



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

***HSP70*: ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ
ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗΣ ΤΩΝ *MCF7* ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ Π. ΒΡΑΖΕΛΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

***HSP70*: ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ
ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗΣ ΤΩΝ *MCF7* ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ Π. ΒΡΑΖΕΛΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).»

Ημερομηνία αίτησης της κ. Βραζέλη Παρασκευής: 28-1-2009

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 655^α/10-3-2009

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Αγγελίδης Χαράλαμπος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Γαλάρης Δημήτριος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Καναβάρος Παναγιώτης, Καθηγητής Ανατομίας που Καλύπτει και την Ιστολογία –Εμβρυολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 24-3-2009

«Hsp 70: Μηχανισμός ρύθμισης της απόπτωσης και μετανάστευσης των MCF-7 καρκινικών κυττάρων»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 781^α/29-9-2015

Αγγελίδης Χαράλαμπος	Καθηγητής Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Γαλάρης Δημήτριος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Καλφακάκου Βασιλική	Καθηγήτρια Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Καναβάρος Παναγιώτης	Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία – Εμβρυολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Βεζυράκη Πατρώνα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Παπάς Περικλής	Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Σύρρου Μαρίκα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας –Ιατρικής Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 31-3-2016

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Η Γραμματέας του Τμήματος



ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

“Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.”



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Στον άντρα της ζωής μου

Στην αδερφή μου Ευθυμία

&

στους γονείς μου Πάνο και Ροδάνθη

Η ζωή είναι ένα τρένο

Σε κάθε σταθμό άνθρωποι ανεβαίνουν και άλλοι κατεβαίνουν,
με κάποιους θα συνταξιδέψεις περισσότερο, με άλλους λιγότερο.

Μέσα στο τρένο θα συναντήσεις πολλούς...

Ανθρώπους σημαντικούς για σένα, αλλά και αδιάφορους...

Θα έρθουν αυτοί που θα αγαπήσεις, αυτοί που θα σε αγαπήσουν, άλλοι θα σου βάλουν
τρικλοποδιές, άλλοι θα σε σηκώσουν όταν πέσεις, κάποιοι θα σου κρατούν το χέρι όταν
φοβάσαι τον γκρεμό και άλλοι θα θελήσουν να σε πετάξουν από το παράθυρο...

Θα συναντήσεις συνεπιβάτες που θα σου μιλούν ψιθυριστά, όπως ταιριάζει στον έρωτα και
αυτοί που με κακία θα σου φωνάζουν...

Στο ταξίδι θα περάσεις από θάλασσες και βουνά, άλλοτε το ταξίδι είναι ήρεμο και άλλοτε
περνάς κακοτράχαλα δύσβατα σημεία, χειμώνες και καλοκαίρια θα
εναλλάσσονται...νηνεμία και φουρτούνες θα συναντήσεις...

Νύχτα και μέρα, φορές που ο ήλιος θα ζεσταίνει την καρδιά, μα και άλλες που το κρύο θα
πληγώνει την ψυχή, φορές που χαλαρός θα κοιμάσαι, φορές που με αγωνία θα ξενυχτάς!

Θα τύχει να δεις αγαπημένους σου να κατεβαίνουν, γιατί το ταξίδι τους έφτασε στο τέλος
του και θα πονάς για τον αποχωρισμό. Θα τύχει να δεις αγαπημένους σου να αλλάζουν
βαγόνι και να σε αφήνουν, μα κάποιες φορές και εσύ θα αλλάξεις βαγόνι και θα τους
αφήσεις...

Μέσα στις αποσκευές σου κουβαλάς, γνώσεις, εμπειρίες, αγάπη, πόνο, δάκρυα, γέλια, χαρά
και λύπη. Ένα ταξίδι που συνέχεια σου δίνει και σε μαθαίνει. Γεμίζουν οι αποσκευές σου
και λαχταράς για τον επόμενο σταθμό...

Καλή συνέχεια του ταξιδιού μας λοιπόν...

(Πηγή: La Verita)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό της επίβλεψη του Καθηγητή του Εργαστηρίου Βιολογίας κ. Χαράλαμπου Αγγελίδη και συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση - Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ) και Εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) - Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II.

Η πραγμάτωση της διδακτορικής μου διατριβής απαιτήσε την επένδυση μεγάλης προσπάθειας, πνευματικών και ψυχικών αποθεμάτων. Η συμβολή ορισμένων ανθρώπων, υπήρξε καταλυτική στην ολοκλήρωσή της, τους οποίους και θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντά μου κ. Χαράλαμφο Αγγελίδη - Καθηγητή Βιολογίας, ο οποίος με δέχτηκε στο εργαστήριο και στη ομάδα του και με την συνεχή καθοδήγησή του, με τις ιδέες του, τις πολύτιμες συμβουλές του και την εγκάρδια παρότρυνσή του βοήθησε ένα από τα όνειρά μου, το διδακτορικό μου, να γίνουν πραγματικότητα. Τον ευχαριστώ τόσο για την ουσιαστική ερευνητική μας συνεργασία όσο και για το συνολικό ακαδημαϊκό ήθος το οποίο μου μετέδωσε.

Ευχαριστώ τους κυρίους Δημήτριο Γαλάρη και Παναγιώτη Καναβάρο, μέλη της τριμελούς επιτροπής, για τις συμβουλές τους και το συνεχές ενδιαφέρον για την πρόοδο αυτού του έργου. Σας ευχαριστώ θερμά για τη συνεργασία!

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις κυρίες Πατρώνα Βεζυράκη, Βασιλική Καλφακάκου και Μαρίκα Σύρρου καθώς και τον κύριο Περικλή Παππά, μέλη της εξεταστικής επιτροπής, για το χρόνο που διέθεσαν προκειμένου να αξιολογήσουν την παρούσα εργασία, για τις καθημερινές τους συμβουλές, επιστημονικές και μη, και για το καθημερινό τους χαμόγελο στο εργαστήριο. Σας ευχαριστώ πολύ!

Ευχαριστώ επίσης τους Καθηγητές Θεόδωρο Τζαβάρα, Παναγιώτη Κούκλη, Σπυρίδωνα Καρκαμπούνα, Άγγελο Ευαγγέλου, Φράγκου Μαρία, Βασιλική Γαλάνη για την καθημερινή συνεργασία, τις ιδέες τους και την υλική τους βοήθεια, όλο αυτό το διάστημα.

Ευχαριστώ επίσης τους συναδέλφους που συνάντησα, ήρθαν, πέρασαν, έφυγαν ή έμειναν στο εργαστήριο. Ευχαριστώ πάρα πολύ την Ιωάννα Κύρου για την παρέα της, την ειλικρίνειά της και τις συμβουλές της, τη Γιώτα Κασιούμη για τη συνεργασία στα δύσκολα και τη Δέσποινα Γκέκα για τη συνεργασία, το χαμόγελο και την εμπιστοσύνη της. Ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου τις Ίριδα Δήμα και Σωτηρούλα Θρασυβούλου για τη φιλία τους, τις συμβουλές τους και τις ατέλειωτες ώρες συζητήσεων. Τη Βιολέττα Μαλταμπέ και την Αλέκα Ντουχανιάρη για την καθοδήγησή τους. Τη Μαρία Γκιούλη, τον Πάνο Λέκκα, Στέλιο Ζερικιώτη και την Χριστιάννα Ζαχαρίου για την συνεργασία, τις επιστημονικές συμβουλές, τις ιδέες, τη φιλία και την καθημερινή στήριξή τους. Την Ντιάνα Πότση και τον Μιχάλη Μάντζαρη για την πολύτιμη βοήθειά τους. Σας ευχαριστώ όλους από καρδιάς!

