

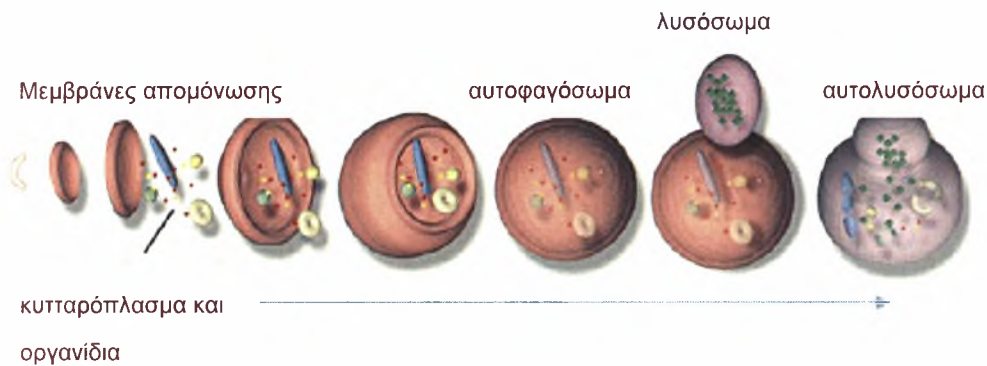
	Τύπου I, απόπτωση	Τύπου II, αυτοφαγία
ΠΥΡΗΝΑΣ	Συμπύκνωση χρωματίνης Πύκνωση του πυρήνα «Σπάσιμο» της διπλής έλικας του DNA και διάσπαση του πυρήνα	Μερική συμπύκνωση χρωματίνης Κάποιες φορές πύκνωση του πυρήνα Άθικτος πυρήνας μέχρι τα τελικά στάδια. Απουσία «σπασίματος» DNA
ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑ	Συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος Απώλεια ριβοσωμάτων από το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο	Αυξημένος αριθμός κυτταροπλασματικών κυστιδίων Αυξημένος αριθμός αυτολυσωσωμάτων
	Διάσπαση σε αποπτωτικά σωματίδια Πιθανή εμπλοκή λυσοσωμικών πρωτεασών που απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα	Αυξημένη λυσοσωμική δραστηριότητα Αύξηση μεγέθους του συμπλέγματος Golgi, συχνά διαστολή του Ε.Δ.
	Συχνά μεταβολή της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης Ενεργές κασπάσες	Συχνά μεταβολή της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης Ανεξάρτητη κασπάσων
ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΥ	Δημιουργία φυσαλίδων Ετεροφαγία από άλλα κύτταρα	Δημιουργία φυσαλίδων Καθυστερημένη και ευκαιριακή ετεροφαγία από άλλα κύτταρα
ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	Ηλεκτρονική μικροσκοπία Ανίχνευση της διάσπασης του πυρήνα ή του κυτταροπλάσματος	Ηλεκτρονική μικροσκοπία Έλεγχος αυξημένης αποικοδόμησης πρωτεϊνών μακράς διάρκειας ζωής
	Μέτρηση ενεργότητας κασπάσων Έλεγχος διάσπασης υποστρωμάτων των κασπάσων	Έλεγχος αυξημένης λυσοσωμικής δραστηριότητας (χρώσεις MDC, acridine orange ή lysotracker κλπ) Έλεγχος αυξημένης κυτταροπλασματικής καταστροφής (LDH ή σουκρόζη)
	Ανίχνευση «σπασίματος» του DNA Χρώση TUNEL	Ανίχνευση της στρατολόγησης της πρωτεΐνης LC3 σε αυτοφαγικές μεμβράνες (αλλαγές στην ενδοκυτταρική τοποθέτηση ή ανίχνευση μετατοπισμένης μάντας)
	Αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων στην υπο-G1 φάση (ανάλυση FACS) Χρώση ανθεξίνης V	

Πίνακας 3: Σύγκριση των δύο τύπων προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου

Προσαρμογή από Gozuacik D and Kimchi A, *Oncogene* 2004 (23) 2891-906

1.7.2.2 Ο βασικός μηχανισμός της αυτοφαγίας

Κατά τη διαδικασία της αυτοφαγίας (Σχήμα 20), αρχικά, μία δομή με απλή μεμβράνη η οποία ονομάζεται μεμβράνη απομόνωσης, περικυκλώνει τμήμα κυτταροπλάσματος και κυτταρικά οργανίδια. Κλείσιμο της μεμβράνης απομόνωσης δημιουργεί μία νέα δομή διαμέτρου περίπου 1μm που ονομάζεται αυτοφαγόσωμα. Ακολουθεί συγχώνευση του τελευταίου με ένα λυσόσωμα, αποικοδόμηση των εσωτερικών μεμβρανών και γένεση του αυτολυσοσώματος. Τέλος, τα συστατικά που περικλείει το αυτολυσόσωμα αποικοδομούνται με την απελευθέρωση λυσοσωμικών υδρολασών. Η διάρκεια ζωής των αυτοφαγοσωμάτων είναι μικρή (χρόνος ημιζωής περίπου 8 λεπτά) σε σχέση με άλλα οργανίδια (95).



Σχήμα 20: Η αυτοφαγική διαδικασία στα θηλαστικά

Προσαρμογή από *Yoshimori T, Bioch Bioph Res Com 2004, 313 (453-458)*.

Η πρωτεΐνη LC3, ομόλογη της Arg8 της ζύμης, εντοπίζεται στη μεμβράνη των αυτοφαγοσωμάτων μετά την έναρξη της διαδικασίας. Αρχικά, η πρωτεΐνη υφίσταται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Αμέσως μετά τη σύνθεσή της, το καρβοξυτελικό της άκρο (5 αμινοξέα στην ανθρώπινη LC3) κόβεται και προκύπτει μία δεύτερη μορφή, η LC3-II, η οποία συνδέεται στενά με τις μεμβράνες των αυτοφαγοσωμάτων. Επίσης, η ποσότητα της LC3-II σχετίζεται με το στάδιο σχηματισμού των αυτοφαγοσωμάτων (Σχήμα 21). Η LC3 πρωτεΐνη λοιπόν έχει αναφερθεί ως ο πρώτος μοριακός μάρτυρας για την ανίχνευση αυτοφαγικής δραστηριότητας (97,98).

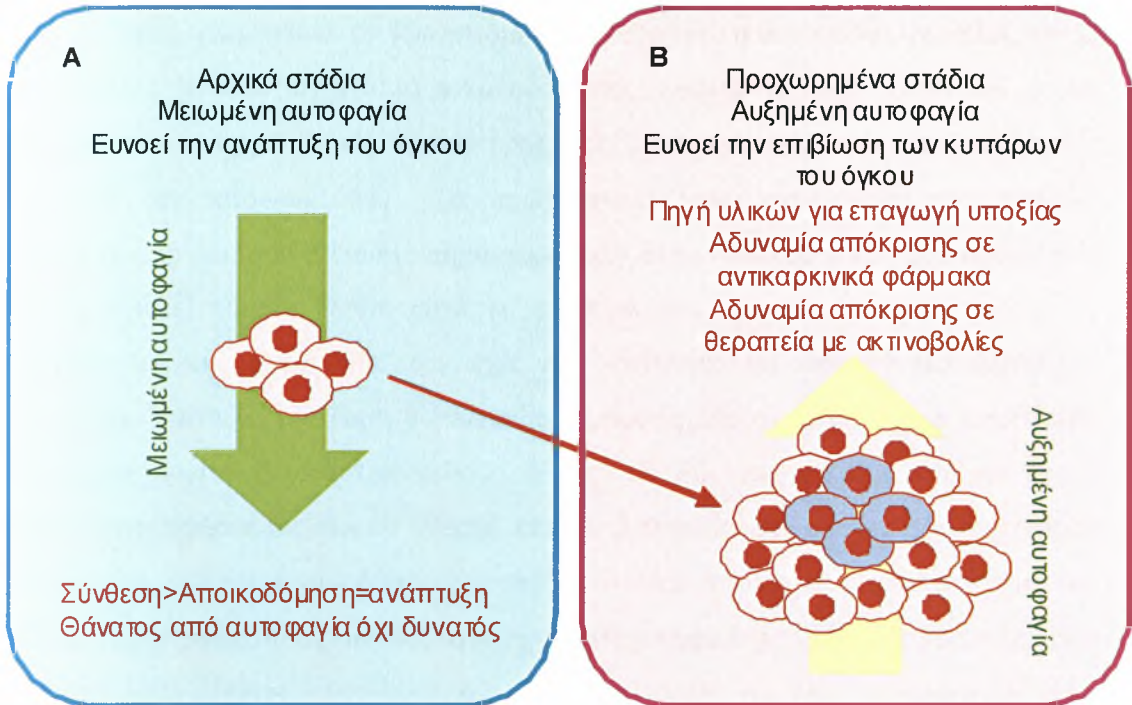


Σχήμα 21: Σχηματική απεικόνιση της δημιουργίας αυτοφαγοσώματος στα κύτταρα θηλαστικών.

Ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Arg5, Arg12, and Arg16L, προσδένεται στις νεοδημιουργούμενες μεμβράνες απομόνωσης και στρατολογεί την πρωτεΐνη LC3-II στις μεμβράνες και ξεκινά η επιμήκυνσή τους. Οι μεμβράνες επιμηκώνονται και τελικά ωριμάζουν σε αυτοφαγοσώματα. Το σύμπλεγμα των Arg εγκαταλείπει τις μεμβράνες ακριβώς πριν ή μετά τη συγχώνευσή τους, ενώ η LC3 παραμένει. Προσαρμογή από Yoshimori T, *Bioch Bioph Res Com* 2004, 313 (453-458).

1.7.2.3 Αυτοφαγία και καρκίνος

Στα καρκινικά κύτταρα, η αυτοφαγική ικανότητα είναι πιο χαμηλή από αυτή των αντίστοιχων φυσιολογικών ιστών, προτείνοντας ότι η αυτοφαγία εξασθενεί κατά τη διάρκεια της καρκινικής εξαλλαγής των κυττάρων. Τα θετικά αποτελέσματα της αυτοφαγικής δραστηριότητας συνοψίζονται στο ότι μπορεί να καταστείλει τον όγκο επάγοντας κυτταρικό θάνατο στα εξαλλαγμένα κύτταρα και απομακρύνοντας αλλοιωμένα οργανίδια τα οποία θα μπορούσαν να προκαλέσουν την απελευθέρωση ελεύθερων ριζών και να αυξήσουν τον αριθμό των μεταλλάξεων στα κύτταρα. Από την άλλη, αυξημένη αυτοφαγική δραστηριότητα σε καρκινικά κύτταρα μπορεί να συντελέσει στην επιβίωσή τους και την προστασία τους από αντικαρκινικούς παράγοντες (99–101). Είναι γενικά παράδοξο το γεγονός ότι η αυτοφαγία μπορεί να βοηθά την κυτταρική επιβίωση αλλά και να συντελεί στην καταστροφή των κυττάρων. Σε κύτταρα πρώιμων αδενωμάτων και αδενωμάτων παγκρέατος φάνηκε απρόσμενα υψηλή αυτοφαγική δραστηριότητα και αυξημένη ικανότητα δημιουργίας αυτοφαγικών κυστιδίων, σε αντίθεση με κύτταρα αδενοκαρκινώματος (101). Αυτό δείχνει ότι η αυτοφαγική ικανότητα είναι συμβατή με τα προχωρημένα στάδια του καρκίνου του παγκρέατος. Αν λοιπόν η καρκινογένεση θεωρηθεί μία δυναμική διαδικασία θα μπορούσαμε να πούμε πως τόσο η ενεργοποίηση όσο και η απενεργοποίηση της αυτοφαγίας μπορούν να έχουν ωφέλιμα αποτελέσματα (Σχήμα 22).



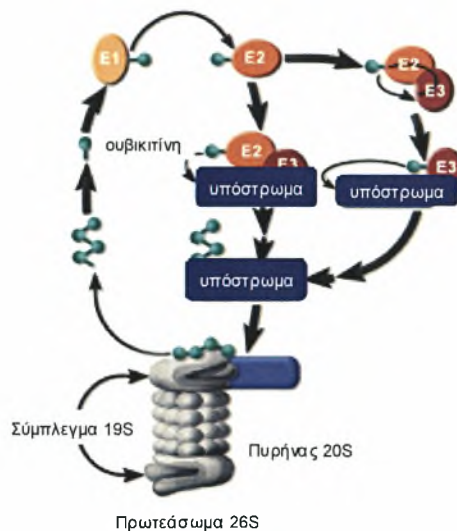
Σχήμα 22: Υποθετικό μοντέλο του διπλού ρόλου της αυτοφαγίας στον καρκίνο.

Ανάλογα με το στάδιο, η μετάβαση από την παρεμπόδιση της αυτοφαγίας στη μέγιστη ενεργοποίησή της θα μπορούσε να είναι ωφέλιμη για κάποιους τύπους καρκίνου (**A**) Στα πρώιμα στάδια, μείωση της πρωτεϊνικής αποικοδόμησης με αυτοφαγία θα μπορούσε να μετατοπίσει τη ζυγαριά προς την πρωτεϊνική σύνθεση κι έτσι να ευνοήσει την κυτταρική αύξηση. Επίσης, οι χαμηλού ρυθμοί αυτοφαγίας θα μπορούσαν να κάνουν τα κύτταρα αυτά ανθεκτικά το θάνατο. (**B**) Σε προχωρημένα στάδια καρκινογένεσης, η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας θα μπορούσε να επιτρέπει την κυτταρική επιβίωση των κυττάρων που βρίσκονται σε κεντρικές περιοχές του όγκου (μπλε) τα οποία εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα αγγειογένεσης. Για να αντισταθμιστεί το γεγονός ότι χαμηλές ποσότητες θρεπτικών ουσιών φτάνουν στα κύτταρα αυτά με την κυκλοφορία του αίματος, θα μπορούσε να ενεργοποιηθεί η αυτοφαγία προκειμένου να αποικοδομηθούν ενδοκυτταρικά μακρομόρια κι έτσι να μην υπάρχει ανάγκη σύνθεσης συστατικών. Κάποια από τα καρκινικά αυτά κύτταρα θα μπορούσαν να ενεργοποιήσουν την αυτοφαγία εκτιθέμενα σε διάφορες αντικαρκινικές θεραπείες, ως μηχανισμός άμυνας. Προσαρμογή από *Cuervo AM, Trends Cel Biol 2004, 14 (70-77)*.

Έχει δειχθεί ότι η ογκοπρωτεΐνη Ha-Ras επάγει αυτοφαγία σε καρκινικές κυτταρικές σειρές γλοίας και στομάχου, σε αντίθεση με τις ογκοπρωτεΐνες Ki- και N-Ras (102). Σε κύτταρα HT29, το ογκογονίδιο *RAS* επάγει αυτοφαγία μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού μεταγωγής σήματος της MAPK (103). Επομένως, η επαγωγή αυτοφαγικού κυτταρικού θανάτου από την πρωτεΐνη Ras θα μπορούσε να αποτελεί επίπεδο ελέγχου κατά της δημιουργίας καρκίνου.

1.7.3 Το πρωτεάσωμα

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, η αυτοφαγία αποτελεί, εκτός των άλλων, βασικό μηχανισμό αποικοδόμησης ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ο δεύτερος, ανεξάρτητος μηχανισμός αποικοδόμησης είναι το πρωτεάσωμα (104). Το πρωτεάσωμα είναι ένα σύμπλεγμα πολλών πρωτεϊνών το οποίο έχει επίσης σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών που έχουν υποστεί κάποια βλάβη κατά τη σύνθεσή τους ή που είναι γερασμένες. Σε αντίθεση με την αυτοφαγία, δεν έχει την ικανότητα να αποικοδομεί ολόκληρα οργανίδια. Αποτελεί μια δομή βαρελοειδούς μορφής που συνίσταται από μία στοίβα τεσσάρων πρωτεϊνών δακτυλιοειδούς δομής. Οι δύο κεντρικοί δακτύλιοι έχουν ενεργότητα πρωτεάσης και το ενεργό κέντρο βρίσκεται στο κέντρο του κυλίνδρου (Σχήμα 23). Η προς αποικοδόμηση πρωτεΐνη δεσμεύεται αρχικά ομοιοπολικά με ένα μόριο ουβικιτίνης, μιας μικρής συντηρημένης πρωτεΐνης (105). Το σύμπλοκο ουβικιτίνης-πρωτεΐνης αναγνωρίζεται και δεσμεύεται σε ένα πρωτεάσωμα, που αποδεσμεύει την ουβικιτίνη και αποδιατάσσει την πρωτεΐνη-στόχο. Η πρωτεΐνη στη συνέχεια εισέρχεται στο διάυλο που σχηματίζουν οι πρωτεϊνικοί δακτύλιοι. Καθώς περνά από το κέντρο του διαύλου αποικοδομείται σε πεπτίδια, τα οποία απελευθερώνονται στη διαλυτή φάση, όπου ολοκληρώνεται η αποικοδόμησή τους σε αμινοξέα.

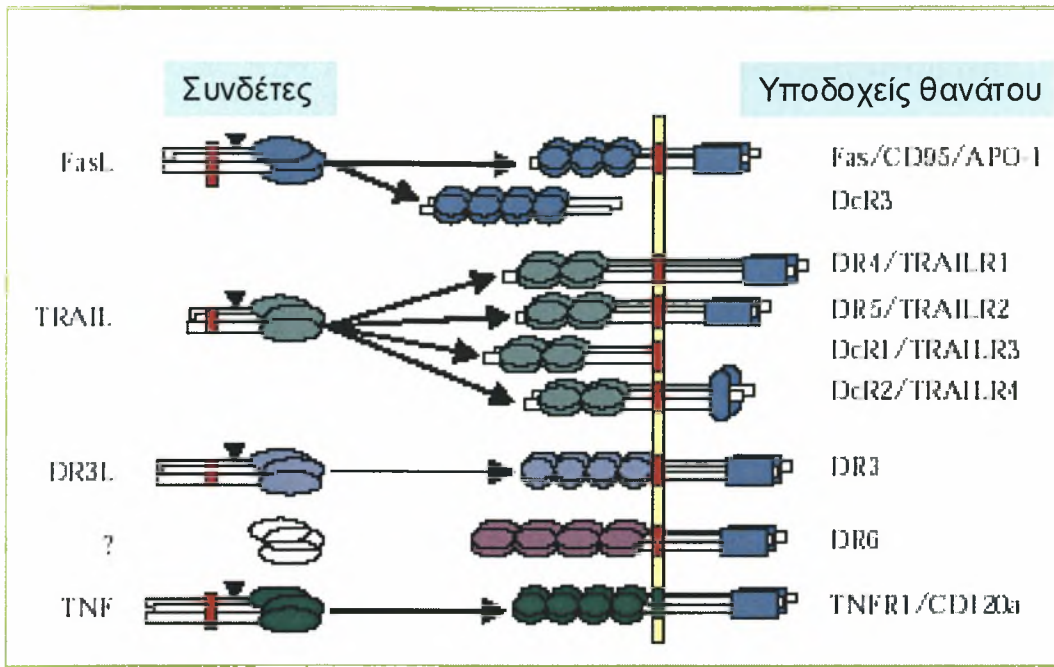


Σχήμα 23: Το πρωτεάσωμα

1.8 Υποδοχείς θανάτου και απόπτωση

Οπως περιγράφηκε στην ενότητα 1.7.1, η απόπτωση είναι μία μορφολογική και βιοχημική διαδικασία η οποία διαφέρει από τη νέκρωση και επιτρέπει σε έναν πολυκύτταρο οργανισμό να αποβάλλει τα γερασμένα, πλεονάζοντα ή κατεστραμμένα κύτταρα. Έτσι, η απόπτωση μπορεί να αποτρέψει τη διατήρηση και τον πολλαπλασιασμό των κατεστραμμένων κυττάρων. Κατ' επέκταση, στην περίπτωση του καρκίνου, η επαγωγή απόπτωσης μπορεί να αποτελέσει στόχο καρκινικής θεραπείας. Η ενεργοποίηση των κασπασών, η οποία είναι απαραίτητη για την απόπτωση, μπορεί να προκληθεί από ένα μονοπάτι το οποίο ξεκινά από το εξωτερικό του κυττάρου και χρησιμοποιεί ειδικούς μεμβρανικούς «υποδοχείς θανάτου» προκειμένου να καταλήξει στην ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών. Οι υποδοχείς θανάτου αποτελούν μέλη της υπεροικογένειας παραγόντων νέκρωσης όγκου (tumour necrosis factors, TNF), οι οποίοι όταν αναγνωρίσουν τους συνδέτες τους ξεκινούν ταχύτατη ενεργοποίηση των κασπασών και οδηγούν το κύτταρο σε απόπτωση. Όλοι οι υποδοχείς θανάτου κατέχουν μία ομάδα πλούσια σε κυστεΐνες στο εξωκυττάριο τμήμα τους και μία ενδοκυτταρική περιοχή η οποία χαρακτηρίζεται από μία χαρακτηριστική αλληλουχία, γνωστή ως «περιοχή θανάτου» (death domain, DD) (106,107).

Οι καλύτερα χαρακτηρισμένοι υποδοχείς θανάτου είναι οι CD95/Fas/Apo1 και TNFR1 (Σχήμα 24). Πρόσδεση των υποδοχέων με τους συνδέτες τους έχει ως αποτέλεσμα τον τριμερισμό των υποδοχέων, τη συνάθροιση των περιοχών θανάτου των υποδοχέων και ακολούθως τη στρατολόγηση της πρωτεΐνης FADD (Fas-associated death domain· γνωστή επίσης και ως Mort1). Η FADD περιέχει επίσης στο καρβοξυτελικό της άκρο μία περιοχή θανάτου. Επίσης, διαθέτει μία δεύτερη περιοχή στο αμινοτελικό της άκρο στην οποία μπορεί να προσδένεται η εναρκτήρια κασπάση-8. Το σύμπλεγμα που δημιουργείται από την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών αναφέρεται ως σύμπλεγμα DISC (death-inducing signalling complex) (108,109). Αυτοκατάλυση της προκασπάσης-8 δημιουργεί την ενεργή κασπάση-8. Με ανάλογο τρόπο, ο τριμερισμένος TNFR1 μπορεί να οδηγήσει σε στρατολόγηση του μορίου TRADD (TNFR-associated death domain), το οποίο στρατολογεί την πρωτεΐνη FADD και την προκασπάση-8.



Σχήμα 24: Οι υποδοχείς θανάτου.

Ανήκουν στην οικογένεια των TNF και μοιράζονται μία διακριτή κυτταροπλασματική περιοχή η οποία ονομάζεται «περιοχή θανάτου». Προσαρμογή από *Petak I and Houghton JA, Pathol Oncol Res 2001, 7 (95-106)*.

1.8.1 Το TRAIL

Το TRAIL (Apo2 Ligand or Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Induced Ligand) είναι ένα από τα μέλη της υπεροικογένειας των παραγόντων νέκρωσης όγκου (TNF) και εντοπίστηκε το 1995 (110,111). Ανήκει στις κυτοκίνες, οι οποίες είναι πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση κυττάρων με δέσμευσή τους σε ειδικούς υποδοχείς κυττάρων-στόχων. Δείχνει μεγαλύτερη ομολογία με τον CD95L, περίπου 28% στην εξωκυτταρική τους περιοχή. Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μέλη της υπεροικογένειας των TNF, των οποίων η έκφραση υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση και εκφράζονται παροδικά μόνο στα ενεργοποιημένα κύτταρα, το mRNA του TRAIL εκφράζεται σταθερά σε μεγάλο αριθμό ιστών (110).

Ο παράγοντας TRAIL, όπως όλα τα μέλη της οικογένειας TNF, είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II, 33-35kDa, η οποία διαθέτει μία εξωκυτταρική περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο και μία ενδοκυτταρική περιοχή στο αμινοτελικό

άκρο και δρα ως τριμερές. Αντίθετα με άλλα μέλη της οικογένειας TNF, ο παράγοντας TRAIL φέρει ένα ιόν ψευδαργύρου στην επιφάνεια του τριμερούς, το οποίο συγκρατείται από το μοναδικό, αζευγάρωτο κατάλοιπο κυστεΐνης, Cys 230, κάθε μονομερούς. Το ιόν ψευδαργύρου είναι ουσιώδες για τη δομική ακεραιότητα του παράγοντα TRAIL και αντικατάσταση της κυστεΐνης 230 σε αλανίνη ή σερίνη επηρεάζει την ικανότητα του παράγοντα TRAIL να επάγει απόπτωση.

1.8.2 Υποδοχείς του TRAIL και απόπτωση μέσω του συμπλέγματος DISC.

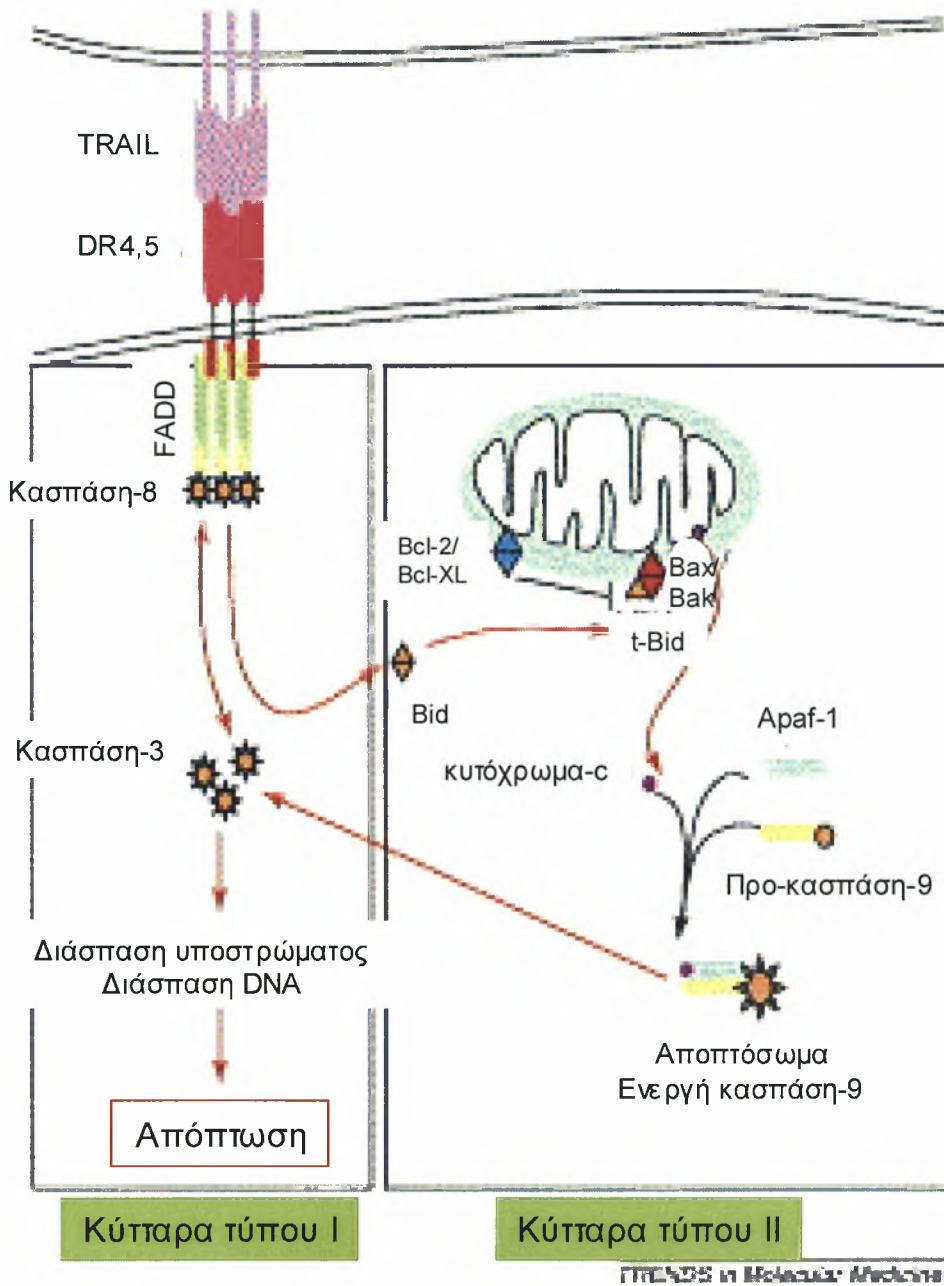
Το TRAIL μεταβιβάζει αποπτωτικά σήματα μέσω της πρόσδεσής του ως ομοτριμερές (112) με ένα σύστημα υποδοχέων που αποτελείται από δύο υποδοχείς θανάτου, τους DR4 (TRAIL-R1) και DR5 (TRAIL-R2). Οι υποδοχείς αυτοί περιέχουν μία κυτταροπλασματική ουρά στο αμινοτελικό τους άκρο η οποία ονομάζεται περιοχή θανάτου (113). Το μονοπάτι θανάτου ξεκινά με τη στρατολόγηση της πρωτεΐνης FADD (Fas-associated death domain) στο ενδοκυτταρικό τμήμα του συστήματος των υποδοχέων και ακολουθεί η πρόσδεση της προκασπάσης-8 ή της προκασπάσης-10, οπότε δημιουργείται το σύμπλεγμα θανάτου DISC (108,109) (Σχήμα 25). Το TRAIL μπορεί επίσης να προσδέεται σε δύο ακόμα υποδοχείς «παραπλάνησης» (decoy receptors) DcR1 (TRAIL-R3) and DcR2 (TRAIL-R4), οι οποίοι δεν περιέχουν τομέα θανάτου και δεν έχουν την ικανότητα να μεταβιβάζουν σήμα θανάτου (114,115).

Το TRAIL έχει ήδη προσελκύσει το ενδιαφέρον ως υποψήφιο αντικαρκινικό φάρμακο και αυτό κυρίως οφείλεται στην ικανότητά του να επάγει απόπτωση επιλεκτικά σε πολλά καρκινικά κύτταρα, χωρίς να επηρεάζει τα φυσιολογικά, μη μετασχηματισμένα κύτταρα (116,117). Η σχετική ανθεκτικότητα των φυσιολογικών κυττάρων στην επαγόμενη από το TRAIL απόπτωση έχει αποδοθεί στην υψηλή περιεκτικότητα των κυττάρων αυτών σε υποδοχείς «παραπλάνησης» (118). Πρόσφατες προ-κλινικές έρευνες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν παράγωγα ανασυνδυασμένου TRAIL, καθώς και μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία μιμούνται τα αποτελέσματα του TRAIL, έδειξαν πως μπορεί να προκληθεί απόπτωση σε μεγάλη ποικιλία ανθρώπινων όγκων αλλά και καταστολή όγκων σε ποντίκια, χωρίς παράλληλη τοξικότητα στον οργανισμό. Επιπλέον, το TRAIL μπορεί να χορηγείται συμπληρωματικά σε ήδη εφαρμοσμένες θεραπείες, εφόσον μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία στον κυτταρικό θάνατο σε όγκους δρώντας συνεργιστικά με

χημειοθεραπευτικούς παράγοντες ή θεραπεία με υπεριώδη ακτινοβολία (119).

1.8.3 Το μιτοχονδριακό μονοπάτι

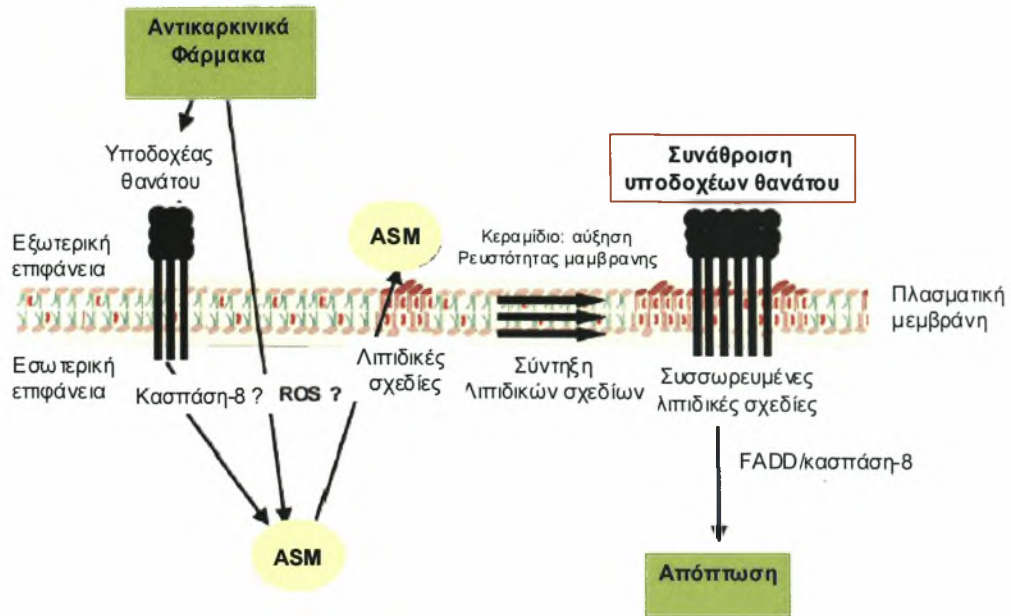
Η δημιουργία του συμπλέγματος DISC και η διάσπαση της κασπάσης-8 μπορεί να οδηγήσει στην άμεση ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών ο οποίος θα καταλήξει σε απόπτωση (κύτταρα τύπου I). Σε μία δεύτερη περίπτωση, εξαρτώμενη πολλές φορές από τον κυτταρικό τύπο, ο κυτταρικός θάνατος πραγματοποιείται μέσω της ενεργοποίησης μονοπατιών στα οποία μεσολαβούν τα μιτοχόνδρια. Στα κύτταρα αυτά, κύτταρα τύπου II, η κασπάση-8 προκαλεί διάσπαση της πρωτεΐνης Bid, η οποία ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2. Το κομμένο καρβοξυτελικό τμήμα της Bid (truncated Bid, t-Bid), μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα την εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης του μιτοχονδρίου προκαλώντας την αλλαγή του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η αλλαγή αυτή συνοδεύεται από την απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c και των πρωτεϊνών Samac/DIABLO στο κυτταρόπλασμα, την επακόλουθη ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών (120,121) και την απόπτωση. Έχει επίσης δειχθεί ότι η t-Bid μπορεί να προκαλέσει αλλαγή στη διαμόρφωση μίας άλλης πρωτεΐνης, ομόλογης της Bcl-2, της πρωτεΐνης Bax, η οποία μπορεί να προωθήσει τη δημιουργία πόρων στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, συντελώντας στην απελευθέρωση προαποπτωτικών πρωτεϊνών από τα μιτοχόνδρια (Σχήμα 25).



Σχήμα 25: Δημιουργία του συμπλέγματος DISC και αποπτωτικά μονοπάτια

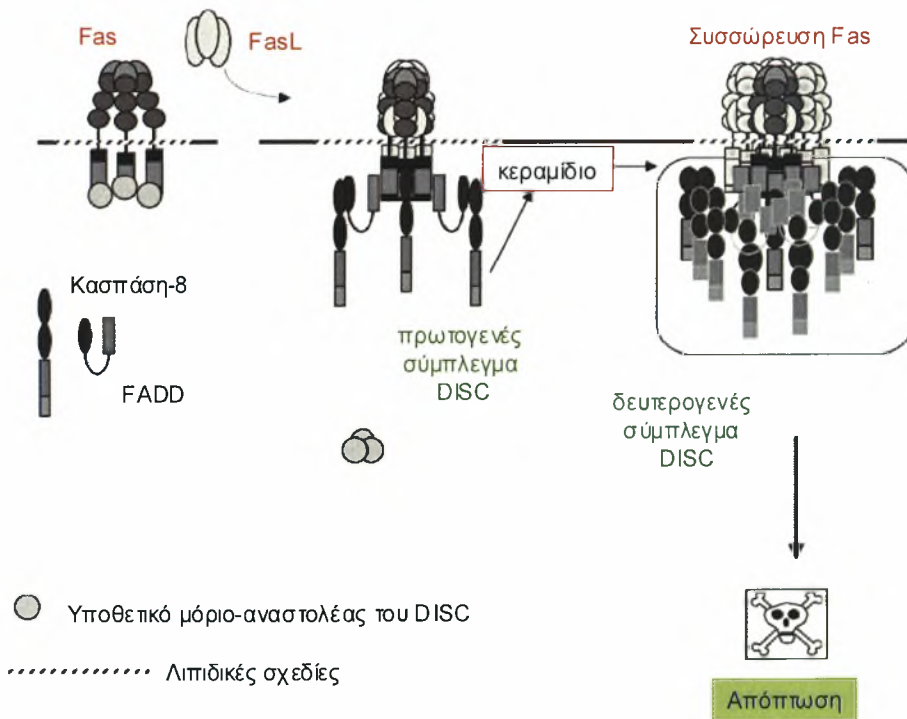
1.9 Λιπιδικές «σχεδίες» (*lipid rafts*)

Έχει βρεθεί ότι τα λιπίδια υπάρχουν σε διάφορες φάσεις στη λιπιδική διπλοστιβάδα. Οι λιπιδικές σχεδίες αποτελούν μία δυναμική συνάθροιση χοληστερόλης και σφιγγολιπιδίων (σφιγγομυελίνης και γλυκοσφιγγολιπιδίων) στην εξωκυτταρική πλευρά της διπλοστιβάδας. Αποτελούν διακριτές μικροδομές με βασική ιδιότητα την πρόσληψη ή απομάκρυνση διάφορων πρωτεϊνών. Πρωτεΐνες με μεγάλη συγγένεια για τις λιπιδικές σχεδίες είναι οι πρωτεΐνες που προσδέονται με γλυκοφωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (GPI-anchored πρωτεΐνες) ή πρωτεΐνες που φέρουν υδροφοβικές τροποποιήσεις. Δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος ο λόγος για τον οποίο πολλές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες περικλείονται στις λιπιδικές σχεδίες. Η παλμιτοϋλίωση μπορεί να αυξήσει τη συγγένεια της πρωτεΐνης για τις λιπιδικές σχεδίες και αυτό ίσως εξηγεί και τον εντοπισμό της Ha-Ras πρωτεΐνης στις μικροδομές αυτές, όπως είδαμε στην παράγραφο 1.5.1. Ένα από τα βασικά συστατικά των μικροδομών αυτών είναι κυστίδια καβεολίνης. Τα κυστίδια αυτά, αν και η γενική λειτουργία τους δεν είναι ξεκάθαρη, συμμετέχουν στις διαδικασίες ενδοκύτωσης αλλά και σε διαδικασίες μεταγωγής σημάτων. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο να συσσωρεύουν υποδοχείς επιφανείας σε εξειδικευμένες θέσεις κι έτσι να ξεκινούν τη μεταγωγή σημάτων από έναν μεγάλο αριθμό υποδοχέων (122,123). Πρόσδεση των υποδοχέων με τους συνδέτες τους αυξάνει τη συγγένειά τους για τις λιπιδικές σχεδίες. Έχει βρεθεί ότι εάν η ενεργοποίηση ενός υποδοχέα συμβεί μέσα σε αυτές τις δομές, το σύμπλεγμα του υποδοχέα προστατεύεται από ένζυμα όπως μεμβρανικές φωσφατάσες, οι οποίες διαφορετικά θα επηρέαζαν το σήμα. Διάφορα μοντέλα έχουν προταθεί για το ρόλο των μικροδομών αυτών στην ενεργοποίηση μεμβρανικών υποδοχέων (Σχήμα 26, Σχήμα 27). Έχει δειχθεί ότι η πολυφαινόλη ρεσβερατρόλη προκαλεί ανακατανομή των υποδοχέων θανάτου και συσώρευσή τους στις λιπιδικές σχεδίες και με τον τρόπο αυτό συνεργάζεται με το TRAIL και τον CD95 για την επαγωγή κυτταρικού θανάτου σε κύτταρα παχέος εντέρου (124,125). Επίσης, το σύμπλεγμα έναρξης της απόπτωσης DISC μετά την ενεργοποίηση υποδοχέων θανάτου δημιουργείται στις λιπιδικές σχεδίες σε ενεργοποιημένα θυμοκύτταρα (123). Η δημιουργία του συμπλέγματος DISC της απόπτωσης που επάγεται από την πρόσδεση του συνδέτη Fas στον υποδοχέα του σταθεροποιείται με τη βοήθεια σφιγγολιπιδίων όπως το κεραμίδιο, το οποίο επάγει επίσης και συγχώνευση κοντινών λιπιδικών σχεδίων με αποτέλεσμα την επέκταση του σήματος (Σχήμα 27).