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ μου και την ευγνωμοσύνη μου θα ήθελα να τα απευθύνω στον Θεό, στην οικογένειά μου και στους φίλους μου. Στον Νότη μου, για την

αγάπη του, το χιούμορ του, τη στήριξή του στα δύσκολα, τις θυσίες του και τις ατέλειωτες νύχτες συζητήσεων μέσω *skype* τα τελευταία δύομισι χρόνια. Η ζωή μας... μια οθόνη! Συγγνώμη που ήμουν μακριά... τα καλύτερα έρχονται! Στη Θυμιέλα μου, για την παρουσία της, την συμπαράστασή της και τις συμβουλές της όλον αυτόν τον καιρό. Ήξερες πάντα πως νιώθω, χωρίς καν να μιλήσω. Στους γονείς μου, Πάνο και Ροδάνθη, για την αγάπη τους και για τον τρόπο μου με ανέθρεψαν, ώστε να πιστεύω στον εαυτό μου και να επιμένω μπρος σε κάθε δυσκολία. Σας ευχαριστώ πραγματικά, μέσα από την καρδιά μου, για όλα!

Σας ευχαριστώ όλους θερμά!

Ιωάννινα, Μάρτιος 2016

Εύη Βραζέλη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 ΘΕΡΜΙΚΟ ΣΟΚ	3
1.1.1 Απόκριση θερμικού σοκ	3
1.1.2 Πρωτεΐνες θερμικού σοκ	4
1.1.3 Ο ρόλος των πρωτεϊνών θερμικού σοκ	5
1.1.4 Μοριακού συνοδοί	7
1.1.5 Οικογένειες πρωτεϊνών θερμικού σοκ	8
1.1.6 Η οικογένεια θερμικού σοκ 70 kDa (Hsp70)	9
1.1.7 Η οικογένεια των <i>Hsp70</i> στον άνθρωπο	11
Δομή και ρόλος	
1. Hsp70-1a και Hsp70-1b	12
2. Hsp70-1t	15
3. Hsp70-2	15
4. Hsp70-5 (Bip ή Grp 78)	15
5. Hsp70-6	16
6. Hsp70-8, Hsc70	16
7. Hsp70-9	17
1.1.8 <i>Hsps</i> και καρκίνος	17
1.2 ΑΝΕΣΤΙΑ	19
1.2.1 Αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος μέσω ανέστιας	19
1.2.2 Μηχανισμοί επαγωγής της ανέστιας	20
1.2.3 Ανέστια και μεταστατικότητα	22
1.2.4 Κυτταρική εισβολή	24
1.2.5 Επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης	25
1.2.6 Ο ρόλος των ιντεγκρινών στην κυτταρική επιβίωση και στην απόπτωση (ανέστια)	26

1.3	ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ ΠΡΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΒΑΣΗ (EMT)	28
1.3.1	Επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση - <i>EMT</i>	28
1.3.2	Η επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο	29
1.3.3	Ταξινόμηση της επιθηλιακής προς μεσεγχυματικής μετάβασης (<i>EMT</i>)	30
	EMT τύπου I	30
	EMT τύπου II	31
	EMT τύπου III	32
1.3.4	<i>EMT</i> και καρκίνος	32
1.3.5	Μόρια που συμμετέχουν στην <i>EMT</i>	34
	E-καδερίνη	34
	N-καδερίνη	35
	Βιμεντίνη	35
	<i>Slug</i>	35
1.3.6	<i>EMT</i> και <i>Hsp70</i>	36
1.4	Η ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ P53	36
1.4.1	Η δομή της <i>p53</i>	37
1.4.2	Λειτουργίες της <i>p53</i>	38
	1.Σημεία ελέγχου κυτταρικού κύκλου	38
	2.Απόπτωση	40
1.4.3	Μοντέλα ενεργοποίησης της <i>p53</i>	42
1.4.4	<i>MDM2</i> και <i>p53</i>	44
1.4.5	Η φωσφορυλίωση της <i>p53</i>	46
1.4.6	Η μεταφορά της <i>p53</i> από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα	46
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	51
2.1	ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	53
2.1.1	Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας ευκαρυωτικών κυττάρων	53
2.1.2	Κυτταρική σειρά <i>MCF7</i>	53
2.1.3	Υλικά κυτταρικής καλλιέργειας	54
	Επανακαλλιέργεια κυτταρικής σειράς	54

1.Διάλυμα έκπλυσης - <i>PBS</i>	54
2.Ορός - <i>FBS</i>	54
3.Διάλυμα θρυψίνης - <i>Trypsin</i>	54
2.1.4 Αποθήκευση ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών σε υγρό άζωτο	55
2.1.5 Απόψυξη ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών από το υγρό άζωτο	55
2.1.6 Ικανότητα των κυττάρων να δημιουργούν αποικίες (Colony Efficiency)	55
2.1.7 Ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων	56
2.2. ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ – ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΕΚΧΕΙΛΙΣΜΑΤΑ	57
2.2.1 Λύση κυττάρων – Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα	57
2.2.2 Λύση κυττάρων – Διαχωρισμός των πυρηνικών πρωτεϊνών από τις κυτταροπλασματικές	58
2.2.3 Λύση κυττάρων – Απομόνωση πυρηνίσκων σε βαθμιδώσεις σακχαρόζης	58
2.2.4 Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών (Bio-Rad protein assay)	59
2.2.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)	60
2.2.6 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blot)	61
2.2.7 Χρώση των πρωτεϊνών στην πηκτή με Coomassie blue	64
2.2.8 Χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με PonceauS	64
2.2.9 Ανοσοκαθίζηση πρωτεϊνών (Immunoprecipitation)	65
2.2.10 Ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών (Immunofluorescence)	66
2.3 ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ (<i>Confocal Microscopy</i>)	67
2.4 ΈΛΕΓΧΟΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ MTT (MTT assay)	68
2.5 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ <i>pcDNA3-siRNA-Hsp70</i>	69
2.6 ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΡΗΣΗΣ (Transfection with	73

electroporation)	
2.7 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ	74
2.8 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ <i>MCF7</i> ΚΥΤΤΑΡΩΝ	75
2.9 ΠΡΟΚΛΗΣΗ <i>ΑΝΟΙΚΙΣ</i> ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ	76
1. Προετοιμασία <i>poly-HEMA</i> τρυβλίων	76
2. Επίστρωση των κυττάρων σε <i>poly-HEMA</i> τρυβλία	76
2.10 ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΎΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΠΟΛΥΩΡΗ ΕΠΩΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΤΡΥΒΑΙΑ ΕΠΙΣΤΡΩΜΕΝΑ ΜΕ <i>POLY-HEMA</i>	77
2.11 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ	77
2.12 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	78
2.12.1 Υγρή καλλιέργεια βακτηρίων	78
2.12.2 Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων	79
2.12.3 Απομόνωση πλασμιδιακού <i>DNA</i> σε μεσαία κλίμακα (Midiprep procedure)	79
2.13 ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	79
1. Δοξορουβικίνη (<i>Doxorubicin: DOX</i>)	79
2. Σισπλατίνη (<i>Cisplatin</i>)	80
2.14 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	81
3 ΣΚΟΠΟΣ	83
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	87
4.1 Η ΑΠΟΥΣΙΑ ΤΗΣ <i>HSP70</i> ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ <i>MCF7</i>	89

**ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΒΑΣΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ, ΟΠΩΣ Ο ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ, Η
ΘΕΡΜΟΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ Η ΑΠΟΠΤΩΣΗ.**

4.1.1	Γονιδιακή αποσιώπηση της <i>Hsp70</i>	89
4.1.2	Η <i>Hsp70</i> διατηρείται υπό γονιδιακή αποσιώπηση (knockdown) στα <i>MCF7-siRNA-Hsp70</i> κύτταρα ακόμη και υπό συνθήκες θερμικού σοκ	91
4.1.3	Η απουσία της <i>Hsp70</i> αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό του <i>MCF7-siRNA-Hsp70</i>	93
4.1.4	Η απουσία της <i>Hsp70</i> προκαλεί θερμοευαισθησία στα καρκινικά <i>MCF7</i> κύτταρα και μειωμένη ικανότητα δημιουργίας κυτταρικών αποικιών	95
4.1.5	Η γονιδιακή αποσιώπηση της <i>Hsp70</i> οδηγεί τα <i>MCF7</i> κύτταρα σε απόπτωση	98
4.2	<i>HSP70</i> ΚΑΙ <i>ANOIKIS</i> ΑΠΟΠΤΩΣΗ	100
4.2.1	Η απουσία της <i>Hsp70</i> καθιστά τα κύτταρα πιο ευαίσθητα στην <i>anoikis</i> απόπτωση	101
4.2.2	Η <i>Hsp70</i> εμποδίζει την ενεργοποίηση της ανέστιας μέσω <i>p53</i> .	104
4.2.3	Κυτταρικός εντοπισμός της <i>p53</i> και <i>phospho-p53</i> (Serine 15) υπό φυσιολογικές και στρες συνθήκες	106
4.3	Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ <i>HSP70</i> ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ <i>MCF7</i> ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	109
4.3.1	Η απουσία της <i>Hsp70</i> από τα <i>MCF7</i> κύτταρα ευνοεί την ικανότητά τους προς μετανάστευση	110
4.4	ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΗΣ <i>HSP70</i> ΚΑΙ ΤΩΝ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΘΑΝΑΤΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΜΕΤΑΚΙΝΗΣΗ (MIGRATION)	111

4.4.1	Η απουσία της <i>Hsp70</i> καθιστά τα κύτταρα πιο ευαίσθητα έπειτα από έκθεσή τους σε χημειοθεραπευτικά. Ανάλυση με τη μέθοδο <i>MTT</i>	112
4.4.2	Η απουσία της <i>Hsp70</i> και τα χημειοθεραπευτικά <i>Doxorubicin</i> ή <i>Cisplatin</i> προωθούν τη μετανάστευση (μεταστατικότητα) των καρκινικών κυττάρων	115
4.5	Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΗΣ <i>HSP70</i> ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΣΕ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (EMT)	121
4.5.1	Η απουσία της <i>Hsp70</i> από την κυτταρική σειρά <i>MCF7</i> ωθεί στην μετατροπή των κυττάρων από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά	122
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	127
6	ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ	143
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	145
	SUMMARY	147
7	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	149

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.ΘΕΡΜΙΚΟ ΣΟΚ

1.1.1.Απόκριση θερμικού σοκ

Τα κύτταρα απαιτούν δραστικά συστήματα για να επιβιώσουν έπειτα από σοβαρές στρεσογόνες συνθήκες, όπως είναι οι ακραίες θερμοκρασίες, οι τοξίνες, τα παθογόνα μικρόβια και οι μεταλλάξεις. Η απόκριση σε θερμικό σοκ είναι από τις πιο πρωτόγονες και υψηλά συντηρημένες για την κυτταρική επιβίωση (1) (2). Η έκθεση των κυττάρων σε υψηλές θερμοκρασίες οδηγεί σε μια γρήγορη αλλαγή στην έκφραση των γονιδίων και στη βιοσύνθεση μιας σειράς νέων πρωτεϊνών. Αυτή η αλλαγή επιτυγχάνεται, εν μέρει, με μια γενική αναστολή της μεταγραφής, ταυτόχρονα όμως παρατηρείται μια αύξηση στη σύνθεση μιας ομάδας πρωτεϊνών οι οποίες ονομάζονται πρωτεΐνες θερμικού σοκ (hsps: heat shock proteins) και είναι ευρύτερα γνωστές ως μοριακοί συνοδοί (molecular chaperons) (3-5). Παράλληλα με τις αλλαγές στο επίπεδο της μεταγραφής, παρατηρείται και μια επιλεκτική μετάφραση εκείνων των μηνυμάτων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που επάγονται από το θερμικό σοκ. Τα μηνύματα όμως, που δεν μεταφράζονται κατά τη διάρκεια του θερμικού σοκ, δεν αποικοδομούνται, αλλά απλά απενεργοποιούνται. Αυτή η περίπλοκη διαδικασία είναι βέβαια πλήρως αντιστρεπτή: όταν τα κύτταρα επιστρέψουν στην κανονική θερμοκρασία, τόσο τα πρότυπα της μεταγραφής, όσο και η μετάφραση, επανέρχονται στα κανονικά επίπεδα (5, 6).

Όλοι οι οργανισμοί -είτε ευκαρυωτικοί είτε προκαρυωτικοί- όταν αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες υψηλότερες από τις κανονικές επάγουν τη σύνθεση χαρακτηριστικών πρωτεϊνών. Ο βαθμός εξελικτικής συντηρητικότητας μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών ποικίλει. Φαίνεται όμως ότι κάποια σχέση υφίσταται (7). Όλες οι πρωτεΐνες των οποίων η σύνθεση επάγεται από το θερμικό σοκ εμφανίζονται να έχουν σημαντικό ρόλο στο να προστατεύουν από τη θνησιμότητα που προκαλείται από τις υψηλές θερμοκρασίες, καθώς επίσης να επιτρέπουν στους οργανισμούς να συνεχίσουν την αύξηση και την ανάπτυξή τους όταν επανέλθουν σε λιγότερο ακραίες θερμοκρασίες. Οι πρωτεΐνες επάγονται επίσης και από μια ποικιλία άλλων στρεσογόνων συνθηκών, όπως είναι η έλλειψη οξυγόνου, η παρουσία ιόντων βαρέων μετάλλων (κάδμιο, αρσενικό, μόλυβδος, χαλκός κλπ.), οι παρεμποδιστές του μεταβολισμού ενέργειας, οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, τα ανάλογα αμινοξέων, η οξειδωτική βλάβη (αλλαγή pH) (7), η λοίμωξη από ιό (8), η

ισχαιμία, η υπερτροφία, το οίδημα, η κακοήθεια, κάποιες μεταβολές στον κυτταρικό κύκλο και τέλος η ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κύτταρων.

Απόκριση θερμικού σοκ (Heat shock response) ονομάζεται η αλλαγή στην κατάσταση ή ενεργότητα ενός κυττάρου ή ενός οργανισμού, ως αποτέλεσμα ενός ξαφνικού θερμικού εξωτερικού ερεθίσματος, με θερμοκρασία υπεράνω της φυσιολογικής του οργανισμού ή του κυττάρου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να επηρεάζονται πολλές λειτουργίες μεταξύ των οποίων, η κίνηση, η έκκριση, η παραγωγή ενζύμων, η γονιδιακή έκφραση και πολλές άλλες. Περιγράφηκε για πρώτη φορά στο έντομο *Drosophila melanogaster* από τον *Ferruccio M. Ritossa* το 1962, ο οποίος παρατήρησε ότι η αύξηση της θερμοκρασίας είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός νέου προτύπου χρωμοσωμικών διογκώσεων (puffs) στα πολυταινικά χρωμοσώματα των σιελογόνων αδένων του εντόμου (9). Το 1972 από τους *Ashburner* και *Bonner* αποδείχτηκε ότι οι συγκεκριμένες χρωμοσωμικές διογκώσεις αποτελούν ενεργές περιοχές αυξημένης μεταγραφής *mRNAs* πρωτεϊνών, που αργότερα χαρακτηρίστηκαν ως θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (Hsps) (10). Ο όρος θερμοεπαγόμενο γονίδιο και θερμοεπαγόμενη πρωτεΐνη δόθηκε το 1974 από τον *Tissieres*, ο οποίος επίσης μελετούσε την απόκριση στο θερμικό στρες στο έντομο *Drosophila melanogaster* (11). Το 1978-1979, μελέτες σε άλλους οργανισμούς αποκάλυψαν ότι η αύξηση της θερμοκρασίας και άλλες στρεσογόνες καταστάσεις επάγουν τη σύνθεση θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών σε κύτταρα πτηνών, στη ζύμη και στο πρωτόζωο *Tetrahymena spp.* Μέσα σε λίγα χρόνια παρόμοιες αποκρίσεις αναφέρθηκαν σε έναν μεγάλο αριθμό οργανισμών. Αντίστοιχες μελέτες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι τα θερμοεπαγόμενα γονίδια εμφανίζουν υψηλό βαθμό συντήρησης κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, όχι μόνο σε ότι αφορά την κωδική αλληλουχία των πρωτεϊνών τους, αλλά και στις ρυθμιστικές τους αλληλουχίες (12).