Σχήμα 26: Πρώιμα γεγονότα που συμβαίνουν στην πλασματική μεμβράνη και φαίνεται να συμμετέχουν στον επαγόμενο από χημειοθεραπεία κυτταρικό θάνατο.

Προσαρμογή από *Dimanche-Boitrel et al., Drug Res Updates 2005, 8 (5-14)*.



Σχήμα 27: Υποθετική διαδικασία μεταγωγής σήματος από τον Fas/CD95.

Υποδοχείς που περιέχουν περιοχή θανάτου όπως ο Fas βρίσκονται στις λιπιδικές σχεδίες σε ανενεργή μορφή, εξαιτίας σύνδεσής τους με πιθανά μόρια που ρυθμίζουν αρνητικά τη δράση τους, προλαμβάνοντας τη συνάθροιση των υποδοχέων. Η πρόσδεση του συνδέτη FasL καταργεί τους αναστολείς από τις λιπιδικές σχεδίες και τα μόρια που απαιτούνται για τη σηματοδότηση όπως ο FADD και η κασπάση-8 στρατολογούνται στις λιπιδικές σχεδίες. Προσαρμογή από *Hueber AO, Cell Death Differ 2003, 10 (7-9)*.

1.10 Συστήματα-μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

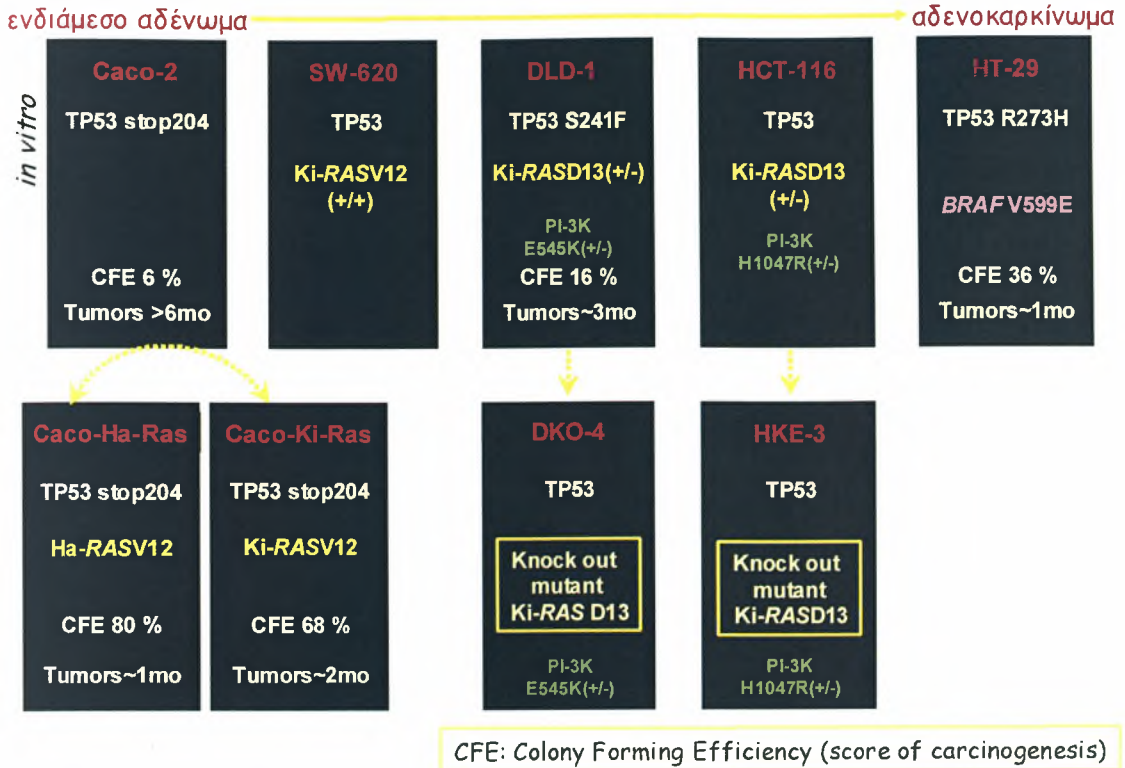
Προκειμένου να συσχετίσουμε τα αποτελέσματα της κερσετίνης στα κύτταρα με τα *RAS* ογκογονίδια, χρησιμοποιήσαμε τρία βασικά συστήματα.

A. Το πρώτο σύστημα αποτελείται από κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου, οι οποίες φέρουν διάφορες μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα πρωτοογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια, προέρχονται από τον ίδιο ασθενή και αντιπροσωπεύουν διάφορα στάδια καρκινογένεσης (Caco-2, DLD-1 και HT-29). Το πλεονέκτημα του συστήματος αυτού είναι ότι μπορούμε να μελετάμε μονοπάτια σε κάθε ένα από τα βήματα του πολυσταδιακού συστήματος της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου (Σχήμα 28A).

B. Το δεύτερο σύστημα έχει περιγραφεί από τους Roberts et al. (126). Αποτελείται από αδενωματικά κύτταρα ανθρώπινου παχέος εντέρου (Caco-2) τα οποία έχουν επιμολυνθεί με το *RAS* ογκογονίδιο και υπερεκφράζουν σταθερά το μεταλλαγμένο Ki-*RAS* ή Ha-*RAS*. Το σύστημα αυτό προσφέρει τη δυνατότητα μελέτης της επίδρασης ενός μόνο ογκογονιδίου στο μετασχηματισμό των κυττάρων και την μεσολαβούμενη από την κερσετίνη τροποποίηση των μονοπατιών που σηματοδοτούνται από το *RAS*. Επιπλέον, για τον ίδιο λόγο χρησιμοποιήσαμε κύτταρα που έχουν ήδη ενεργοποιημένο *RAS* ογκογονίδιο και τα αντίστοιχα κύτταρα που προήλθαν από απαλοιφή του ογκογονιδίου με ομόλογο ανασυνδυασμό (Σχήμα 28A, B).

Γ. Τέλος, στα πειράματα της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε ένα νέο *in vitro* σύστημα μελέτης χημειοπροστατευτικής δράσης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήσαμε σύστημα επαγόμενης έκφρασης του *RAS* σε αθανατοποιημένα ανθρώπινα κύτταρα. Το πλεονέκτημα που παρέχει το σύστημα αυτό είναι μία *in vitro* προσέγγιση των πρώιμων αλλαγών που επιφέρει η ενεργοποίηση του *RAS* ογκογονιδίου και μια πιο άμεση διαπίστωση της χημειοπροστατευτικής δράσης των ουσιών που μας ενδιαφέρουν στην εξέλιξη - πρόληψη του καρκίνου (Σχήμα 29).

A

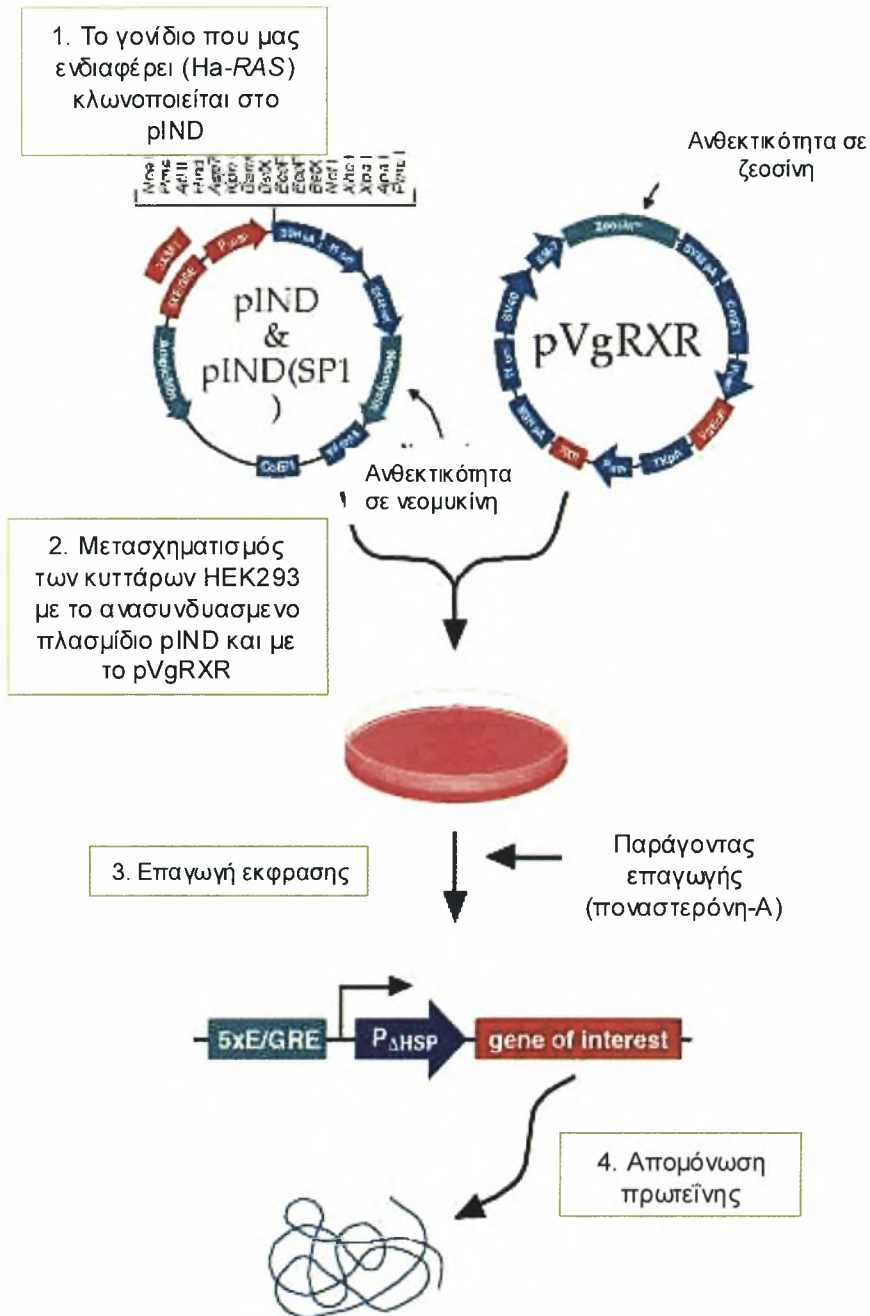
Κυτταρικές σειρές και μετασχηματισμένα κύτταρα με το ογκογονίδιο *RAS*

B

**Σχήμα 28: Κύτταρα του παχέος εντέρου που χρησιμοποιήθηκαν.**

A. Κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου και μετασχηματισμένα κύτταρα με το *RAS* ογκογονίδιο.

B. Μορφολογία των κλώνων του *RAS* γονιδίου. Τα κύτταρα αδενοκαρκινώματος Caco-2 μετασχηματίστηκαν με πλασμίδιο που περιείχε το μεταλλαγμένο γονίδιο *Ki-RAS* ή *Ha-RAS* και οι κλώνοι K15 και H2 επιλέχθηκαν για τα πειράματά μας εξαιτίας των ενδιάμεσων επιπέδων έκφρασης της εξωγενούς έκφρασης των γονιδίων *Ki-RAS* ή *Ha-RAS*, αντίστοιχα. Το ογκογονίδιο *Ha-RAS* άλλαξε σημαντικά τη μορφολογία των κυττάρων.



Σχήμα 29: Το επαγόμενο σύστημα της έκφρασης του *RAS*.

Το πλασμίδιο *pVgRXR* κωδικοποιεί τον υποδοχέα της εκδυσόνης. Το ογκογονίδιο *RAS* κλωνοποιείται μέσα στο πλασμίδιο *pIND* και τα κύτταρα επιμολύνονται ταυτόχρονα με τα δύο πλασμίδια (*pVgRXR* and *pIND-RAS*). Προσθήκη ποναστερόνης-A (ομόλογο της εκδυσόνης) στα κύτταρα επιτρέπει την πρόσδεση του υποδοχέα της εκδυσόνης στον υποκινητή στο πλασμίδιο *pIND* και επάγει την έκφραση του ογκογονιδίου *RAS*.

Σκοπός της διδακτορικής διατριβής.

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η επίδραση της κερσετίνης στην κυτταρική βιωσιμότητα καρκινικών και προ-καρκινικών κυττάρων και σε ογκογονικές ιδιότητες, μέσω της ικανότητάς της να τροποποιεί μόρια «κλειδιά», υπεύθυνα για τον ογκογονικό μετασχηματισμό. Εφόσον το ογκογονίδιο *RAS* είναι ένα από τα πιο βασικά γονίδια του οποίου οι μεταλλάξεις ανιχνεύονται σε αρχικά στάδια διάφορων τύπων καρκίνου, η επίδραση της κερσετίνης στα επίπεδα της ογκοπρωτεΐνης Ras σε επιθηλιακά ανθρώπινα κύτταρα αποτέλεσε στόχο των πειραμάτων μας.

Επιπλέον, στοχεύοντας στο να ενισχύσουμε τα επίπεδα της απόπτωσης που επάγει ο αποπτωτικός παράγοντας TRAIL σε καρκινικά κύτταρα του ανθρώπινου παχέος εντέρου τα οποία εμφανίζουν μειωμένη ευαισθησία στον παράγοντα αυτό, μελετήσαμε τα αποτελέσματα του συνδυασμού του TRAIL με την πολυφαινόλη κερσετίνη. Για το λόγο αυτό, εξετάσαμε το αποτέλεσμα του συνδυασμού στην κυτταρική βιωσιμότητα, αλλά και σε μονοπάτια μεταγωγής σημάτων που οδηγούν τα κύτταρα σε απόπτωση.

Κεφάλαιο 2

Υλικά και

μέθοδοι

2.1 Υλικά και εταιρείες προέλευσης

2.1.1 Κυτταροκαλλιέργεια

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium): Gibco, Invitrogen

FBS (fetal bovine serum): Gibco, Invitrogen

Πενικιλίνη, Στρεπτομυκίνη: Gibco, Invitrogen

Non-essential aminoacids: Gibco, Invitrogen

Hepes: Sigma

Ινσουλίνη: Sigma

Τρανσφερίνη: Calbiochem

Υδροκορτιζόνη: Sigma

Διάλυμα θρυψίνης: Gibco, Invitrogen

PBS 1x: αραιώση από διάλυμα 10x, Gibco, Invitrogen

Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO): Fluka

Ponasterone-A: Invitrogen

z-VAD-fmk: Alexis

MDC (monodansylcadaverin): Sigma

3-MA (3-methyladenine): Sigma

MG132: TechnoBioChem (Biomol)

Κερσετίνη (3,3',4', 5,7-pentahydroxyflavone): Sigma

2.1.2 Χημικά για χρήση *in vitro* τεχνικών

Φαλλοϊδίνη: Molecular Probes

BSA (albumin bovine serum): Biomol

Hoechst33258: Sigma

Ιωδιούχο προπίδιο: Sigma

TRIZOL: Life Technologies, Invitrogen

Αντίστροφη μεταγραφάση: Invitrogen

Τaq πολυμεράση: Invitrogen

Αντιδραστήριο Bradford: Biomol Laboratories

Λουμινόλη, κουμαρικό οξύ: Sigma

Απροτινίνη, Λευπεπτίνη: Sigma

2.1.3 Χημικά για παρασκευή διαλυμάτων

Χλωριούχο νάτριο (NaCl), χλωριούχο κάλιο (KCl), Tris-βάση, χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂), σακχαρόζη, αιθυλενο-διάμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA), αιθυλενο-γλυκολ-bis (2-αμινοεθυλαιθερ)- N, N, N', N'- τετραοξικό οξύ, υπερθειικό αμμώνιο (APS),θειικό δωδεκυλικό νάτριο (SDS), φθοριούχο νάτριο (NaF), υδροχλωρικό οξύ (HCl), γλυκίνη, αιθανόλη, μεθανόλη, οξικό οξύ, βορικό οξύ, **BDH**

MES, BBS, DTT, φαινυλ-μεθυλ-σουλφονυλο-φθορίδιο (PMSF), γλυκερόλη, Triton X-100, τετραμεθυλ-αιθυλεν-διαμίνη (TEMED), **SIGMA**

2.1.4 Αντισώματα

α. Ανάλυση κατά Western

Πρωτογενή αντισώματα- Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έναντι των: Ki-Ras (Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-30), Ha-Ras (Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-29), Ha-Ras (Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-35), RhoA (Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-418), PARP (Santa Cruz Biotechnology Inc., PARP (Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-8007), Bid (Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-11423), Bax (Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-493), Κυτόχρωμα-*c* (Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-13156), Καβεολίνη-1 (Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-894), Κασπάση-3 (Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-1225), Κασπάση-8 (Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-6134), FADD (BD Transduction Laboratories, No. 610399), DR4 (Alexis, #1139), DR5 (Alexis, #2019), Erk-2 (Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-1647), β-ακτίνη (Abcam, ab8226).

Δευτερογενή αντισώματα- Αντισώματα παρασκευασμένα σε κασίκα σημασμένα με ομάδα περοξειδάσης έναντι των ανοσοσφαιρινών IgG κουνελιού, ποντικού, αρουραίου (Jackson) ή κασίκας (Santa Cruz Biotechnology).

β. Ανοσοφθορισμός

Πρωτογενή αντισώματα- Τα αντισώματα που αναγνωρίζουν τους υποδοχείς του TRAIL προσφέρθηκαν από τον Dr. Ladislav Andera (*Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech*): DR4 (clone 02B4) και DR5 (clone 5C11/G8). Η καβεολίνη-1 ήταν από τη Santa Cruz Biotechnology Inc. (sc-894).

Δευτερογενή αντισώματα- αντίσωμα παρασκευασμένο σε κασίκα έναντι των ανοσοσφαιρινών IgG ποντικού (Alexa fluor 488, πράσινο) και κουνελιού (Alexa fluor 555, κόκκινο) από την Alexis.

γ. Κυτταρομετρία ροής

Για την ανίχνευση του πρωτεολυτικού τμήματος της κυτοκερατίνης-18: μονοκλωνικό αντίσωμα προσδεμένο σε φλουορεσκίνη (κλώνος M30, Roche, No 2 156 857).

Για τη ανίχνευση των DR4 και DR5 στην κυτταρική επιφάνεια: *Πρωτογενή αντισώματα*- DR4 - Alexis HS101, DR5 - Alexis HS201, DcR1 - Alexis HS301, DcR2 - Alexis HS402, Fas- Exbio LT95, CD29 -Exbio MEM101A
Δευτερογενή αντισώματα- IgG1- GAM-PE (#1070-09 – Southern Biotechnology Associates).

2.1.5 Εκκινητές

Για το *DR4*: Fw: 5'-CAGAACGTCCTGGAGCCTGTAAC- 3' και Rev: 5'-ATGTCCATTGCCTGATTCTTTGTG-3'

Για το *DR5*, Fw: 5'-GGGAAGAAGATTCTCCTGAGATGTG-3' και Rev: 5'-ACATTGTCCTCAGCCCCAGGTCG-3'

Για το *Ki-RAS*: Fw: 5'-AGTGCCTTGACGATACAG-3' και Rev: *Ki(4B)*: 5'-GCATCATCAACACCCTGTCTT-3'

Για το *Ha-RAS*: Fw, 5'-CAAGAGTGCGCTGACCATCC- 3' και Rev, 5'-CCGGATCTCACGCACCAAC-3'

Για το *GAPDH* Fw: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' και Rev: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'.

2.2 Διαλύματα

2.2.1 Ηλεκτοφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

TBE 5x (για 1 λίτρο): 54gr Tris-base, 27,5gr βορικό οξύ και 20ml 0,5M EDTA pH 8.

Πήκτωμα αγαρόζης 1,2%: 1,2gr αγαρόζης σε 100ml TBE 1x

2.2.2 Διαλύματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

Διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (resolving gel) - για 10ml

	8%	10%	12.5%	15%
dd H ₂ O	4.78 ml	4.1 ml	3.4 ml	2.4 ml
Bis-acrylamide	2.72 ml	3.4 ml	4.1 ml	5.1 ml
4x Tris pH8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5ml	2.5 ml
APS	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
TEMED	13 μl	13 μl	13 μl	13 μl

Διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης (stacking gel) – για 10ml

dd H ₂ O	2.92 ml
Bis-acrylamide	0.83 ml
4x Tris pH6.8	1.25 ml
APS	50 μl
TEMED	7 μl

4x Tris HCL - SDS pH 8.8

Tris base	91 g
SDS	2 g
HCl	> pH 8.8
d H ₂ O	> 900 ml

Διάλυμα ακρυλαμιδίου

Acrylamide	29 g
Bis-acrylamide	1 g
d H ₂ O	συμπλήρωση μέχρι 1 L

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer) 10x

Tris base	30.2 g
Glycine	144 g
SDS	10 g
d H ₂ O	συμπλήρωση μέχρι 1 L

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x

Running buffer 10x	100 ml
d H ₂ O	900 ml

Διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer) 10x

Tris-base	30.2 g
Glycine	144 g
d H ₂ O	συμπλήρωση μέχρι 1 L

Διάλυμα μεταφοράς 1x

Transfer buffer 10x	100 ml
μεθανόλη 20%	200ml
d H ₂ O	700 ml

Διάλυμα TBS 10x

Tris base	24.2 g
NaCl	80 g
HCl	> pH 7.6
d H ₂ O	συμπλήρωση μέχρι 1 L

Διάλυμα TBS-T

TBS buffer 10x	50 ml
Tween	500 μl
d H ₂ O	450 ml

Χρώση Ponceau-S

Χρωστική Ponceau-S	2 g
Τριχλωροξικό οξύ	30 g
Σουλφοσαλυλικικό οξύ	30 g
d H ₂ O	συμπλήρωση μέχρι 100ml

Διαλύματα ECL για τη ανίχνευση των πρωτεϊνών (για 10ml)

Διάλυμα I: 1ml Tris-HCl pH 8,5, 100μl λουμινόλη, 44μl κουμαρικό οξύ

Διάλυμα II: 1ml Tris-HCl pH 8,5, 6,4μl H₂O₂

2.2.3 Διάλυμα λύσης για την απομόνωση μιτοχονδριακών κλασμάτων

250mM σουκρόζη, 20mM Hepes, 1mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 1mM DTT

2.2.4 Διάλυμα λύσης για τη μελέτη των πρωτεϊνών Ras

10% γλυκερόλη, 1% Nonidet P-40, 50mM Tris-HCl [pH 7.4], 200mM NaCl, 2,5mM MgCl₂, εμπλουτισμένο με αναστολείς πρωτεασών (1mM PMSF, 1μM λευπεπτίνη, 10μg αναστολέα θρυψίνης/ml, 0.1μM απροτινίνη), οι οποίοι προστίθενται στο διάλυμα ακριβώς πριν τη χρήση του.

2.2.5 Απλό διάλυμα λύσης για την προετοιμασία ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

50mM Tris-HCl pH 7.4, 250mM σουκρόζη, 1mM EDTA, 10mM NaF, 1mM EGTA και 1% Triton X-100 εμπλουτισμένο με αναστολείς πρωτεασών, όπως αναφέρθηκαν παραπάνω, οι οποίοι προστίθενται στο διάλυμα εκχύλισης λίγο πριν τη χρησιμοποίησή του.

2.2.6 Διάλυμα λύσης για την κατακρήμνιση του DISC

30mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 10% γλυκερόλη, 1% Triton X-100 και αναστολείς πρωτεασών.

2.2.7 Διάλυμα επιμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA

Διάλυμα BBS 2x: 20mM BES pH 6,95, 280mM NaCl και 1,5mM Na₂HPO₄ (-20⁰C)

2.3 Μέθοδοι

2.3.1 Κυτταροκαλλιέργεια

Οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου Caco-2, DLD-1, HT-29, HCT-116 και SW620 προμηθεύτηκαν από την ATCC. Τα κύτταρα FHC προσφέρθηκαν από τη Martina Kovarikova, Institute of Biophysics, Acad. Science of Czech Rep. Οι κυτταρικές σειρές DKO-4 και HKE-3 προέκυψαν από τις ανθρώπινες αδενοκαρκινωματικές σειρές του παχέος εντέρου DLD-1 και HCT-116, αντίστοιχα, μετά από απαλοιφή του ογκογονιδίου *Ki-RAS* με ομόλογο ανασυνδυασμό (127). Οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου καθώς και οι κλώνοι που προέκυψαν από τα Caco-2 και υπερεκφράζουν τα ογκογονίδια *RAS* καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) εμπλουτισμένο με 10% ορό FBS, αντιβιοτικά (πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη) και αμινοξέα (non-essential amino-acids). Τα κύτταρα FHC καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 10% ορό, αντιβιοτικά και αμινοξέα, 25mM HEPES, 5μg/ml ινσουλίνη, 5μg/ml τρανσφερίνη και 100ng/ml υδροκορτιζόνη. Τα κύτταρα 293indRas καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 10% ορό και αντιβιοτικά. Τα κύτταρα RGC-2 προσφέρθηκαν από τον καθηγητή C. Paraskeva (United Kingdom).

Οι Caco-2 κλώνοι σταθερής υπερέκφρασης των ενεργών Ras ογκοπρωτεϊνών έχουν ήδη χαρακτηριστεί (126). Στην παρούσα μελέτη, οι κλώνοι που περιέχουν το άδειο πλασμίδιο (Caco-N10), οι μετασηματισμένοι με το Ha-*RASV12* (Caco-H2) και οι μετασηματισμένοι με το *Ki-RASV12* (Caco-K15) κλώνοι επιλέχθηκαν εξαιτίας των ενδιάμεσων επιπέδων των ογκογονιδίων εξωγενούς έκφρασης.

Η δημιουργία των κλώνων επαγόμενης έκφρασης του ογκογονιδίου Ha-RASV12 (293indRas κύτταρα) με βάση το σύστημα της εκδυσόνης και ο χαρακτηρισμός τους έχουν περιγραφεί (Moumtzi et al., submitted) Προσθήκη ποναστερόνης (ανάλογο της εκδυσόνης) στα κύτταρα αυτά έχει ως αποτέλεσμα την ελεγχόμενη έκφραση του ογκογονιδίου.

Όταν κριθεί απαραίτητος ο διαχωρισμός των κυττάρων, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα πλένονται με διάλυμα PBS 1x. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αποκολλώνται, αφού προστεθεί διάλυμα θρυψίνης 5% που προέρχεται από αραιώση με PBS 1x, διαλύματος θρυψίνης εμπορίου σε ποσότητα που καλύπτει την επιφάνεια όπου είναι προσκολλημένα τα κύτταρα και γίνεται επώαση στον κλίβανο για περίπου 5 λεπτά. Το εναιώρημα των κυττάρων τοποθετείται σε πλαστικούς σωλήνες τύπου universal (Greiner) και φυγοκεντρείται στις 1.500rpm για 5 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα αναδιαλύεται σε μικρό όγκο θρεπτικού υλικού και μοιράζεται σε κατάλληλο αριθμό φιαλών καλλιέργειας ή τρυβλίων (Corning).

Για την αποθήκευση των κυττάρων, ακολουθείται η ίδια διαδικασία. Το ίζημα των κυττάρων αναδιαλύεται σε 1ml διαλύματος κατάψυξης (70% DMEM, 20% FBS και 10% DMSO) και τα κύτταρα μεταφέρονται σε πλαστικά φιαλίδια και διατηρούνται σε δοχεία υγρού αζώτου. Η κατάψυξη γίνεται σταδιακά, με ψύξη σε καταψύκτη (-20°C) και σε υπερκαταψύκτη (-80°C) πριν μεταφερθούν στο υγρό άζωτο, για να εξασφαλιστεί η βέλτιστη βιωσιμότητα των κυττάρων.

Η μέθοδος της κυτταροκαλλιέργειας απαιτεί αυστηρώς αποστειρωμένες συνθήκες, τόσο στα υλικά όσο και στους χώρους που χρησιμοποιούνται, προς αποφυγή μόλυνσης των κυττάρων. Ο οποιοσδήποτε χειρισμός κυττάρων και υλικών γίνεται σε εστία κάθετης ροής αέρος. Η καλλιέργεια των κυττάρων γίνεται σε κλίβανο που έχει θερμοκρασία 37°C, ατμόσφαιρα 5% CO₂ και σχετική υγρασία 95%.

2.3.2 Μέθοδοι μέτρησης κυτταρικής βιωσιμότητας και κυτταροτοξικότητας

Για τη μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας και του ρυθμού αύξησης των κυττάρων παρουσία ή όχι πολυφαινόλων ή/ και TRAIL, τα κύτταρα μεγαλώνουν για 24 ώρες στην κυτταροκαλλιέργεια σε τρυβλία 12-θέσεων και τα δείγματα προετοιμάζονται εις τριπλούν. Ακολουθεί επώαση με διάφορες συγκεντρώσεις των ανάλογων συστατικών για διάφορα χρονικά διαστήματα. Μετά το τέλος της επώασης, τα κύτταρα πλένονται με PBS, μονιμοποιούνται με μεθανόλη για 5 λεπτά σε

θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια χρωματίζονται με 0,5% κρυσταλλικό ιώδες για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, τα δείγματα πλένονται με άφθονο νερό, αφήνονται να στεγνώσουν και η χρωστική εκχειλίζεται από τα κύτταρα με 30% οξικό οξύ. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 595nm. Για τη μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων 293indRas στις διάφορες συνθήκες, τα κύτταρα επωάζονται για 24 ώρες με κερσετίνη και μετά από επιπλέον 24 ώρες επώασης ή όχι με 0,125 μ M ποναστερόνη-A. Κάποια δείγματα επωάζονται με 0,5% FBS σε θρεπτικό μέσο DMEM. Τα κύτταρα μονιμοποιούνται, χρωματίζονται και μετρώνται όπως αναφέρθηκε.

Για τη μέτρηση του ποσοστού απόπτωσης, τα κύτταρα επωάζονται στις διάφορες συνθήκες, μονιμοποιούνται με μεθανόλη για 5 λεπτά και οι αποπτωτικοί πυρήνες χρωματίζονται με Hoechst33258 σε συγκέντρωση 1 μ g/ml σε PBS και μετρώνται σε μικροσκόπιο φθορισμού (Nikon Eclipse T-200). Το ποσοστό απόπτωσης υπολογίζονται από το μέσο όρο του λόγου αποπτωτικών προς συνολικών πυρήνων σε 5 πεδία για κάθε δείγμα.

Για τη μέτρηση του ποσοστού νέκρωσης, μετά από επώαση των κυττάρων στις κατάλληλες συνθήκες ακολουθεί επώαση με Propidium Iodide σε συγκέντρωση 1 μ g/ml σε PBS και οι νεκρωτικοί πυρήνες μετρώνται σε μικροσκόπιο φθορισμού.

2.3.3 Κυτταρομετρία ροής (Fluorescence Activated Cell Sorting-FACS analysis)

α. Για τη μελέτη της επίδρασης της κερσετίνης στον *κυτταρικό κύκλο*, τα κύτταρα επωάζονται με 20 μ M πολυφαινόλης για διάφορες χρονικές περιόδους. Στη συνέχεια, μετά από τρυψινοποίηση, φυγοκέντρωση στις 1.200 rpm για 5 λεπτά και τρία πλυσίματα με PBS ακολουθεί μονιμοποίηση των κυττάρων με 70% αιθανόλη στους -20⁰C για ένα βράδυ. Αφού τα κύτταρα μονιμοποιηθούν, συλλέγονται με φυγοκέντρωση στις 1.200 rpm για 5 λεπτά στους 4⁰C και ακολουθεί πλύσιμο των κυττάρων με PBS. Στα κύτταρα προστίθεται διάλυμα PBS το οποίο περιέχει 20 μ g/ml RNάση-A και 1 mg/ml ιωδιούχο προπίδιο. Μετά από επώαση στους 37⁰ C για 20 λεπτά, τα δείγματα αναλύονται με κυτταρομετρία ροής.

β. Για τη μελέτη της επίδρασης της κερσετίνης στα *επίπεδα των DR4 και DR5 στην κυτταρική επιφάνεια* τα κύτταρα (5×10^5), αφού επωασθούν με κερσετίνη, συλλέγονται με φυγοκέντρωση και επωάζονται με διάλυμα δέσμευσης μη ειδικών

θέσεων (blocking) που αποτελείται από PBS με 0.2% ζελατίνη, 0.1% αζιδίου του νατρίου και 20% FBS για 20 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια επωάζονται με διάλυμα χρώσης που περιέχει 0.2% ζελατίνη, 0.1% αζιδίου του νατρίου και 50 µg/ml πρωτογενές αντίσωμα σε PBS για 30 λεπτά στον πάγο. Μετά την επώαση με το διάλυμα χρώσης, τα κύτταρα πλένονται τρεις φορές με PBS και επωάζονται για 30 λεπτά στον πάγο με διάλυμα χρώσης της ίδιας σύστασης με το παραπάνω με τη διαφορά ότι περιέχει 25 µg/ml δευτερογενούς αντισώματος. Τα κύτταρα πλένονται τρεις φορές με PBS και αναδιαλύονται σε διάλυμα χρώσης που δεν περιέχει κανένα αντίσωμα. Ακολουθεί ανάλυση των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής όπου γίνονται μετρήσεις τουλάχιστον 4000 ζωντανών κυττάρων (αρνητικά για τη χρώση ιωδιούχου προπιδίου) για την κάθε συνθήκη.

γ. Για τη μέτρηση της *διάσπασης της κυτοκερατίνης-18* και την ιστολογική ανάλυση της απόπτωσης, τα κύτταρα, αφού πλένονται με PBS το οποίο περιέχει 0.1% Tween, μονιμοποιούνται με μεθανόλη για 30 λεπτά. Αφού πλυθούν, επωάζονται με αντίσωμα έναντι της κυτοκερατίνης-18, προσδεμένο σε FITC για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, τα κύτταρα αναλύονται με κυτταρομετρία ροής.

2.3.4 Δημιουργία αποικιών σε μαλακό άγαρ

Τα πειράματα σε μαλακό άγαρ δείχνουν την αποτελεσματικότητα των καρκινικών κυττάρων να μεγαλώνουν δημιουργώντας αποικίες σε μη σταθερό υπόστρωμα. Τα κύτταρα συλλέγονται με τρυψινοποίηση και 10^4 κύτταρα αναδιαλύονται σε θρεπτικό μέσο DMEM το οποίο περιέχει 10% FBS και 0,3% κ.ο. αγαρόζης. Το μείγμα τοποθετείται πάνω από 0,5% κ.ο. αγαρόζη σε μέσο DMEM με 10% FBS. Μετά από 24 ώρες επώαση των δειγμάτων στους 37°C τοποθετείται 0,5ml θρεπτικό με ή χωρίς κερσετίνη, το οποίο αλλάζεται κάθε 2 μέρες. Τα πειράματα πραγματοποιούνται σε πλάκες 6-θέσεων και τα δείγματα προετοιμάζονται εις τριπλούν. Στην περίπτωση των κυττάρων 293indRas, το θρεπτικό (0,5% FBS ή 10% FBS) μαζί με την κερσετίνη ή/ και την ποναστερόνη-A (0.125 µM) αλλάζεται κάθε 3 μέρες.

Η επώαση γίνεται στους 37 °C σε συνθήκες καλλιέργειας για 10-20 μέρες. Μετά το τέλος της περιόδου επώασης, οι αποικίες χρωματίζονται με 0,005% κρυσταλλικό ιώδες για 1 ώρα στους 37 °C και οι αποικίες που δημιουργούνται στο ανώτερο στρώμα αγαρόζης (0,3%κ.ο.) μετρώνται σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων.

2.3.5 Μέτρηση *in vitro* μεταστατικότητας των κυττάρων

Η εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης των πηγαδιών ειδικών τρυβλίων 24 θέσεων (Transwell chambers, Costar) η οποία αποτελείται από πόρους διαμέτρου 8μm επιστρώνεται με ινονεκτίνη (10μg/ml σε 10% FBS σε DMEM) για 2 ώρες στους 37⁰C και ακολουθεί πλύσιμο με PBS. Η ινονεκτίνη χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο του εξωκυττάριου χώρου των κυττάρων. Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέγονται με τρυψινοποίηση και αφού πλυθούν 3 φορές με θρεπτικό που περιέχει 1% FBS και αναδιαλυθούν σε συγκέντρωση 10⁵ κύτταρα/ml στο ίδιο θρεπτικό, τοποθετούνται στο εσωτερικό μέρος της μεμβράνης στο πιάτο, ενώ το κατώτερο μέρος καλύπτεται με θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% FBS. Τα κύτταρα επωάζονται για 36 ώρες στους 37⁰C, μονιμοποιούνται με μεθανόλη για 5 λεπτά, χρωματίζονται με 0,5% κρυσταλλικό ιώδες για 10 λεπτά και τα κύτταρα που δεν πέρασαν τους πόρους της μεμβράνης απομακρύνονται με τη βοήθεια μπατονέτας. Μετά από επαναλαμβανόμενα πλυσίματα με νερό, τα κύτταρα που μετανάστευσαν προς την κατώτερη επιφάνεια της μεμβράνης μέσω των πόρων μετρώνται σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων σε όλη την επιφάνεια της μεμβράνης (μεγέθυνση x40).

2.3.6 Παρασκευή ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Για τον προσδιορισμό των Ras πρωτεϊνών, τα κύτταρα τοποθετούνται σε πάγο και τα εκχυλίσματα παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας διάλυμα λύσης σύμφωνα με τους de Castro et al. (128). Για τις υπόλοιπες πρωτεΐνες χρησιμοποιείται απλό διάλυμα λύσης. Το κυτταρικό διάλυμα επωάζεται για 30 λεπτά σε πάγο, φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 13.000rpm στους 4⁰C και το υπερκείμενο διάλυμα με τις συνολικές πρωτεΐνες φυλάσσεται στους -80⁰C.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών γίνεται με τη μέθοδο Bradford. Συγκεκριμένα, 1μl πρωτεΐνης προστίθεται σε 800μl νερό και 200μl διάλυμα Bradford και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 595nm. Η τιμή της φωτομέτρησης ανάγεται σε πρότυπη καμπύλη κατασκευασμένη με γνωστές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης BSA και προσδιορίζεται η συγκέντρωση κάθε δείγματος σε πρωτεΐνη.

Στα πειράματα ελεγχόμενης έκφρασης του ογκογονιδίου Ha-RAS στα κύτταρα 293indRas, τα κύτταρα επωάζονται για 24 ώρες με 0.125 μM ποναστερόνη-A. Για τη μελέτη της ταχύτητας αποικοδόμησης του ογκογονιδίου Ha-RAS, η ποναστερόνη-A αφαιρείται και μετά από πλύσιμο με θρεπτικό μέσο DMEM τα κύτταρα επωάζονται

για διάφορους χρόνους με DMEM χωρίς ποναστερόνη-A με ή χωρίς 20 μM κερσετίνη και τα επίπεδα της Ha-Ras πρωτεΐνης εκτιμώνται με στύπωμα κατά Western.