1.1.2. Πρωτεΐνες θερμικού σοκ

Η λειτουργία μιας πρωτεΐνης καθορίζεται από την τρισδιάστατη δομή της. Όταν οι πρωτεΐνες εκτίθενται σε υψηλή θερμοκρασία, οι αλυσίδες των αμινοξέων που διπλώνονται σε έλικες ή πτυχωτές επιφάνειες χάνουν το σχήμα τους. Όταν το εσωτερικό αυτών των πρωτεϊνών εκτίθεται, οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν σφαιρικές δομές. Αυτό

τις κάνει μη λειτουργικές. Αυτές οι λανθασμένες στερεοδιατάξεις των πρωτεϊνών είναι υπεύθυνες για έναν μεγάλο αριθμό παθολογικών καταστάσεων όπως η νόσος *Alzheimer* και ο καρκίνος (καρκινογένεση).

Πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSP) είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών οι οποίες εκφράζονται από κύτταρα έπειτα από την έκθεσή τους σε στρεσογόνες συνθήκες. Αυτά περιγράφηκαν για πρώτη φορά σε σχέση με το θερμικό σοκ (9), αλλά είναι τώρα επίσης γνωστό ότι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ εκφράζονται κατά τη διάρκεια και άλλων ακραίων συνθηκών, συμπεριλαμβανομένης της έκθεσης σε κρύο, (13) το υπεριώδες φως (14) και κατά τη διάρκεια της επούλωσης τραύματος ή την αναδιαμόρφωση των ιστών (15). Πολλά μέλη αυτής της ομάδας εκτελούν λειτουργία συνοδού σταθεροποιώντας τις πρωτεΐνες για να εξασφαλιστεί η σωστή αναδίπλωση ή βοηθώντας στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών που είχαν καταστραφεί, έπειτα από στρες του κυττάρου (2). Αυτή η αύξηση στην έκφρασή τους, έπειτα από συνθήκες στρες, είναι μεταγραφικά ρυθμιζόμενη. Η θεαματική απορύθμιση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ είναι ένα βασικό μέρος της απάντησης στο θερμικό σοκ και προκαλείται κυρίως από τον παράγοντα θερμικού σοκ (HSF) (16). Οι πρωτεΐνες αυτές βρίσκονται σε σχεδόν όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, από τα βακτήρια έως τον άνθρωπο.

1.1.3 Ο ρόλος των πρωτεϊνών θερμικού σοκ

Σχεδόν όλες οι *Hsps* εκφράζονται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες αύξησης και η λειτουργία τους επικεντρώνεται στην διατήρηση της ομοιόστασης των πρωτεϊνών, ρυθμίζοντας τον ποιοτικό έλεγχο στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών και βοηθώντας στη μετατόπιση τους κατά μήκος των ενδοκυτταρικών μεμβρανών (17-19). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες οι μοριακοί συνοδοί βοηθούν στη διαδικασία αναδίπλωσης και διαμερισματοποίησης των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών, ενώ επίσης συμμετέχουν σε μια ποικιλία άλλων κυτταρικών λειτουργιών (20).

Ως μοριακοί συνοδοί ορίζονται οι πρωτεΐνες που προσδένουν, και έτσι σταθεροποιούν τις μη σταθερές μορφές άλλων πρωτεϊνών –μέσω της ελεγχόμενης πρόσδεσης και απελευθέρωσης, διευκολύνουν *in vivo* την απόκτηση σωστής δομής στο

χώρο, τη μεταφορά σε συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα, ή στην απομάκρυνση μέσω της αποδόμησης (21). Οι μοριακοί συνοδοί δεν καθορίζουν την τεταρτοταγή δομή των αναδιπλωμένων πρωτεϊνών αλλά τις βοηθούν να βρουν τη δομή τους πιο αποτελεσματικά. Ωστόσο, μόνο λίγοι συμπεριφέρονται ως αληθινοί καταλύτες αυξάνοντας το ρυθμό της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών οι οποίοι και καλούνται “καταλύτες αναδίπλωσης” (folding catalysts).

Η πλειοψηφία των μοριακών συνοδών αποτρέπει τις μη σωστές αλληλεπιδράσεις των νέο-συντιθεμένων πρωτεϊνών και τους επιτρέπουν την αυθόρμητη αναδίπλωση. Ο μηχανισμός αυτός αυξάνει την απόδοση, αλλά όχι το ρυθμό της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης (22). Οι μοριακοί συνοδοί είναι πρωτεΐνες πανταχού παρούσες και υψηλά συντηρημένες, οι οποίες πιθανότατα έχουν παίξει κάποιο κυρίαρχο ρόλο στην εξέλιξη των σύγχρονων ενζύμων (23). Οι μοριακοί συνοδοί είναι ζωτικής σημασίας για τα κύτταρα καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Ωστόσο, είναι ακόμα περισσότερο απαραίτητοι ύστερα από περιβαλλοντικό στρες το οποίο επάγει την πρωτεϊνική βλάβη. Οι μοριακοί συνοδοί παίζουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία πολυάριθμων ασθενειών και έχουν ένα συνεχώς αυξανόμενο ρόλο στην κλινική εφαρμογή (24).

Κατά την βιοσύνθεση των πρωτεϊνών, τα νεοσυντιθέμενα πολυπεπτίδια ανέρχονται από το ριβόσωμα έχοντας τις υδρόφοβες περιοχές τους εκτεθειμένες οι οποίες τελικά θα προστατευτούν στο εσωτερικό της αναδιπλωμένης πρωτεΐνης. Οι μοριακοί συνοδοί αναγνωρίζουν τις εκτεθειμένες υδρόφοβες περιοχές των πολυπεπτιδίων και έτσι αποτρέπουν τις μη κατάλληλες αλληλεπιδράσεις που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στη δημιουργία συσσωματωμάτων. Κατά την μετάφραση, οι μοριακοί συνοδοί συνεισφέρουν στην ωρίμανση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, είτε με το να βοηθούν στη σωστή αναδίπλωσή τους είτε με την μετατόπισή τους στα διάφορα ενδοκυτταρικά οργανίδια (24).

Οι μοριακοί συνοδοί δεν προσδένονται στα υποστρώματά τους μόνο για να εμποδίσουν άμεσα τη διαμοριακή συσσωμάτωση, με το να προστατεύουν τις περιοχές των μη-διαλυτών πολυπεπτιδικών αλυσίδων που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, αλλά επιπλέον, αποτρέπουν ή αντιστρέφουν την ενδομοριακή αναδίπλωση. Συγκεκριμένοι μοριακοί συνοδοί, όπως οι οικογένειες των *Hsp100* και *Clp* έχουν τη ικανότητα να ξετυλίγουν πρωτεΐνες ή να διαταράσσουν μικρά πρωτεϊνικά συσσωματώματα με έναν *ATP*-εξαρτώμενο μηχανισμό (19).