2.3.7 Προετοιμασία μιτοχονδριακών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων

Η κλασμάτωση των κυττάρων για τη δημιουργία μιτοχονδριακών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων που ακολουθείται περιγράφεται από τους (129). Συγκεκριμένα τα κύτταρα, αφού επωασθούν για 24 ώρες με 30 μM κερσετίνη ή χωρίς και ακολούθως με 100ng/ml TRAIL για διάφορα χρονικά διαστήματα, συλλέγονται και αναδιαλύονται με 600 μl κατάλληλου διαλύματος λύσης. Στη συνέχεια τα κύτταρα ομογενοποιούνται σε κρύο γυάλινο κυλινδρικό ομογενοποιητή (Dounce). Τα κύτταρα που δεν υπέστησαν λύση καθώς και οι πυρήνες απομακρύνονται με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 750g στους 4 $^{\circ}\text{C}$. Το υπερκείμενο φυγοκεντρείται για 25 λεπτά στις 10.000g στους 4 $^{\circ}\text{C}$. Το ίζημα αναδιαλύεται σε 40 μl από το διάλυμα λύσης των κυττάρων και αυτό αντιστοιχεί στο μιτοχονδριακό κλάσμα. Το υπερκείμενο φυγοκεντρείται για 60 λεπτά στις 10.000g στους 4 $^{\circ}\text{C}$ και το υπερκείμενο της τελικής φυγοκέντρησης αντιστοιχεί στο κυτταροπλασματικό κλάσμα.

2.3.8 Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοστύπωμα κατά Western

Για την ανάλυση των επιπέδων των πρωτεϊνών στα ολικά εκχυλίσματα ή στα προϊόντα της ανοσοκατακρήμνισης ακολουθείται η ανάλυση κατά Western.

α. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)- Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών γίνεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, κάτω από συνθήκες που ευνοούν το διαχωρισμό των πρωτεϊνών στις πολυπεπτιδικές τους υπομονάδες. Χρησιμοποιείται το ανιονικό απορρυπαντικό θειικό δωδεκυλικό νάτριο (SDS) σε συνδυασμό με κάποιον αναγωγικό παράγοντα και θέρμανση για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών πριν την ηλεκτροφόρηση. Τα αποδιαταγμένα πολυπεπίδια προσδένουν το SDS και αποκτούν αρνητικό φορτίο. Με αυτόν τον τρόπο, κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, τα συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίων μετακινούνται στο πήκτωμα με βάση τα μοριακά τους βάρη.

Το πήκτωμα αποτελείται από ένα τμήμα όπου γίνεται ο διαχωρισμός των

πρωτεϊνών (πηκτή διαχωρισμού). Το ποσοστό του σε ακρυλαμίδιο ποικίλλει ανάλογα με το μέγεθος της ανιχνευόμενης πρωτεΐνης. Πάνω από το πρώτο πήκτωμα τοποθετείται ένα δεύτερο διάλυμα πηκτής επιστοιβάξης, το οποίο χρησιμεύει στη συμπίκνωση του δείγματος, ώστε όλα τα πολυπεπίδια να εισέλθουν ταυτόχρονα στο πήκτωμα διαχωρισμού. Συνήθως, χρησιμοποιούνται 30-50μg ολικού εκχυλίσματος πρωτεΐνης. Στο διάλυμα της πρωτεΐνης προστίθεται 3x ή 6x SDS διαλύματος φόρτωσης στο οποίο προστίθεται DTT σε αναλογία 1:10 ή 2:10 αντίστοιχα αμέσως πριν τη χρήση, ακολουθεί θέρμανση στους 95⁰C για 5 λεπτά και τα δείγματα και τα δείγματα φορτώνονται στην κορυφή του πηκτώματος επιστοιβάξης, σε ειδικά διαμορφωμένες θέσεις. Παράλληλα, φορτώνεται και ειδικός δείκτης ο οποίος περιέχει πρωτεΐνες γνωστών μοριακών βαρών οι οποίες εμφανίζονται ως έγχρωμες ζώνες στο πήκτωμα. Η πορεία της ηλεκτροφόρησης παρακολουθείται με βάση την πορεία του marker. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση στα 300 Volts για 1 ώρα σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης σε κατάλληλη συσκευή (Biorad).

β. Μεταφορά πρωτεϊνών και ανοσοτύπωση κατά Western- Στο στάδιο αυτό οι πρωτεΐνες μεταφέρονται, αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Sigma), ώστε να ακολουθήσει ανοσοτύπωση. Μετά την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα τοποθετείται σε επαφή με φύλλο νιτροκυτταρίνης ως εξής: ξεκινώντας από το θετικό πόλο της συσκευής, με τη βοήθεια πλέγματος, χαρτί Whatman- πήκτωμα- νιτροκυτταρίνη- χαρτί Whatman. Κατά την τοποθέτηση πρέπει μεταξύ πηκτώματος και νιτροκυτταρίνης να μην υπάρχουν φυσαλίδες αέρα. Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται στη νιτροκυτταρίνη με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου, σε κατάλληλη συσκευή και με τη χρήση διαλύματος μεταφοράς. Κατά τη διαδικασία, εφαρμόζεται ρεύμα έντασης 330mA για 90 λεπτά σε θερμοκρασία 4⁰C.

Μετά τη μεταφορά, οι πρωτεΐνες μπορούν να γίνουν ορατές με προσθήκη χρώσης Ponceau-S για μερικά δευτερόλεπτα και πλύσιμο με απεσταγμένο νερό. Με τον τρόπο αυτό διαπιστώνεται και η ισόποση μεταφορά πρωτεϊνών σε όλα τα δείγματα.

Ακολουθεί κατάληψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης με επώαση της μεμβράνης με διάλυμα σκόνης γάλακτος 5% σε TBS-T για 1 ώρα. Ακολουθεί πλύσιμο της μεμβράνης με TBS-T και επώαση με ειδικά πρωτογενή αντισώματα σε τελική αραιώση από 1:250-1:2000 σε διάλυμα 2% BSA σε TBS-T για χρονικές περιόδους από 1 ώρα (σε θερμοκρασία δωματίου) ως ένα βράδυ (σε θερμοκρασία

4⁰C). Ακολουθούν τρία πλυσίματα των 10-15 λεπτών με TBS-T και επώαση με το κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα σε αραιώση 1:20.000-1:30.000 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και τα πλυσίματα επαναλαμβάνονται.

Τέλος, γίνεται η ανίχνευση του συμπλέγματος πρωτεΐνης-αντισώματος με χημειοφωταύγεια. Οι μεμβράνες επωάζονται με διάλυμα που προκύπτει από ανάμειξη ίσων όγκων διαλυμάτων I και II ECL, έτσι ώστε να καλύπτεται όλη η επιφάνεια της μεμβράνης και ακολουθεί έκθεση της μεμβράνης σε φιλμ ακτινών-X (Fuji) για λίγα λεπτά (ανάλογα με την ευαισθησία του αντισώματος) και εμφάνιση. Τα επίπεδα των πρωτεϊνών ποσοτικοποιούνται με βάση τα επίπεδα της Erk-2 ή της β-ακτίνης.

2.3.9 Ανοσοκατακρήμνιση του συμπλέγματος DISC

Για την ανοσοκατακρήμνιση του συμπλέγματος DISC χρησιμοποιείται TRAIL συνδεδεμένο με βιοτίνη, σε συνδυασμό με σφαιρίδια στρεπταβιδίνης (Streptavidine beads, Pierce). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται από τους (130). Αναλυτικά, τα κύτταρα μεγαλώνουν σε 3x15cm² πιάτα καλλιέργειας για κάθε συνθήκη και για τα μισά ακολουθεί επώαση με κερσετίνη για 24 ώρες. Τα κύτταρα συλλέγονται με τρυψινοποίηση, πλένονται δύο φορές με RPMI θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και επωάζονται στους 37⁰C υπό ανακίνηση και για διάφορες χρονικές περιόδους με 100ng/ml Bio-TRAIL ή χωρίς, για την κατακρήμνιση των υποδοχέων που δε συμμετέχουν στο DISC (σημείο αναφοράς, κύτταρα που δεν έχουν επωασθεί με Bio-TRAIL). Η δημιουργία του DISC διακόπτεται, αφού ολοκληρωθούν οι χρόνοι επώασης, με την προσθήκη κρύου PBS. Ακολουθεί λύση των κυττάρων και εκχύλιση των πρωτεϊνών με κατάλληλο διάλυμα λύσης. Τα συμπλέγματα των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη δημιουργία του DISC κατακρημνίζονται από τα εκχυλίσματα με επώαση με 20μl από το διάλυμα των σφαιριδίων στρεπταβιδίνης για 90 λεπτά στους 4⁰C υπό ανακίνηση. Οι μη διεγερμένοι υποδοχείς στα κύτταρα που δεν έχουν επωασθεί με Bio-TRAIL κατακρημνίζονται με την προσθήκη Bio-TRAIL στο κυτταρικό εκχύλισμα. Τα προϊόντα της κατακρήμνισης συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 800rpm για 1 λεπτό στους 4⁰C και, αφού πλυθούν 4 φορές με το διάλυμα λύσης τους, τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα εκχυλίζονται από τα σφαιρίδια με την προσθήκη SDS διαλύματος φόρτωσης και με θέρμανση στους 42⁰C για 15 λεπτά. Ακολουθεί διαχωρισμός των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-ακρυλαμιδίου και ανάλυση κατά Western.

2.3.10 Απομόνωση λιπιδικών «σχεδίων» (lipid rafts)

Τα κύτταρα (100×10^6), αφού υποβληθούν σε 48 ώρες επώαση με κερσετίνη, πλένονται στον πάγο με κρύο PBS και ακολουθεί η λύση τους με 1 ml διαλύματος 25 mM MES, pH 6,5 εμπλουτισμένο με 150 mM NaCl, αναστολείς πρωτεασών και 1% Triton X-100. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων στον πάγο για 30 λεπτά και στη συνέχεια τα κύτταρα ομογενοποιούνται σε κρύο γυάλινο κυλινδρικό ομογενοποιητή (Dounce). Μετά από φυγοκέντρηση στα 1.200 rpm για 10 λεπτά το υπερκείμενο (αφού συμπληρωθεί μέχρι όγκο 2 ml) αναδιαλύεται σε ίσο όγκο (2 ml) διαλύματος MES που περιέχει 80% κ.ο σουκρόζη (τελική αραίωση σουκρόζης: 40%) και τοποθετούνται στη βάση διαλύματος γραμμικής κλίσης συγκέντρωσης σουκρόζης που δημιουργείται με την προσθήκη διαλυμάτων 35% (5ml) και 5% (3ml) σουκρόζης πάνω από το αρχικό διάλυμα των κυττάρων. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 34.500 rpm για 22 ώρες στους 4 °C, αφού τοποθετηθούν σε κεφαλή SW-40 Ti, Beckman. 12 x 1 ml κλάσματα συλλέγονται από την κορυφή προς τη βάση της κλίσης. Τέλος, 40μl από κάθε δείγμα αναμειγνύονται με 6x SDS διάλυμα φόρτωσης και τα δείγματα υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου και στύπωμα κατά Western.

2.3.11 Ανοσοφθορισμός

Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία 12-48 θέσεων και μεγαλώνουν για 24 ώρες στους 37°C πριν επωασθούν με τις κατάλληλες ουσίες. Ακολουθεί επώαση με κερσετίνη, TRAIL ή νυστατίνη, ανάλογα με το πείραμα, στις απαιτούμενες συγκεντρώσεις και χρονικές περιόδους.

α. Για τη μελέτη της οργάνωσης του κυτταροσκελετού και την επίδραση της κερσετίνης, τα κύτταρα που μεγάλωσαν παρουσία ή απουσία της πολυφαινόλης μονιμοποιούνται με 4% παραφορμαλδεΐδη σε PBS για 20 λεπτά. Ακολουθούν πλυσίματα με PBS και απομάκρυνσης της περίσσειας της παραφορμαλδεΐδης με 50 mM NH_4Cl για 15 λεπτά. Οι μεμβράνες των κυττάρων γίνονται διαπερατές με 0,1% Triton X-100 σε PBS για 10 λεπτά, ακολουθεί δέσμευση των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης με επώαση σε 5% FBS σε PBS για 30 λεπτά και επώαση με διάλυμα φαλλοϊδίνης ροδαμίνης σε PBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, πλυσίματα και παρατήρηση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε μικροσκόπιο φθορισμού.

β. Για τον κυτταρικό εντοπισμό των υποδοχέων DR4 και DR5 και το σχετικό

εντοπισμό της πρωτεΐνης καβεολίνης, η διαδικασία που ακολουθείται για τη μονιμοποίηση των κυττάρων είναι παρόμοια με αυτή που περιγράφηκε για τη φαλλοϊδίνη. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τους υποδοχείς του TRAIL DR4 και DR5 χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώσεις 1:100 ενώ το αντίσωμα για την καβεολίνη-1 σε αραιώση 1:50 Τα δευτερογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:500.

2.3.12 Παροδική έκφραση της πρωτεΐνης LC3 με επιμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA και παρατήρηση των αυτοφαγικών κυστιδίων μετά από χρώση με MDC

Το πλασμίδιο pEGFP-LC3 μας παραχωρήθηκε από τους καθηγητές Noboru Mizushima και Tamotsu Yoshimori (National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japan) (98). Τα κύτταρα Caco-H2 σε πυκνότητα 50% επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pEGFP-LC3 χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου η οποία στηρίζεται στο σχηματισμό συμπλέγματος φωσφορικού ασβεστίου-DNA, το οποίο μπορεί να εισέλθει στο κύτταρο.

Αναλυτικά, αναμειγνύονται 100μl αποστειρωμένου νερού, 10μl CaCl₂ και 2,5gr πλασμιδιακού DNA και μετά από 5 λεπτά το μείγμα προστίθεται σε 100μl διαλύματος BBS. Μετά από 15 λεπτά, το συνολικό μείγμα προστίθεται αργά στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων. 24 ώρες μετά από την επιμόλυνση με το πλασμίδιο τα κύτταρα επωάζονται στην καλλιέργεια για επιπλέον 20 ώρες με 20μM κερσετίνη μετά από 3 ώρες επώαση με 3-MA στις περιπτώσεις που χρειάζεται και τα αυτοφαγικά κυστίδια χρωματίζονται με 0,05 mM MDC σε PBS στους 37°C για 15 λεπτά. Μετά το τέλος της περιόδου της επώασης, τα κύτταρα μονιμοποιούνται με 4% παραφορμαλδεΰδη σε PBS για 20 λεπτά, πλένονται 4 φορές με PBS, παρατηρούνται αμέσως στο μικροσκόπιο φθορισμού και λαμβάνονται φωτογραφίες με τη βοήθεια ψηφιακής κάμερας.

2.3.13 Απομόνωση mRNA και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία *in vitro* ενζυμική σύνθεση

τμημάτων DNA με τη βοήθεια δύο ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών που βρίσκονται εκατέρωθεν της περιοχής του δίκλωνου DNA που πρόκειται να επιμηκυνθεί. Για την ολοκλήρωσή της απαιτούνται 3 στάδια.

α. Απομόνωση του RNA- Τα κύτταρα πλένονται με PBS και συλλέγονται με αναδιάλυση σε ανάλογη ποσότητα του αντιδραστηρίου TRIZOL. Η διαδικασία που ακολουθείται γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Invitrogen. Αναλυτικά, τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθενται σε αυτά 0,2ml χλωροφορμίου/ml TRIZOL. Τα δείγματα ανακινούνται για 15 δευτερόλεπτα και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται στις 11.000 rpm για 15 λεπτά στους 4⁰C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης το μείγμα διαχωρίζεται σε μία χαμηλότερη φάση φαινόλης-χλωροφορμίου, μία μεσόφαση και μία άχρωμη υδατική φάση η οποία περιέχει το RNA. Το RNA συλλέγεται προσεκτικά και μεταφέρεται σε νέο σωλήνα όπου κατακρημνίζεται από την υδατική φάση με ανάμειξη με ισοπροπυλική αλκοόλη (0,5ml/ml TRIZOL). Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση στις 11.000 rpm για 10 λεπτά στους 4⁰C. Το ίζημα του RNA που σχηματίζεται στα πλάγια τοιχώματα και τον πάτο του σωλήνα πλένεται με 75% αιθανόλη/ml TRIZOL. Το μείγμα ανακινείται και φυγοκεντρείται στις 7.000 rpm για 5 λεπτά στους 4⁰C. Το ίζημα του RNA αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για 10-15 λεπτά και αναδιαλύεται σε νερό. Στη συνέχεια επωάζεται στους 55-60⁰C για 10 λεπτά ώστε να διευκολυνθεί η αναδιάλυσή του και φωτομετρείται στα 260nm για τον υπολογισμό της συγκέντρωσής του.

β. Αντίστροφη μεταγραφή- Η αντίστροφη μεταγραφή και η σύνθεση cDNA (complementary DNA) πραγματοποιείται με ανάμειξη 1μg RNA, 1,25μg εκκινητή oligo(dT), dNTPs, dTT, αναστολέα RNAsin και 500 μονάδων ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης απομονωμένης από ρετροϊό Moloney leukemia. Το μείγμα θερμαίνεται στους 41⁰C για 50 λεπτά και στη συνέχεια στους 70⁰C για 15 λεπτά. Τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο και το cDNA που παράγεται αραιώνεται με την προσθήκη νερού.

γ. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)- Μετά την αντίστροφη μεταγραφή και τη σύνθεση των αντίστοιχων μορίων cDNA, ακολουθεί αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, αφού αναμειχθούν τα ακόλουθα συστατικά: 5μl cDNA, κατάλληλο

ρυθμιστικό διάλυμα, 0,24mM dNTPs, 2,5mM MgCl₂, 20pmoles από τους δύο εκκινητές (Forward και Reverse), και 1 μονάδα Taq DNA πολυμεράση. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης συμπληρώνεται στα 50 μl με προσθήκη νερού. Η θερμοκρασία αποδιάταξης είναι 58⁰C για όλους τους εκκινητές. Τα προϊόντα της αντίδρασης αναμειγνύονται με διάλυμα φόρτωσης το οποίο περιέχει κατάλληλη χρωστική και διαχωρίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% μέσα σε διάλυμα TBE 1x. Μετά από ιχνηθέτηση με βρωμιούχο αιθίδιο τα κομμάτια του DNA που διαχωρίστηκαν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος παρατηρούνται σε υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογραφίζονται με τη βοήθεια ψηφιακής κάμερας. Τα επίπεδα της έντασης των ζωνών μετρώνται με τη βοήθεια προγράμματος Molecular Dynamics ImageQuant Software (Amersham Biosciences). Όλα τα προϊόντα ποσοτικοποιούνται με βάση την έκφραση του GAPDH.

2.3.14 Στατιστική ανάλυση και αξιολόγηση

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων τόσο στα πειράματα κυτταρικής βιωσιμότητας όσο και στα πειράματα ανάλυσης κατά Western πρωτεϊνών με τη βοήθεια του προγράμματος ImageQuant αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Excel και οι διαφορές αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας το Student's *t*-test. Τιμές $P < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

Κεφάλαιο 3

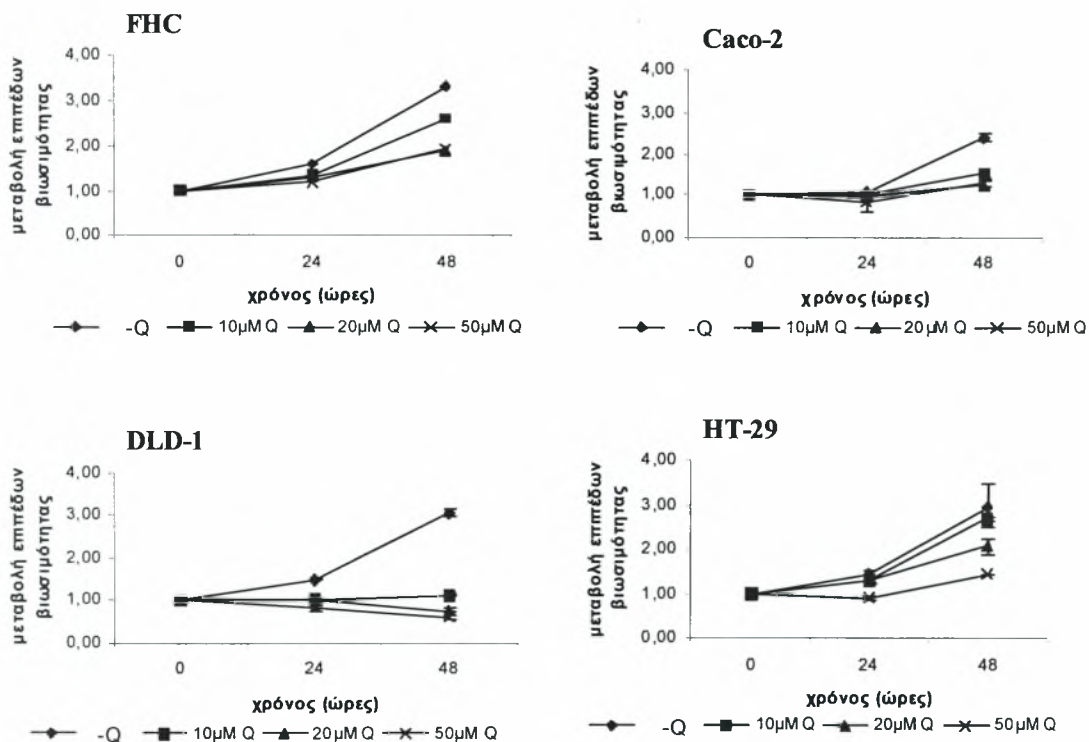
Αποτελέσματα

Η κερσετίνη προκαλεί επιλεκτική αποικοδόμηση των ογκογονικών μορφών της πρωτεΐνης Ras και αυτοφαγία σε κύτταρα του παχέος εντέρου μετασχηματισμένα με το ογκογονίδιο Ha-RAS.

3.1 Κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου εμφανίζουν ευαισθησία στην επίδραση της κερσετίνης στην κυτταρική βιωσιμότητα.

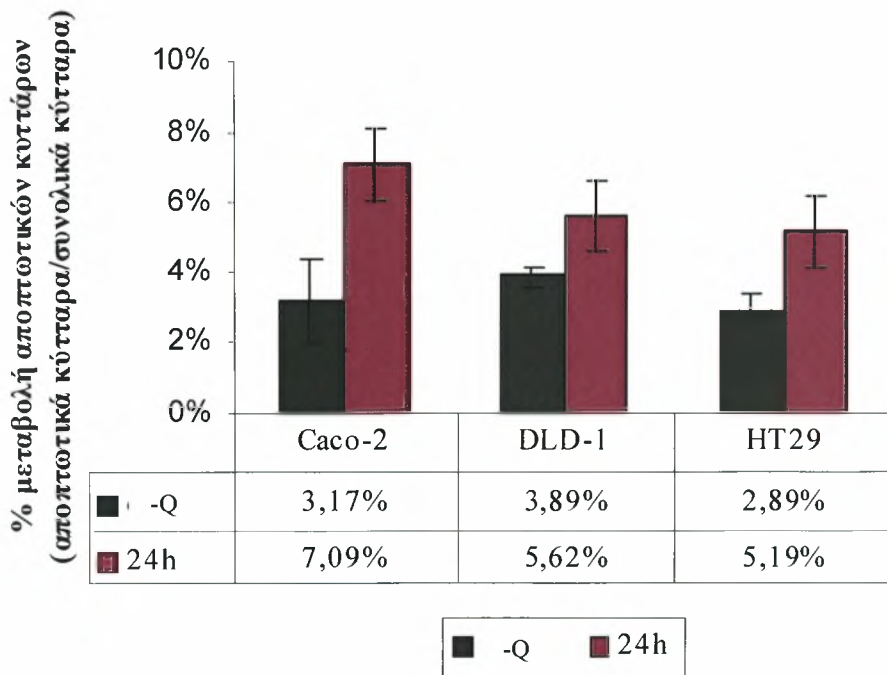
Έχει δειχθεί ότι η κερσετίνη ελαττώνει τους ρυθμούς κυτταρικής αύξησης. Προκειμένου να εξετάσουμε τα αποτελέσματα της κερσετίνης στην κυτταρική βιωσιμότητα σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινου παχέος εντέρου, χρησιμοποιήσαμε κυτταρικές σειρές οι οποίες αντιπροσωπεύουν διάφορα στάδια του καρκίνου του παχέος εντέρου με ποικίλα προφίλ μεταλλάξεων. Επώασαμε τα κύτταρα με διάφορες συγκεντρώσεις κερσετίνης για διάφορες χρονικές περιόδους. Στην *Εικόνα 1* φαίνεται ότι στα κύτταρα αδενώματος παχέος εντέρου DLD-1 η κερσετίνη προκάλεσε μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας εξαρτώμενη από τη συγκέντρωσή της και το χρόνο επώασης. Αντίθετα, στα ενδιάμεσα αδενώματα Caco-2 η κερσετίνη δεν προκάλεσε σημαντικές αλλαγές στη βιωσιμότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις και μικρό χρόνο επώασης. Προκειμένου να εξετάσουμε την επίδραση της κερσετίνης σε φυσιολογικά κύτταρα, του παχέος εντέρου, χρησιμοποιήσαμε τα κύτταρα FHC, στα οποία επίσης η κερσετίνη δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Στην *Εικόνα 1*, φαίνεται ότι η κερσετίνη είχε ανασταλτικό αποτέλεσμα στην αύξηση των κυττάρων αδενοκαρκινώματος DLD-1 ακόμα και στη χαμηλότερη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε (10μM) και η επίδραση ξεκίνησε σχετικά νωρίς (τα ζωντανά κύτταρα αποτελούσαν το 37% των κυττάρων στα οποία δεν είχε προστεθεί κερσετίνη μετά από 24 ώρες επώαση). Συγκρίνοντας το αποτέλεσμα της κερσετίνης μετά από 48 ώρες επώαση σε συγκέντρωση 20μM, το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων ήταν στην περίπτωση των DLD-1 περίπου το 28% των μη επωασμένων με κερσετίνη κυττάρων, στον ίδιο χρόνο, ενώ στην περίπτωση των Caco-2, τα οποία αποτελούν ενδιάμεσο αδένωμα, το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 58% και στην περίπτωση των κυττάρων FHC το ποσοστό ήταν ακόμα πιο υψηλό (60% των μη επωασμένων με κερσετίνη κυττάρων). Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά των κυττάρων FHC εμφανίστηκαν και σε άλλα φυσιολογικά κύτταρα στις ίδιες συνθήκες. Φαίνεται

λοιπόν πως τα αδενωκαρκινώματα παρουσιάζουν μια αυξημένη ευαισθησία στη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας που επάγεται από την κερσετίνη. Όταν επώασαμε τα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου HT-29 με 20μM κερσετίνη για 48 ώρες τα αποτελέσματα διαφοροποιήθηκαν σε σχέση με αυτά που πήραμε από τα κύτταρα DLD-1 και έμοιαζαν με αυτά των αδενωμάτων, αφού το αντίστοιχο ποσοστό μείωσης της κυτταρικής βιωσιμότητας έφτασε το 65%. Η παρατήρηση αυτή μαρτύρησε μία σχετική ανθεκτικότητα των κυττάρων HT-29 στην τοξικότητα του επάγεται από την κερσετίνη.



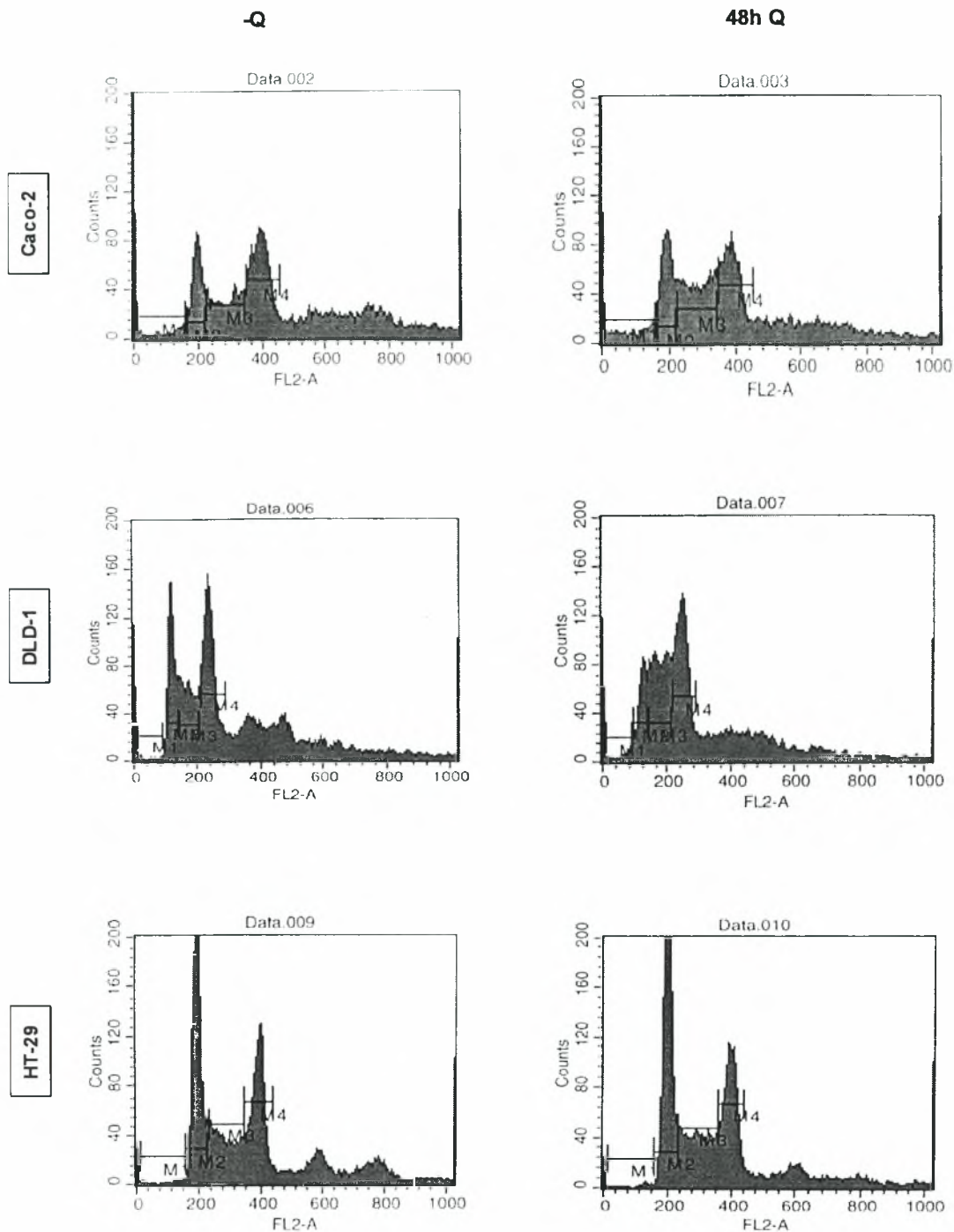
Εικόνα 1: Η κερσετίνη παρεμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε καρκινικές σειρές ανθρώπινου παχέος εντέρου. Κύτταρα του παχέος εντέρου καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό και μετά από 24 ώρες σε θρεπτικό που περιείχε 10, 20 και 50μM κερσετίνη για 24 και 48 ώρες. Τα κύτταρα-μάρτυρες (-Q) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό που περιείχε DMSO. Το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων μετά την επώαση με κερσετίνη μετρήθηκε μετά από χρώση με κρυσταλλικό ιώδες, όπως περιγράφεται στο «υλικά και μέθοδοι».

Η μειωμένη κυτταρική βιωσιμότητα που προκάλεσε η κερσετίνη σε όλες τις κυτταρικές σειρές ανθρώπινου παχέος εντέρου που εξετάστηκαν θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα επαγωγής κυτταρικού θανάτου από την πολυφαινόλη, αλλοιώσεων του κυτταρικού κύκλου, ή συνδυασμού και των δύο. Η πιθανότητα να προκαλεί η κερσετίνη απόπτωση εξετάστηκε με τη χρώση Hoechst33258, όπου τα ποσοστά θετικής χρώσης μετά από επώαση των κυττάρων με 20μΜ κερσετίνη δεν ήταν στατιστικά σημαντικά, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 2*. Η ανικανότητα της κερσετίνης να προκαλεί σημαντικά ποσοστά απόπτωσης στη χαμηλή συγκέντρωση των 20μΜ, επιβεβαιώθηκε με επώαση των κυττάρων με το γενικό αναστολέα των κασπασών z-VAD-FMK, παρουσία κερσετίνης, αλλά και από την απουσία πρωτεολυτικού τμήματος της πρωτεΐνης PARP. Επιπλέον, χρώση με ιωδιούχο προπίδιο δεν αποκάλυψε σημαντικά ποσοστά νέκρωσης παρουσία της πολυφαινόλης.



Εικόνα 2: Μέτρηση των αποπτωτικών κυττάρων μετά από επώαση με κερσετίνη για 24 ώρες- Τα ποσοστά παρουσιάζονται ως λόγος αποπτωτικών κυττάρων προς τα κύτταρα που μετρήθηκαν συνολικά σε κάθε πεδίο. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος από τις μετρήσεις σε 10 συνολικά πεδία (μεγέθυνση x40).

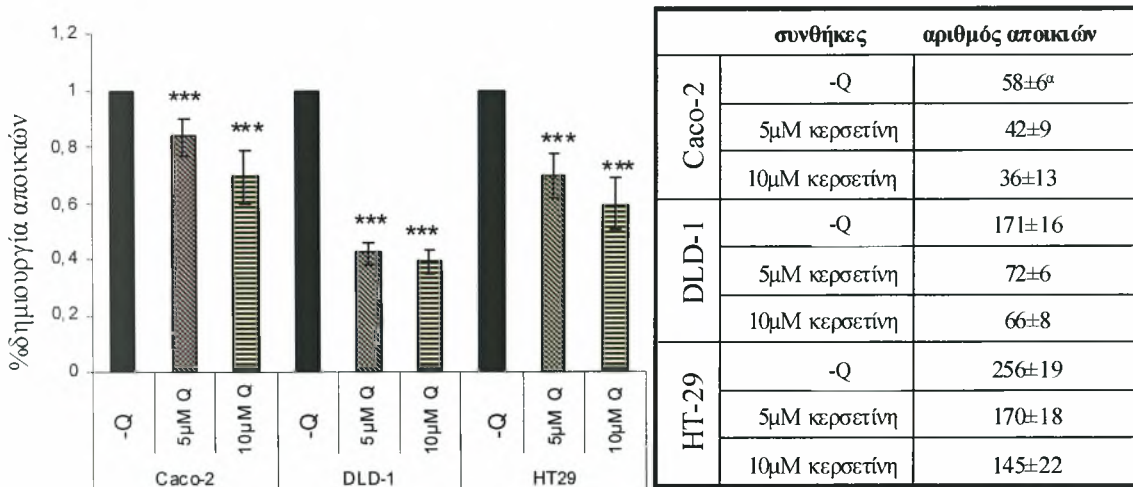
Μετά από τις παρατηρήσεις αυτές, θελήσαμε να εξετάσουμε την πιθανότητα μεταβολών στον κυτταρικό κύκλο παρουσία κερσετίνης. Προχωρήσαμε λοιπόν σε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής σε κύτταρα τα οποία είχαν επωασθεί απουσία ή παρουσία 20μΜ κερσετίνης. Τα αποτελέσματα που φαίνονται στη *Εικόνα 3* έδειξαν ότι η κερσετίνη προκάλεσε αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων που βρίσκονταν στην S-φάση του κυτταρικού κύκλου μετά από 48 ώρες τόσο στα Caco-2 όσο και στα DLD-1 κύτταρα (περίπου 1,8 φορές), ενώ παράλληλα ελαττώθηκε ο πληθυσμός των κυττάρων που βρισκόταν στη G1-φάση, ιδιαίτερα στην περίπτωση των κυττάρων DLD-1. Το προφίλ του κυτταρικού κύκλου HT-29 των κυττάρων δεν επηρεάστηκε ιδιαίτερα από την κερσετίνη στις 48 ώρες, γεγονός το οποίο μπορεί να συσχετισθεί με την προηγούμενη παρατήρηση ότι τα κύτταρα αυτά έδειξαν σχετική ανθεκτικότητα στην επαγόμενη από την πολυφαινόλη κυταροτοξικότητα. Σε όλες τις περιπτώσεις, δεν εμφανίστηκε ιδιαίτερα αυξημένος πληθυσμός κυττάρων στην υπο-G1-φάση με την παρουσία κερσετίνης και αυτό ήταν μία επιπλέον επιβεβαίωση ότι η ουσία δεν επάγει σημαντικά ποσοστά απόπτωσης στις συνθήκες που εξετάστηκαν.



Εικόνα 3: Η κερσετίνη επιδρά στον κυτταρικό κύκλο σε καρκινικές σειρές ανθρώπινου παχέος εντέρου- τα κύτταρα επώασθησαν με 20μM κερσετίνη για 48 ώρες και μετά από μονιμοποίηση σε μεθανόλη και προσθήκη διαλύματος RNAσης και Ιωδιούχου Προπιδίου σε PBS, οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής (M1: υπο-G1 φάση, M2: G1 φάση, M3: S φάση, M4: G2/M φάση).

3.2 Η κερσετίνη αναστέλλει βασικές *in vitro* καρκινικές ιδιότητες των κυττάρων του παχέος εντέρου.

Προκειμένου να μελετήσουμε την ικανότητα της κερσετίνης να παρεμποδίζει καρκινικές ιδιότητες, μετρήσαμε αρχικά την αύξηση των κυττάρων σε μαλακό άγαρ απουσία και παρουσία κερσετίνης. Επώαση των κυττάρων Caco-2 (πρώιμα αδενοκαρινώματα), DLD-1 και HT-29 (αδενοκαρκινώματα) σε 5 και 10μM κερσετίνη για 10 μέρες ελάττωσε την ικανότητά τους να σχηματίζουν αποικίες σε μαλακό άγαρ (Εικόνα 4). Οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν προκαλούσαν πολύ χαμηλά ποσοστά κυτταρικού θανάτου, σε αντίστοιχες συνθήκες με αυτές του πειράματος κι έτσι μπορούμε με αρκετή βεβαιότητα να πούμε ότι εκτιμήσαμε αυτή καθαυτή τη μείωση των αποικιών και όχι και τη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Η επίδραση της κερσετίνης φάνηκε να είναι ιδιαίτερα σημαντική στα κύτταρα DLD-1, ακόμα και στη χαμηλότερη συγκέντρωση.

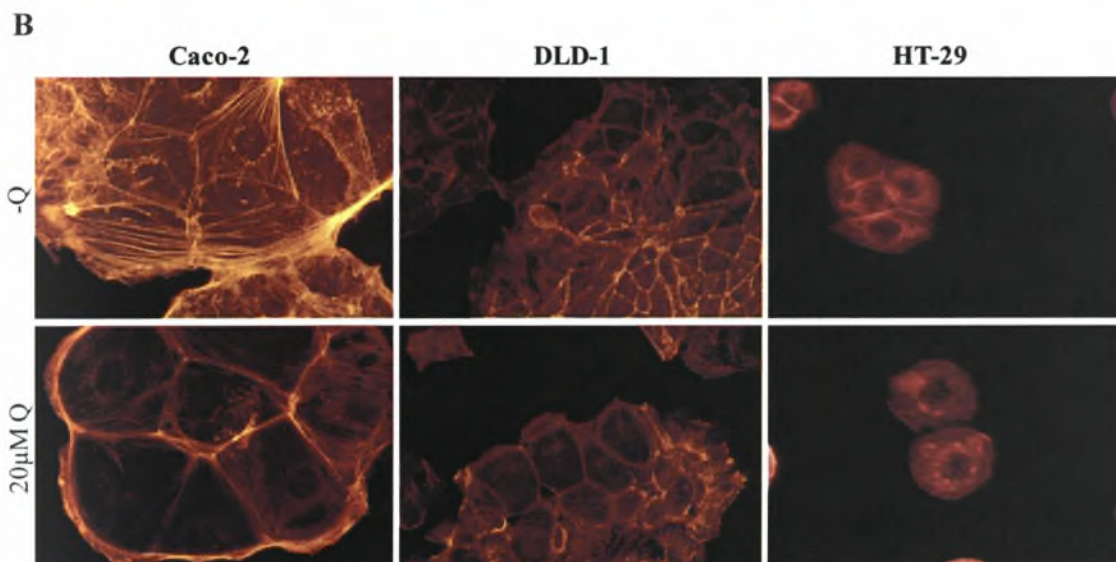
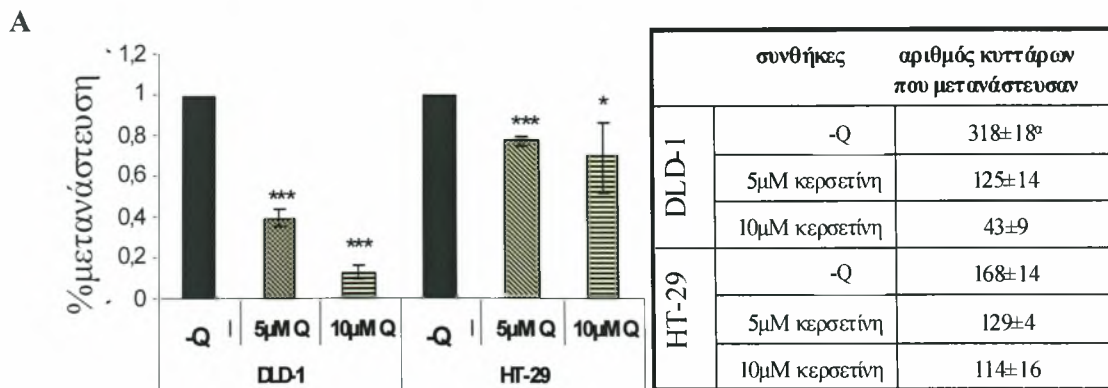


Εικόνα 4: Η κερσετίνη εμποδίζει τη δημιουργία αποικιών σε μαλακό άγαρ σε κυτταρικές σειρές του ανθρώπινου παχέος εντέρου- Τα κύτταρα επώασθησαν με ή χωρίς 5 ή 10μM κερσετίνη για 10 μέρες και οι αποικίες που δημιουργήθηκαν στο ανώτερο στρώμα αγαρόζης μετρήθηκαν σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στα κύτταρα-μάρτυρες (-Q) και τα κύτταρα στα οποία είχε προστεθεί κερσετίνη στο θρεπτικό μέσο ήταν στατιστικά σημαντικές (**P<0.01), όπως διαπιστώθηκε με τη βοήθεια του Student's t-test.

Ο πίνακας δείχνει την επίδραση της κερσετίνης στον αριθμό των αποικιών που δημιούργησαν τα DLD-1 και HT-29 κύτταρα, όπως φαίνεται στο γράφημα.

^aοι τιμές παριστάνουν τη μέση απόκλιση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, το καθένα αποτελούμενο από διπλές επαναλήψεις δειγμάτων.

Η *in vitro* μεταστατικότητα των καρκινικών κυττάρων αντικατοπτρίζει την ικανότητά τους να προσδένονται στο εξωκυττάριο υλικό. Αυτό αποτελεί σημαντική προϋπόθεση για την ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Η *Εικόνα 5A* δείχνει ότι ο αριθμός των κυττάρων DLD-1 που μετανάστευσαν μέσω πορώδους φίλτρου καλυμμένου με ινονεκτίνη μειώθηκε σημαντικά υπό την παρουσία κερσετίνης, ενώ το ποσοστό μείωσης της μεταναστευτικότητας από την κερσετίνη ήταν χαμηλότερο στην περίπτωση των κυττάρων HT-29 μετά από 36 ώρες επώασης. Και εδώ οι συγκεντρώσεις της κερσετίνης επιλέχθηκαν να είναι χαμηλές, ώστε να επιδρούν ελάχιστα έως καθόλου στην κυτταρική βιωσιμότητα. Στην περίπτωση των αδενωματικών κυττάρων Caco-2, η μείωση της μεταναστευτικότητας δεν μπόρεσε να εκτιμηθεί, δεδομένου ότι τα ίδια τα κύτταρα με δυσκολία περνάνε τους πόρους του φίλτρου, με αποτέλεσμα τα ποσοστά να είναι ιδιαίτερα χαμηλά. Δεδομένου ότι η κερσετίνη μείωσε τη μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων, εξετάσθηκε στη συνέχεια η ικανότητά της ως προς την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Τα κύτταρα επώασθηκαν με 20μM κερσετίνης για 48 ώρες. Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 5B*, χρώση φαλλοϊδίνης στα κύτταρα Caco-2 και DLD-1 έδειξε αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, διάλυση των ινιδίων ακτίνης, συσσώρευση της χρώσης στην περιφέρεια των κυττάρων αλλά και μια συνολική εξασθένιση της χρώσης. Αυτά θα μπορούσαν να εξηγηθούν από τροποποίηση σημάτων από την κερσετίνη, τα οποία είναι υπεύθυνα για κυτταρική προσκόλληση και σημάτων στα οποία μεσολαβούν οι ιντεγκρίνες. Από την άλλη, η κερσετίνη δεν άλλαξε ιδιαίτερα την οργάνωση του κυτταροσκελετού στα κύτταρα HT-29. Στην *Εικόνα 5* φαίνονται χαρακτηριστικές φωτογραφίες. Τα αποτελέσματα προτείνουν μία πιθανή επίδραση της κερσετίνης σε μονοπάτια μεταγωγής σημάτων στα οποία μεσολαβούν μόρια κυτταρικής προσκόλλησης και κυτταρικής μετανάστευσης, τα οποία ίσως εκφράζονται διαφορετικά στις διάφορες κυτταρικές σειρές.



Εικόνα 5: Η κερσετίνη εμποδίζει την *in vitro* μεταναστευτικότητα των καρκινικών κυτταρικών σειρών του ανθρώπινου παχέος εντέρου και προκαλεί αλλαγές στον κυτταροσκελετό- **A.** Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στο ανώτερο τμήμα του φίλτρου ειδικού πιάτου επιστρωμένου με ινονεκτίνη (transwell chamber) για 36 ώρες και, μετά από χρώση με κρυσταλλικό ιώδες, μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων στην κατώτερη επιφάνεια του φίλτρου. Το αποτέλεσμα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων φαίνονται στο γράφημα και η τυπική απόκλιση χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση των γραμμών σφάλματος (*P<0,05, **P<0,001). Ο πίνακας δείχνει την επίδραση της κερσετίνης στον αριθμό των κυττάρων που μετανάστευσαν, όπως φαίνονται στο γράφημα.

^aΟι τιμές παριστάνουν τη μέση απόκλιση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, το καθένα αποτελούμενο από διπλές επαναλήψεις δειγμάτων.

B. Κύτταρα αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου Caco-2, DLD-1 και HT-29 επώασθησαν με 20μM κερσετίνη για 48 ώρες. Μετά από χρώση με φαλλοϊδίνη, ο κυτταροσκελετός της ακτίνης παρατηρήθηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού (Nikon Eclipse T-200). Στην Εικόνα παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από χαρακτηριστικά πεδία.

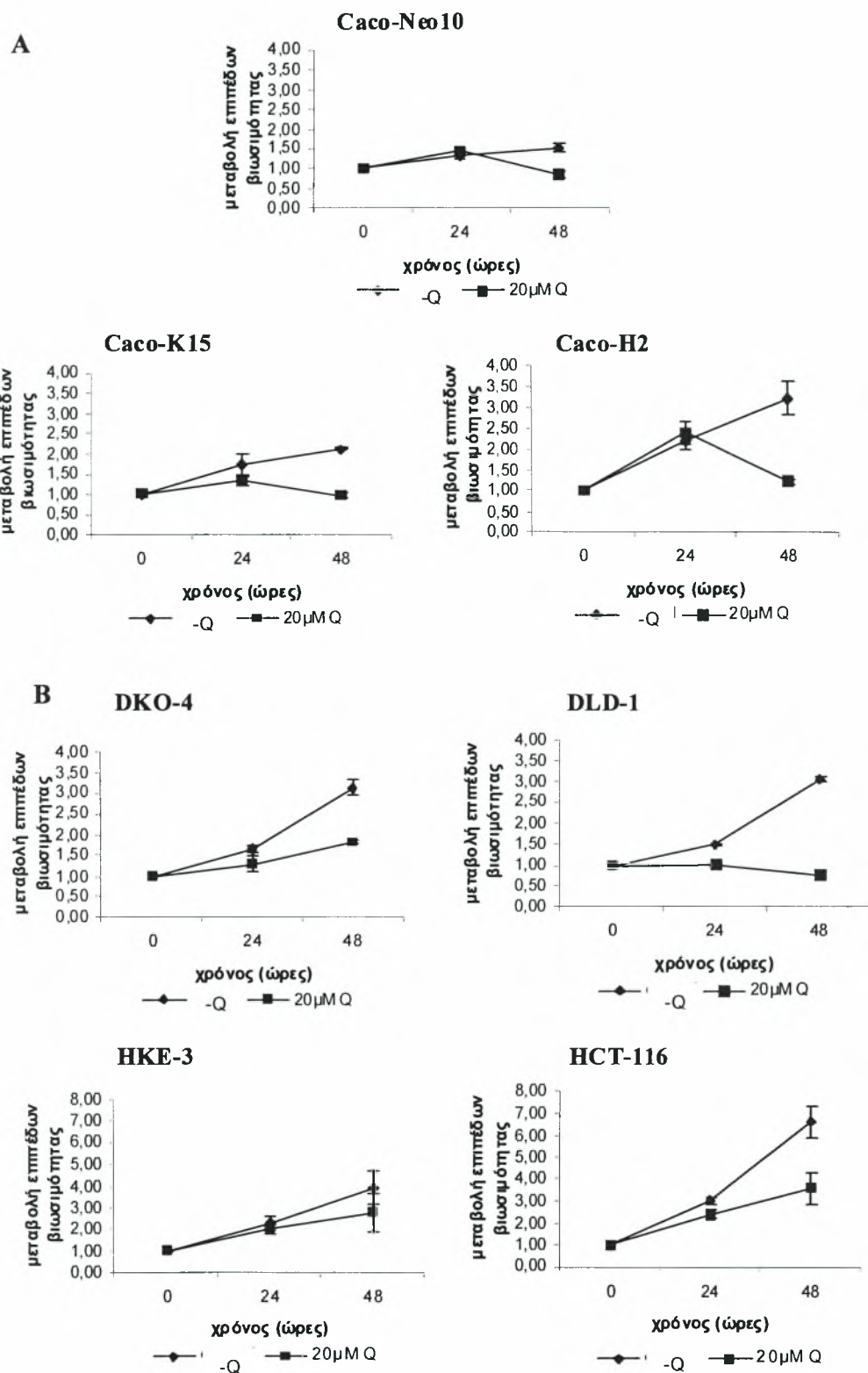
3.3 Ο μετασχηματισμός των κυττάρων από το ογκογονίδιο *RAS* τροποποιεί την επίδραση της κερσετίνης στην κυτταρική βιωσιμότητα.

Εφόσον οι πρωτεΐνες Ras διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο κυτταρικό μετασχηματισμό, την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό αλλά και τον κυτταρικό θάνατο εξετάσαμε την επίδραση της κερσετίνης σε κύτταρα μετασχηματισμένα με το ογκογονίδιο *RAS* (126) αλλά και σε αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου στα οποία το ογκογονίδιο *RAS* έχει εξαλειφθεί με ομόλογο ανασυνδυασμό (127).

Οι κλώνοι που περιέχουν το άδειο πλασμίδιο N10 (Caco-N10), καθώς και οι μετασχηματισμένοι κλώνοι με το ογκογονίδιο Ha-*RAS* (Caco-H2) αλλά και με το Ki-*RAS* (Caco-K15) επιλέχθηκαν εξαιτίας των ενδιάμεσων επιπέδων της εξωγενούς έκφρασης των γονιδίων, όπως έχει περιγραφεί στο Roberts et al. (126). Η *Εικόνα 6* δείχνει ότι τα μετασχηματισμένα με το *RAS* κύτταρα Caco-K15 και Caco-H2 ήταν περισσότερο ευαίσθητα στην παρεμπόδιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από την κερσετίνη, συγκρινόμενα με τα Caco-N10 κύτταρα, τα οποία περιείχαν τον άδειο φορέα χωρίς κάποιο από τα δύο ογκογονίδια. Μετά από 48 ώρες επώαση των Caco-N10 με 20μM κερσετίνη, το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων ήταν το 56% αυτών στα οποία δεν είχε προστεθεί κερσετίνη, στον ίδιο χρόνο. Το αντίστοιχο ποσοστό στην περίπτωση των Caco-K15 ήταν 46%, ενώ στην περίπτωση των Caco-H2 κυττάρων έφτασε το 38% (*Εικόνα 6A*). Τα αποτελέσματα αυτά μας έκαναν να αναρωτηθούμε αν υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην ογοπρωτεΐνη Ras και την ευαισθησία των κυττάρων στην κερσετίνη. Έτσι, εξετάσαμε αν η απαλοιφή του *RAS* ογκογονιδίου μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα μία διαφορετική απόκριση ως προς την κυτταρική αύξηση παρουσία κερσετίνης. Για να επιβεβαιώσουμε την υπόθεσή μας, συγκρίναμε τους ρυθμούς της κυτταρικής αύξησης παρουσία κερσετίνης ανάμεσα στα κύτταρα αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου DLD-1 και HCT-116 παρουσία κερσετίνης και στα κύτταρα DKO-4 και HKE-3 από τα οποία απουσιάζει το μεταλλαγμένο Ki-*RAS* και τα οποία έχουν προέλθει αντίστοιχα από τα προηγούμενα με ομόλογο ανασυνδυασμό του ογκογονιδίου (127). Η *Εικόνα 6B* δείχνει καμπύλες αύξησης των κυττάρων DLD-1 στα οποία η κερσετίνη μείωσε την κυτταρική βιωσιμότητα κατά 72% μετά από 48 ώρες στη συγκέντρωση των 20μM και των κυττάρων DKO-4, στα οποία η κερσετίνη ελάττωσε τη βιωσιμότητα μόνο κατά 42% στον ίδιο χρόνο επώασης. Επιπρόσθετα, η πολυφαινόλη ελάττωσε μόνο κατά 30% τη βιωσιμότητα των κυττάρων HKE-3, ποσοστό αρκετά χαμηλότερο από το

ποσοστό μείωσης 47% που προκάλεσε στα κύτταρα HCT-116 στις 48 ώρες. Όλα αυτά έδειξαν ότι το ογκογονίδιο *RAS* μπόρεσε να ευαισθητοποιήσει τα κύτταρα στο κυτταροτοξικό-κυτταροστατικό αποτέλεσμα που προκάλεσε η κερσετίνη.

Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των κλώνων των Caco-2 κυττάρων με κυτταρομετρία ροής σε κύτταρα τα οποία είχαν επωασθεί απουσία ή παρουσία κερσετίνης για 48 ώρες. Η *Εικόνα 6Γ* δείχνει καθαρά ότι η κερσετίνη προκάλεσε συσσώρευση των κυττάρων Caco-K15 τόσο στην S-φάση (1,8 φορές σε σχέση με τα μη επωασμένα με κερσετίνη κύτταρα) όσο και στη G2-φάση (1,7 αντίστοιχα), ενώ ο πληθυσμός των κυττάρων στη G1-φάση εμφανίστηκε μειωμένος στο 40%. Αντίθετα, η κερσετίνη δεν προκάλεσε κάποια αλλαγή στον κυτταρικό κύκλο των κυττάρων Caco-H2, γεγονός το οποίο δείχνει ότι η πολυφαινόλη δεν ελαττώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων αυτών μέσω αλλοιώσεων στον κυτταρικό κύκλο. Στην περίπτωση των κυττάρων Caco-N10 με το άδειο πλασμίδιο, το αποτέλεσμα ήταν παρόμοιο με αυτό που είχε η κερσετίνη στα κύτταρα Caco-2 (βλέπε *Εικόνα 3*).

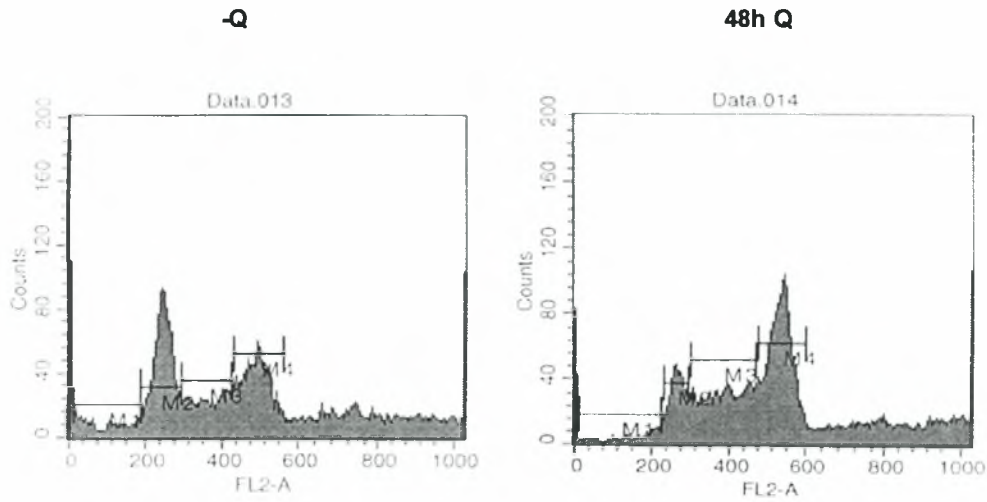


Εικόνα 6: Η επίδραση της κερσετίνης στην κυτταρική βιωσιμότητα τροποποιείται από το ογκογονίδιο *RAS*.

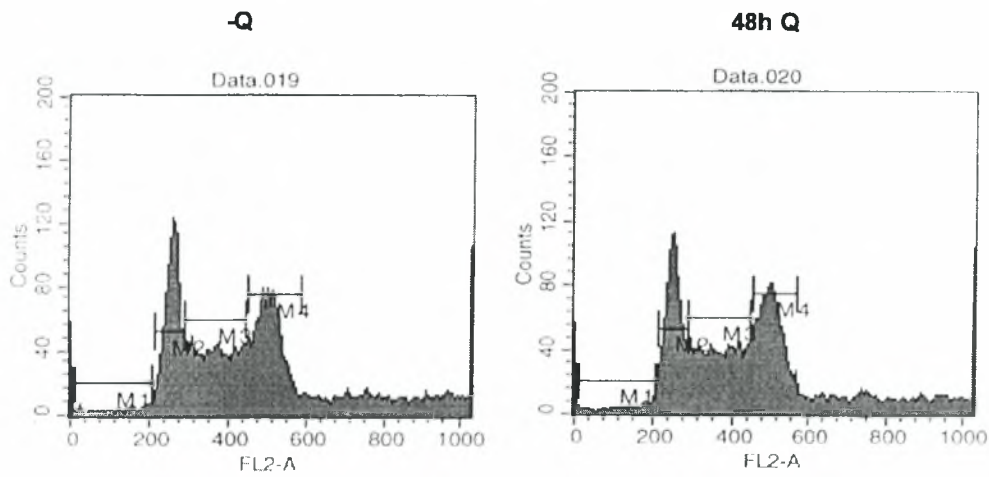
A. Το πείραμα κυτταρικής βιωσιμότητας πραγματοποιήθηκε όπως στην Εικόνα 1 για τα κύτταρα Caco-Neo10, Caco-K15 και Caco-H2. Η τυπική απόκλιση χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση των γραμμών σφάλματος (* $P < 0,05$, ** $P < 0,001$).

B. Μέτρηση κυτταρικής βιωσιμότητας για τα κύτταρα DKO-4 και DLD-1, καθώς και για τα HKE-3 και HCT-116.

Caco-K15



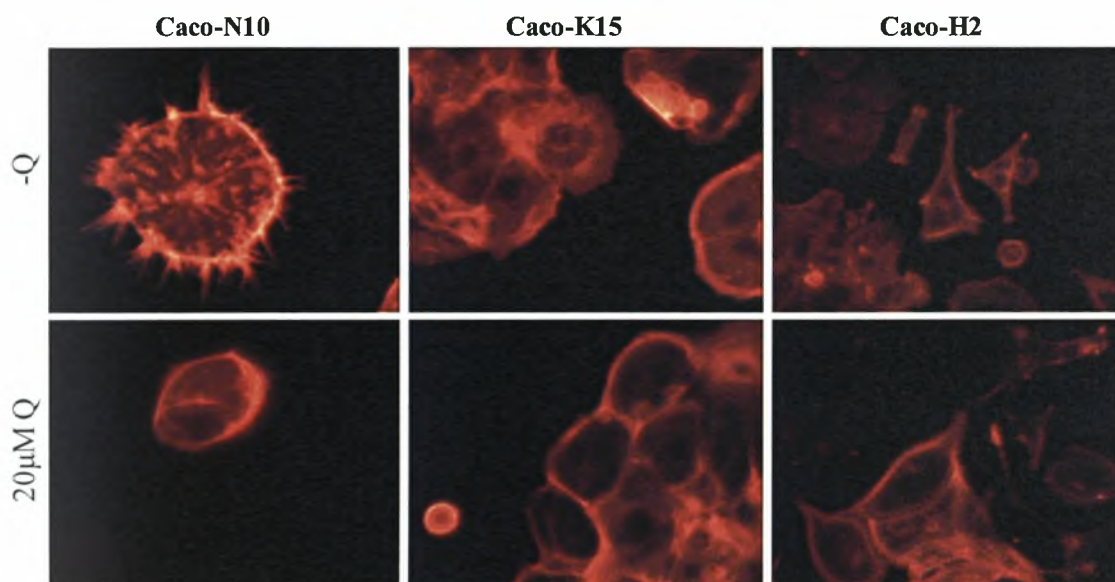
Caco-H2



Εικόνα 7: Ο μετασχηματισμός των κυττάρων από το ογκογονίδιο *RAS* τροποποιεί την επίδραση της κερσετίνης στον κυτταρικό κύκλο- Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου για τα Caco-K15 και Caco-H2 κύτταρα με κυτταρομετρία ροής, μετά από 48 ώρες επώαση με κερσετίνη.

3.4 Η κερσετίνη προκαλεί κυτταροσκελετικές αλλαγές στα κύτταρα που υπερεκφράζουν τα ογκογονίδια *RAS*.

Επώαση των κυττάρων Caco-N10, Caco-K15 και Caco-H2 με 20μM κερσετίνη για 24 και 48 ώρες προκάλεσε εμφανείς αλλαγές στην οργάνωση του κυτταροσκελετού. Συγκεκριμένα, σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε συσσώρευση της ακτίνης στην περιφέρεια του κυττάρου και, ιδιαίτερα στην περίπτωση των Caco-N10 και Caco-K15, μείωση της έκτασης των προεκβολών γύρω από το κύτταρο (φιλοποδίων, ελασματοποδίων). Οι παρατηρήσεις αυτές υποστηρίζουν πως η πολυφαινόλη επιδρά σε μονοπάτια μεταγωγής σημάτων στα οποία εμπλέκονται μόρια που ρυθμίζουν την οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης (Εικόνα 7).

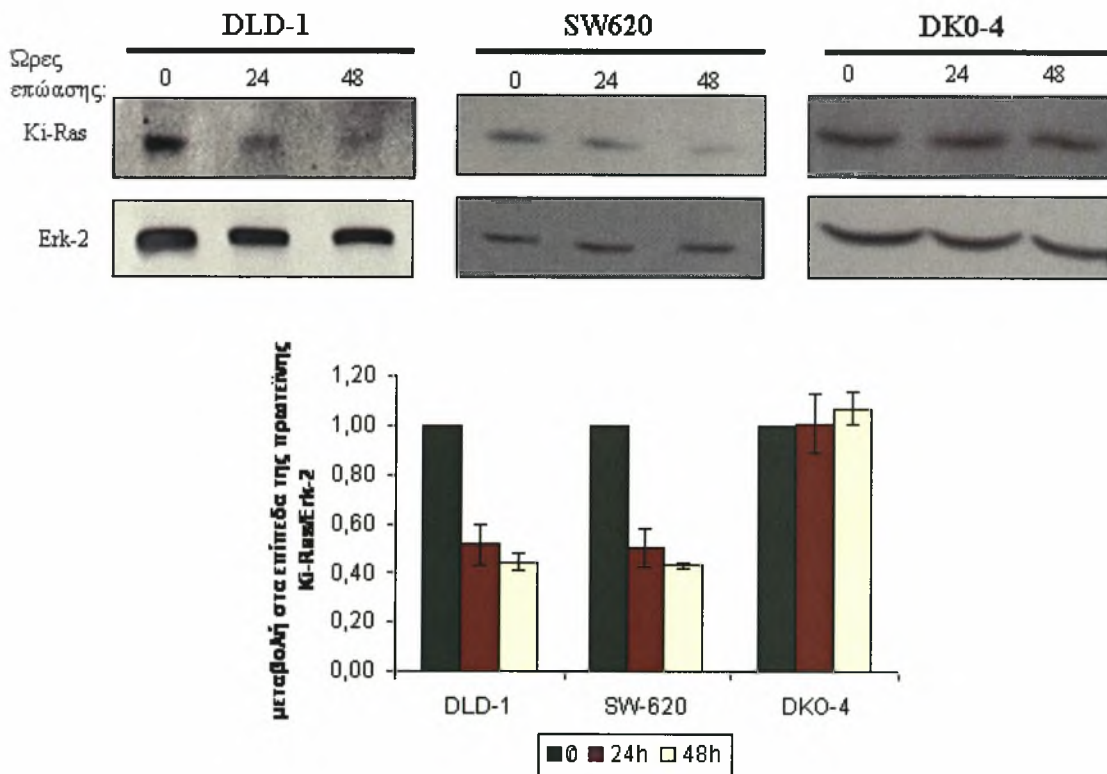


Εικόνα 8: Η κερσετίνη αλλάζει την οργάνωση του κυτταροσκελετού σε κύτταρα μετασχηματισμένα με το ογκογονίδιο *RAS* - Κύτταρα αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου Caco-2 and DLD-1 επώασθησαν με 20μM κερσετίνη για 24 ώρες. Μετά από χρώση με φαλλοϊδίνη, ο κυτταροσκελετός της ακτίνης παρατηρήθηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού (Nikon Eclipse T-200). Στην Εικόνα παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από χαρακτηριστικά πεδία.

3.5 Η κερσετίνη ελαττώνει τα επίπεδα των ογκοπρωτεϊνών Ras και τα επίπεδα της πρωτεΐνης Rho.

Έχει δειχθεί ότι η πολυφαινόλη κερσετίνη τροποποιεί διάφορα μονοπάτια μεταγωγής σημάτων. Σε μία προσπάθεια να εξετάσουμε τα αποτελέσματα της κερσετίνης στα επίπεδα των Ras πρωτεϊνών, αναλύσαμε τις πρωτεΐνες Ha- και Ki-Ras χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα τα οποία έχουν δοκιμαστεί σε ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες (128). Αρχικά, τα καρκινικά κύτταρα DLD-1 επώασθησαν με 20μM κερσετίνη για 24 και 48 ώρες και στη συνέχεια τα επίπεδα της πρωτεΐνης Ki-Ras αναλύθηκαν σε στύπωμα κατά Western. Στην *Εικόνα 9* φαίνεται ότι η κερσετίνη ελάττωσε τα επίπεδα της ογκοπρωτεΐνης Ki-Ras στα DLD-1 κύτταρα σε ποσοστό 52% στις 24 ώρες και 45% στις 48 ώρες. Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι η κερσετίνη ελαττώνει τα επίπεδα της μεταλλαγμένης Ras πρωτεΐνης, εξετάσαμε την επίδραση της ουσίας στα SW620 κύτταρα αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου, τα οποία είναι ομόζυγα ως προς τη μετάλλαξη του ογκογονιδίου Ki-RAS. Παρατηρήσαμε πως και στην περίπτωση αυτή η κερσετίνη προκάλεσε ελάττωση των επιπέδων της ογκοπρωτεΐνης Ki-Ras στο 51% μετά από 24 ώρες και στο 43% μετά από 48 ώρες επώασης. Με στόχο την περαιτέρω επιβεβαίωση της ενδιαφέρουσας παρατήρησης όσο αφορά την ειδική μείωση των επιπέδων της ογκοπρωτεΐνης Ras μετά από επώαση των κυττάρων με κερσετίνη, χρησιμοποιήσαμε τα κύτταρα Caco-N10, Caco-K15 και Caco-H2 (*Εικόνα 10A*). Στα κύτταρα Caco-K15 και Caco-H2, τα επίπεδα των ογκοπρωτεϊνών Ki- και Ha-Ras, αντίστοιχα (οι οποίες εκφράζονται εξωγενώς), ελαττώθηκαν επίσης υπό την παρουσία κερσετίνης. Πιο συγκεκριμένα, μετά από 48 ώρες επώαση με κερσετίνη, τα επίπεδα της ογκοπρωτεΐνης Ki-Ras στα κύτταρα Caco-K15 ήταν το 53% των επιπέδων της πρωτεΐνης στα μη επωασμένα κύτταρα και τα επίπεδα της Ha-Ras πρωτεΐνης στα κύτταρα Caco-H2 ήταν το 49% των αντίστοιχων επιπέδων της Ha-Ras πρωτεΐνης στα μη επωασμένα κύτταρα. Η επίδραση της κερσετίνης στα επίπεδα της Ki-Ras πρωτεΐνης εξετάστηκε στη συνέχεια στα DKO-4 κύτταρα στα οποία το ογκογονίδιο Ki-RAS έχει απαλοιφεί του από τα κύτταρα DLD-1 με ομόλογο ανασυνδυασμό. Στην περίπτωση αυτή η κερσετίνη δεν επηρέασε τα επίπεδα της Ras πρωτεΐνης, γεγονός το οποίο αποτελεί περαιτέρω επιβεβαίωση της αρχικής μας υπόθεσης ότι η πολυφαινόλη προκαλεί ελάττωση των επιπέδων των μεταλλαγμένων Ras πρωτεϊνών. Ακόμα δύο κυτταρικές σειρές οι οποίες δεν εκφράζουν κάποια από τις μεταλλαγμένες μορφές

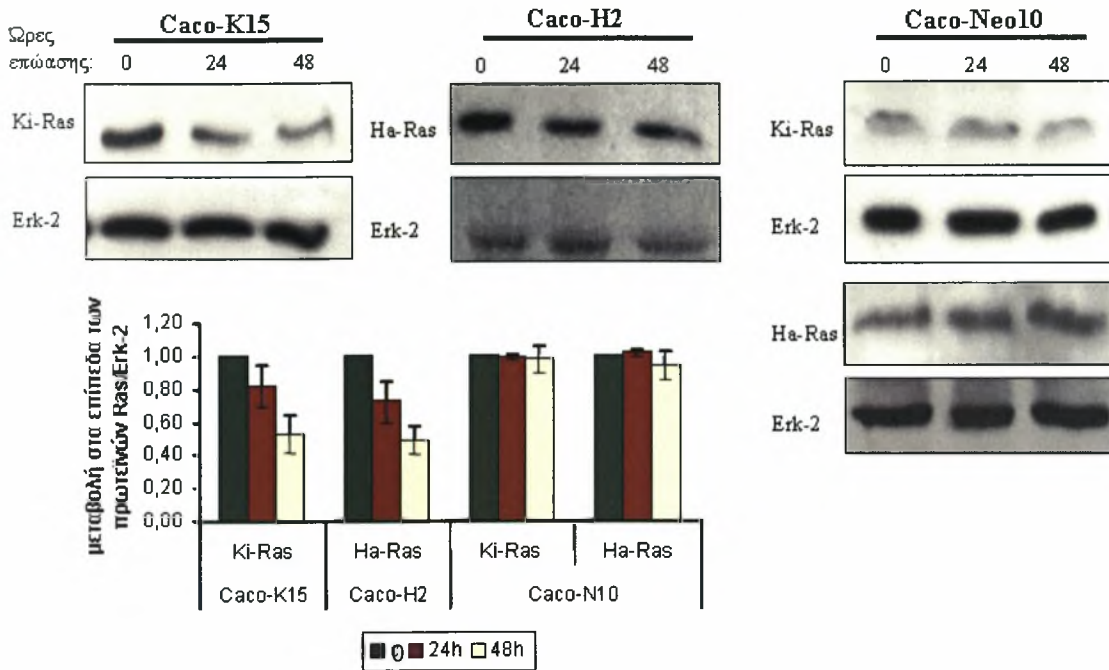
των Ras πρωτεϊνών εξετάστηκαν ως προς τη μείωση των επιπέδων των Ras πρωτεϊνών «άγριου τύπου». Στις κυτταρικές σειρές Caco-2 και HT-29, οι οποίες δε φέρουν μεταλλαγμένες μορφές του *RAS*, δεν παρατηρήθηκε ελάττωση των επιπέδων των ενδογενών Ras πρωτεϊνών, μετά από χρώση με το αντίσωμα που αναγνωρίζει και τις 3 ισομορφές των πρωτεϊνών Ras (Εικόνα 10B). Εμφανίζουμε επομένως μία σειρά δεδομένων με τη χρήση διάφορων κυτταρικών σειρών, που υποστηρίζει ότι η ογκοπρωτεΐνη Ras είναι στόχος της προκαλούμενης από την κερσετίνη παρεμπόδισης της κυτταρικής αύξησης κάτι το οποίο θα μπορούσε να εξηγηθεί από τη γενικότερη ευαισθησία που παρουσιάζουν οι GTPασες όταν βρίσκονται στην ενεργή τους μορφή (περαιτέρω συζήτηση στο κεφάλαιο 5).



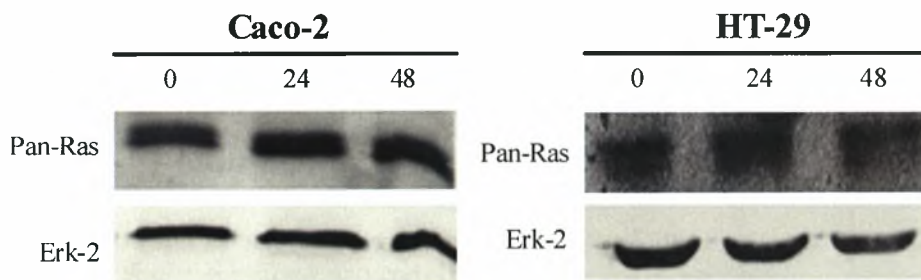
Εικόνα 9: Η κερσετίνη μειώνει τα επίπεδα της ογκοπρωτεΐνης Ki-Ras.

Ανάλυση κατά Western των επιπέδων της πρωτεΐνης Ki-Ras μετά από επώαση ή όχι (χρόνος 0) των κυττάρων με 20µM κερσετίνη για 24 και 48 ώρες και τη χρήση ειδικού για την πρωτεΐνη αντισώματος. (κάτω) Ποσοτική ανάλυση των μεταβολών της πρωτεΐνης Ki-Ras στις συνθήκες των στυπωμάτων μετά από ποσοτικοποίηση σε σχέση με τη συνολική Erk-2 πρωτεΐνη. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ των αποτελεσμάτων από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα.

A

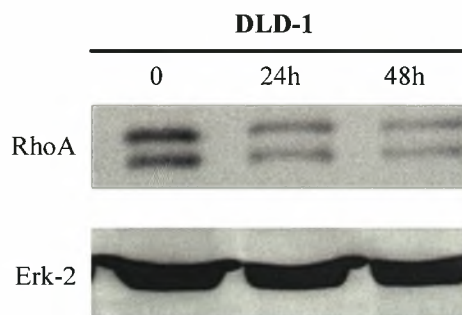


B



Εικόνα 10: Η κερσετίνη μειώνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης Ras μόνο σε κύτταρα που υπερεκφράζουν ογκογονικές μορφές της πρωτεΐνης - Α. (πάνω) Α. Ολικά εκχυλίσματα από τα μετασηματισμένα με το ογκογονίδιο RAS Caco-2 κύτταρα μετά από επώαση ή όχι με κερσετίνη υποβλήθηκαν σε στύπωμα κατά Western και τα σχετικά επίπεδα των Ki- και Ha-Ras αναλύθηκαν με τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων για τις πρωτεΐνες Ki- ή Ha-Ras. (κάτω αριστερά) Ποσοτική ανάλυση των μεταβολών της πρωτεΐνης Ki-Ras στις συνθήκες των στυπωμάτων, μετά από ποσοτικοποίηση σε σχέση με τη συνολική πρωτεΐνη Erk-2. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ των αποτελεσμάτων από τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα. **Β.** Ανάλυση κατά Western για τις πρωτεΐνες Ras με τη χρήση αντισώματος που αναγνωρίζει όλες τις ενδογενείς μορφές της πρωτεΐνης Ras στα κύτταρα Caco-2 και HT-29.

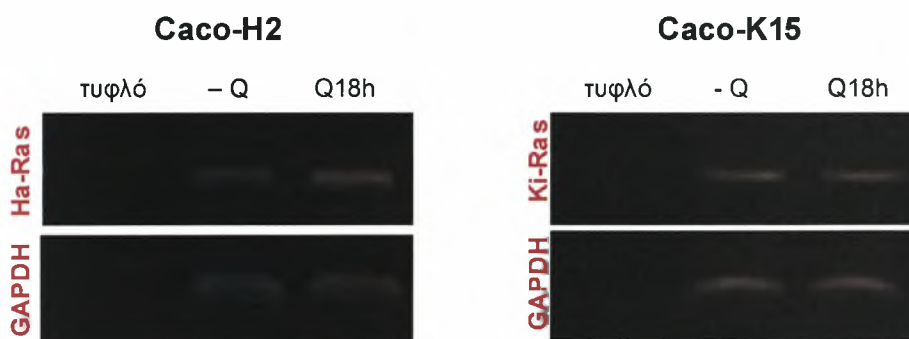
Ακολούθησε ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης Rho μετά από επώαση με κερσετίνη σε κύτταρα αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου DLD-1. Τα κύτταρα αυτά φέρουν μετάλλαξη στο *Ki-RAS* ογκογονίδιο και η κερσετίνη προκαλεί μείωση των επιπέδων της ογκοπρωτεΐνης. Η ανάλυση έδειξε ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης Rho ελαττώνονται επίσης μετά από επώαση των κυττάρων με 20μΜ κερσετίνη για 24 και 48 ώρες, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 9*. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να συσχετισθεί με το αποτέλεσμα των κυτταροσκελετικών αλλαγών που παρουσιάστηκαν στην *Εικόνα 11*, δεδομένου ότι οι Rho GTPάσες ελέγχουν την οργάνωση του κυτταροσκελετού.



Εικόνα 11: Ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης RhoA μετά από επώαση DLD-1 αδενοκαρκινωματικών κυττάρων με κερσετίνη.