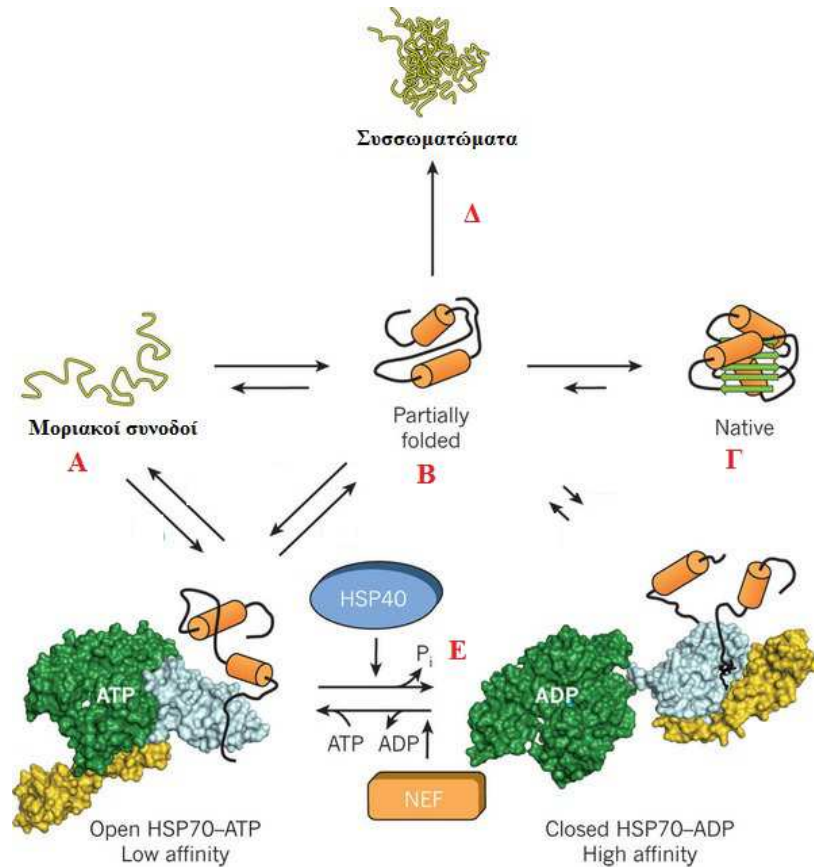
Οι *Hsps* κατατάσσονται στην οικογένεια των μοριακών συνοδών και είναι υπεύθυνες τόσο για τη διατήρηση των ανώτερων δομών άλλων πρωτεϊνών όσο και για τη σωστή διαμόρφωση τους, κατά τη βιοσύνθεσή τους και τη μεταφορά τους στα οργανίδια. Η δράση τους ως μοριακοί συνοδοί οφείλεται στην ικανότητά τους να αναγνωρίζουν και να προσδένονται στις υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνών οι οποίες κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσής τους, ή λόγω άλλων παραγόντων, είναι εκτεθειμένες (25).

1.1.4 Μοριακοί συνοδοί

Ο όρος μοριακός συνοδός χρησιμοποιήθηκε αρχικά, για την περιγραφή της λειτουργίας της νουκλεοπλασμίνης, μίας πυρηνικής πρωτεΐνης που διευκολύνει τη συγκρότηση της χρωματίνης, παρεμποδίζοντας ανορθόδοξες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιστονών και του *DNA* (26). Στη συνέχεια ο όρος γενικεύτηκε περιλαμβάνοντας ένα μεγάλο σύνολο ετερόλογων, αλλά λειτουργικά συσχετιζόμενων πρωτεϊνών οι οποίες υποβοηθούν την πρωτεϊνική αναδίπλωση και τη συγκρότηση άλλων πρωτεϊνών του κυττάρου (27). Προκειμένου μία πρωτεΐνη να χαρακτηριστεί ως μοριακός συνοδός, θα πρέπει να πληροί τα εξής κριτήρια:

- ✓ Δέσμευση σε πρωτεΐνες που εκθέτουν στην επιφάνειά τους υδρόφοβα αμινοξέα (28, 29).
- ✓ Ελεγχόμενη απελευθέρωση των προσδεδεμένων πολυπεπτιδίων (30, 31).
- ✓ Επαγωγή αλλαγών στη δομή των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων (32-34).

Ένα προτεινόμενο μοντέλο πρωτεϊνικής αναδίπλωσης φαίνεται στην εικόνα 1. Οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην κατηγορία των μοριακών συνοδών, είναι υψηλά συντηρημένες, με ευρεία κατανομή από τα βακτήρια έως τα κύτταρα των θηλαστικών (35).



Εικόνα 1: Πρωτεϊνική αναδίπλωση υποβοηθούμενη από μοριακούς συνοδούς. Τόσο η βιοσύνθεση πρωτεϊνών όσο και το κυτταρικό στρες μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία πολυπεπτιδίων τα οποία έχουν χάσει ή δεν έχουν χάσει την τριτοταγή τους διαμόρφωση (A). Τα μόρια αυτά θα πρέπει να αναδιπλωθούν μέσω διαφόρων ενδιάμεσων μορφών (B), μέχρις ότου φθάσουν τη φυσική και ταυτόχρονα λειτουργική τους διαμόρφωση. Οι ενδιάμεσες αυτές μορφές, είναι δυνατό να εκθέτουν στην επιφάνειά τους υδρόφοβα αμινοξέα, τα οποία και τις καθιστούν ευαίσθητες στη συσσωμάτωση (Δ). Οι μοριακοί συνοδοί αναγνωρίζουν και συνδέονται με τις επιφάνειες αυτές και παρεμποδίζουν τη συσσωμάτωσή τους. Επιπλέον, πρόσφατα δεδομένα, αναδεικνύουν τη δυνατότητα κάποιων μοριακών συνοδών να επαναδιαλυτοποιούν πρωτεΐνες που είναι εγκλωβισμένες στα συσσωμάτωματα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, μία ATP-εξαρτώμενη αλλαγή στη διαμόρφωση του μοριακού συνοδού, σηματοδοτεί την αποδέσμευση του πολυπεπτιδίου, το οποίο βρίσκεται υπό αναδίπλωση. Κάποια από τα μόρια που αποδεσμεύονται, είναι σε θέση να καταλάβουν την ορθή τους διαμόρφωση χωρίς επιπλέον βοήθεια από τους μοριακούς συνοδούς, κάποια άλλα μεταφέρονται σε άλλη μηχανή αναδίπλωσης (E), ενώ τέλος, τα υπολείποντα επαναδεσμεύονται στον ίδιο μοριακό συνοδό και συμμετέχουν σε ένα νέο κύκλο αναδίπλωσης. (36)

1.1.5 Οικογένειες πρωτεϊνών θερμικού σοκ

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ παίρνουν το όνομά τους ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Οι οικογένειες που έχουν μέχρι τώρα ταξινομηθεί είναι οι παρακάτω:

- ✓ Πρωτεΐνη θερμικού σοκ 100 kDa (HSP 100)
- ✓ Πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90 kDa (HSP 90)

- ✓ Πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70 kDa (HSP 70)
- ✓ Πρωτεΐνη θερμικού σοκ 60 kDa (HSP 60- chaperonin)
- ✓ Μικρές πρωτεΐνες θερμικού σοκ (alpha – clystalin proteins)

<u>Name</u>	<u>Localization</u>	<u>Function</u>
Hsp104	Cytoplasm	Releases proteins from aggregates
Hsp90α and β	Cytoplasm	Prevents protein aggregation, enables protein stabilization and trafficking, facilitates activation of numerous regulated proteins
Grp94	Endoplasmic reticulum	Quality control of protein processing in the endoplasmic reticulum
TRAP/Hsp75	Mitochondria	Unclear
Hsp70/Hsc70	Cytoplasm	Prevents protein aggregation, aids protein folding
Grp78/Bip	Endoplasmic reticulum	Protein import and folding in the endoplasmic reticulum
Hsp60/Chaperonins	Cytoplasm and mitochondria	Prevents protein aggregation, aids protein folding
Hsp47	Endoplasmic reticulum	Facilitates the folding and assembly of pro-collagen molecules, retaining unfolded molecules within the ER, and assisting the transport of correctly folded molecules from the ER to the Golgi apparatus.
Hsp40/HDJ2	Cytoplasm	Helps protein folding as a co-chaperone of Hsp70
Hsp32 (HO-1; small Hsps)	Endoplasmic reticulum, plasma membrane and mitochondria	Catalyzes first step of heme degradation to bilirubin, which has antioxidant properties.
Hsp27/25 (small Hsps)	Endoplasmic reticulum	Prevents protein aggregation, may have role in cell growth and differentiation
Alpha B crystallin (small Hsps)	Cytoplasm	Major eye lens protein. It inhibits TRAIL induced apoptosis in cancer. It confers a cyto-protective effect by suppressing aggregation of denatured proteins. It is constitutively expressed, often at high levels, in human cancers, including gliomas, breast, prostate and renal cell carcinomas.

Πίνακας 1: Οι οικογένειες πρωτεϊνών θερμικού σοκ, ο κυτταρικός εντοπισμός τους και η λειτουργία τους (37).