3.6 Η μείωση των επιπέδων της ογκοπρωτεΐνης Ras δεν οφείλεται σε ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής.

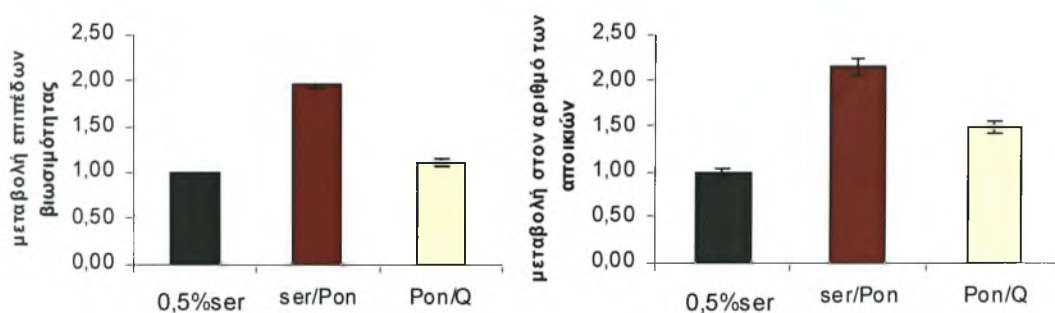
Η μείωση των επιπέδων των ογκοπρωτεϊνών Ras υπό την επίδραση της κερσετίνης θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα είτε ρύθμισης σε επίπεδο μεταγραφής των αντίστοιχων ογκογονιδίων, είτε μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων, είτε ενός συνδυασμού και των δύο. Θελήσαμε λοιπόν αρχικά να ελέγξουμε αν η κερσετίνη μειώνει τα επίπεδα των mRNA των ογκογονιδίων *Ki-RAS* και *Ha-RAS*. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε τα κύτταρα *Caco-K15* και *Caco-H2* στα οποία τα αντίστοιχα ογκογονίδια είναι μονίμως ενεργά. RT-PCR ανάλυση των mRNA για τα ογκογονίδια *Ki-RAS* και *Ha-RAS* έδωσε μία πρώτη ένδειξη ότι τα επίπεδα έκφρασής τους δε μεταβάλλονται μετά από επώαση με κερσετίνη για 18 ώρες (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Επίδραση της κερσετίνης στα επίπεδα των mRNA των ογκογονιδίων *Ki-RAS* και *Ha-RAS*- τα κύτταρα *Caco-K15* και *Caco-H2* επώαθησαν για 18 ώρες παρουσία κερσετίνης (20μM) και τα αντίστοιχα επίπεδα των mRNA αναλύθηκαν με RT-PCR.

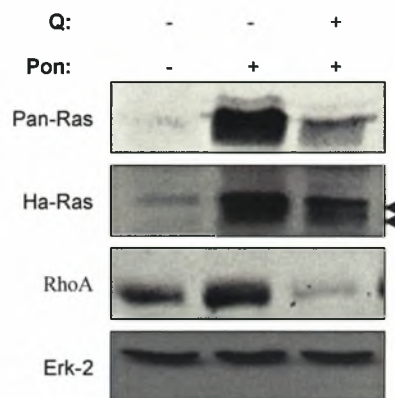
3.7 Η κερσετίνη επιταχώνει την αποικοδόμηση των ογκοπρωτεϊνών Ras σε σύστημα επαγόμενης έκφρασης του RAS

Για την περαιτέρω διερεύνηση του ρυθμιστικού μηχανισμού μέσω του οποίου η κερσετίνη ελαττώνει τα επίπεδα των Ras ογκοπρωτεϊνών, κύτταρα HEK293 τα οποία επάγεται παροδικά η έκφραση του ογκογονιδίου Ha-RAS (293indRas, Moutmtzi et al., submitted) χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα επαγόμενης έκφρασης του ογκογονιδίου (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι). Πειράματα βιωσιμότητας έδειξαν ότι η επαγωγή της έκφρασης του μεταλλαγμένου Ha-RAS παρουσία ορού και ποναστερόνης αύξησε την κυτταρική βιωσιμότητα και διπλασίασε τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων μετά από 48 ώρες συνεχούς έκφρασης (Εικόνα 11). Ωστόσο, παρουσία κερσετίνης στο θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε ορό και ποναστερόνη μείωσε την κυτταρική βιωσιμότητα και, ακόμα πιο ενδιαφέρον, ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων μετά από 48 ώρες πλησίασε τον αριθμό των κυττάρων τα οποία είχαν μεγαλώσει απουσία ορού και ποναστερόνης. Επιπλέον, παρόλο που η παρουσία ορού και ποναστερόνης αύξησε την ικανότητα των κυττάρων 293indRas να σχηματίζουν αποικίες σε μαλακό άγαρ, η ικανότητα αύξησης ανεξάρτητα από την παρουσία σταθερού υποστρώματος ελαττώθηκε στα κύτταρα στα οποία είχε προστεθεί κερσετίνη. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η κερσετίνη μπορεί να ανατρέψει τα αποτελέσματα της έκφρασης του μεταλλαγμένου RAS στα επαγόμενα κύτταρα (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Η κερσετίνη αναστέλλει καρκινικές ιδιότητες που επάγονται από την έκφραση του ογκογονιδίου RAS- (αριστερά) Καμπύλες βιωσιμότητας των 293indRas κυττάρων σε διάφορες συνθήκες. (δεξιά) Δημιουργία αποικιών σε μαλακό άγαρ σε κύτταρα 293indRas μετά από 20 μέρες επώαση (0,5%ser: 0,5% ορός, ser/Pon: πλήρες θρεπτικό μέσο με ποναστερόνη-A, Pon/Q: κερσετίνη μαζί με ποναστερόνη-A.

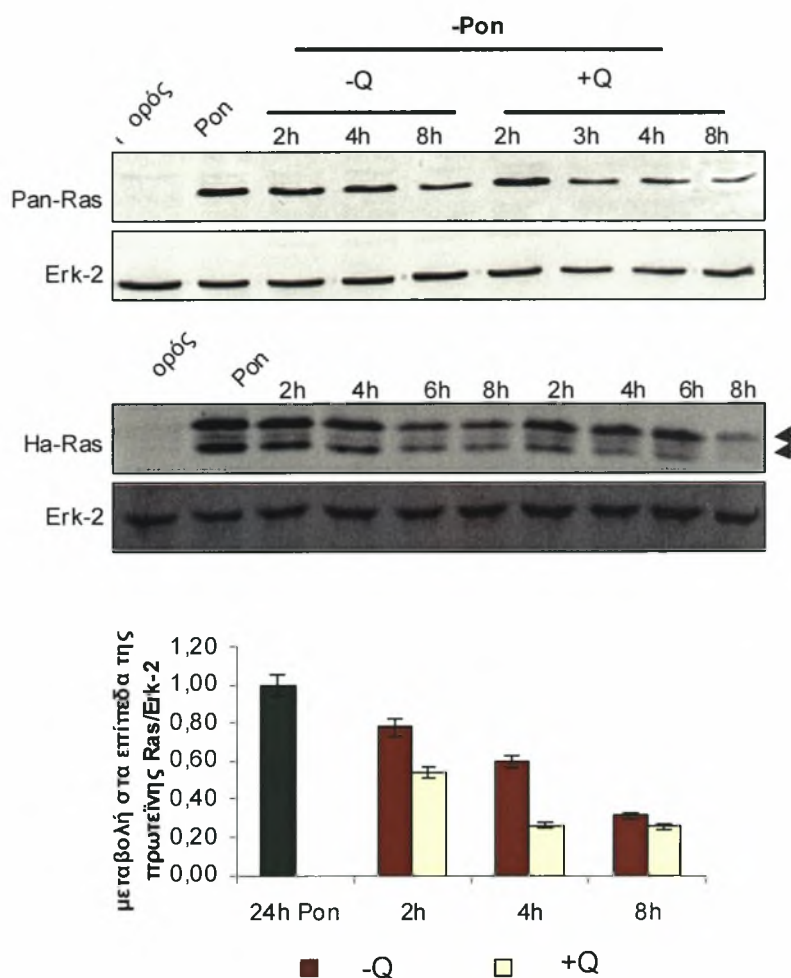
Προεπάση των κυττάρων 293indRas με 20μM κερσετίνη για 24 ώρες ελάττωσε τα επίπεδα της επαγόμενης Ras πρωτεΐνης (24 ώρες επαγωγή της έκφρασης) σε σχέση με τα επαγόμενα κύτταρα στα οποία δεν είχε προστεθεί κερσετίνη (Εικόνα 14). Προκειμένου να ερευνησουμε αν η μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης Rho που παρατηρήθηκε στα κύτταρα DLD-1 προκλήθηκε εξαιτίας της μείωσης των επιπέδων της Ras πρωτεΐνης ή αν η Rho είναι άμεσος στόχος της κερσετίνης, μελετήσαμε τα επίπεδά της μετά από επώαση με κερσετίνη και στα κύτταρα 293indRas, μετά από επαγωγή του ογκογονιδίου και επίδραση κερσετίνης. Η Εικόνα 14 δείχνει πως η μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης Ras συνοδεύτηκε από μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης Rho.



Εικόνα 14: Η κερσετίνη μειώνει τα επίπεδα της επαγόμενης πρωτεΐνης Ras στα 293indRas κύτταρα και μείωση αυτή ακολουθείται από μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης Rho- Μετά από επώαση με απλό θρεπτικό μέσο ή με μέσο που περιείχε 20μM κερσετίνη για 24 ώρες, τα 293indRas κύτταρα επώασθησαν με ποναστερόνη-A για ακόμα 24 ώρες προκειμένου να επαχθεί η έκφραση του ογκογονιδίου Ha-RAS. Στη συνέχεια, τα επίπεδα της πρωτεΐνης Ha-Ras μετρήθηκαν με στύπωμα κατά Western και τη χρήση αντισωμάτων είτε anti-PAN-Ras είτε ειδικού anti-Ha-Ras είτε anti-Rho-A.

Στη συνέχεια δείξαμε ότι η κερσετίνη κάνει τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη περισσότερο επιρρεπή σε αποικοδόμηση. Έγινε επαγωγή της έκφρασης του ογκογονιδίου Ha-RAS στα 293indRas κύτταρα για 24 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με θρεπτικό μέσο και η νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη αφέθηκε να αποικοδομηθεί σε νέο θρεπτικό το οποίο δεν περιείχε ποναστερόνη (διακοπή της έκφρασης του ογκογονιδίου), απουσία ή παρουσία κερσετίνης. Στη συνέχεια προετοιμάσθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα στα χρονικά σημεία που φαίνονται στην Εικόνα 15 και τα εναπομείναντα επίπεδα των πρωτεϊνών αναλύθηκαν σε στύπωμα κατά Western. Ανίχνευση με το ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την

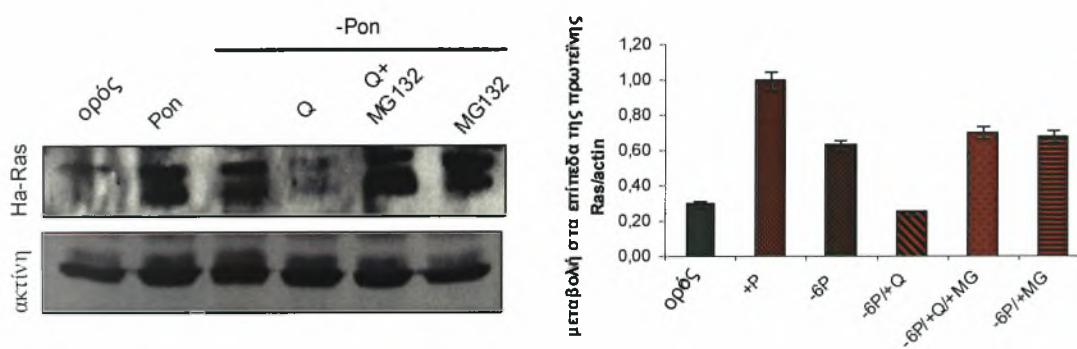
πρωτεΐνη Ha-Ras έδωσε δύο ειδικές ζώνες. Στο στύπωμα φάνηκε ότι η ογκοπρωτεΐνη Ras είχε αυξημένη ταχύτητα αποικοδόμησης παρουσία κερσετίνης, με τα επίπεδά της να φτάνουν το 31% της συνολικής πρωτεΐνης που είχε συντεθεί στις 24 ώρες μετά από 4 ώρες χρόνο αποικοδόμησης, ενώ στα κύτταρα στα οποία δεν είχε προστεθεί κερσετίνη κατά τη διάρκεια της αποικοδόμησης της πρωτεΐνης Ras τα αντίστοιχα επίπεδα της πρωτεΐνης στις 4 ώρες ήταν σχεδόν διπλάσια (60% της συνολικής συντιθέμενης πρωτεΐνης). Ο χρόνος ημιζωής της πρωτεΐνης ήταν περίπου 4,5 ώρες, ενώ παρουσία κερσετίνης ήταν περίπου 2,4 ώρες, δηλαδή μειώθηκε περίπου στο μισό.



Εικόνα 15: Η κερσετίνη επιταχύνει την αποικοδόμηση της Ras ογκοπρωτεΐνης- (πάνω) Τα 293indRas κύτταρα επωάσθησαν για 24 ώρες με ποναστερόνη-A και στη συνέχεια, προκειμένου να εκτιμηθεί η αποικοδόμηση της πρωτεΐνης Ha-Ras, η ποναστερόνη αφαιρέθηκε, και τα κύτταρα επωάσθησαν με θρεπτικό μέσο χωρίς ή με κερσετίνη. Αφού πέρασαν οι χρόνοι που φαίνονται, προετοιμάσθησαν ολικά εκχυλίσματα και τα επίπεδα της πρωτεΐνης Ha-Ras εκτιμήθηκαν με στύπωμα κατά Western. (κάτω) Ποσοτική ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης που απέμεινε μετά από αποικοδόμηση, σε σχέση με τα συνολικά επίπεδα της επαγόμενης πρωτεΐνης (24 ώρες ποναστερόνη-A).

3.8 Η επαγόμενη από την κερσετίνη αποικοδόμηση της ογκοπρωτεΐνης Ras αναστέλλεται από τον αναστολέα του πρωτεασώματος.

Παρόλα αυτά, ο μηχανισμός που ήταν υπεύθυνος για την επαγόμενη από την κερσετίνη αποικοδόμηση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης Ha-Ras παρέμενε άγνωστος. Ένας από τους βασικούς μηχανισμούς με τον οποίο το κύτταρο αποικοδομεί ένα μεγάλο ποσοστό των πρωτεϊνών του είναι το πρωτεάσωμα. Ως εκ τούτου, αναρωτηθήκαμε αν η μεταλλαγμένη Ras πρωτεΐνη στο σύστημά μας αποικοδομήθηκε μέσω του πρωτεασώματος. Για το λόγο αυτό, προσθέσαμε στα κύτταρα τον αναστολέα του 26S πρωτεασώματος MG132. Στην *Εικόνα 16* φαίνεται ότι ο MG132 σταθεροποιεί την ογκοπρωτεΐνη Ras και αυτό προλαμβάνει την πρωτεΐνη από την αποικοδόμηση που επάγεται από την κερσετίνη. Οι παρατηρήσεις αυτές προτείνουν ότι το πρωτεάσωμα μεσολαβεί στην αποικοδόμηση της ογκοπρωτεΐνης Ras από την κερσετίνη.



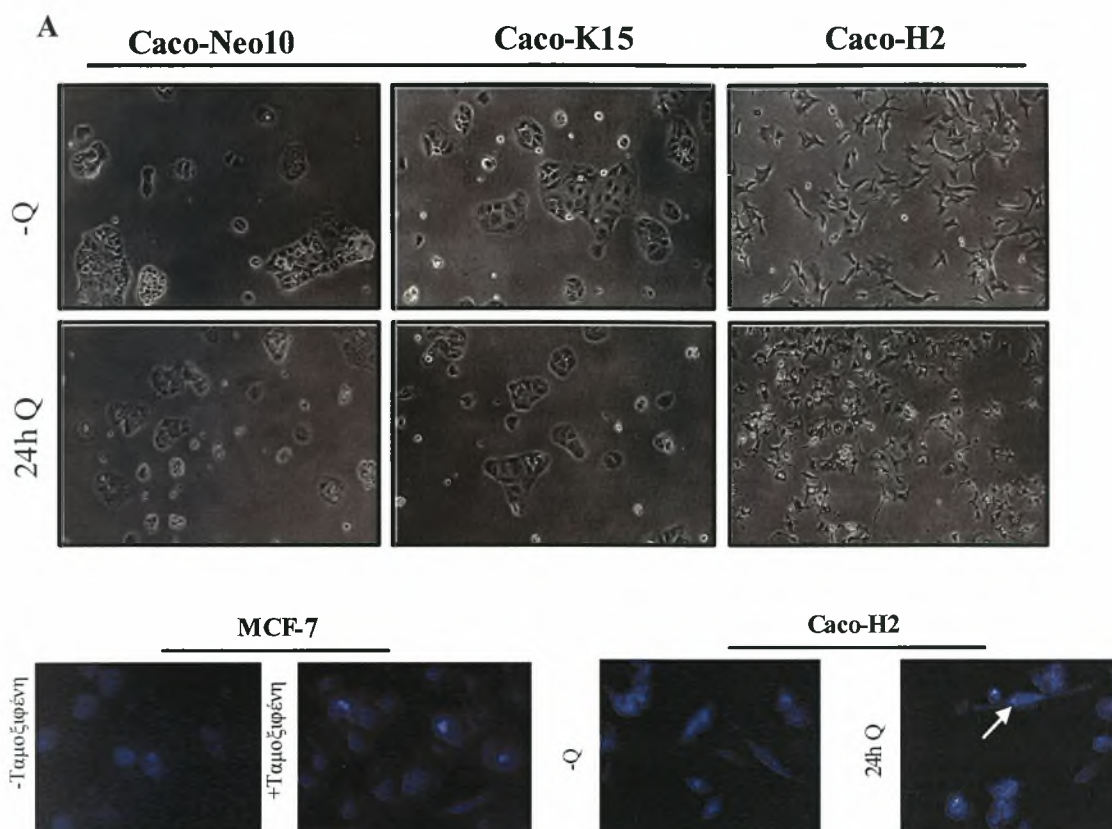
Εικόνα 16: Η κερσετίνη επιταχύνει την αποικοδόμηση της ογκοπρωτεΐνης Ras μέσω του πρωτεασώματος- (αριστερά) Τα κύτταρα 293indRas αναπτύχθηκαν για 24 ώρες παρουσία ποναστερόνης-A προκειμένου να επαχθεί η έκφραση της πρωτεΐνης Ras. Στη συνέχεια, η ποναστερόνη-A αφαιρέθηκε και τα κύτταρα επώασθησαν για 6 ώρες με πλήρες θρεπτικό ή με θρεπτικό που περιείχε κερσετίνη ή/και τον αναστολέα MG132 και ακολούθησε ανάλυση των επιπέδων της πρωτεΐνης Ras με στύπωμα κατά Western.

(δεξιά) Ποσοτική ανάλυση της πρωτεΐνης σε σχέση με τα επίπεδα της πρωτεΐνης ERK-2. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα αποτελέσματα από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα.

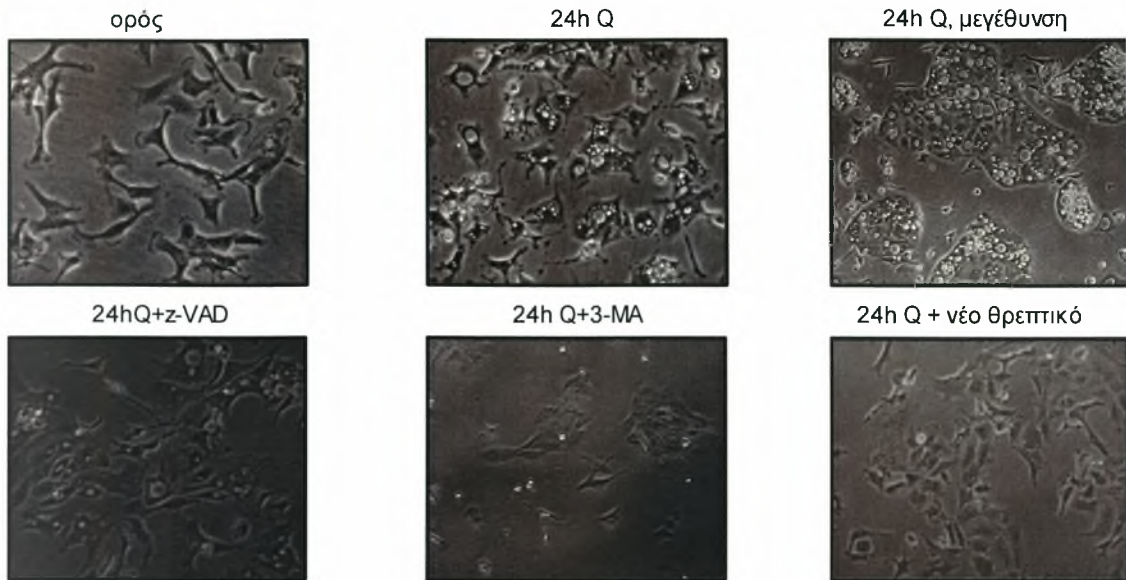
3.9 Η κερσετίνη επάγει αυτοφαγία σε κύτταρα του παχέος εντέρου μετασχηματισμένα με το Ha-RAS.

Μία αξιοσημείωτη εμφάνιση κυστιδίων στο κυτταρόπλασμα παρατηρήθηκε στα Caco-H2 κύτταρα μετά από επώαση με κερσετίνη για 24 ώρες (*Εικόνα 17*). Σε αντίθεση, τα κύτταρα Caco-N10 και Caco-K15 φαίνονται να αντιστέκονται στην κυστιδιοποίηση αυτή που εμφανίζεται στο κυτταρόπλασμα και που επάγεται από την κερσετίνη. Η εμφάνιση των κυστιδίων υπό την επίδραση της κερσετίνης έγινε ήδη εμφανής στα κύτταρα Caco-H2 μετά από επώαση για 6 ώρες με την πολυφαινόλη και φάνηκε να είναι η πρώτη ένδειξη για την ενεργοποίηση αυτοφαγικών διαδικασιών στα κύτταρα αυτά. Το φαινόμενο παρατηρήθηκε και σε ακόμα δύο κλώνους του Ha-RAS σε κύτταρα Caco-2. Για την περαιτέρω επιβεβαίωση της αυτοφαγίας στα κύτταρα αυτά, προχωρήσαμε σε χρώση των κυττάρων με τη φθορίζουσα χρωστική MDC (monodansylcadaverin), η οποία έχει αναδειχθεί ειδική για τα αυτοφαγικά κυστίδια (131). Αρχικά, θελήσαμε να επιβεβαιώσουμε το πρότυπο χρώσης της MDC σε κύτταρα τα οποία υπόκεινται σε αυτοφαγία. Σε κύτταρα MCF-7, έχει δείχθει ότι όταν αυτά αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο παρουσία 10μM ταμοξιφένης για 48 ώρες, τα κύτταρα ενεργοποιούν αυτοφαγικούς μηχανισμούς (132). Στην *Εικόνα 17A* φαίνεται ότι στην περίπτωση αυτή, όταν τα κύτταρα χρωματίζονται με MDC, η χρώση εμφανίζεται σε συναθροίσεις μέσα στο κυτταρόπλασμα, οι οποίες πιθανώς αντιπροσωπεύουν κυτταροπλασματικά αυτοφαγικά κυστίδια. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων με 20μM κερσετίνη, τα κύτταρα χρωματίστηκαν με MDC και παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού. Οι αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες που φαίνονται στην *Εικόνα 17B*, δείχνουν ένα στικτό μοτίβο της χρώσης στα κύτταρα που έχουν επωασθεί με κερσετίνη, χαρακτηριστικό της παρουσίας αυτοφαγικών κυστιδίων στο κυτταρόπλασμα. Στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν απουσία κερσετίνης, ελάχιστα κύτταρα εμφάνισαν αντίστοιχη εικόνα. Με σκοπό να επιβεβαιωθεί η συμμετοχή του μονοπατιού της αυτοφαγίας, τα κύτταρα επώασθηκαν με τον αναστολέα της αυτοφαγίας 3-MA, ο οποίος παρεμποδίζει την αυτοφαγική δραστηριότητα στα αρχικά της στάδια (133). Επώαση με τον αναστολέα είχε ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της δημιουργίας αυτοφαγικών κυστιδίων. Ο γενικός αναστολέας των κασπασών z-VAD-FMK απέτυχε στο να αναστείλει την εμφάνιση κυστιδίων στα κύτταρα παρουσία κερσετίνης, επιβεβαιώνοντας ότι το φαινόμενο της αυτοφαγίας είναι ανεξάρτητο κασπασών. Αλλαγή του θρεπτικού μέσου που περιείχε

κερσετίνη και προσθήκη νέου θρεπτικού ανέτρεψε το φαινόμενο και τα κυστίδια σχεδόν εξαφανίστηκαν (Εικόνα 18).

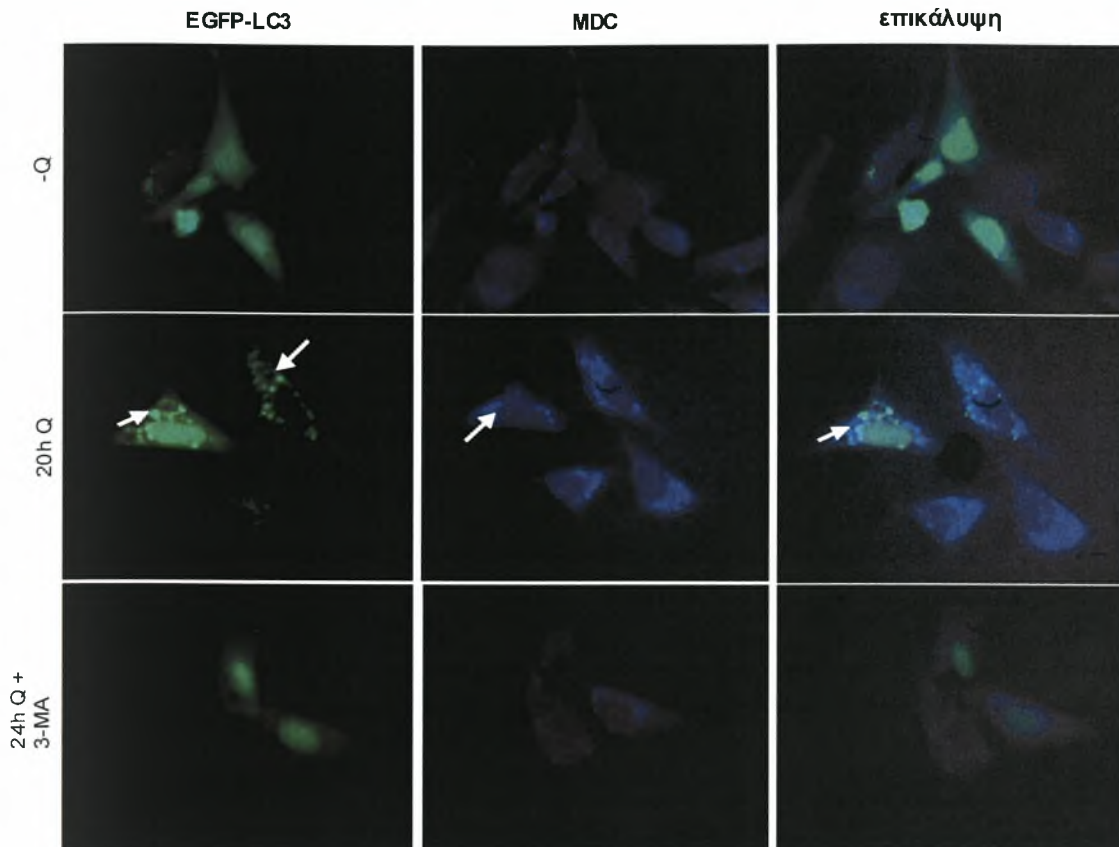


Εικόνα 17: Η κερσετίνη επάγει το σχηματισμό αυτοφαγικών κυστιδίων στα κύτταρα Caco-H2- A. Τα κύτταρα Caco-N10, Caco-K15 και Caco-H2 επώασθησαν σε μέσο με 10% FBS μόνο ή με 20 μ M κερσετίνη στους 37°C για 24 ώρες και στη συνέχεια παρατηρήθηκε η κυτταρική μορφολογία. Τα κυτταροπλασματικά κυστίδια εμφανίστηκαν μόνο στα κύτταρα Caco-H2 κύτταρα. **B.** Τα κύτταρα MCF-7 (αριστερά) και Caco-H2 (δεξιά) επώασθησαν με 10 μ M ταμοξιφένη για 48 ώρες και 20 μ M κερσετίνη για 24 ώρες αντίστοιχα και στη συνέχεια επώασθησαν με 0.05mM MDC σε PBS στους 37°C για 15 λεπτά. Μετά από μονιμοποίηση με παραφορμαλδεΐδη, τα κύτταρα παρατηρήθηκαν αμέσως στο μικροσκόπιο φθορισμού.



Εικόνα 18: Η εμφάνιση κυστιδίων στο κυτταρόπλασμα που επάγεται από την κερσετίνη εμποδίζεται από αναστολείς της αυτοφαγίας αλλά όχι αναστολείς αποπτωτικών μονοπατιών- Τα κύτταρα Caco-H2 επώασθησαν στις συνθήκες που φαίνονται στην Εικόνα και στη συνέχεια παρατηρήθηκε η μορφολογία τους σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων.

Υπό το φως των παραπάνω παρατηρήσεων ελέγξαμε την περίπτωση συνεντοπισμού της χρώσης MDC με την πρωτεΐνη LC3. Όπως αναφέρθηκε, η LC3 πρωτεΐνη εντοπίζεται στις μεμβράνες των αυτοφαγικών κυστιδίων μετά την έναρξη της αυτοφαγίας (98). Μετά από παροδική υπερέκφραση της πρωτεΐνης EGFP-LC3 στα κύτταρα Caco-H2 ακολουθούμενη από επώαση με κερσετίνη για 20 ώρες, η EGFP-LC3 εμφάνισε στικτό μοντέλο σε μικροσκόπιο φθορισμού (Εικόνα 19, πράσινη χρώση, μέση). Αντίθετα, σε κύτταρα που δεν είχαν επωασθεί με κερσετίνη η EGFP-LC3 παρουσίασε διάχυτη κατανομή (Εικόνα 19, πάνω) η οποία έμοιαζε με την Εικόνα που έδωσαν τα κύτταρα όταν σε αυτά προστέθηκε ο αναστολέας 3-MA λίγο πριν την προσθήκη κερσετίνης στο θρεπτικό μέσο (Εικόνα 19, κάτω). Παράλληλη χρώση με MDC έδειξε ότι κάποια από τα θετικά για τη χρώση κυστίδια (στικτό μοτίβο) καλύπτονταν από την πρωτεΐνη EGFP-LC3 (Εικόνα 19, δεξιά). Αυτά επιβεβαίωσαν την ενεργοποίηση αυτοφαγικών λειτουργιών σε κύτταρα μετασχηματισμένα με το ογκογονίδιο Ras, οι οποίες ενισχύονταν από την κερσετίνη.



Εικόνα 19: Η κερσετίνη επάγει το σχηματισμό αυτοφαγικών κυστιδίων που χρωματίζονται με την MDC και στα οποία εντοπίζεται η πρωτεΐνη LC3 στα κύτταρα Caco-H2- 24 ώρες μετά την επιμόλυνση των Caco-H2 κυττάρων με το πλασμίδιο που εκφράζει την πρωτεΐνη EGFP-LC3, τα κύτταρα επώασθησαν με απλό θρεπτικό ή με θρεπτικό που περιείχε 20μM κερσετίνη με ή χωρίς 3-MA για επιπλέον 20 ώρες, χρωματίστηκαν με MDC και μονιμοποιήθηκαν. Στη συνέχεια, τα κύτταρα παρατηρήθηκαν αμέσως στο μικροσκόπιο φθορισμού.

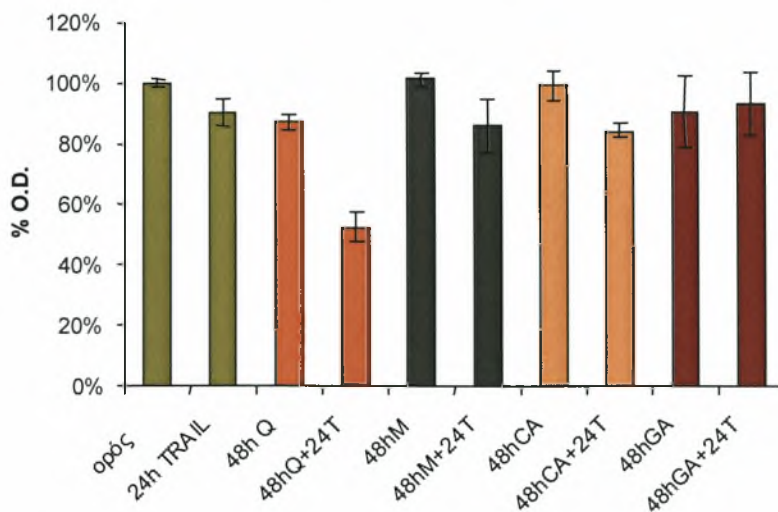
μ έ ρ ο ς β

Η κερσετίνη συνεργεί στην επαγόμενη από το TRAIL απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου.

Διάφορες κυτοκίνες όπως το TRAIL έχουν την ικανότητα να επάγουν απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου, μέσω της πρόσδεσής τους σε συστήματα υποδοχέων θανάτου. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις όπου η αποφυγή της επαγόμενης από αντικαρκινικά φάρμακα απόπτωσης χαρακτηρίζει πολλούς τύπους καρκίνου. Το πρόβλημα αυτό οδήγησε στην ανάγκη για συνδυαστικές θεραπείες, έτσι ώστε κύτταρα τα οποία δείχνουν περιορισμένη ευαισθησία σε φάρμακα να γίνονται περισσότερο επιρρεπή στην απόπτωση, πολλές φορές σε ελαττωμένες συγκεντρώσεις κυτταροτοξικών φαρμάκων, οι οποίες θα μπορούσαν να ελαττώσουν και τις πιθανότητες παρενεργειών. Βασιζόμενοι σε αυτά, θελήσαμε να ενισχύσουμε τα επίπεδα της απόπτωσης που επάγει το TRAIL στα καρκινικά κύτταρα του ανθρώπινου παχέος εντέρου HT-29 τα οποία εμφανίζουν μειωμένη ευαισθησία στο TRAIL. Για το λόγο αυτό, μελετήσαμε τα αποτελέσματα του συνδυασμού του TRAIL με την πολυφαινόλη κερσετίνη και εξετάσαμε το αποτέλεσμα του συνδυασμού στην κυτταρική βιωσιμότητα, αλλά και σε μονοπάτια μεταγωγής σημάτων που οδηγούν τα κύτταρα σε απόπτωση.

3.10 Διάφορες πολυφαινόλες ενισχύουν τα αποτελέσματα του TRAIL στον κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων HT-29.

Προκειμένου να μελετηθεί μία πιθανή συνέργεια πολυφαινολών με τον αποπτωτικό παράγοντα TRAIL, υποβάλλαμε τα κύτταρα HT-29 σε συνθήκες συνδυασμένης επώασης. Συγκεκριμένα, επώασαμε τα κύτταρα με κάθε μία από τις πολυφαινόλες που φαίνονται στην *Εικόνα 20*, σε συγκέντρωση 30μΜ και μετά από 24 ώρες προσθέσαμε στα κύτταρα TRAIL. Μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους έδειξε πως η κερσετίνη φαίνεται να είναι ο πιο πιθανός ευαισθητοποιητής των κυττάρων στην απόπτωση που επάγεται από το TRAIL.

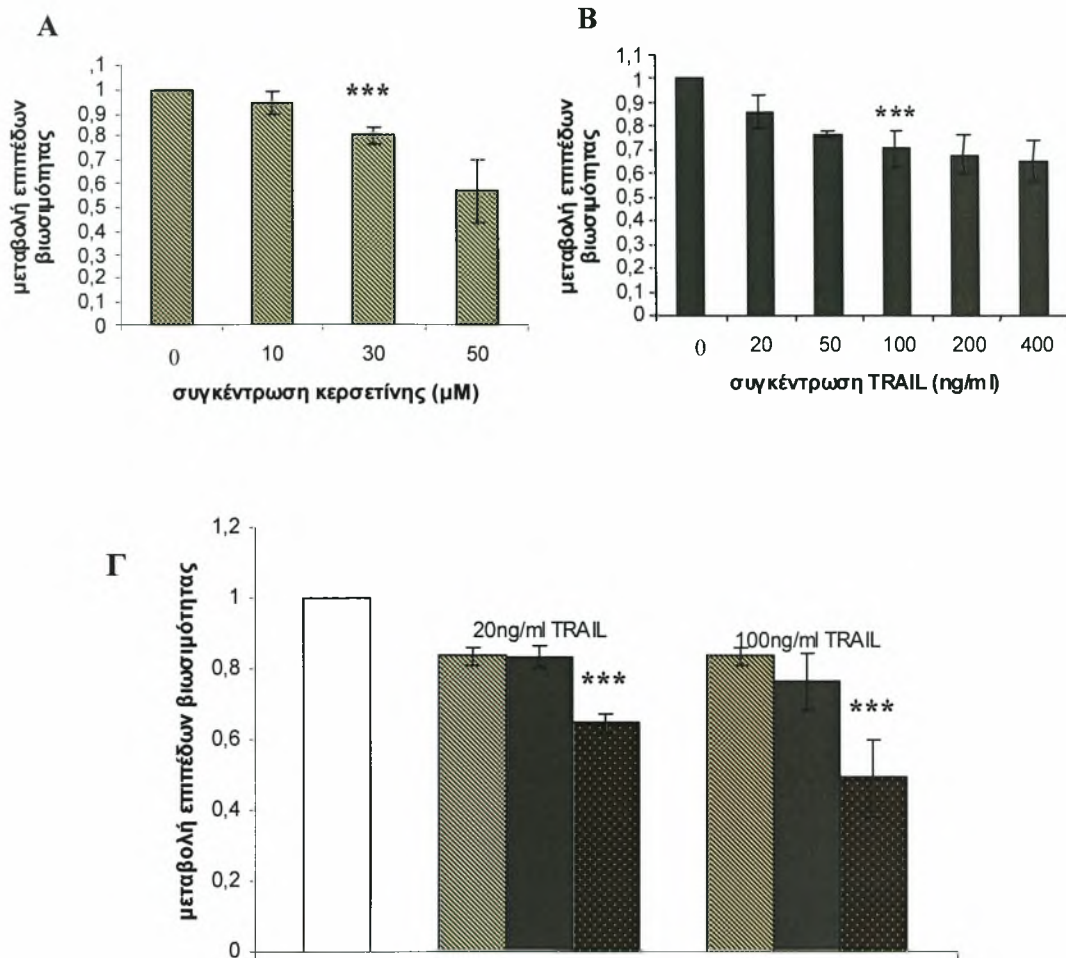


Εικόνα 20: Επίδραση της συνδυασμένης επώασης πολυφαινόλων με TRAIL (20 μ M πολυφαινόλων, 100ng/ml TRAIL).

Q: κερσετίνη (quercetin), M: μυρισετίνη (myricetin), CA: καφεϊκό οξύ (caffeic acid), GA: γαλλικό οξύ (gallic acid).

3.11 Η κερσετίνη και το TRAIL συνεργάζονται στην επαγωγή της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου.

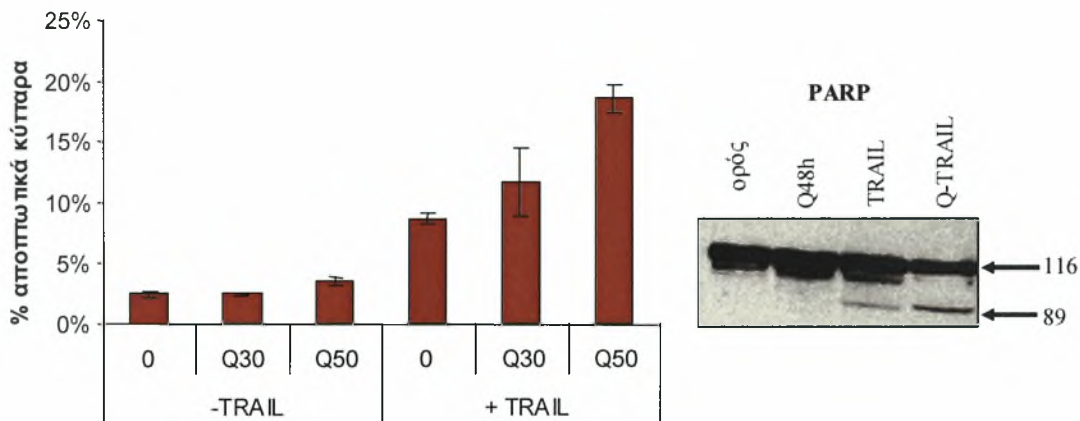
Για τη μελέτη της επίδρασης της πολυφαινόλης κερσετίνης στην απόπτωση που επάγεται από το TRAIL, επιλέξαμε τα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου HT29, τα οποία είναι γνωστό ότι επιδεικνύουν σχετική ανθεκτικότητα στην απόπτωση που επάγεται από το TRAIL. Στην *Εικόνα 21* παρουσιάζεται η δοκιμή μιας κλίμακας συγκεντρώσεων του TRAIL και το αποτέλεσμα της στην κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων HT-29. Επώαση των κυττάρων με 100ng/ml TRAIL προκάλεσε μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας μόνο κατά 20%. Παράλληλα, η επίδραση της κερσετίνης στην κυτταρική βιωσιμότητα γίνεται φανερή σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις, κάτι το οποίο δείχθηκε και σε προηγούμενα πειράματα. Παρόλα αυτά, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η πολυφαινόλη φαίνεται να ευαισθητοποιεί τα κύτταρα στην επαγόμενη από το TRAIL απόπτωση. Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 21*, προεπώαση των κυττάρων HT-29 με 30 μ M κερσετίνη για 24 ώρες ενίσχυσε τα κυτταροτοξικά αποτελέσματα του TRAIL. Το ποσοστό της μείωσης της κυτταρικής βιωσιμότητας υπό συνθήκες συνδυασμένης επώασης με TRAIL και κερσετίνη (30 μ M κερσετίνη για 48 ώρες και 100ng/ml TRAIL τις τελευταίες 24 ώρες) έφτασε το 51%, ενώ η κερσετίνη μόνη της στην ίδια συγκέντρωση μείωσε τη κυτταρική βιωσιμότητα μόνο κατά 13% μετά από 48 ώρες επώαση.



Εικόνα 21: Η επίδραση της κερσετίνης και του TRAIL στην κυτταρική βιωσιμότητα στα HT-29 κύτταρα- Μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους μετά από επώαση των HT-29 κυττάρων στις συνθήκες που φαίνονται **Α.** με κερσετίνη (24 ώρες), **Β.** με TRAIL (48 ώρες), **Γ.** με 30μΜ κερσετίνη για 24 ώρες και την ακόλουθη ή όχι επώαση με 100ng/ml TRAIL για τις τελευταίες 24 ώρες (λευκή ράβδος: κύτταρα που μεγάλωσαν σε απλό θρεπτικό, γραμμωτή ράβδος: κύτταρα που επώασθηκαν με 30μΜ κερσετίνη για 48 ώρες, πράσινη ράβδος: κύτταρα που επώασθηκαν με 20ng/ml ή 100 ng/ml TRAIL, στικτή ράβδος: κύτταρα που υποβλήθηκαν σε συνδυαστική θεραπεία κερσετίνης και TRAIL).

Το αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης της κερσετίνης και του TRAIL στην απόπτωση των κυττάρων HT-29 εκτιμήθηκε επίσης με τη μέτρηση των αποπτωτικών πυρήνων με χρώση Hoechst33258. Για το λόγο αυτό, τα κύτταρα προεπώασθηκαν με 30μΜ κερσετίνη για 24 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκε TRAIL για τις τελευταίες 6 ώρες. Το αποτέλεσμα στην απόπτωση ήταν μεγαλύτερο από αθροιστικό, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 22*, και αυτό ήταν μία ένδειξη ότι η

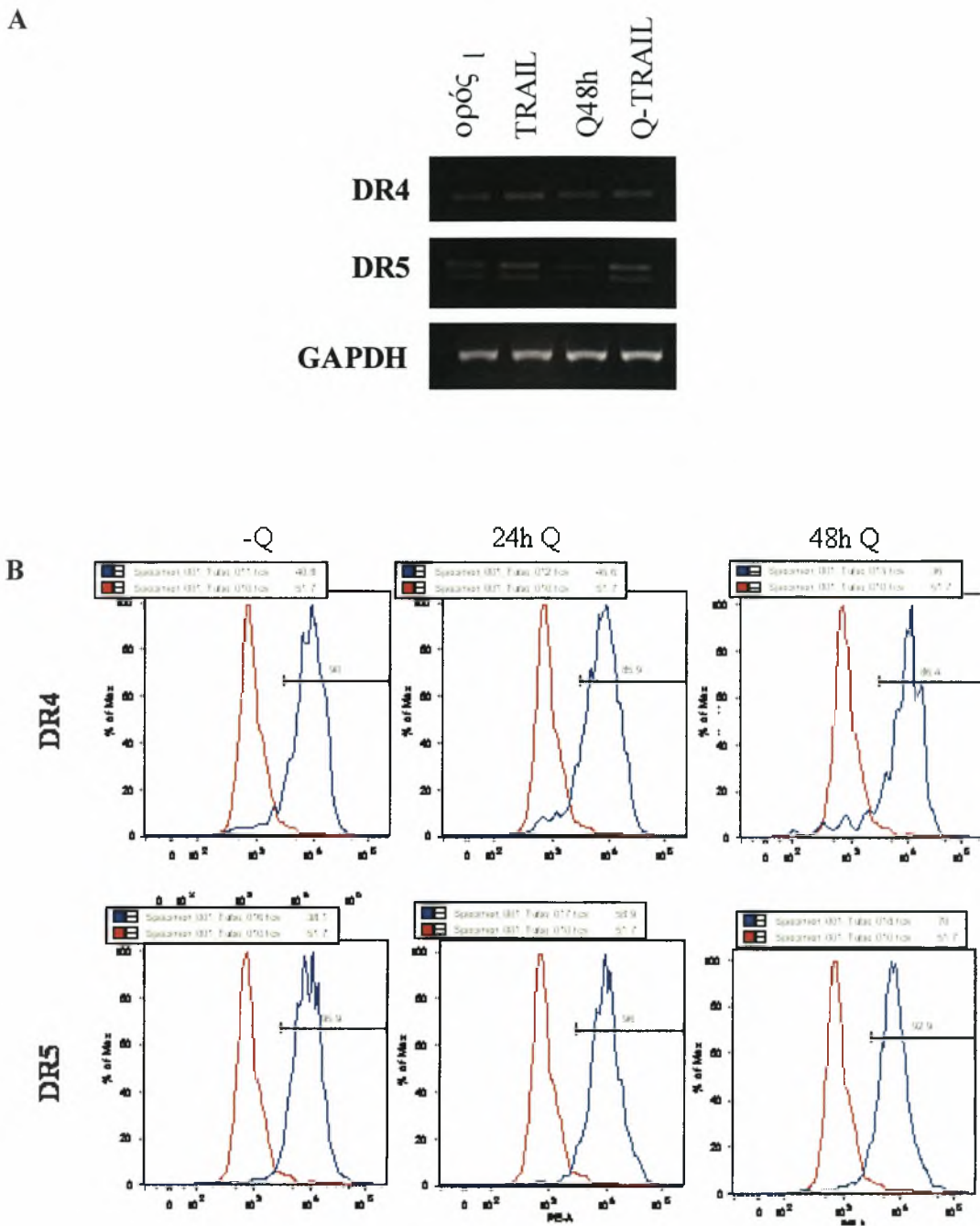
κερσετίνη καθιστά τα HT-29 κύτταρα επιδεκτικά στην απόπτωση που επάγεται από το TRAIL. Έτσι, η συνδυασμένη χορήγηση κερσετίνης και TRAIL θα μπορούσε να προταθεί ως μοντέλο επαγωγής ενισχυμένης απόπτωσης στα HT-29 κύτταρα. Η συνεργασία των δύο συστατικών να επάγουν υψηλά ποσοστά απόπτωσης επιβεβαιώθηκε περαιτέρω από την ενισχυμένη πρωτεόλυση της πρωτεΐνης PARP σε συνθήκες συνδυασμένης επώασης, σε σύγκριση με τα επίπεδα πρωτεόλυσης που επάγεται μόνο από το TRAIL. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα του θραύσματος των 89-kDa της πρωτεΐνης PARP διπλασιάστηκαν στην περίπτωση που τα κύτταρα προεπώασθησαν με κερσετίνη για 24 ώρες πριν την προσθήκη TRAIL για επιπλέον 24 ώρες, συγκρινόμενα με τα κύτταρα που επώασθησαν για 24 ώρες μόνο με TRAIL, χωρίς να έχει προηγηθεί προσθήκη κερσετίνης στο θρεπτικό μέσο. Σημειώνεται ότι η κερσετίνη μόνη της δε διασπά την πρωτεΐνη PARP σε συγκεντρώσεις μέχρι 30 μ M μετά από 24 ώρες επώαση (Εικόνα 22). Τα δεδομένα επιβεβαιώνουν τα χαμηλά επίπεδα αποπτωτικών πυρήνων που παρατηρούνται μετά από χρώση με Hoechst33258 στις ίδιες συνθήκες επώασης. Όλα αυτά δείχνουν πως η κερσετίνη ενισχύει την αποτελεσματικότητα του TRAIL να επάγει απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου.



Εικόνα 22: Η επίδραση της κερσετίνης στην επαγόμενη από το TRAIL απόπτωση στα HT-29 κύτταρα- (αριστερά) απεικόνιση των ποσοστών απόπτωσης που μετρήθηκαν μετά από χρώση Hoechst33258 κυττάρων HT-29 τα οποία επώασθησαν ή όχι με κερσετίνη πριν την προσθήκη ή όχι TRAIL στο θρεπτικό τους μέσο (δεξιά) ανάλυση κατά Western της πρωτεΐνης PARP και του πρωτεολυτικού τμήματος των 89 kDa.

3.12 Η ενίσχυση της κυτταροτοξικότητας του TRAIL από την κερσετίνη δε συνδυάζεται με υπερέκφραση των υποδοχέων του.

Το επόμενο βήμα ήταν να μελετήσουμε την έκφραση των υποδοχέων του TRAIL και να διερευνήσουμε αν τα αυξημένα επίπεδα απόπτωσης σε συνθήκες συνδυασμένης επώασης κερσετίνης με TRAIL οφείλονταν σε αυξημένη έκφραση των υποδοχέων. RT-PCR ανάλυση για τους υποδοχείς θανάτου του TRAIL DR4 και DR5, έδωσε μία πρώτη ένδειξη ότι η κερσετίνη δεν προκαλεί αλλαγές στα επίπεδα του mRNA των υποδοχέων. Στην *Εικόνα 23Α* φαίνεται καθαρά η επαγωγή της έκφρασης των DR4 και DR5 μετά από επώαση των κυττάρων με TRAIL για 24 ώρες. Παρόλα αυτά, δεν φαίνεται να υπάρχει συνέργεια με την κερσετίνη στην έκφραση των υποδοχέων. Επιπλέον, η κερσετίνη μόνη της δε φάνηκε να επηρεάζει την έκφραση των υποδοχέων του TRAIL. Στη συνέχεια, πραγματοποιώντας κυτταρομετρία ροής για τους DR4 και DR5 δείξαμε πως η κερσετίνη δεν προκάλεσε σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα των υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια (*Εικόνα 23 Β*). Όλα αυτά είναι ενδείξεις ότι δεν υπάρχει κάποια ρύθμιση σε επίπεδο έκφρασης των υποδοχέων του TRAIL από την κερσετίνη.

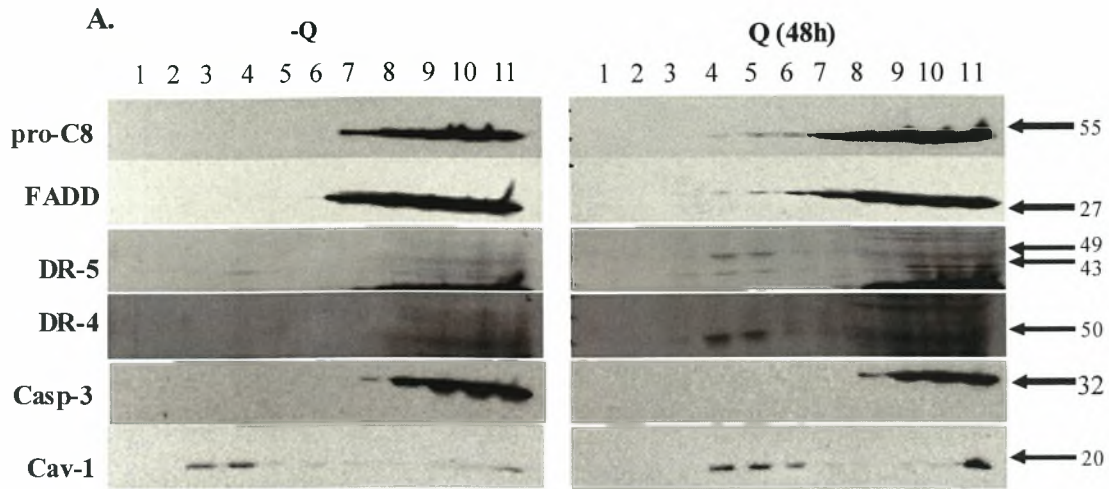


Εικόνα 23: Η επίδραση της κερσετίνης στην επαγόμενη από το TRAIL απόπτωση στα HT-29 κύτταρα- Α. Ανάλυση RT-PCR των υποδοχέων θανάτου του TRAIL μετά από επώαση των HT-29 κυττάρων με 100ng/ml TRAIL για 24 ώρες, 30μM κερσετίνη για 48 ώρες ή το συνδυασμό των δύο (48 ώρες κερσετίνη και προσθήκη TRAIL για τις τελευταίες 24 ώρες). **Β.** Κυτταρομετρία ροής για την ανάλυση των επιπέδων των DR4 και DR5 στην επιφάνεια των κυττάρων παρουσία κερσετίνης.

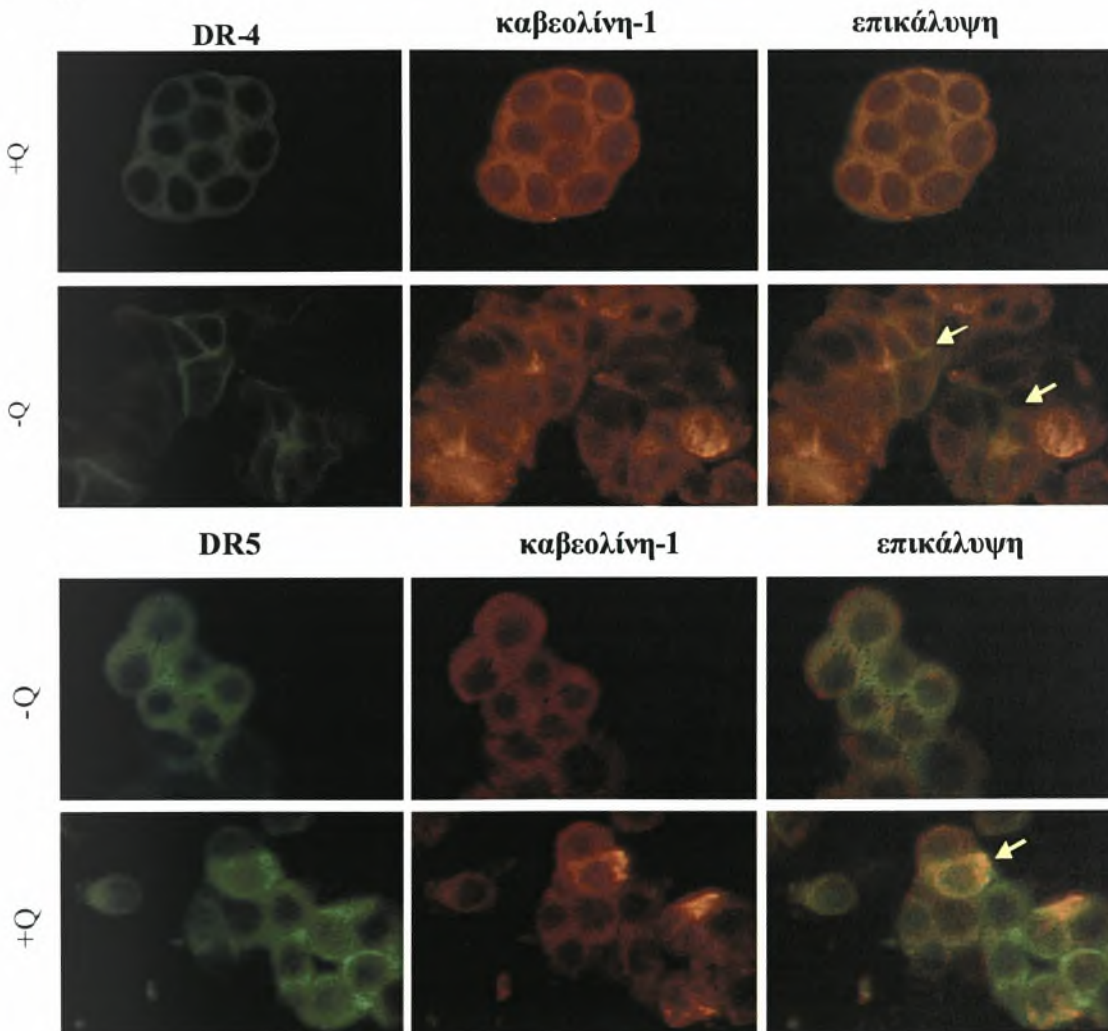
3.13 Η κερσετίνη επάγει τη συσσώρευση των υποδοχέων του TRAIL σε λιπιδικές «σχεδίες» (*lipid rafts*).

Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει το ρόλο μικροδομών της πλασματικής μεμβράνης οι οποίες είναι πλούσιες σε χοληστερόλη και γλυκοσφιγγολιπίδια στην έναρξη κυτταρικού θανάτου που μεσολαβείται από τους υποδοχείς θανάτου. Οι μελέτες αυτές μας οδήγησαν να διερευνήσουμε αν η κερσετίνη επηρεάζει την κατανομή των υποδοχέων στη πλασματική μεμβράνη. Για το λόγο αυτό και προκειμένου να προβούμε σε μια πιο λεπτομερή μηχανιστική μελέτη της συνεισφοράς της κερσετίνης στην επαγόμενη από το TRAIL απόπτωση, απομονώσαμε κυτταρικά κλάσματα με υπερφυγοκέντρωση σε διάλυμα γραμμικά διαβαθμισμένης συγκέντρωσης σουκρόζης μετά από επώαση των κυττάρων απουσία ή παρουσία 30μM κερσετίνης για 48 ώρες. Έκθεση των κυττάρων σε κερσετίνη είχε ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση των DR4, DR5 και της πρωτεΐνης FADD στα κλάσματα 4,5 και 6 τα οποία ήταν θετικά ως προς την έκφραση της καβεολίνης-1 (πρωτεΐνη που συμμετέχει στις λιπιδικές μικροδομές και που αποτελεί δείκτη για τις λιπιδικές σχεδίες). Η προκασπάση-8 ήταν επίσης παρούσα στα κλάσματα αυτά. Η κασπάση-3 χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός δείκτης και δεν εμφανίστηκε μετατοπισμένη στις λιπιδικές μικροδομές (*Εικόνα 24A*).

Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων απομόνωσης των λιπιδικών μικροδομών έγινε με τεχνική ανοσοφθορισμού, με τη χρήση αντισωμάτων που αναγνωρίζουν τους DR4, DR5 και την καβεολίνη-1. Οι εικόνες που φάνηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού και που φαίνονται στις φωτογραφίες της *Εικόνας 25A*, έδειξαν ότι επώαση των κυττάρων με κερσετίνη για 48 ώρες προκάλεσε τη συσσώρευση των υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων, σε αντίθεση με το TRAIL, το οποίο δε φάνηκε να αλλάζει την κατανομή των υποδοχέων στα κύτταρα. Επιπλέον, στις συνθήκες αυτές παρατηρήθηκε συνεντοπισμός τόσο του DR4 όσο και του DR5 με την καβεολίνη-1, γεγονός που συμφωνεί με τα προηγούμενα.

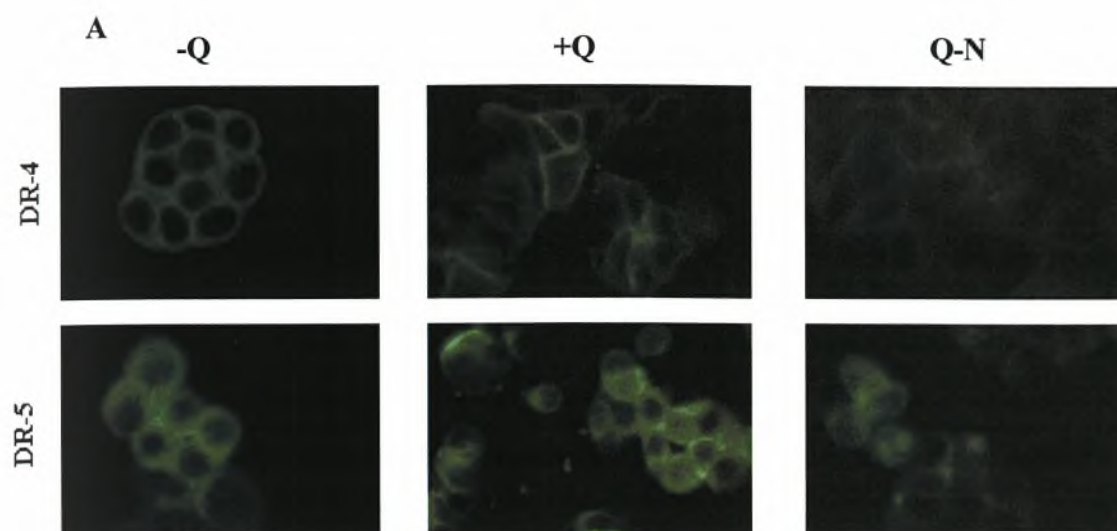
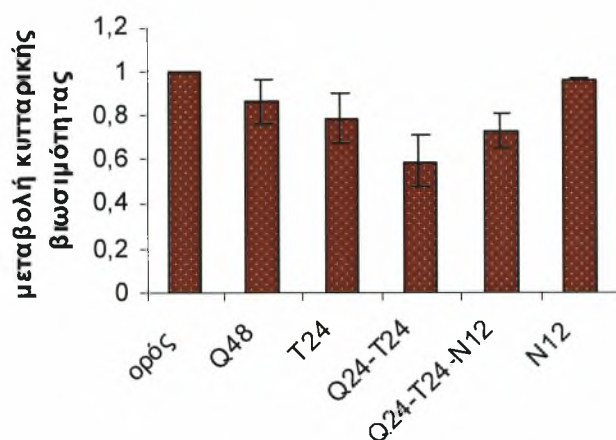


B



Εικόνα 24: Η κερσετίνη προκαλεί στα κύτταρα HT-29 την ανακατανομή των υποδοχέων DR4 και DR5 σε λιπιδικές σχεδίες- **A.** Ανάλυση κατά Western των πρωτεϊνών που φαίνονται μετά από επώαση με 30μM κερσετίνη για 48 ώρες και κλασμάτωση των κυττάρων HT-29 σε διάλυμα γραμμικά διαβαθμισμένης συγκέντρωσης σουκρόζης. **B.** Μικροσκοπία φθορισμού για τον εντοπισμό των DR4, DR5 και καβεολίνης-1 σε HT-29 κύτταρα που επώασθηκαν ή όχι με 30μM κερσετίνη για 48 ώρες (μεγέθυνση x40).

Παρουσία νυστατίνης στα κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή των μεταβολών στην κυτταρική μεμβράνη, παρά την παρουσία κερσετίνης. Η νυστατίνη, είναι μόριο που αφαιρεί τη χοληστερόλη από τις μεμβρανικές μικροδομές και επομένως εμποδίζει τη δημιουργία των λιπιδικών σχεδίων. Στο πείραμα που παρουσιάζεται στην *Εικόνα 25Α*, τα HT-29 κύτταρα επώασθησαν με 30 μ M κερσετίνη για 24 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκε σε αυτά TRAIL (100ng/ml) για ακόμα 24 ώρες ή/και νυστατίνη για τις τελευταίες 12 ώρες. Η νυστατίνη εμπόδισε τη συσσώρευση των υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια όπως φαίνεται στην *Εικόνα* και οι υποδοχείς DR4 και DR5 εμφάνισαν πιο διάχυτη κατανομή σε σχέση με τα κύτταρα στα οποία υπήρχε μόνο η κερσετίνη στο θρεπτικό μέσο. Σε αντίστοιχες συνθήκες, η νυστατίνη απέτρεψε σε μεγάλο βαθμό την επαγόμενη από το TRAIL απόπτωση στα HT-29 κύτταρα, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της *Εικόνας 25Β*. Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι η κερσετίνη επάγει συσσώρευση των υποδοχέων θανάτου σε ειδικές μικροδομές της πλασματικής μεμβράνης και αυτό διευκολύνει την επαγόμενη από το TRAIL απόπτωση.

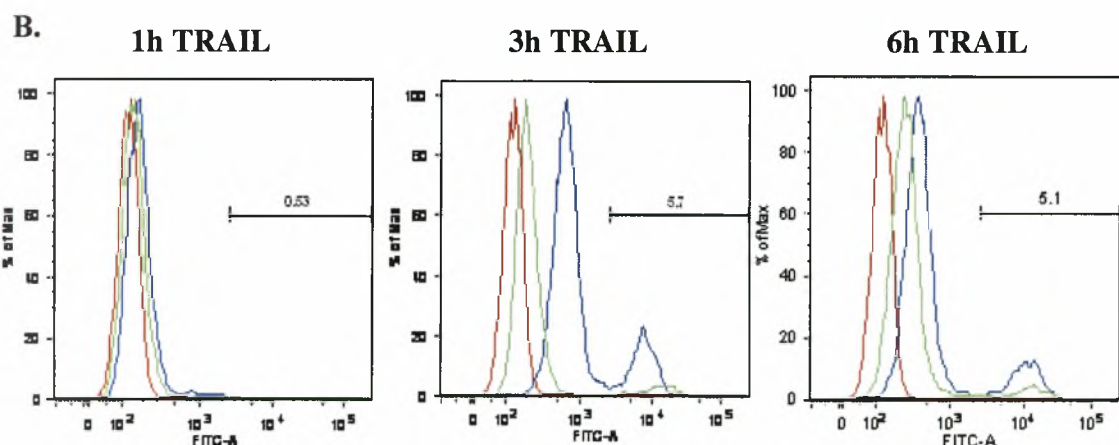
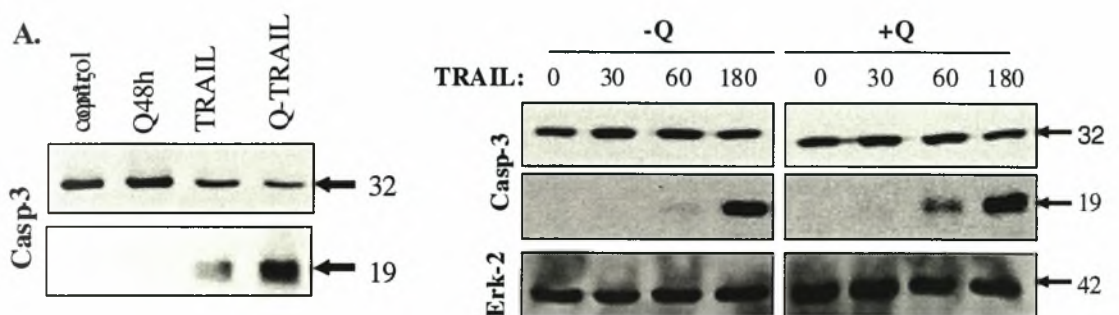
**B**

Εικόνα 25: Η νυστατίνη αναστέλλει την ανακατανομή των υποδοχέων του TRAIL και μειώνει τα επίπεδα κυτταρικού θανάτου που επάγονται από την κερσετίνη στα κύτταρα HT-29- Α. Μικροσκοπία φθορισμού σε κύτταρα που έχουν επωασθεί ή όχι με 30μM κερσετίνη ή/ και 20ng/ml νυστατίνη, μετά από χρώση με αντισώματα έναντι των DR4 και DR5 (μεγέθυνση x40). **Β.** μέτρηση κυτταρικής βιωσιμότητας μετά από επώαση των HT-29 κυττάρων με κερσετίνη (30μM, 48 ώρες), TRAIL (100ng/ml, 24ώρες) ή το συνδυασμό των δύο ή με νυστατίνη (20ng/ml, 12 ώρες), μετά από επώαση ή όχι με κερσετίνη και TRAIL. Η μέτρηση έγινε με τη μέθοδο του κρυσταλλικού ιώδους.

3.14 Η κερσετίνη ενισχύει την πρωτεόλυση της κασπάσης-3.

Στη συνέχεια θελήσαμε να εξετάσουμε αν υπάρχει επίδραση της κερσετίνης σε συνδυασμό με το TRAIL στα επίπεδα πρωτεόλυσης της κασπάσης-3 η ενεργοποίηση της οποίας, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, αποτελεί το τελικό στάδιο στον καταρράκτη των κασπασών που οδηγεί στην απόπτωση. Επώασαμε τα κύτταρα με απλό θρεπτικό (ορός), με κερσετίνη για 24 και 48 ώρες, με TRAIL για 24 ώρες και με το συνδυασμό των δύο (48 ώρες κερσετίνη με την προσθήκη TRAIL για τις τελευταίες 24 ώρες) και αναλύσαμε τα επίπεδα του συνολικού και του πρωτεολυτικού κλάσματος της κασπάσης-3 σε στύπωμα κατά Western. Το αποτέλεσμα που φαίνεται στην *Εικόνα 26Α* έδειξε ότι το τμήμα των 19kDa της κασπάσης-3 ήταν περίπου 3 φορές δυνατότερο σε ένταση μετά από επώαση των κυττάρων με TRAIL για 24 ώρες στην περίπτωση που είχε προηγηθεί επώαση με κερσετίνη για 24 ώρες. Η χρονική ανάλυση της πρωτεόλυσης της κασπάσης-3 που ακολούθησε έδειξε ότι παρόλο που το TRAIL προκάλεσε μία ασθενή διάσπαση της κασπάσης-3 μετά από 1 ώρα επώαση, προεπώαση με κερσετίνη προκάλεσε δυνατότερη διάσπαση στον ίδιο χρόνο και η ένταση παραμένει μεγαλύτερη και μετά από 3 ώρες. Επίσης, φαίνεται πως το αποτέλεσμα ξεκίνησε νωρίτερα και το κλάσμα των 19kDa εμφανίζεται από τα 30 λεπτά παρουσίας του TRAIL στο θρεπτικό μέσο με την κερσετίνη. Προσθήκη κερσετίνης, χωρίς TRAIL, δεν προκάλεσε αλλαγές στην κασπάση-3 και αυτό συμφωνεί με την ανικανότητα της κερσετίνης να επάγει απόπτωση στη συγκέντρωση των 30μM στα κύτταρα HT-29. Δεδομένου ότι η κυτοκερατίνη-18 είναι ένα άμεσο υπόστρωμα για την κασπάση-3 και η διάσπασή της αποτελεί σημαντική ένδειξη για την απόπτωση σε επιθηλιακά κύτταρα, προχωρήσαμε σε ανάλυση των επιπέδων του πρωτεολυτικού τμήματος της κυτοκερατίνης-18 πραγματοποιώντας κυτταρομετρία ροής και χρησιμοποιώντας το αντίσωμα M30, το οποίο αναγνωρίζει ειδικά το κομμένο κομμάτι της κυτοκερατίνης-18. Τα κύτταρα επώασθηκαν σε θρεπτικό μέσο με ή χωρίς κερσετίνη για 24 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκε TRAIL για 1, 3 και 6 ώρες πριν τη μέτρηση. Τα αποτελέσματα έδειξαν διαφορές στην ευαισθησία των κυττάρων στο TRAIL μετά από επώαση με κερσετίνη. Τα κύτταρα στα οποία είχε προηγηθεί κατεργασία με κερσετίνη ήταν σε μεγαλύτερο ποσοστό αποπτωτικά μετά την προσθήκη του TRAIL στο θρεπτικό μέσο, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 26Β*. Τα αποτελέσματα στις διαφορές στην απόπτωση μετά την επώαση των κυττάρων με κερσετίνη επιβεβαιώθηκαν με χρώση ανεξίνης στις ίδιες

συνθήκες, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 26B*.

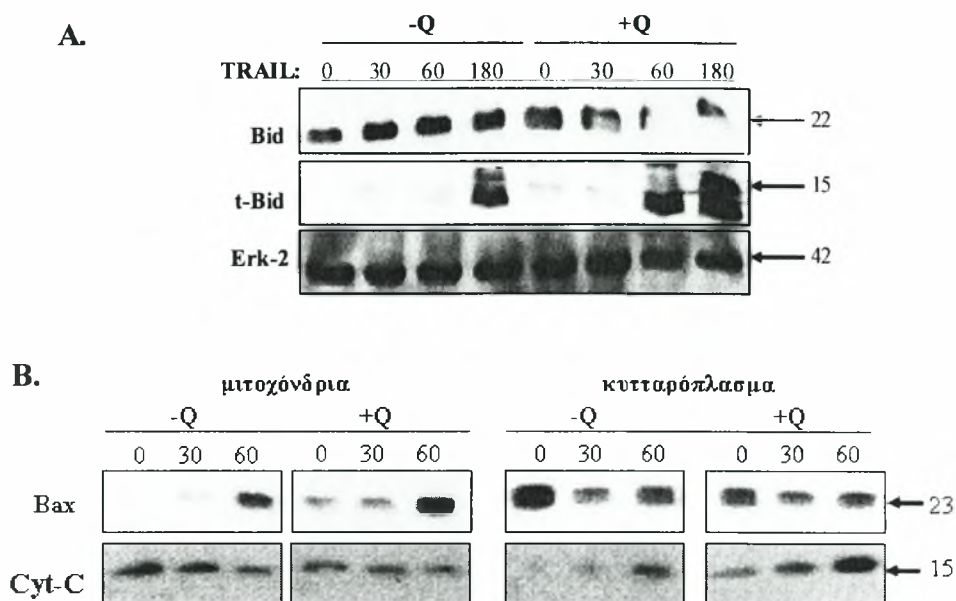


Εικόνα 26: Η επίδραση της κερσετίνης στην πρωτεόλυση της κασπάσης-3 και της κυτοκερατίνης-18- A. (αριστερά) Ανάλυση κατά Western της κασπάσης-3 στις ίδιες συνθήκες που περιγράφηκαν στην *Εικόνα 21*. **(δεξιά)** Ανάλυση των επιπέδων της κασπάσης-3 σε διάφορους χρόνους σε συνθήκες συνδυασμένης επώασης με κερσετίνη και TRAIL. Οι αριθμοί δείχνουν τα μοριακά βάρη των θραυσμάτων σε kDa. **B.** Κυτταρομετρία ροής και ανάλυση του πρωτεολυτικού τμήματος της κυτοκερατίνης-18 με τη χρήση αντισώματος προσδεμένου σε FITC μετά από 1, 3 και 6 ώρες επώασης με TRAIL σε κύτταρα που μεγάλωσαν παρουσία ή όχι 30μM κερσετίνης για 24 ώρες (κόκκινη γραμμή: κύτταρα-μάρτυρες, πράσινη γραμμή: κύτταρα που επώασθηκαν με TRAIL, μπλε γραμμή: κύτταρα που επώασθηκαν με TRAIL μετά από επώαση με κερσετίνη).

3.15 Η ενίσχυση της επαγόμενης από το TRAIL απόπτωσης από την κερσετίνη ακολουθείται από τροποποιήσεις στο μιτοχονδριακό μονοπάτι.

Η επαγόμενη από το TRAIL διάσπαση της κασπάσης-3 φάνηκε να ενισχύεται από την κερσετίνη. Η παρατήρηση αυτή μας δημιούργησε το ερώτημα εάν η κερσετίνη στοχεύει σε αλλαγές στο επίπεδο της συγκρότησης του συμπλέγματος DISC ή στο μονοπάτι στο οποίο μεσολαβεί το μιτοχόνδριο. Για το λόγο αυτό, θελήσαμε αρχικά να διερευνήσουμε αν η κερσετίνη είχε τη δυνατότητα να επάγει αλλαγές στο μιτοχονδριακό μονοπάτι. Προσθήκη TRAIL σε κύτταρα με ή χωρίς προεπάση με κερσετίνη έδειξε πως η κερσετίνη διευκόλυνε την πρωτεολυτική διάσπαση της πρωτεΐνης Bid, η οποία αποτελεί μέλος της οικογένειας Bcl-2. Στην *Εικόνα 27A*, φαίνεται πως η διάσπαση της Bid και η δημιουργία του θραύσματος t-Bid, 1 ώρα μετά την παρουσία TRAIL στα κύτταρα ενισχύθηκε από την κερσετίνη.

Η διάσπαση της Bid η οποία παρατηρήθηκε στα κύτταρα HT-29 σε συνθήκες συνδυασμένης επώασης με κερσετίνη και TRAIL ήταν μία ένδειξη ότι το μιτοχονδριακό μονοπάτι εμπλέκεται στις αποπτωτικές διαδικασίες που παρατηρήθηκαν. Για περαιτέρω επιβεβαίωση της συμμετοχής του μιτοχονδρίου, προχωρήσαμε σε μελέτη της κατανομής της πρωτεΐνης Bax καθώς και του κυτοχρώματος-*c* στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα κυττάρων που είχαν εκτεθεί σε TRAIL ή/και κερσετίνη. Στην *Εικόνα 27B*, τα κύτταρα επώασθηκαν για 24 ώρες με ή χωρίς 30μM κερσετίνη πριν την προσθήκη TRAIL για 30 και 60 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα λύθηκαν και διαχωρίστηκαν τα μιτοχονδριακά από τα κυτταροπλασματικά τους συστατικά πριν την ανάλυση των πρωτεϊνών σε στύπωμα κατά Western. Η *Εικόνα* δείχνει πως η απελευθέρωση του κυτοχρώματος-*c* από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα πραγματοποιήθηκε σε χαμηλό βαθμό από την παρουσία της κερσετίνης, ενώ το TRAIL μπόρεσε να επάγει έντονη απελευθέρωση του κυτοχρώματος παρουσία της πολυφαινόλης μετά από 30 και 60 λεπτά επώασης. Επιπλέον, η επαγόμενη από το TRAIL μεταφορά της Bax στα μιτοχόνδρια μετά από 30 και 60 λεπτά επώαση φάνηκε να είναι ιδιαίτερα ενισχυμένη από την κερσετίνη.