1.1.6 Η οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού σοκ 70kDa (Hsp70)

Οι οικογένεια *Hsp70* περιλαμβάνει υψηλά συντηρημένους (38-40) μοριακούς συνοδούς που ρυθμίζουν την πρωτεϊνική αναδίπλωση κατά τη διάρκεια φυσιολογικών συνθηκών αλλά και κάτω από συνθήκες στρες (41). Έχει βρεθεί σε όλους τους οργανισμούς, από τα αρχαιοβακτήρια και τα φυτά, μέχρι τους ανθρώπους. Μάλιστα η προκαρυωτική *Hsp70*, η *DnaK*, παρουσιάζει 50% ομολογία με τις ευκαρυωτικές *Hsp70* πρωτεΐνες. Αναλογικά, η *Hsp70* αποτελεί έναν υψηλά αξιόπιστο φυλογενετικά δείκτη εξέλιξης σε μοριακό επίπεδο. Έχει χρησιμοποιηθεί για να φανερώσει τη μονοφυλετική συγγένεια μεταξύ οργανισμών του βασιλείου των μεταζώων, αλλά και ως ένας αδιάσειστος φυλογενετικός δείκτης συγγένειας (91%) μεταξύ των ζώων και των μυκήτων (39, 41).

Η συντηρημένη αλληλουχία αμινοξέων αντανακλάται επίσης και από τις συντηρημένες λειτουργικές της ιδιότητες μεταξύ των ειδών. Για παράδειγμα, η *Hsp70* της

Drosophila, όταν εκφράζεται σε θηλαστικά κύτταρα, είναι ικανή να τα προστατεύει ικανοποιητικά από το θερμικό σοκ (42), ενώ και η *Hsp70* των τρωκτικών μπορεί να συμπληρωθεί λειτουργικά από την ανθρώπινη *Hsp70*, η οποία προσφέρει κυτταρική προστασία κατά διαφόρων ειδών στρες *in-vitro* (43), αλλά και σε διαγονιδιακά ζώα (44).

Η οικογένεια *Hsp70* αποτελεί την καλύτερα μελετημένη ομάδα των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς τα γονίδια των πρωτεϊνών αυτών αποτελούν πολυγονιδιακές οικογένειες των οποίων τα διάφορα μέλη εκφράζονται είτε σε φυσιολογικές συνθήκες είτε σε συνθήκες στρες (45, 46). Οι *Hsp70s* προωθούν την αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων στα ριβοσώματα, τη μετακίνηση των πρωτεϊνών κατά μήκος των μεμβρανών και την προστασία σε υψηλές θερμοκρασίες, δια μέσου αλληλεπιδράσεων με τις εκτεθειμένες υδροφοβικές επιφάνειες των μη-αναδιπλωμένων ή μερικώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών.

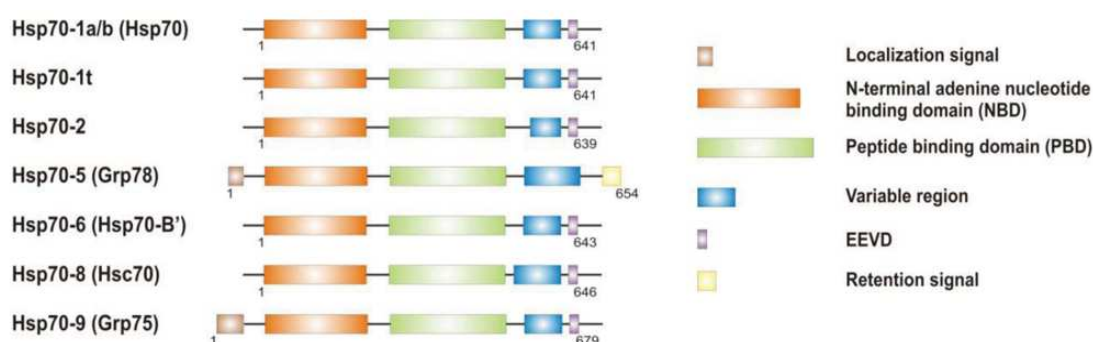
Όλοι οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν περισσότερα από ένα γονίδια που κωδικοποιούν *Hsp70* πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, στο μύκητα *Blastocladiella emersonii* υπάρχουν 10 υποτιθέμενα μέλη της οικογένειας με μεγάλη ομολογία με τις αντίστοιχες *Hsp70* της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*. Η ζύμη περιέχει οκτώ ομόλογες *Hsp70*, από τις οποίες οι έξι βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα (*Ssa1*, *Ssa2*, *Ssa3*, *Ssa4*, *Ssb1* και *Ssb2*) και δύο είναι ειδικά διαμερισματοποιημένες η *Ssc1* που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και η *Ssd1/Kar2* στο ενδοπλασματικό δίκτυο (47, 48). Γενετικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι οι τέσσερις *Ssa* πρωτεΐνες μπορούν να αλληλοσυμπληρώνονται, ενώ η ταυτόχρονη απαλοιφή τους είναι θανατηφόρα (47, 48). Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι η ζωτικής σημασίας λειτουργία των κυτταροπλασματικών *Ssa* πρωτεϊνών δεν μπορεί να αντικατασταθεί από τις *Ssb*, κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα κυτταροπλασματικά μέλη της οικογένειας των *Hsp70*, έχουν και αλληλοκαλυπτόμενες αλλά και διαφορετικές λειτουργίες στη ζύμη (41).

1.1.7 Η οικογένεια των Hsp70 στον άνθρωπο

Δομή και ρόλος

Η οικογένεια των *Hsp70s* στον άνθρωπο περιέχει τουλάχιστον οκτώ γονιδιακά προϊόντα που διαφέρουν μεταξύ τους στην αλληλουχία αμινοξέων, στο επίπεδο έκφρασης και στον υποκυτταρικό εντοπισμό τους (49). Ο εντοπισμός της *Hsp70-5* (Bip ή Grp78) και της *Hsp70-9* (mtHsp70 ή Grp75) περιορίζονται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου και στην μήτρα του μιτοχονδρίου αντίστοιχα, ενώ οι υπόλοιπες έξι *Hsp70* πρωτεΐνες κατανέμονται βασικά στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα γεγονός που υποδηλώνει ότι είτε έχουν ειδικότητα για την κάθε πρωτεΐνη που αποτελεί υπόστρωμά τους είτε εμπλέκονται σε συγκεκριμένες λειτουργίες ανεξάρτητες από αυτές μίας συνοδούς πρωτεΐνης. Όπως συμβαίνει γενικά με όλα τα είδη των *Hsp70* πρωτεϊνών, έτσι και με τις ανθρώπινες, η αλληλουχία των αμινοξέων τους αλλά και οι περιοχές της δομής τους είναι υψηλά συντηρημένες και είναι οι εξής (Εικόνα 2):

- ✓ μία συντηρημένη περιοχή με λειτουργία ATPάσης στο αμινοτελικό άκρο
- ✓ μία ενδιάμεση περιοχή με σημεία ευαίσθητα στις πρωτεάσες
- ✓ μία περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίων (18-kDa δίπλα στην ATPase περιοχή) και
- ✓ μία περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο πλούσια σε γλυκίνη και προλίνη (G/Richdomain) όπως επίσης και ένα μοτίβο των αμινοξέων γλουταμινικό-γλουταμινικό-βαλίνη-ασπαραγινικό (EEVDmotif) το οποίο και ενισχύει την πρόσδεση άλλων *Hsp* πρωτεϊνών αλλά και ομο-συνοδών πρωτεϊνών (50-52).



Εικόνα 2: Αναπαράσταση της δομής των μελών της οικογένειας *Hsp70* στον άνθρωπο (53).

Επιπλέον, τα μέλη που βρίσκονται εντοπισμένα σε ειδικά κυτταρικά διαμερίσματα έχουν κάποιο σήμα εντοπισμού στο αμινοτελικό τους άκρο και η *Hsp70-5* έχει κάποιο

σήμα συγκράτησης στο καρβοξυτελικό της άκρο, που δεν της επιτρέπει να εκκριθεί από το ενδοπλασματικό δίκτυο (54). Η συντηρημένη δομή των περιοχών των *Hsp70* πρωτεϊνών ενισχύει ουσιαστικά τη λειτουργία τους ως συνοδές πρωτεΐνες και τις καθιστά ικανές να συνδέονται, με έναν *ATP*-εξαρτώμενο τρόπο, με εκτεταμένες περιοχές υδροφοβικών αμινοξέων, που εκτίθενται λόγω της λανθασμένης αναδίπλωσης των πρωτεϊνών στις οποίες ανήκουν, και στη συνέχεια να τις απελευθερώνουν (21, 51).