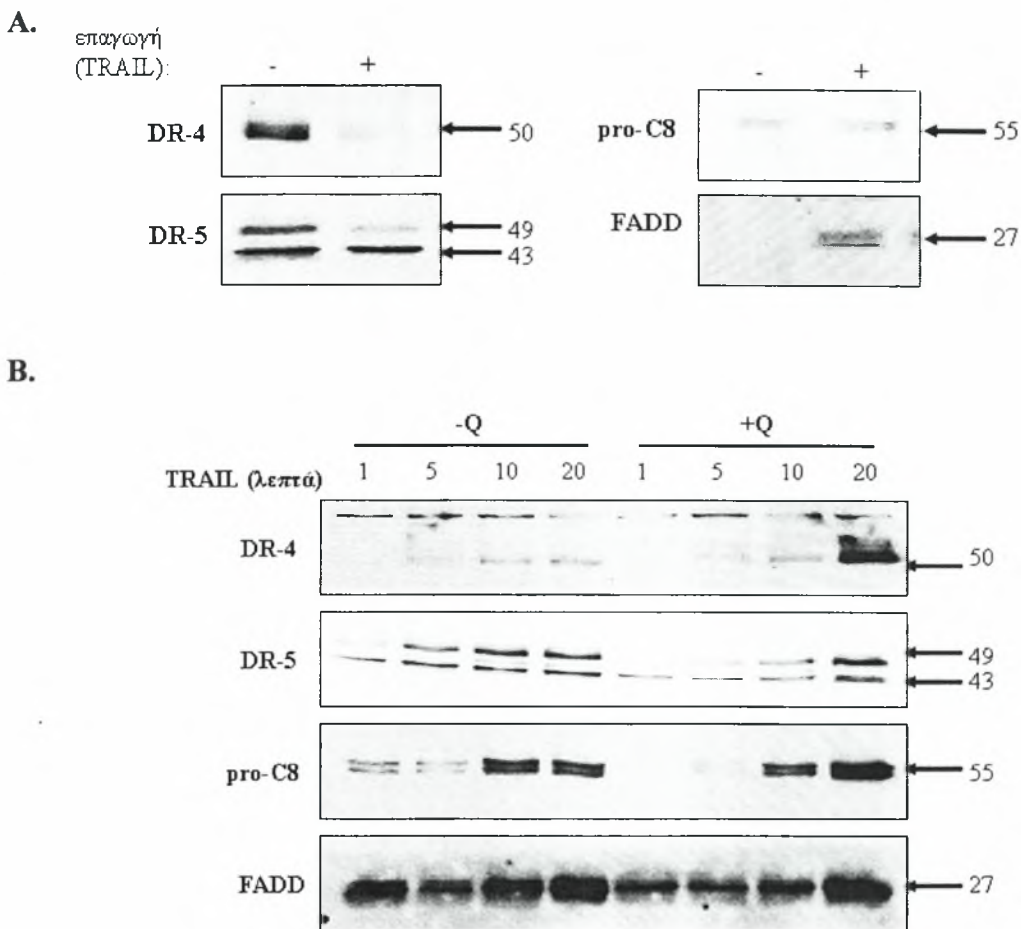


Εικόνα 27: Η κερσετίνη επάγει αλλαγές στο μιτοχόνδριο και διευκολύνει την απελευθέρωση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών- Α. Ανάλυση κατά Western της πρωτεΐνης Bid και του θραύσματος t-Bid μετά από επώαση των κυττάρων HT-29 με 100ng/ml TRAIL για διάφορες χρονικές περιόδους που ακολούθησαν προεπώαση ή όχι με κερσετίνη για 24 ώρες. **Β.** Ανάλυση των επιπέδων των πρωτεϊνών Bax και κυτοχρώματος-c στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα μετά από επώαση με κερσετίνη ή/ και TRAIL στους χρόνους που φαίνονται και την απομόνωση μιτοχονδριακών και κυτταροπλασματικών κλαμάτων. Οι αριθμοί δείχνουν τα μοριακά βάρη των κλασμάτων σε kDa.

3.16 Η κερσετίνη ενισχύει τη δημιουργία του συμπλέγματος DISC

Όπως δείχθηκε στην *Εικόνα 23*, η κερσετίνη δεν άλλαξε σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων του TRAIL DR4 και DR5. Η παρατήρηση αυτή δεν απέκλεισε την πιθανότητα να μπορεί η κερσετίνη να εμπλέκεται στη συγκρότηση του συμπλέγματος DISC σε απόκριση της επαγωγής του από το TRAIL. Επιπλέον, η συσσώρευση των υποδοχέων του TRAIL στις λιπιδικές σχεδίες της κυτταρικής μεμβράνης θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της συγκρότησης του συμπλέγματος και κατ'επέκταση του σήματος που οδηγεί σε απόπτωση. Επώαση των κυττάρων HT-29 με TRAIL προσδεμένο σε ομάδα βιοτίνης (bio-TRAIL) για 3 λεπτά και επώαση με σφαιρίδια στρεπταβιδίνης προκάλεσε κατακρήμνιση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη δημιουργία του συμπλέγματος DISC και έδειξε ότι η κασπάση-8 και η πρωτεΐνη FADD στρατολογούνται στο σύμπλεγμα DISC (*Εικόνα 28Α*). Στην *Εικόνα 28Β*, επώασαμε τα HT-29 κύτταρα χωρίς ή με 30μM κερσετίνη για 48 ώρες. Στη συνέχεια, επώασαμε τα κύτταρα με TRAIL το οποίο ήταν προσδεμένο με ομάδα βιοτίνης για τις χρονικές περιόδους που φαίνονται. Ακολούθησε κατακρήμνιση του

DISC με την προσθήκη σφαιριδίων στρεπταβιδίνης. Οι πρωτεΐνες που συμμετείχαν στη δημιουργία του συμπλέγματος DISC σε απόκριση του TRAIL εκλύθηκαν και τα επίπεδά τους αναλύθηκαν με στύπωμα κατά Western. Προεπάση με κερσετίνη φάνηκε να ενισχύει σημαντικά τη διαδικασία σχηματισμού του DISC. Τα επίπεδα των DR4, DR5 καθώς και της στρατολογημένης προκασπάσης-8 και της πρωτεΐνης FADD στο σύμπλεγμα ήταν αυξημένα μετά από 20 λεπτά επώασης με TRAIL όταν στα κύτταρα είχε προηγηθεί επώαση με κερσετίνη, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 28B*.



Εικόνα 28: Η κερσετίνη ενισχύει τη δημιουργία του συμπλέγματος DISC- A. Ανάλυση κατά Western μετά από ανοσοκατακρήμιση των υποδοχέων του TRAIL και των FADD και κασπάσης-8 με σφαιρίδια στρεπταβιδίνης, μετά από επώαση ή όχι των κυττάρων με 100ng/ml Bio-TRAIL για 3 λεπτά και προσθήκη ανάλογης ποσότητας στα εκχυλίσματα των μη διεγερμένων κυττάρων μετά τη λύση τους ώστε να κατακρημινισθούν οι μη διεγερμένοι υποδοχείς. **B.** Ανάλυση του συμπλέγματος DISC σε κύτταρα HT-29 που επώασθησαν με 100ng/ml Bio-TRAIL για τους ανάλογους χρόνους, μετά από επώαση ή όχι με κερσετίνη.

Κεφάλαιο 4

Συζήτηση

συζήτηση

Ο καρκίνος είναι το αποτέλεσμα μίας προοδευτικής διαδικασίας κατά την οποία αναστέλλονται διάφορα μονοπάτια μεταγωγής σημάτων που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση (3). Αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως κι επομένως η θεραπεία αλλά και η πρόληψη του καρκίνου έχουν γίνει πλέον ανάγκη και αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας σε ολόκληρο τον κόσμο. Η επιλογή δραστικών μορίων που προφυλάσσουν ή αναστέλλουν τον ογκογονικό μετασχηματισμό αντιπροσωπεύει ένα μείζον τμήμα του ενδιαφέροντος της σύγχρονης έρευνας.

Η επιτυχία της πρόληψης του καρκίνου συνίσταται στο να ανιχνευθούν οι ογκογονικές αλλοιώσεις όσο το δυνατό πιο νωρίς και να επαχθεί κυτταρικός θάνατος επιλεκτικά στα αλλοιωμένα κύτταρα, καταστέλλοντας τον ογκογονικό μετασχηματισμό ή επιτυγχάνοντας την ασφαλή απομάκρυνση των κυττάρων αυτών. Είναι γνωστό ότι ένα μεγάλο ποσοστό καρκίνων εξαρτάται από τη διατροφή. *In vitro* πειράματα τα οποία υποστηρίζονται περαιτέρω από μελέτες σε ζώα, αλλά και επιδημιολογικές μελέτες για τον καρκίνο του παχέος εντέρου στον άνθρωπο, προτείνουν ότι η εξέλιξη της ασθένειας μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά από παράγοντες της διατροφής μας.

Οι πολυφαινόλες, και ιδιαίτερα τα φλαβονοειδή, ενώσεις που βρίσκονται σε μεγάλα ποσοστά στο καθημερινό μας διαιτολόγιο, έχουν την ικανότητα να διαδραματίζουν ιδιαίτερα ουσιαστικό ρόλο στην πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Στην παρούσα εργασία θελήσαμε να μελετήσουμε την ικανότητα πολυφαινολών να επιδρούν στην κυτταρική βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Εστίασαμε ιδιαίτερα στην ανάλυση της επίδρασης της πολυφαινόλης κερσετίνης να τροποποιεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική επιβίωση και τη διαφοροποίηση και να στοχεύει μόρια-κλειδιά τα οποία είναι υπεύθυνα για ογκογονικές ιδιότητες των κυττάρων.

Επιπλέον, θελήσαμε να μελετήσουμε την ικανότητα της κερσετίνης να ενισχύει αποπτωτικές διαδικασίες οι οποίες επάγονται από τον αποπτωτικό παράγοντα TRAIL. Η ανάγκη για την ανάπτυξη συνδυαστικών θεραπειών έχει προκύψει από το γεγονός ότι πολλοί τύποι καρκίνου έχουν επιδείξει ικανότητες αποφυγής απόπτωσης. Πιο συγκεκριμένα, οι δόσεις των φαρμάκων που απαιτούνται

για την επαγωγή απόπτωσης στους καρκίνους αυτούς εμφανίζουν υψηλή κυτταροτοξικότητα ακόμα και σε υγιείς ιστούς και, συνεπώς, προκαλούν σημαντικές παρενέργειες. Οι συνδυαστικές θεραπείες στοχεύουν στην επανενεργοποίηση αποπτωτικών μονοπατιών με τη χρήση χαμηλών συγκεντρώσεων επιλεγμένων ουσιών, έτσι ώστε να γίνουν τα καρκινικά κύτταρα περισσότερο «δεκτικά» στην απόπτωση, με αποτέλεσμα ένα φάρμακο να μπορέσει να τα οδηγήσει στο θάνατο χωρίς να χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις από αυτό.

Υπάρχουν ήδη μελέτες οι οποίες προτείνουν συνδυασμούς κυτταροτοξικών φαρμάκων με φυσικά συστατικά οι οποίοι διευκολύνουν την απόπτωση σε σχετικά ανθεκτικά κύτταρα (134,135). Ένα από τα φάρμακα που αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο χημειοθεραπευτικό παράγοντα είναι το TRAIL. Η ανάδειξη αυτή του TRAIL οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι διαθέτει την ικανότητα να επάγει απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα, χωρίς να επηρεάζει αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς. Παρόλα αυτά, η αποτελεσματικότητα του TRAIL στην επαγωγή της απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου ποικίλλει μεταξύ μερικής και πλήρους ανθεκτικότητας (46,136,137). Η μεσολαβούμενη από το TRAIL χημειοθεραπεία έχει δείξει συχνά περιορισμένη αποτελεσματικότητα, εξαιτίας εγγενούς ή επίκτητης κυτταρικής ανθεκτικότητας (43).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι χαμηλές δόσεις φαρμάκων ή φυσικών συστατικών θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο καρκινικές σειρές του παχέος εντέρου που εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στο TRAIL. Διάφορες μελέτες έχουν προτείνει συνδυασμούς κυτταροτοξικών φαρμάκων με φυσικά προϊόντα οι οποίοι διευκολύνουν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ανθεκτικά καρκινικά κύτταρα. Έχει δειχθεί πως η κερσετίνη, εκτός από την ικανότητά της να αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και να επάγει κυτταρικό θάνατο σε διάφορες καρκινικές σειρές, είναι δυνατό να ενεργοποιεί αποπτωτικά μονοπάτια (138). Επιπλέον, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν πως η κερσετίνη μπορεί να λειτουργήσει ως πολλά υποσχόμενος ενεργοποιητής στην απόπτωση που επάγεται από το TRAIL. Ευαισθητοποιεί μία καρκινική σειρά η οποία είναι ανθεκτική στην απόπτωση που επάγεται από το συνδέτη CD95 με το να ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση $-Ca$ (139). Επίσης ενισχύει την επαγόμενη από τον CD95 σε κύτταρα λευχαιμίας HPB-ALL (140). Τα αποτελέσματα της συνδυασμένης επώασης της πολυφαινόλης κερσετίνης με το TRAIL και η δυνατότητα του συνδυασμού αυτού να επάγει υψηλά

επίπεδα απόπτωσης σε ανθεκτικά καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου αποτέλεσε επιπλέον βασικό αντικείμενο των πειραμάτων μας.

Ένα από τα κύρια ευρήματα της εργασίας αυτής ήταν ότι η κερσετίνη παρεμπόδισε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και βασικές καρκινικές ιδιότητες κυττάρων αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου του ανθρώπου, μεσολαμβάντας την αποικοδόμηση των ογκογονικών μορφών των Ras πρωτεϊνών.

Η κερσετίνη επάγει αυτοφαγία στα μετασχηματισμένα κύτταρα με το ογκογονίδιο Ha-Ras- Πολλές μελέτες παρουσιάζουν τα ανασταλτικά αποτελέσματα της κερσετίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου, με σταμάτημα των κυττάρων στη G0/G1-φάση (141) ή τη G1/S-φάση (142) και σε ορισμένες περιπτώσεις τα αποτελέσματά της στην απόπτωση σε υψηλές συγκεντρώσεις. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιώντας χαμηλές συγκεντρώσεις κερσετίνης, παρουσιάζουμε μια διαφορετική απόκριση όσο αφορά στον κυτταρικό κύκλο ανάμεσα στα κύτταρα αδενοκαρκινώματος DLD-1 και HT-29 και στα κύτταρα ενδιάμεσου αδενώματος Caco-2. Είναι σημαντικό να τονίσουμε εδώ ότι οι κυτταρικές αυτές σειρές φέρουν διαφορετικές ενδογενείς μεταλλάξεις και αυτό θα μπορούσε να είναι μια εξήγηση της διαφορετικής συμπεριφοράς των κυττάρων μετά από την επώασή τους με κερσετίνη. Πιο συγκεκριμένα, εκτός από τις μεταλλάξεις στα γονίδια *APC* και *P53*, τα κύτταρα DLD-1 φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια *Ki-RAS* και *PI-3K*, ενώ τα HT-29 φέρουν μεταλλαγμένο γονίδιο *BRAF*.

Στο σύστημά μας, τα δεδομένα έδειξαν πως η απόπτωση δεν ήταν ο κύριος τρόπος μέσω του οποίου η κερσετίνη προκάλεσε μειωμένη κυτταρική βιωσιμότητα στα κύτταρα αδενώματος και αδενοκαρκινώματος στις συνθήκες που εξετάστηκαν. Τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν καθαρά ότι στην περίπτωση των Caco-H2 κυττάρων η κερσετίνη επάγει αυτοφαγία, έναν τύπο κυτταρικού θανάτου διαφορετικό από αυτόν της απόπτωσης, ο οποίος είναι ανεξάρτητος κασπασών και δε συνοδεύεται από διάσπαση της πρωτεΐνης PARP. Η επαγόμενη από την κερσετίνη αυτοφαγία στα κύτταρα αυτά θα μπορούσε να αποτελεί και ένα μηχανισμό που να τα βοηθάει να επιβιώσουν, δεδομένου ότι η κερσετίνη δεν προκαλεί μαζικό θάνατο στα κύτταρα αυτά. Έχει ήδη αναφερθεί η ικανότητα της πολυφαινόλης ρεσβερατρόλης να προκαλεί αυτοφαγία σε καρκινικές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ωοθηκών (143). Στα κύτταρα Caco-H2, μετά από επώαση με κερσετίνη η πρωτεΐνη LC3 εμφάνισε ένα στικτό μοτίβο (98), όπως επιβεβαιώθηκε με μικροσκοπία φθορισμού. Το ογκογονίδιο

Ha-RAS έχει ήδη αναφερθεί ότι επάγει από μόνο του αυτοφαγία σε καρκινικές κυτταρικές σειρές γλοίας και στομάχου (102). Επίσης, το μεταλλαγμένο RAS(G12V,T35S) επάγει αυτοφαγία στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου HT-29 (103), υπάρχουν όμως μελέτες που δείχνουν αρνητική ρύθμιση της αυτοφαγίας από το RAS (144) προτείνοντας ότι το ογκογονίδιο ρυθμίζει πολλαπλά μονοπάτια σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Εδώ προτείνουμε ότι το ογκογονίδιο Ha-RAS ευαισθητοποιεί τα κύτταρα στην αυτοφαγία και στη συνέχεια, υπό την επίδραση της κερσετίνης τα κύτταρα ενεργοποιούν αυτοφαγικούς μηχανισμούς προσπαθώντας να «αποφασίσουν» αν θα επιβιώσουν ή θα οδηγηθούν σε εναλλακτικό πρόγραμμα κυτταρικού θανάτου (145-147). Επιπρόσθετα, ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής στα Caco-K15 και Caco-H2 κύτταρα έδειξε καθαρά τη διαφορετική απόκριση των δύο κυτταρικών τύπων στην επώαση με κερσετίνη. Φάνηκε λοιπόν ότι τα ογκογονίδια Ki- και Ha-RAS προκαλούν διαφορετική αντίδραση στα κύτταρα, ίσως εξαιτίας της διαφορετικής τους κυτταρικής τοποθέτησης και τρόπου ρύθμισης (60,62,148). Έγινε προφανές ότι η κερσετίνη κυρίως επηρεάζει το προφίλ του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων Caco-K15 ενώ προωθεί την αυτοφαγία στα κύτταρα Caco-H2.

Η κερσετίνη μεσολαβεί στην επιταχυνόμενη αποικοδόμηση των Ras ογκοπρωτεϊνών μέσω του πρωτεασώματος- Οι Ras ογκοπρωτεΐνες είναι συνεχώς «κλειδωμένες» στην ενεργή τους μορφή, σε αντίθεση με τις αντίστοιχες ενδογενείς πρωτεΐνες «άγριου τύπου» και αυτές οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες επιδεικνύουν σημαντικές διαφορές στη συμπεριφορά τους και στην πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις πρωτεΐνες-στόχους τους. Επιπλέον, είναι ικανές να προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαφοροποίηση, την απόπτωση, αλλά και την επιβίωση, μέσω των μονοπατιών μεταγωγής σημάτων που ενεργοποιούν (Raf, PI-3K, Ral). Εδώ, η επίδραση της κερσετίνης σχετίζεται με την έκφραση του ογκογονιδίου RAS και προτείνεται ότι το ογκογονίδιο ευαισθητοποιεί τα κύτταρα στο θάνατο που επάγεται από την κερσετίνη, εφόσον η πολυφαινόλη ελαττώνει κατά προτίμηση τα επίπεδα της πρωτεΐνης Ras μόνο σε κύτταρα που φέρουν μετάλλαξη στο αντίστοιχο ογκογονίδιο. Πιο λεπτομερώς, στα κύτταρα DLD-1 και DKO-4 στα οποία το ενδογενές Ki-RAS, είτε «άγριου τύπου» είτε μεταλλαγμένο, βρίσκεται υπό τον έλεγχο του ενδογενούς υποκινητή και η κερσετίνη μειώνει μόνο τα επίπεδα της πρωτεΐνης στα κύτταρα DLD-1, όπου εκφράζεται το

μεταλλαγμένο *RAS*. Η κερσετίνη ελαττώνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης Ras μόνο στα κύτταρα Caco-K15 και Caco-H2 και στα 293indRas τα οποία εκφράζουν εξωγενώς το ογκογονίδιο *RAS* και όχι στα Caco-N10 ή στα μη επαγόμενα 293indRas. Είναι λοιπόν λογικό να υποθέσουμε πως η κερσετίνη ελαττώνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης Ras μέσω μηχανισμού ο οποίος δεν εξαρτάται από τη μεταγραφή και ο οποίος είναι επιλεκτικός για τις ογκογονικές, προσδεδεμένες σε GTP μορφές των πρωτεϊνών. Επιπλέον, τα δεδομένα δείχνουν ότι η αποικοδόμηση της πρωτεΐνης Ras, η οποία επάγεται από την κερσετίνη μεσολαβείται από μία διαδικασία που καθοδηγείται από το πρωτεάσωμα είτε απευθείας στο Ras είτε με πιο έμμεσο τρόπο.

Προηγούμενη μελέτη έχει δείξει ότι η κερσετίνη ελαττώνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης Ras μέσω της παρεμπόδισης της έκφρασης του γονιδίου *p-21RAS* (33) και ότι το αντικαρκινικό φάρμακο 17-AAG στοχεύει για αποικοδόμηση την ογκοπρωτεΐνη (V600E) B-RAF καθώς και άλλες ογκογονικές μορφές της πρωτεΐνης, ενώ οι μη μεταλλαγμένες μορφές της εμφανίζονται περισσότερο σταθερές (149). Αυτό σχετίζεται περισσότερο με τη διαμόρφωση των μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης παρά με την κατάσταση ενεργοποίησής τους. Σε κύτταρα είτε με στοχευόμενη απαλοιφή του ογκογονιδίου είτε με εξωγενή υπερέκφραση των *RAS* ισομορφών δείξαμε ότι η κερσετίνη προκάλεσε ειδική αποικοδόμηση των μεταλλαγμένων Ras πρωτεϊνών, ενώ δεν επηρέασε τα επίπεδα των ενδογενών Ras πρωτεϊνών «άγριου τύπου». Ίσως αυτό να οφείλεται στο γεγονός ότι οι ενεργοποιημένες GTPases είναι περισσότερο επιρρεπείς σε αποικοδόμηση σε σύγκριση με τις αντίστοιχες μορφές «άγριου τύπου» (150,151). Έχει δειχθεί ότι η ενεργοποίηση μορίων-στόχων της πρωτεΐνης Rho είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της σε μεμβρανικά κλάσματα. Η ενεργή RhoA εντοπίζεται στα μεμβρανικά αυτά κλάσματα, είναι ασθενώς προσδεδεμένη σε RhoGDIs και υπόκειται σε ενισχυμένη αποικοδόμηση (152). Ίσως πάλι η προτίμηση της κερσετίνης στις μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης Ras να σχετίζεται με τη διαμόρφωσή της, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Χρησιμοποιώντας ένα πρότυπο επαγόμενης έκφρασης του *RAS* ογκογονιδίου σε ανθρώπινα κύτταρα (κύτταρα 293indRas), δείξαμε ότι η κερσετίνη είχε ανασταλτική επίδραση στα επίπεδα των εξωγενώς υπερεκφραζόμενων Ras πρωτεϊνών και συνεπώς μπορούσε να ανατρέψει τις *in vitro* καρκινικές ιδιότητες που προκάλεσε η επαγόμενη έκφραση του ογκογονιδίου *RAS*. Επιπλέον, το σύστημα αυτό αποτέλεσε

εργαλείο με τη χρήση του οποίου αποδείχθηκε ότι η κερσετίνη επάγει τη στόχευση των ογκοπρωτεϊνών Ras για ειδική αποικοδόμηση, και συγκεκριμένα μειώνει το χρόνο ημιζωής της εξωγενώς εκφραζόμενης πρωτεΐνης. Σε παλιότερες μελέτες είχε δειχθεί ότι ο χρόνος ημιζωής του mRNA που κωδικοποιεί το γονίδιο *ras* στον ποντικό ήταν 5-7 ώρες (153), ενώ ο χρόνος ημιζωής της πρωτεΐνης Ras σε κύτταρα αρουραίου ήταν περίπου 20 ώρες (154). Σε αυτό το ανθρώπινο σύστημα επαγόμενης έκφρασης του *RAS*, ο χρόνος ημιζωής της νεοσυντιθέμενης ογκοπρωτεΐνης Ha-Ras ήταν περίπου 4,5- ώρες και ελαττώθηκε περίπου στο μισό υπό τη επίδραση της κερσετίνης. Μπορούμε να προτείνουμε ότι ο μειωμένος χρόνος ημιζωής στο σύστημά μας οφείλεται στη διαρκή πρόσδεση της πρωτεΐνης στο GTP και ότι η κερσετίνη, μέσω ενός όχι ξεκάθαρου μηχανισμού, επιταχύνει τη διαδικασία αποικοδόμησής της. Τα πειράματά μας δείχνουν επίσης για πρώτη φορά ότι η κερσετίνη ελαττώνει τα επίπεδα των ογκοπρωτεϊνών Ras με το να επιταχύνει την αποικοδόμησή τους μέσω της λειτουργίας του πρωτεασώματος, όπως δείξαμε με τη χρήση του αναστολέα του πρωτεασώματος. Σε μία πρόσφατη αναφορά σε ανθρώπινους ινοβλάστες, δειχθηκε πως η πρωτεΐνη Ha-Ras σταθεροποιείται μετά από επώαση με τον αναστολέα του πρωτεασώματος MG132 (155). Μέχρι στιγμής, δεν έχει προσδιοριστεί ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η κερσετίνη προκαλεί την αποικοδόμηση της ογκοπρωτεΐνης Ras. Έχει δειχθεί ότι οι πρωτεΐνες Ha-Ras υπόκεινται σε μόνο- και δι-ουβικιτινίωση προκειμένου να μεταφερθούν στα ενδοσώματα (104,156). Ωστόσο, δεν υπάρχουν προφανείς ενδείξεις για άμεση πολύ-ουβικιτινίωση, η οποία είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών Ras μέσω του πρωτεασώματος. Επίσης, έχει προταθεί ότι η ενεργοποίηση των ERK1/2 και η υψηλή ενεργότητα των ROS σταθεροποιεί την πρωτεΐνη Ha-Ras παρεμποδίζοντας την αποικοδόμησή της από το πρωτεάσωμα (157). Είναι λοιπόν πιθανό η αποικοδόμηση της ογκοπρωτεΐνης Ras από την κερσετίνη να προκαλείται από το πρωτεάσωμα μέσω κάποιου παράγοντα ο οποίος επηρεάζει τη σταθερότητα των πρωτεϊνών. Περαιτέρω μελέτες θα μπορούσαν στο μέλλον να οδηγήσουν στην απόδοση ενός πιθανού ρόλου στην ουβικιτινίωση όσο αφορά τη διαδικασία αποικοδόμησης της ογκοπρωτεΐνης.

Ένας πιθανός μηχανισμός ο οποίος θα μπορούσε να εξηγήσει την επίδραση της κερσετίνης στις μεταλλαγμένες μορφές των πρωτεϊνών Ras είναι ο εξής: οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες δημιουργούν σύμπλοκα με την πρωτεΐνη του θερμικού σοκ Hsp70, προκειμένου η πρωτεΐνη να «αποφασίσει» αν θα τροφοδοτήσει το

πρωτεάσωμα με τις μεταλλαγμένες αυτές πρωτεΐνες. Η κερσετίνη, μειώνοντας τα επίπεδα της Hsp70 (30-32), απελευθερώνει τη μεταλλαγμένη Ras από το σύμπλοκο και τη στέλνει για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα.

Η αποικοδόμηση των ογκοπρωτεϊνών Ras από την κερσετίνη στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου θα μπορούσε να συσχετισθεί και με την προκαλούμενη παρεμπόδιση των ογκογονικών ιδιοτήτων από αυτή, όπως η δημιουργία αποικιών σε μαλακό άγαρ και η *in vitro* μεταναστευτικότητα των κυττάρων αυτών. Η ανάπτυξη των κυττάρων ανεξάρτητα από την παρουσία σταθερού υποστρώματος αποτελεί σημαντική ιδιότητα που χαρακτηρίζει το δυναμικό μετασχηματισμού των κυττάρων που έχουν αποκτήσει ογκογονικές ιδιότητες. Τα κύτταρα αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου HT-29 εμφάνισαν πιο μεγάλη ικανότητα να δημιουργούν αποικίες σε μαλακό άγαρ από ότι τα κύτταρα αδενοκαρκινώματος DLD-1 (158), αποτέλεσμα το οποίο σχετίζεται με το περισσότερο προχωρημένο στάδιο μετασχηματισμού τους. Επιπρόσθετα, η κερσετίνη έδειξε αποτελεσματικότητα στο να μειώνει τον αριθμό των αποικιών που δημιούργησαν τα κύτταρα αυτά. Πιο έντονο ήταν το αποτέλεσμα στα κύτταρα DLD-1 και αυτό θα μπορούσε να συσχετισθεί με μια γενικότερη ευαισθησία των κυττάρων αυτών στην κερσετίνη. Η αύξηση της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη διεισδυτικότητά τους και τα πειράματα εκτίμησης της κυτταρικής μετανάστευσης έχουν περιγραφεί ως από τα περισσότερο χαρακτηριστικά των *in vitro* καρκινικών ιδιοτήτων. Έχει δειχθεί ότι η κερσετίνη εμποδίζει τις ικανότητες διεισδυσης και μετάστασης σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές μελανώματος (159). Σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις αυτές, στις καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου που εξετάστηκαν η κερσετίνη προκάλεσε ελάττωση της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων, αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, αποδιοργάνωση των ινιδίων ακτίνης και μία γενική μείωση της συνολικής χρώσης της φαλλοϊδίνης. Τα δεδομένα αυτά θα μπορούσαν να εξηγηθούν από μία πιθανή επίδραση της κερσετίνης σε μονοπάτια μεταγωγής σημάτων στα οποία μεσολαβούν μόρια κυτταρικής προσκόλλησης και κυτταρικής μετανάστευσης, όπως οι ιντεγκρίνες, κυτοκερατίνες, η βιμεντίνη και η FAK (Focal Adhesion Kinase). Περαιτέρω μελέτη θα μπορούσε να συσχετίσει και την τροποποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης Rho που προκαλείται από την κερσετίνη με την απόκριση των κυττάρων όσο αφορά στην κυτταρική μετανάστευση και την οργάνωση του

κυτταροσκελετού. Βέβαια, μελέτες οι οποίες εξετάζουν την επίδραση της κερσετίνης στην ενεργή μορφή της πρωτεΐνης Rho θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμες.

Για τα πειράματα συνδυαστικής επώασης της κερσετίνης με τον αποπτωτικό παράγοντα TRAIL επιλέχθηκαν τα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου HT-29. Τα κύτταρα αυτά έχουν δείξει περιορισμένη ευαισθησία στην επαγόμενη από διάφορες κυτοκίνες απόπτωση, όπως στην περίπτωση του TRAIL και του Fas-L (129,160). Το γεγονός αυτό έχει συσχετισθεί με τα χαμηλά επίπεδα υποδοχέων που έχουν τα κύτταρα αυτά στην επιφάνειά τους (161). Οι παρατηρήσεις μας δείχνουν ότι η κερσετίνη ευαισθητοποιεί τα κύτταρα HT-29 στην επαγόμενη από το TRAIL απόπτωση, εξαιτίας της ικανότητάς της να προκαλεί ανακατανομή των υποδοχέων και των υπόλοιπων συστατικών του συμπλέγματος DISC σε λιπιδικές μικροδομές της κυτταρικής επιφάνειας. Διευκολύνει με τον τρόπο αυτό τη δημιουργία του DISC και την ενεργοποίηση των καταρροϊκών μονοπατιών μεταγωγής σημάτων κι έτσι προκαλεί ενεργοποίηση της κασπάσης-3 (κασπάση-τελεστής) και αυξημένα επίπεδα απόπτωσης.

Το μιτοχondριακό μονοπάτι μεσολαβεί στη διάσπαση της κασπάσης-3 που επάγεται από την κερσετίνη και το TRAIL- Προεπώαση των κυττάρων HT-29 με κερσετίνη αύξησε το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων μετά από την προσθήκη του TRAIL. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι τα κύτταρα του παχέος εντέρου HT-29 που εμφανίζουν σχετική ανθεκτικότητα στην επαγόμενη από το TRAIL απόπτωση, θα μπορούσαν να μετατραπούν σε ευαίσθητα κύτταρα μετά την προσθήκη της πολυφαινόλης κερσετίνης. Ανάλυση του μονοπατιού των υποδοχέων θανάτου που ενεργοποιείται από το TRAIL, έδειξε ότι η κερσετίνη δεν ενισχύει την ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου σε μεταγραφικό ή μετα-μεταγραφικό επίπεδο.

Η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 (κασπάση-τελεστής) έχει δειχθεί ότι απαιτείται για την απόπτωση που επάγεται από το TRAIL και ότι προκαλεί την πρωτεόλυση της πρωτεΐνης Bid σε απόκριση της παρουσίας του TRAIL. Η πρωτεόλυση της Bid και η παρουσία του πρωτεολυτικού τμήματος t-Bid προκαλεί αλλαγές σε μιτοχondριακό επίπεδο, όπως η απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c, των SMAC/DIABLO και AIF από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα, όπου ενεργοποιούν τον καταρράκτη κασπασών. Στις συνθήκες που εξετάστηκαν, προεπώαση των κυττάρων με κερσετίνη και επακόλουθη επώαση με TRAIL προκάλεσε υψηλά επίπεδα διάσπασης της κασπάσης-3, η οποία πραγματοποιήθηκε

πιο σύντομα. Η διάσπαση της κασπάσης-3 συνοδεύτηκε από διάσπαση της κυτοκερατίνης-18, η οποία αποτελεί ειδικό στόχο της κασπάσης-3. Τα πειράματα έδειξαν ότι το μιτοχονδριακό μονοπάτι εμπλέκεται στην επαγόμενη από το TRAIL και την κερσετίνη απόπτωση στα κύτταρα HT-29. Ο συνδυασμός των δύο παραγόντων είχε ως αποτέλεσμα την επιταχυνόμενη διάσπαση της κασπάσης-3 και της πρωτεΐνης Bid καθώς και την επακόλουθη επιτάχυνση της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος-*c* στο κυτταρόπλασμα, αλλά και της συσσώρευσης της πρωτεΐνης Bax στα μιτοχόνδρια. Ένα σημαντικό κομμάτι της έρευνας έχει στραφεί στη στόχευση των μιτοχονδρίων για την θεραπεία του καρκίνου και οι λειτουργίες αυτές έχουν ήδη κερδίσει το ενδιαφέρον σε στόχοι διάφορων πιθανών αντικαρκινικών φαρμάκων. Υπάρχουν αρκετοί πιθανοί χημειοπροστατευτικοί παράγοντες για τον καρκίνο οι οποίοι έχουν την ιδιότητα να προκαλούν απόπτωση σε προκαρκινικά ή καρκινικά κύτταρα *in vitro*, μέσω της ικανότητάς τους να προκαλούν αλλαγές στη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης, πιθανώς μέσω ρύθμισης μελών της οικογένειας Bcl-2 (67,109,162).

Η ευαισθητοποίηση των καρκινικών κυττάρων HT-29 από την κερσετίνη στην απόπτωση που επάγεται από το TRAIL συνοδεύεται από γεγονότα κινητικότητας σε επίπεδο κυτταρικής μεμβράνης- Προεπάση των κυττάρων HT-29 με κερσετίνη ενίσχυσε το σχηματισμό του συμπλέγματος DISC στην κυτταρική επιφάνεια, σε απόκριση της ενεργοποίησης από το TRAIL. Πιο συγκεκριμένα, έκθεση των κυττάρων σε κερσετίνη για 24 ώρες αύξησε τα επίπεδα της προκασπάσης-8 και της πρωτεΐνης FADD που στρατολογήθηκαν στο σύμπλεγμα DISC μετά από αλληλεπίδραση του TRAIL με τους υποδοχείς DR4 και DR5. Παρόμοια αποτελέσματα εμφανίστηκαν και για τους ίδιους τους υποδοχείς DR4 και DR5, γεγονός το οποίο δείχνει ότι η δημιουργία ολόκληρου του συμπλέγματος ενισχύεται από την κερσετίνη.

Τα διάφορα κύτταρα αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου στο άνθρωπο έχουν εμφανίσει διαφορετική ευαισθησία στο TRAIL και το γεγονός αυτό έχει συσχετισθεί με τη διαφορετική έκφραση υποδοχέων θανάτου στα κύτταρα αυτά (161). Παρόλο που στην παρούσα μελέτη τα επίπεδα των υποδοχέων δεν τροποποιήθηκαν από την παρουσία κερσετίνης, δεν αποκλείσαμε γεγονότα μεταγωγής σήματος τα οποία συμβαίνουν στην πλασματική μεμβράνη και περιλαμβάνουν τη συμμετοχή των υποδοχέων θανάτου. Δείξαμε λοιπόν ότι τα κύτταρα HT-29, τα οποία εμφανίζουν

ανθεκτικότητα στο TRAIL, η πολυφαινόλη μπόρεσε να επάγει την ανακατανομή των υποδοχέων σε λιπιδικές «σχεδίες» (*lipid rafts*) της πλασματικής μεμβράνης. Τόσο οι υποδοχείς DR4 και DR5 όσο και η προκασπάση-8 και η πρωτεΐνη FADD εντοπίστηκαν στα μεμβρανικά αυτά κλάσματα, τα οποία είναι πλούσια σε χοληστερόλη και γλυκοσφιγγολιπίδια.

Οι λιπιδικές σχεδίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη συσσώρευση μεμβρανικών υποδοχέων, ενζύμων που συμμετέχουν στη μεταγωγή σημάτων και μορίων πρόσδεσης σε μεμβρανικά συμπλέγματα σε ειδικές θέσεις, όπου ρυθμίζουν την έναρξη μονοπατιών μεταγωγής σημάτων από έναν αριθμό υποδοχέων (163). Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα που αφορούν στον τρόπο ενεργοποίησης υποδοχέων μέσα σε λιπιδικές σχεδίες τέτοιου τύπου (123). Η ανακατανομή των υποδοχέων υπό την επίδραση της κερσετίνης δε φαίνεται επαρκής για να επάγει κυτταρικό θάνατο, συνεισφέρει όμως στον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από το TRAIL. Επιπλέον μελέτες θα μπορούσαν να εξηγήσουν το λόγο για τον οποίο η κερσετίνη προκαλεί συσσώρευση των υποδοχέων στις λιπιδικές σχεδίες. Σε κάποια συστήματα, η συσσώρευση των υποδοχέων σε συγκεκριμένα σημεία της κυτταρικής μεμβράνης φαίνεται να ρυθμίζεται ενεργειακά, με τη συμμετοχή του κυτταροσκελετού. Η επίδραση της κερσετίνης σε μόρια που ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό θα μπορούσε να διευκολύνει τη συσσώρευση των υποδοχέων σε συγκεκριμένες θέσεις και τη μεταγωγή σημάτων από τις τοπικές συναθροίσεις των υποδοχέων. Επιπλέον, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε πως, καθώς η κερσετίνη περνάει μέσα από την κυτταρική μεμβράνη για να εισέλθει στο κύτταρο, επάγει κάποιες υδροφοβικές τροποποιήσεις στα λιπίδια της μεμβράνης, γεγονός το οποίο μπορεί να επάγει τη δημιουργία αθροισμάτων των γλυκοσφιγγολιπιδίων και της χοληστερόλης στη μεμβράνη και την επακόλουθη συσσώρευση των υποδοχέων στις δομές αυτές.