1. *Hsp70-1a* και *Hsp70-1b*

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, όσων αφορά την οικογένεια των *Hsp70* στον άνθρωπο και τα βασικά μέλη της οικογένεια αυτής, δηλαδή την *Hsp70-1a* και την *Hsp70-1b* (κοινώς ονομαζόμενες *Hsp70-1*), επάγονται από διάφορα είδη στρες μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται και οι υψηλές περιβαλλοντικές θερμοκρασίες. Τα γονίδια *HSPA1A* και *HSPA1B* που κωδικοποιούν τις *Hsp70-1a* και *Hsp70-1b* αντίστοιχα, είναι στενά συνδεδεμένα, επάγονται από το στρες και δεν έχουν ιντρόνια (55, 56). Επίσης ανήκουν στη ομάδα *MHCIII* (μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας) που εντοπίζεται ανάμεσα στα γονίδια του συμπληρώματος και του *TNF* (Tumor Necrosis Factor) στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 6 (57).

Σύμφωνα με δημοσιευμένες ακολουθίες πρωτεϊνών οι *Hsp70-1a* και *Hsp70-1b* έχουν πάνω από 99% ομολογία αφού ουσιαστικά διαφέρουν μόνο σε δύο αμινοξέα από τα 641 συνολικά. Κατά τη διάρκεια διαφόρων συνθηκών στρες, και τα δύο γονίδια των *Hsp70-1* ενεργοποιούνται από την πρόσδεση ενός επαγόμενου από το στρες μεταγραφικού παράγοντα του *HSF1* (Heat Shock Factor 1), πάνω σε ρυθμιστικά στοιχεία του θερμικού σοκ (Heat Shock Elements: HSE), που βρίσκονται σε πολλαπλά αντίγραφα ανοδικά των ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων (57, 58).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η έκφραση των πρωτεϊνών *Hsp70-1* εξαρτάται και από τον τύπο των κυττάρων, αλλά και από τη συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου, αφού έχει παρατηρηθεί συσσώρευσή τους κατά την *G1* και *S* φάση (59). Ανάλογα και οι υποκινητές των *Hsp70-1* γονιδίων περιέχουν διάφορες θέσεις πρόσδεσης βασικών μεταγραφικών παραγόντων όπως οι *TATA* παράγοντες (*TATA*-factors), ο *CTF* (*CCAAT*-box-binding-transcription-factor) και ο *SPI* (60). Η βασική έκφραση των *mRNAs* που παράγονται από τα γονίδια *HSPA1A* και *HSPA1B* διαφέρει ελάχιστα στους περισσότερους

ιστούς και κυτταρικούς τύπους, αφού λίγο μεγαλύτερη έκφραση παρουσιάζει το *HSPA1A*. Οι επαγόμενες από στρες *Hsp70-1* λειτουργούν ως συνοδές πρωτεΐνες και καθιστούν το κύτταρο ικανό να χειρίζεται τα συσσωματώματα των αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών, κατά τη διάρκεια του στρες αλλά και μετά από αυτό (21, 61).

Σε μοριακό επίπεδο, η *Hsp70* είναι μία συνοδός πρωτεΐνη που καθοδηγεί τα μονοπάτια πρωτεϊνικής αναδίπλωσης (62), πρωτεϊνικής μετακίνησης, αλλά και πρωτεϊνικού καταβολισμού. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι οι λειτουργίες της *Hsp70* εκτελούνται σε συνεργασία με μία ομάδα ομο-συνοδών πρωτεϊνών, εκ των οποίων βασικά μέλη αποτελούν οι *Hsp40s*, οι οποίες συνδυασμένες με την *Hsp70* δημιουργούν λειτουργικές νανομηχανές συνοδών πρωτεϊνών (63-65). Η ενεργότητα αυτών φαίνεται να εξαρτάται από την κατάσταση στην οποία βρίσκεται η *Hsp70*. Στοιχεία σχετικά με τη ολιγομερή κατάσταση της *Hsp70* οδήγησαν στις προτάσεις ότι η *Hsp70* είναι ανενεργή στην ολιγομερή μορφή της, ενώ η λειτουργία της ως συνοδός πρωτεΐνη εκτελείται μόνο υπό τη μονομερή της μορφή (66, 67).

Κατά την εφαρμογή διαφόρων ειδών στρες (θερμότητα, ισχαιμία και οξειδωτικό στρες) που προκαλούν πρωτεϊνική καταστροφή, η υπερέκφραση των *Hsp70-1* πρωτεϊνών προσφέρει προστασία κατά του στρες σε κυτταροκαλλιέργειες (43, 68-75) και εμπλέκεται με τη θερμοευαισθησία, την βιωσιμότητα των κυττάρων (44, 76), καθώς και με τον κυτταρικό θάνατο (77). Επίσης σε επίπεδο ολόκληρου του οργανισμού η *Hsp70-1* φαίνεται να συσχετίζεται με παθολογικές καταστάσεις ή ασθένειες (44, 78) όπως το ισχαιμικό σοκ (79), οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες και ο καρκίνος.

Στην περίπτωση θερμικού σοκ, έχει αποδειχτεί ότι η λειτουργία της *Hsp70-1* ως συνοδού πρωτεΐνης είναι θεμελιώδης για την προστασία του κυττάρου, αφού έχει προταθεί ότι αναστέλλει τη συσσώρευση των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, αποσύροντας έτσι το ερέθισμα που θα οδηγούσε σε κυτταρικό θάνατο (80, 81). Επίσης η *Hsp70-1* προστατεύει τα μιτωτικά κύτταρα από ανωμαλίες διαίρεσης που συμβαίνουν εξαιτίας της επαγόμενης από θερμότητα καταστροφής του κεντροσωματίου (82). Όμως η *Hsp70-1* επίσης προστατεύει τα ποντίκια κατά της παγκρεατίτιδας και του *TNF* (83) και ενισχύει την επιβίωση των κυτταροκαλλιεργειών που εκτίθενται σε διάφορα ερεθίσματα, τα οποία όμως δεν είναι γνωστό ότι προκαλούν πρωτεϊνική αποδιάταξη και συσσωμάτωση, όπως είναι η ενεργότητα των υποδοχέων θανάτου της οικογένειας *TNF* υποδοχέων (84, 85) της ασιτίας

λόγω έλλειψης γλυκόζης (86), του κεραμιδίου (84), της δοξορουβικίνης (87), της υπεριώδους ακτινοβολίας (88), φαρμάκων που καταστρέφουν τους μικροσωληνίσκους (75) και κυτταρικών αλλαγών που σχετίζονται με τον καρκίνο (89, 90).

Νέα δεδομένα προτείνουν ότι στην προστασία κατά των παραπάνω ερεθισμάτων που αναφέρθηκαν, εμπλέκεται η *Hsp70-1* η οποία εντοπίζεται και στο εσωτερικό της μεμβράνης των λυσοσωμάτων (91-95). Σε αυτή τη θέση σταθεροποιεί τη λυσοσωμική μεμβράνη και αναστέλλει την απελευθέρωση των λυσοσωμικών υδρολασών στο κυτταρόπλασμα, όπου εκεί μπορούν να ξεκινήσουν κάποιο μονοπάτι αποπτωτικού θανάτου (91, 96, 97). Η παραπάνω ιδέα ενισχύεται από το γεγονός ότι στο πάγκρεας διαγονιδιακών ποντικών με έλλειψη της *Hsp70-1*, βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα ποσότητας και δραστικότητας της λυσοσωμικής καθεψίνης (83).