Η συσσώρευση των υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια παρεμποδίζεται από τη νυστατίνη, μόριο που αφαιρεί τη χοληστερόλη από τις λιπιδικές σχεδίες. Η νυστατίνη επίσης μπόρεσε να βοηθήσει τα κύτταρα να ανακτήσουν μερικώς τη βιωσιμότητά τους. Τα γεγονότα αυτά προτείνουν ότι η ακεραιότητα της πλασματικής μεμβράνης είναι απαραίτητη ώστε η κερσετίνη ή/και το TRAIL να επάγουν την επιθυμητή κυτταροτοξικότητα. Επιπλέον, επιβεβαιώνουν ότι ο εντοπισμός των υποδοχέων θανάτου σε κυστίδια πλούσια σε καβεολίνη είναι σημαντικός για τη

μεταγωγή σημάτων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης (164) και μπορεί να βοηθήσει στην επέκταση του σήματος (165).

Τα φυσικά συστατικά της διατροφής έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες, ιδιαίτερα στην περίπτωση του καρκίνου στο επιθήλιο του παχέος εντέρου. Εφόσον η έκφραση των ογκοπρωτεϊνών Ras είναι ουσιώδης για τον μετασχηματισμό των κυττάρων προς καρκινικά, θα ήταν ιδιαίτερα σημαντική η ταυτοποίηση μορίων που παρεμποδίζουν τη δραστηρότητά τους. Η ικανότητα της κερσετίνης να στοχεύει για ειδική αποκοδόμηση τόσο την ογκοπρωτεΐνη Ki-Ras όσο και τη Ha-Ras δίνει την πιθανότητα στην πολυφαινόλη να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη στόχευση πολλών τύπων καρκίνου οι οποίοι προκαλούνται από την ενεργοποίηση του ογκογονιδίου *RAS*. Επιπρόσθετο πλεονέκτημα στην κερσετίνη, όσο αφορά στη χρήση της ως αντικαρκινικό παράγοντα, μπορεί να δώσει το γεγονός ότι συνεργεί στην απόπτωση που επάγεται από το TRAIL σε κύτταρα σχετικώς ανθεκτικά στο φάρμακο. Ο ρόλος της κερσετίνης στο να υπερνικά σημαντικά τη σχετική ανθεκτικότητα καρκινικών κυττάρων θα μπορούσε να δημιουργήσει μία ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα πρόταση για συνδυαστική θεραπεία.

Επιπλέον έρευνα θα χρειαστεί ώστε να μελετηθεί η επίδραση της κερσετίνης σε γεγονότα μεταγωγής σημάτων στα οποία συμμετέχουν μονοπάτια στα οποία μεσολαβεί η ενεργοποίηση του *RAS* ογκογονιδίου, αλλά και μία περαιτέρω μηχανιστική εξήγηση του τρόπου συσσώρευσης και ενεργοποίησης των υποδοχέων του TRAIL σε λιπιδικές μικροδομές στην κυτταρική μεμβράνη. Το βέβαιο είναι πως τα φυσικά συστατικά κερδίζουν συνεχώς πλεονεκτήματα στην έρευνα που αφορά στην πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου.

Κ ε φ ά λ α ι ο 5
β ι β λ ι ο γ ρ α φ ί α

βιβλιογραφία

- (1) Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 2001 May 17;411(6835):390-5.
- (2) Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993 Apr;9(4):138-41.
- (3) Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990 Jun 1;61(5):759-67.
- (4) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- (5) Smith AJ, Stern HS, Penner M, Hay K, Mitri A, Bapat BV, et al. Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res* 1994 Nov 1;54(21):5527-30.
- (6) van de Wetering M., Sancho E, Verweij C, de LW, Oving I, Hurlstone A, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002 Oct 18;111(2):241-50.
- (7) Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, et al. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* 2001 Apr;3(4):433-8.
- (8) Bienz M, Hamada F. Adenomatous polyposis coli proteins and cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 2004 Oct;16(5):528-35.
- (9) McCormick F. Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biol* 1999 Dec;9(12):M53-M56.
- (10) Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de VM, van Boom JH, van der Eb AJ, et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987 May 28;327(6120):293-7.
- (11) Weber CK, Slupsky JR, Kalmes HA, Rapp UR. Active Ras induces heterodimerization of cRaf and BRaf. *Cancer Res* 2001 May 1;61(9):3595-8.
- (12) Oikonomou E, Pintzas A. Cancer genetics of sporadic colorectal cancer: BRAF and PI3KCA mutations, their impact on signaling and novel targeted therapies. *Anticancer Res* 2006 Mar;26(2A):1077-84.
- (13) Glade MJ. Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997. *Nutrition* 1999 Jun;15(6):523-6.
- (14) Wattenberg LW. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res* 1985 Jan;45(1):1-

- 8.
- (15) Manson MM. Cancer prevention -- the potential for diet to modulate molecular signalling. *Trends Mol Med* 2003 Jan;9(1):11-8.
 - (16) Hayes JD, Ellis EM, Neal GE, Harrison DJ, Manson MM. Cellular response to cancer chemopreventive agents: contribution of the antioxidant responsive element to the adaptive response to oxidative and chemical stress. *Biochem Soc Symp* 1999;64:141-68.
 - (17) Hayes JD, McMahon M. Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention. *Cancer Lett* 2001 Dec 28;174(2):103-13.
 - (18) Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 2001 Dec;1(3):222-31.
 - (19) Bange J, Zwick E, Ullrich A. Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. *Nat Med* 2001 May;7(5):548-52.
 - (20) Waddick KG, Uckun FM. Innovative treatment programs against cancer: II. Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) as a molecular target. *Biochem Pharmacol* 1999 Jan 1;57(1):9-17.
 - (21) Campisi J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol* 2001 Nov;11(11):S27-S31.
 - (22) Huang P, Oliff A. Signaling pathways in apoptosis as potential targets for cancer therapy. *Trends Cell Biol* 2001 Aug;11(8):343-8.
 - (23) Harborne JB. Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Prog Clin Biol Res* 1986;213:15-24.
 - (24) Avila MA, Velasco JA, Cansado J, Notario V. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. *Cancer Res* 1994 May 1;54(9):2424-8.
 - (25) Avila MA, Cansado J, Harter KW, Velasco JA, Notario V. Quercetin as a modulator of the cellular neoplastic phenotype. Effects on the expression of mutated H-ras and p53 in rodent and human cells. *Adv Exp Med Biol* 1996;401:101-10.
 - (26) Yoshida M, Yamamoto M, Nikaido T. Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res* 1992 Dec 1;52(23):6676-81.
 - (27) Levy J, Teuerstein I, Marbach M, Radian S, Sharoni Y. Tyrosine protein kinase activity in the DMBA-induced rat mammary tumor: inhibition by quercetin. *Biochem Biophys Res Commun* 1984 Sep 28;123(3):1227-33.
 - (28) Markaverich BM, Roberts RR, Alejandro MA, Johnson GA, Middleditch BS, Clark JH. Bioflavonoid interaction with rat uterine type II binding sites

- and cell growth inhibition. *J Steroid Biochem* 1988;30(1-6):71-8.
- (29) Scambia G, Ranelletti FO, Panici PB, Piantelli M, De VR, Ferrandina G, et al. Quercetin induces type-II estrogen-binding sites in estrogen-receptor-negative (MDA-MB231) and estrogen-receptor-positive (MCF-7) human breast-cancer cell lines. *Int J Cancer* 1993 May 28;54(3):462-6.
- (30) Hansen RK, Oesterreich S, Lemieux P, Sarge KD, Fuqua SA. Quercetin inhibits heat shock protein induction but not heat shock factor DNA-binding in human breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 Oct 29;239(3):851-6.
- (31) Elia G, Amici C, Rossi A, Santoro MG. Modulation of prostaglandin A1-induced thermotolerance by quercetin in human leukemic cells: role of heat shock protein 70. *Cancer Res* 1996 Jan 1;56(1):210-7.
- (32) Koishi M, Hosokawa N, Sato M, Nakai A, Hirayoshi K, Hiraoka M, et al. Quercetin, an inhibitor of heat shock protein synthesis, inhibits the acquisition of thermotolerance in a human colon carcinoma cell line. *Jpn J Cancer Res* 1992 Nov;83(11):1216-22.
- (33) Ranelletti FO, Maggiano N, Serra FG, Ricci R, Larocca LM, Lanza P, et al. Quercetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors. *Int J Cancer* 2000 Feb 1;85(3):438-45.
- (34) Deschner EE, Ruperto J, Wong G, Newmark HL. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis* 1991 Jul;12(7):1193-6.
- (35) Mahmoud NN, Carothers AM, Grunberger D, Bilinski RT, Churchill MR, Martucci C, et al. Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis* 2000 May;21(5):921-7.
- (36) Steerenberg PA, Garssen J, Dortant PM, van d, V, Geerse E, Verlaan AP, et al. The effect of oral quercetin on UVB-induced tumor growth and local immunosuppression in SKH-1. *Cancer Lett* 1997 Mar 19;114(1-2):187-9.
- (37) Khanduja KL, Gandhi RK, Pathania V, Syal N. Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. *Food Chem Toxicol* 1999 Apr;37(4):313-8.
- (38) Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, Fyfe DW, deTakats PG, Anderson D, et al. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res* 1996 Apr;2(4):659-68.
- (39) Frei E, III. Curative cancer chemotherapy. *Cancer Res* 1985 Dec;45(12 Pt 1):6523-37.
- (40) Cohn DE, Herzog TJ. Gestational trophoblastic diseases: new standards for therapy. *Curr Opin Oncol* 2000 Sep;12(5):492-6.

- (41) Jones RH, Vasey PA. New directions in testicular cancer; molecular determinants of oncogenesis and treatment success. *Eur J Cancer* 2003 Jan;39(2):147-56.
- (42) Mayer F, Stoop H, Scheffer GL, Scheper R, Oosterhuis JW, Looijenga LH, et al. Molecular determinants of treatment response in human germ cell tumors. *Clin Cancer Res* 2003 Feb;9(2):767-73.
- (43) Gorlick R, Bertino JR. Drug resistance in colon cancer. *Semin Oncol* 1999 Dec;26(6):606-11.
- (44) Martin SJ, Green DR. Apoptosis as a goal of cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 1994 Nov;6(6):616-21.
- (45) Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, de JS. Loss of drug-induced activation of the CD95 apoptotic pathway in a cisplatin-resistant testicular germ cell tumor cell line. *Cell Death Differ* 2003 Jul;10(7):808-22.
- (46) Blagosklonny MV. Prospective strategies to enforce selectively cell death in cancer cells. *Oncogene* 2004 Apr 12;23(16):2967-75.
- (47) MacKeigan JP, Collins TS, Ting JP. MEK inhibition enhances paclitaxel-induced tumor apoptosis. *J Biol Chem* 2000 Dec 15;275(50):38953-6.
- (48) Solit DB, Basso AD, Olshen AB, Scher HI, Rosen N. Inhibition of heat shock protein 90 function down-regulates Akt kinase and sensitizes tumors to Taxol. *Cancer Res* 2003 May 1;63(9):2139-44.
- (49) Orłowski RZ, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med* 2002 Aug;8(8):385-9.
- (50) Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, Poulaki V, Tai YT, Chauhan D, et al. The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood* 2003 Mar 15;101(6):2377-80.
- (51) Milner AE, Palmer DH, Hodgkin EA, Eliopoulos AG, Knox PG, Poole CJ, et al. Induction of apoptosis by chemotherapeutic drugs: the role of FADD in activation of caspase-8 and synergy with death receptor ligands in ovarian carcinoma cells. *Cell Death Differ* 2002 Mar;9(3):287-300.
- (52) Leverkus M, Sprick MR, Wachter T, Mengling T, Baumann B, Serfling E, et al. Proteasome inhibition results in TRAIL sensitization of primary keratinocytes by removing the resistance-mediating block of effector caspase maturation. *Mol Cell Biol* 2003 Feb;23(3):777-90.
- (53) Sayers TJ, Brooks AD, Koh CY, Ma W, Seki N, Raziuddin A, et al. The proteasome inhibitor PS-341 sensitizes neoplastic cells to TRAIL-mediated apoptosis by reducing levels of c-FLIP. *Blood* 2003 Jul 1;102(1):303-10.
- (54) Jin Z, Dicker DT, El-Deiry WS. Enhanced sensitivity of G1 arrested human cancer cells suggests a novel therapeutic strategy using a combination of

- simvastatin and TRAIL. *Cell Cycle* 2002 Jan;1(1):82-9.
- (55) Fulda S, Meyer E, Friesen C, Susin SA, Kroemer G, Debatin KM. Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis. *Oncogene* 2001 Mar 1;20(9):1063-75.
- (56) Dixon H, Norbury CJ. Therapeutic exploitation of checkpoint defects in cancer cells lacking p53 function. *Cell Cycle* 2002 Nov;1(6):362-8.
- (57) Frame S, Balmain A. Integration of positive and negative growth signals during ras pathway activation in vivo. *Curr Opin Genet Dev* 2000 Feb;10(1):106-13.
- (58) Adjei AA. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001 Jul 18;93(14):1062-74.
- (59) Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 1998 Sep 17;17(11 Reviews):1395-413.
- (60) Apolloni A, Prior IA, Lindsay M, Parton RG, Hancock JF. H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol Cell Biol* 2000 Apr;20(7):2475-87.
- (61) Gutierrez L, Magee AI, Marshall CJ, Hancock JF. Post-translational processing of p21ras is two-step and involves carboxyl-methylation and carboxy-terminal proteolysis. *EMBO J* 1989 Apr;8(4):1093-8.
- (62) Hancock JF. Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003 May;4(5):373-84.
- (63) Garcia Z, Kumar A, Marques M, Cortes I, Carrera AC. Phosphoinositide 3-kinase controls early and late events in mammalian cell division. *EMBO J* 2006 Feb 22;25(4):655-61.
- (64) Wolthuis RM, Bos JL. Ras caught in another affair: the exchange factors for Ral. *Curr Opin Genet Dev* 1999 Feb;9(1):112-7.
- (65) Halaban R. Rb/E2F: a two-edged sword in the melanocytic system. *Cancer Metastasis Rev* 2005 Jun;24(2):339-56.
- (66) Alkarain A, Slingerland J. Deregulation of p27 by oncogenic signaling and its prognostic significance in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004;6(1):13-21.
- (67) Hail N, Jr. Mitochondria: A novel target for the chemoprevention of cancer. *Apoptosis* 2005 Aug;10(4):687-705.
- (68) Feig LA, Buchsbaum RJ. Cell signaling: life or death decisions of ras proteins. *Curr Biol* 2002 Apr 2;12(7):R259-R261.
- (69) Praskova M, Khoklatchev A, Ortiz-Vega S, Avruch J. Regulation of the

- MST1 kinase by autophosphorylation, by the growth inhibitory proteins, RASSF1 and NORE1, and by Ras. *Biochem J* 2004 Jul 15;381(Pt 2):453-62.
- (70) Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell* 2004 Jan 23;116(2):167-79.
- (71) Marshall C. How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry? *Curr Opin Cell Biol* 1999 Dec;11(6):732-6.
- (72) Fukata M, Kaibuchi K. Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 Dec;2(12):887-97.
- (73) Frame MC, Brunton VG. Advances in Rho-dependent actin regulation and oncogenic transformation. *Curr Opin Genet Dev* 2002 Feb;12(1):36-43.
- (74) Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 1995 Apr 7;81(1):53-62.
- (75) Machesky LM, Hall A. Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *J Cell Biol* 1997 Aug 25;138(4):913-26.
- (76) Small JV, Rottner K, Kaverina I. Functional design in the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 1999 Feb;11(1):54-60.
- (77) Banyard J, nand-Apte B, Symons M, Zetter BR. Motility and invasion are differentially modulated by Rho family GTPases. *Oncogene* 2000 Jan 27;19(4):580-91.
- (78) Tapon N, Hall A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 1997 Feb;9(1):86-92.
- (79) Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998 Jan 23;279(5350):509-14.
- (80) Fritz G, Just I, Kaina B. Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer* 1999 May 31;81(5):682-7.
- (81) Sahai E, Olson MF, Marshall CJ. Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *EMBO J* 2001 Feb 15;20(4):755-66.
- (82) Izawa I, Amano M, Chihara K, Yamamoto T, Kaibuchi K. Possible involvement of the inactivation of the Rho-Rho-kinase pathway in oncogenic Ras-induced transformation. *Oncogene* 1998 Dec 3;17(22):2863-71.
- (83) Qiu RG, Abo A, McCormick F, Symons M. Cdc42 regulates anchorage-independent growth and is necessary for Ras transformation. *Mol Cell Biol* 1997 Jun;17(6):3449-58.

- (84) Carragher NO, Frame MC. Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol* 2004 May;14(5):241-9.
- (85) Hall A, Nobes CD. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2000 Jul 29;355(1399):965-70.
- (86) Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 2004 Apr 12;23(16):2891-906.
- (87) Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 2005 May 1;11(9):3155-62.
- (88) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972 Aug;26(4):239-57.
- (89) Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 1991;7:663-98.
- (90) Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997 Feb 7;88(3):347-54.
- (91) Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 1991;32:223-54.
- (92) Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998 Aug 28;281(5381):1312-6.
- (93) Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, et al. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* 2005 Feb;25(3):1025-40.
- (94) Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005 Jun;6(6):439-48.
- (95) Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 2004 Apr 12;23(16):2891-906.
- (96) Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2004 Aug;4(8):592-603.
- (97) Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct* 2002 Dec;27(6):421-9.
- (98) Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J* 2000 Nov 1;19(21):5720-8.
- (99) Ogier-Denis E, Codogno P. Autophagy: a barrier or an adaptive response to

- cancer. *Biochim Biophys Acta* 2003 Mar 17;1603(2):113-28.
- (100) Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahon M, Sphicas E, et al. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res* 2001 Jan 15;61(2):439-44.
- (101) Toth S, Nagy K, Palfia Z, Rez G. Cellular autophagic capacity changes during azaserine-induced tumour progression in the rat pancreas. Up-regulation in all premalignant stages and down-regulation with loss of cycloheximide sensitivity of segregation along with malignant transformation. *Cell Tissue Res* 2002 Sep;309(3):409-16.
- (102) Chi S, Kitanaka C, Noguchi K, Mochizuki T, Nagashima Y, Shirouzu M, et al. Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells. *Oncogene* 1999 Apr 1;18(13):2281-90.
- (103) Patingre S, Bauvy C, Codogno P. Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells. *J Biol Chem* 2003 May 9;278(19):16667-74.
- (104) Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 1994 Oct 7;79(1):13-21.
- (105) Rechsteiner M, Hill CP. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol* 2005 Jan;15(1):27-33.
- (106) Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998 Aug 28;281(5381):1305-8.
- (107) Ware CF, VanArsdale S, VanArsdale TL. Apoptosis mediated by the TNF-related cytokine and receptor families. *J Cell Biochem* 1996 Jan;60(1):47-55.
- (108) Scaffidi C, Medema JP, Krammer PH, Peter ME. FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J Biol Chem* 1997 Oct 24;272(43):26953-8.
- (109) Bodmer JL, Holler N, Reynard S, Vinciguerra P, Schneider P, Juo P, et al. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol* 2000 Apr;2(4):241-3.
- (110) Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995 Dec;3(6):673-82.
- (111) Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 1996 May 31;271(22):12687-90.

- (112) Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 1996 May 31;271(22):12687-90.
- (113) Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 1998 Dec 24;17(25):3261-70.
- (114) Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998 Jun 5;273(23):14363-7.
- (115) Golstein P. Cell death: TRAIL and its receptors. *Curr Biol* 1997 Dec 1;7(12):R750-R753.
- (116) Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 1999 Feb;5(2):157-63.
- (117) Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2002 Jun;2(6):420-30.
- (118) Gura T. How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells. *Science* 1997 Aug 8;277(5327):768.
- (119) Mizutani Y, Nakanishi H, Yoshida O, Fukushima M, Bonavida B, Miki T. Potentiation of the sensitivity of renal cell carcinoma cells to TRAIL-mediated apoptosis by subtoxic concentrations of 5-fluorouracil. *Eur J Cancer* 2002 Jan;38(1):167-76.
- (120) Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998 Aug 21;94(4):491-501.
- (121) Walczak H, Bouchon A, Stahl H, Krammer PH. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand retains its apoptosis-inducing capacity on Bcl-2- or Bcl-xL-overexpressing chemotherapy-resistant tumor cells. *Cancer Res* 2000 Jun 1;60(11):3051-7.
- (122) Muppidi JR, Siegel RM. Ligand-independent redistribution of Fas (CD95) into lipid rafts mediates clonotypic T cell death. *Nat Immunol* 2004 Feb;5(2):182-9.
- (123) Hueber AO, Bernard AM, Herincs Z, Couzinet A, He HT. An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes. *EMBO Rep* 2002 Feb;3(2):190-6.
- (124) Delmas D, Rebe C, Lacour S, Filomenko R, Athias A, Gambert P, et al. Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2003 Oct 17;278(42):41482-90.
- (125) Delmas D, Rebe C, Micheau O, Athias A, Gambert P, Grazide S, et al.

- Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells. *Oncogene* 2004 Nov 25;23(55):8979-86.
- (126) Roberts ML, Drosopoulos KG, Vasileiou I, Stricker M, Taoufik E, Maercker C, et al. Microarray analysis of the differential transformation mediated by Kirsten and Harvey Ras oncogenes in a human colorectal adenocarcinoma cell line. *Int J Cancer* 2006 Feb 1;118(3):616-27.
- (127) Shirasawa S, Furuse M, Yokoyama N, Sasazuki T. Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras. *Science* 1993 Apr 2;260(5104):85-8.
- (128) Perez dC, I, Bivona TG, Philips MR, Pellicer A. Ras activation in Jurkat T cells following low-grade stimulation of the T-cell receptor is specific to N-Ras and occurs only on the Golgi apparatus. *Mol Cell Biol* 2004 Apr;24(8):3485-96.
- (129) Lacour S, Micheau O, Hammann A, Drouineaud V, Tschopp J, Solary E, et al. Chemotherapy enhances TNF-related apoptosis-inducing ligand DISC assembly in HT29 human colon cancer cells. *Oncogene* 2003 Mar 27;22(12):1807-16.
- (130) Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, et al. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 2000 Jun;12(6):599-609.
- (131) Biederbick A, Kern HF, Elsasser HP. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol* 1995 Jan;66(1):3-14.
- (132) Bursch W, Hochegger K, Torok L, Marian B, Ellinger A, Hermann RS. Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J Cell Sci* 2000 Apr;113 (Pt 7):1189-98.
- (133) Seglen PO, Gordon PB. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982 Mar;79(6):1889-92.
- (134) Fulda S, Jeremias I, Debatin KM. Cooperation of betulinic acid and TRAIL to induce apoptosis in tumor cells. *Oncogene* 2004 Oct 7;23(46):7611-20.
- (135) Tomasetti M, Rippon MR, Alleva R, Moretti S, Andera L, Neuzil J, et al. Alpha-tocopheryl succinate and TRAIL selectively synergise in induction of apoptosis in human malignant mesothelioma cells. *Br J Cancer* 2004 Apr 19;90(8):1644-53.
- (136) Hao JH, Yu M, Liu FT, Newland AC, Jia L. Bcl-2 inhibitors sensitize tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by uncoupling of mitochondrial respiration in human leukemic CEM cells. *Cancer Res* 2004 May 15;64(10):3607-16.

- (137) Koornstra JJ, Kleibeuker JH, van Geelen CM, Rijcken FE, Hollema H, de Vries EG, et al. Expression of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) and its receptors in normal colonic mucosa, adenomas, and carcinomas. *J Pathol* 2003 Jul;200(3):327-35.
- (138) Nguyen TT, Tran E, Nguyen TH, Do PT, Huynh TH, Huynh H. The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. *Carcinogenesis* 2004 May;25(5):647-59.
- (139) Russo M, Palumbo R, Mupo A, Tosto M, Iacomino G, Scognamiglio A, et al. Flavonoid quercetin sensitizes a CD95-resistant cell line to apoptosis by activating protein kinase Calpha. *Oncogene* 2003 May 22;22(21):3330-42.
- (140) Russo M, Palumbo R, Tedesco I, Mazzarella G, Russo P, Iacomino G, et al. Quercetin and anti-CD95(Fas/Apo1) enhance apoptosis in HPB-ALL cell line. *FEBS Lett* 1999 Dec 3;462(3):322-8.
- (141) Hosokawa N, Hosokawa Y, Sakai T, Yoshida M, Marui N, Nishino H, et al. Inhibitory effect of quercetin on the synthesis of a possibly cell-cycle-related 17-kDa protein, in human colon cancer cells. *Int J Cancer* 1990 Jun 15;45(6):1119-24.
- (142) Ranelletti FO, Ricci R, Larocca LM, Maggiano N, Capelli A, Scambia G, et al. Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen-binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors. *Int J Cancer* 1992 Feb 1;50(3):486-92.
- (143) Pipari AW, Jr., Tan L, Boitano AE, Sorenson DR, Aurora A, Liu JR. Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2004 Jan 15;64(2):696-703.
- (144) Furuta S, Hidaka E, Ogata A, Yokota S, Kamata T. Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase. *Oncogene* 2004 May 13;23(22):3898-904.
- (145) Cuervo AM. Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol* 2004 Feb;14(2):70-7.
- (146) Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 2004 Nov 5;306(5698):990-5.
- (147) Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahon M, Sphicas E, et al. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res* 2001 Jan 15;61(2):439-44.
- (148) Hancock JF, Magee AI, Childs JE, Marshall CJ. All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* 1989 Jun 30;57(7):1167-77.
- (149) da Rocha DS, Friedlos F, Light Y, Springer C, Workman P, Marais R. Activated B-RAF is an Hsp90 client protein that is targeted by the anticancer

- drug 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Res* 2005 Dec 1;65(23):10686-91.
- (150) Doye A, Mettouchi A, Bossis G, Clement R, Buisson-Touati C, Flatau G, et al. CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell* 2002 Nov 15;111(4):553-64.
- (151) Lynch EA, Stall J, Schmidt G, Chavrier P, Souza-Schorey C. Proteasome-mediated degradation of Rac1-GTP during epithelial cell scattering. *Mol Biol Cell* 2006 May;17(5):2236-42.
- (152) Rolli-Derkinderen M, Sauzeau V, Boyer L, Lemichez E, Baron C, Henrion D, et al. Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2005 Jun 10;96(11):1152-60.
- (153) Quincoces AF, Leon J. Serum growth factors up-regulate H-ras, K-ras, and N-ras proto-oncogenes in fibroblasts. *Cell Growth Differ* 1995 Mar;6(3):271-9.
- (154) Ulsh LS, Shih TY. Metabolic turnover of human c-rasH p21 protein of EJ bladder carcinoma and its normal cellular and viral homologs. *Mol Cell Biol* 1984 Aug;4(8):1647-52.
- (155) Svegliati S, Canello R, Sambo P, Luchetti M, Paroncini P, Orlandini G, et al. Platelet-derived growth factor and reactive oxygen species (ROS) regulate Ras protein levels in primary human fibroblasts via ERK1/2. Amplification of ROS and Ras in systemic sclerosis fibroblasts. *J Biol Chem* 2005 Oct 28;280(43):36474-82.
- (156) Jura N, Scotto-Lavino E, Sobczyk A, Bar-Sagi D. Differential modification of Ras proteins by ubiquitination. *Mol Cell* 2006 Mar 3;21(5):679-87.
- (157) Svegliati S, Canello R, Sambo P, Luchetti M, Paroncini P, Orlandini G, et al. Platelet-derived growth factor and reactive oxygen species (ROS) regulate Ras protein levels in primary human fibroblasts via ERK1/2. Amplification of ROS and Ras in systemic sclerosis fibroblasts. *J Biol Chem* 2005 Oct 28;280(43):36474-82.
- (158) Bellone G, Carbone A, Sibona N, Bosco O, Tibaudi D, Smirne C, et al. Aberrant activation of c-kit protects colon carcinoma cells against apoptosis and enhances their invasive potential. *Cancer Res* 2001 Mar 1;61(5):2200-6.
- (159) Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti FO, Natali PG, Brunetti M, et al. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer* 2000 Aug 15;87(4):595-600.
- (160) Micheau O, Solary E, Hammann A, Martin F, manche-Boitrel MT. Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to fas-mediated cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst* 1997 Jun 4;89(11):783-9.

- (161) Drosopoulos KG, Roberts ML, Cermak L, Sasazuki T, Shirasawa S, Andera L, et al. Transformation by oncogenic RAS sensitizes human colon cells to TRAIL-induced apoptosis by up-regulating death receptor 4 and death receptor 5 through a MEK-dependent pathway. *J Biol Chem* 2005 Jun 17;280(24):22856-67.
- (162) Fulda S, Debatin KM. Resveratrol-mediated sensitisation to TRAIL-induced apoptosis depends on death receptor and mitochondrial signalling. *Eur J Cancer* 2005 Mar;41(5):786-98.
- (163) Hueber AO, Bernard AM, Herincs Z, Couzinet A, He HT. An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes. *EMBO Rep* 2002 Feb;3(2):190-6.
- (164) Galbiati F, Razani B, Lisanti MP. Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* 2001 Aug 24;106(4):403-11.
- (165) Lacour S, Hammann A, Grazide S, Lagadic-Gossmann D, Athias A, Sergent O, et al. Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res* 2004 May 15;64(10):3593-8.

Κεφάλαιο 6

Ευρετήριο σχημάτων και πινάκων

Σ χ ή μ α τ α κ α ι π ί ν α κ ε ς

Σχήμα 1: Η θεωρία των κλώνων.	4
Σχήμα 2: Οι γραμμές ζωής του καρκίνου.	5
Σχήμα 3: Ιδιότητες καρκινικών κυττάρων.....	9
Σχήμα 4: Τρεις τρόποι όπου ένα πρωτο-ογκογονίδιο μετατρέπεται σε κυτταρικό ογκογονίδιο.	12
Σχήμα 5: Τα ποσοστά εμφάνισης ορθοκολικού καρκίνου αυξάνονται εκθετικά με την ηλικία.	13
Σχήμα 6: Το πολυσταδιακό σύστημα της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου. .	14
Σχήμα 7: Επίπεδα αναστολής της καρκινογένεσης.....	19
Σχήμα 8: Χημικές δομές γνωστών φλαβονοειδών.	22
Σχήμα 9: Χημική δομή της κερσετίνης.....	23
Σχήμα 10: Δύο τρόποι να ξεπερασθεί η αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στον κυτταρικό θάνατο.....	28
Σχήμα 11: Τροποποιήσεις και κυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών Ras.....	31
Σχήμα 12: Ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras και μονοπάτια που ενεργοποιεί	33
Σχήμα 13: Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Rho.....	45
Σχήμα 14: Οι Rho, Rac και Cdc42 ελέγχουν την οργάνωση του κυτταροσκελετού.	47
Σχήμα 15: Γενικές αρχές ενεργοποίησης των κασπασών.....	50
Σχήμα 16: Η αυτοφαγική διαδικασία στα θηλαστικά.....	54
Σχήμα 17: Σχηματική απεικόνιση της δημιουργίας αυτοφαγοσώματος στα κύτταρα θηλαστικών.	55
Σχήμα 18: Υποθετικό μοντέλο του διπλού ρόλου της αυτοφαγίας στον καρκίνο.....	56
Σχήμα 19: Το πρωτεάσωμα.....	57
Σχήμα 20: Οι υποδοχείς θανάτου.	59
Σχήμα 21: Δημιουργία του συμπλέγματος DISC και αποπτωτικά μονοπάτια.....	62
Σχήμα 22: Πρώιμα γεγονότα που συμβαίνουν στην πλασματική μεμβράνη και φαίνεται να συμμετέχουν στον επαγόμενο από χημειοθεραπεία κυτταρικό θάνατο	64
Σχήμα 23: Υποθετική διαδικασία μεταγωγής σήματος από τον Fas/CD95.	64
Σχήμα 24: Κύτταρα του παχέος εντέρου που χρησιμοποιήθηκαν.	66
Σχήμα 25: Το επαγόμενο σύστημα της έκφρασης του RAS.....	67
Πίνακας 1: Μεταλλαγές σε γονίδια RAS σε ανθρώπινους καρκίνους.....	17

Πίνακας 2: Παραδείγματα υποκατηγοριών флаβονοειδών στη φύση	23
Πίνακας 3: Σύγκριση των δύο τύπων κυτταρικού θανάτου	53

βιογραφικό

σημείωμα

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ημερομηνία γέννησης 03.10.1976
 Τόπος Γέννησης Αθήνα

ΣΠΟΥΔΕΣ

- | | | |
|---|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Νοέμβριος 2006 | <ul style="list-style-type: none"> • Διδακτορική Διατριβή • Πανεπιστήμιο-Ινστιτούτο • Επιβλέποντες • Συνεργασία | <p>Θέμα: «Μελέτη της επίδρασης της κερσετίνης στις ογκοπρωτεΐνες Ras και της ενίσχυσης της αποτελεσματικότητας του TRAIL από την κερσετίνη, με σκοπό την αναστολή της ογκογονικής δραστηριότητας»
 Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
 Εκπόνηση στο Εργαστήριο Γονιδιακής Ρύθμισης, Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας (IBEB), Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
 Δρ. Αλέξανδρος Πίντζας, Διευθυντής Ερευνών, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
 Γεώργιος Σίμος, Επ. Καθ. Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
 Κεντρική Κλαδική Συνεταιριστική Ένωση Αμπελουργικών Προϊόντων (ΚΕΟΣΟΕ), στα πλαίσια του προγράμματος «Οίνος και Υγεία».</p> |
| <ul style="list-style-type: none"> • Νοέμβριος 2001 | <ul style="list-style-type: none"> • Πτυχίο • Πανεπιστήμιο | <p>Βιολογίας, Βαθμός Πτυχίου: «Λίαν Καλώς»
 Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών</p> |
| <ul style="list-style-type: none"> • Σεπτέμβριος 1999 - Οκτώβριος 2000 | <ul style="list-style-type: none"> • Διπλωματική Εργασία • Ινστιτούτο • Επιβλέποντες | <p>Θέμα: «Αλληλεπίδραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με τις πρωτεΐνες του θερμικού σοκ Hsp70 and Hsp90»
 Εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας, Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
 Δρ. Μιχάλης Αλέξης, Διευθυντής Ερευνών, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
 Διαμάντης Σίδερης, Επ. Καθ. Βιοχημείας, Πανεπιστημίου Αθηνών</p> |
| <ul style="list-style-type: none"> • Ιούνιος 1994 | <ul style="list-style-type: none"> • Δευτεροβάθμια Εκπαίδευση | <p>1^ο Λύκειο Αιγίου</p> |

ΠΡΟΣΘΕΤΗ ΕΡΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- | | | |
|--|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Απρίλιος 2006 | <ul style="list-style-type: none"> • Ινστιτούτο και Αντικείμενο • Επιβλέπων | <p>Συμπληρωματικά Πειράματα στα Πλαίσια της Έρευνας για τη Διδακτορική Διατριβή
 Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic.
 Dr. Ladislav Andera, Research Director</p> |
| <ul style="list-style-type: none"> • Οκτώβριος 2001- Μάρτιος 2002 | <ul style="list-style-type: none"> • Ινστιτούτο και Αντικείμενο • Επιβλέπων | <p>Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur
 Θέμα: «<i>In vitro</i> λειτουργική μελέτη μορίων που συμμετέχουν σε αναπτυξιακές διεργασίες του εγκεφάλου των θηλαστικών»
 Δρ. Ευαγγελία Πατσαβούδη</p> |

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

- Απρίλιος-Ιούνιος 2005
- Σεμινάριο Νέων Ερευνητών «ΠΕΝΕΔ 2001» σε θέματα Μεθοδολογίας και Πρακτικής για τη Διαχείριση Έρευνας, Τεχνολογίας και Καινοτομίας. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (ΕΜΠ)

- Ιούλιος 2004 Εργαστηριακή Εκπαίδευση: «Applications of Light Microscopy in Biomedical Research» Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων και BRI-Gorth
- Αύγουστος 2003 Συμμετοχή σε καλοκαιρινό σχολείο του FEBS-EMBO Advanced Study Institute με θέμα «Μοριακοί Μηχανισμοί Μεταγωγής Σημάτων», Σπέτσες (Poster).

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 2004. *Kranjska gora, Slovenia* 3rd Conference on Experimental and Translational Oncology: *Ras mediated gene expression profile and cell death based therapies during multistage carcinogenesis.* Roberts M., Moutzi S. , Drosopoulos K., Andreolas V., Psahoulia F., Psarras I. Mastora C. and Pintzas A. (Poster)
- Απρίλιος 2004, Αθήνα Διεθνές Συνέδριο Παραδοσιακής Μεσογειακής Δίαιτας: *Παρόν, Παρελθόν και Μέλλον.* Παρουσίαση Πειραματικής Έρευνας πάνω στο Ρόλο Βιολογικά Ενεργών Συστατικών σε Ελληνικές Ποικιλίες Σταφυλιών ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες.
- 2004, *Κέρκυρα* 7th International Conference of Anticancer Research: *Cross-talk between oncogenic and apoptotic cell signals: applications in novel anticancer therapies.* Pintzas A. Drosopoulos K., Roberts M. , Andera L., Moutzi S. , Andreolas V., Voulgari A., Psahoulia F. and Mastora C.
- Αύγουστος 2003, *Σπέτσες* *Chemopreventive compounds regulated interplay of Ras and Rho in human colon tumorigenesis.* Psahoulia F., Roberts ML., Moutzi S. and Pintzas A. (Poster)
The use of Functional Genomics to analyse early versus late Ras signalling in a model of colorectal cancer. Roberts ML., Psahoulia F., Vasileiou G., Guialis A., Alexis MN. and Pintzas A. (Poster)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- 2006, *Carcinogenesis, in press* *Quercetin mediates preferential degradation of oncogenic Ras and causes autophagy in Ha-RAS transformed human colon cells.* Faiy H. Psahoulia, Sophy Moutzi, Michael L. Roberts, Takehiko Sasazuki, Senji Shirasawa, and Alexander Pintzas
- 2006, *submitted* *Quercetin enhances TRAIL-mediated apoptosis in colon cancer cells by inducing the accumulation of death receptors in lipid rafts.* Faiy H. Psahoulia, Konstantinos G. Drosopoulos, Lenka Doubravska, Ladislav Andera and Alexander Pintzas

ΓΛΩΣΣΕΣ

- ΑΓΓΛΙΚΑ FIRST CERTIFICATE OF CAMBRIDGE
- ΓΑΛΛΙΚΑ DIPLOME D'ETUDES FRANCAISES (SORBONNE 2^e Degré),
DIPLOME D'ETUDES EN LANGUE FRANCAISE (D.E.L.F. 2^e Degré)

ΓΝΩΣΗ Η/Υ

- Χρήση Internet, Windows
- Εφαρμογές MS-Office, Adobe Photoshop

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Κυτταροκαλλιέργεια, Κυτταρικοί μετασχηματισμοί, Καθαρισμός πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας, Ανάλυση πρωτεϊνών κατά Western, RT-PCR, Ανοσοκατακρήμνηση, Μικροσκοπία Φθορισμού, Μικροέγχυση, Τεχνικές Βιοτεχνολογίας κλπ.