Τέλος η επαγωγή της *Hsp70-1* από τη θερμότητα έχει αποδειχθεί ότι συνοδεύεται και από τη μετακίνησή της στον πυρήνα των κυττάρων με συγκεκριμένη μάλιστα συσσώρευσή της στους πυρηνίσκους (98) οι οποίοι σε κάποιες δημοσιεύσεις θεωρούνται ότι συνιστούν σημαντικούς κυτταρικούς αισθητήρες του στρες (99). Είναι γνωστό ότι οι πυρηνίσκοι είναι πολυλειτουργικές πυρηνικές περιοχές, που εμπλέκονται στη ρύθμιση διαφόρων κυτταρικών διαδικασιών, όπως η βιογένεση των ριβοσωμάτων, η βιογένεση των μη-ριβοσωματικών ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων, η κυτταρική γήρανση και ο κυτταρικός κύκλος. Για αρκετές δεκαετίες δεν ξέραμε τον πραγματικό λόγο για τον οποίο η *Hsp70-1* μετακινείται και συσσωρεύεται στον πυρήνα και τον πυρηνίσκο κατά τη διάρκεια θερμικού σοκ. Έχει προταθεί ότι η *Hsp70-1* οδηγεί τις αποδιαταγμένες, λόγω θερμότητας, πυρηνικές πρωτεΐνες στον πυρηνίσκο κατά τη διάρκεια του στρες προκειμένου να αποτραπεί σε πρώτη φάση η τυχαία συσσωμάτωσή τους μέσα στον πυρήνα και στη συνέχεια να επιτευχθεί η επαναδίπλωσή τους σε επιτρεπτά επίπεδα που αποτρέπουν την έμμεση βλάβη σε άλλα πυρηνικά συστατικά (100).

Τελευταία δεδομένα υποστηρίζουν ότι η πυρηνισκική συσσώρευση της *Hsp70* (HSPA1) κατά την διάρκεια του στρες συσχετίζεται με την επιδιόρθωση των μονής αλυσίδας θραυσμάτων του πυρηνισκικού *DNA* (101).

2. *Hsp70-1t*

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την *Hsp70-1t* (HSPA1L) δεν έχει ιντρόνια και εδράζεται στην ίδια περιοχή (MHC class III region) όπως και τα γονίδια *HSPA1A* και *HSPA1B* (57). Η πρωτεΐνη είναι ομόλογη κατά 91% με την *Hsp70-1a*, αφού η βασική διαφορά τους εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο τους. Το γονίδιο *HSPA1L* δεν περιέχει καθόλου ρυθμιστικά στοιχεία του θερμικού σοκ (Heat Shock Elements: HSE) στην περιοχή του υποκινητή του και εκφράζεται διαρκώς σε υψηλά επίπεδα στους όρχεις ενώ σε χαμηλά επίπεδα σε άλλους ιστούς. Η λειτουργία και μεταγραφική της ρύθμιση είναι προς το παρόν άγνωστη.

3. *Hsp70-2*

Η πρωτεΐνη *Hsp70-2*, εκφράζεται διαρκώς σε χαμηλά επίπεδα στους περισσότερους ιστούς και σε υψηλά επίπεδα μόνο τους όρχεις και στον εγκέφαλο (102, 103). Το γονίδιο *HSPA2* που την κωδικοποιεί εντοπίζεται στο 14 χρωμόσωμα ενώ η πρωτεΐνη δείχνει ομολογία 84% με την *Hsp70-1a*. Η έκφρασή της είναι συχνά μειωμένη στους άνδρες με ανώμαλη σπερματογένεση (103) και αρσενικά διαγονιδιακά ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου *HSPA2* είναι στείρα λόγω της μαζικής απόπτωσης των σπερματοζωαρίων τους (104). Στα σπερματογόνια των ποντικών έχουν προσδιοριστεί ειδικοί ρόλοι της *Hsp70-2* ως θεμελιώδους συνοδούς πρωτεΐνης για το σύμπλεγμα κυκλίνης *B/cdc2* κατά τη διάρκεια της μειωτικής διαίρεσης (104) αλλά και για τις μεταβατικές πρωτεΐνες -1 και -2 (transition proteins -1 and -2) που εμπλέκονται στο πακετάρισμα του *DNA* κατά τη διαδικασία της μετα-μειωτικής αναδιοργάνωσης του γενώματος. Επιπλέον η *Hsp70-2* απαιτείται για την ανάπτυξη και την επιβίωση διαφόρων ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων (53, 90).

4. *Hsp70-5* (Bip ή Grp78)

Το γονίδιο *HSPA5* εδράζεται στο χρωμόσωμα 9 και κωδικοποιεί μία συνεχώς εκφραζόμενη ειδικά διαμερισματοποιημένη (compartment-specific) πρωτεΐνη την *Hsp70-5*. Η *Hsp70-5* (γνωστή και ως Bip ή Grp78) βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου και διευκολύνει τη μεταφορά των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου και την περαιτέρω αναδίπλωσή τους (54, 105, 106). Η *Hsp70-5* περιέχει μία ειδική αλληλουχία στο αμινοτελικό της άκρο μέσω της οποίας οδηγείται στο

ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου και εντοπίζεται. Στο τέλος του καρβοξυτελικού της άκρου υπάρχει ένα υψηλά συντηρημένο μοτίβο των αμινοξέων *KDEL* το οποίο είναι σήμα συγκράτησης στο ενδοπλασματικό δίκτυο και είναι κοινό για όλες τις διαλυτές πρωτεΐνες του (54).

5. *Hsp70-6*

Η *Hsp70-6* είναι ένα αυστηρά επαγόμενο από στρες μέλος της οικογένειας των *Hsp70* και κωδικοποιείται από το γονίδιο *HSPA6* το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 1. Η *Hsp70-6* έχει ομολογία 85% με την *Hsp70-1a* (107) και επάγεται μόνο μετά από σκληρές συνθήκες στρες (108). Αν και διαφέρει κατά 15% από τις δύο άλλες επαγόμενες από στρες *Hsp70* πρωτεΐνες (*Hsp70-1a* και *Hsp70-1b*), είναι πολύ πιθανό η *Hsp70-6* να λειτουργεί κατά ένα παρόμοιο τρόπο ως ένα εξάρτημα της γενικής απόκρισης στο στρες. Σύμφωνα με την πηγή πληροφοριών γονιδιακής έκφρασης *SymAtlas* (109), η *Hsp70-6* εκφράζεται σε μέτρια επίπεδα στο αίμα, ειδικά στα δενδρικά κύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικούς φονιάδες, αλλά σχεδόν απουσιάζει σε άλλα είδη κυττάρων του αίματος όπως επίσης και σε άλλους ιστούς. Διαγονιδιακά ποντίκια με έλλειψη της *Hsp70-6* δεν έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα και επομένως δεν είναι γνωστό εάν η *Hsp70-6* έχει κάποιες συγκεκριμένες λειτουργίες στα κύτταρα του αίματος. Το χρωμόσωμα 1 περιέχει επίσης ένα ψευδογονίδιο, το *HSPA7*, το οποίο ενώ μεταγράφεται ως απόκριση σε στρες, δεν κωδικοποιεί κάποια λειτουργική *Hsp70* πρωτεΐνη, λόγω προσθήκης ενός νουκλεοτιδίου στο κωδικόνιο στη θέση 340 το οποίο και δημιουργεί μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου με αποτέλεσμα να προκύπτει κωδικόνιο λήξης στη θέση 368 (107, 108).

6. *Hsp70-8, Hsc70*

Το γονίδιο *HSPA8* εδράζεται στο χρωμόσωμα 11 και εκφράζεται συνεχώς στους περισσότερους ιστούς (110). Το γονίδιο *HSPA8* κωδικοποιεί το «συγγενές» (cognate) μέλος της *Hsp70* οικογένειας την *Hsc70* (*Hsp70-8*), η οποία παρουσιάζει 86% ομολογία με την *Hsp70-1a*. Έχει αναφερθεί ότι η *Hsc70* εμπλέκεται σε ένα μεγάλο πλήθος θεμελιωδών λειτουργιών των συνοδών πρωτεϊνών όπως η αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδίων, πρωτεϊνική μεταφορά διαμέσου μεμβρανών, αυτοφαγοκυττάρωση σχετιζόμενη με συνοδές πρωτεΐνες, αποφυγή συσσωμάτωσης πρωτεϊνών υπό συνθήκες στρες και αποσυναρμολόγηση κυστιδίων περιβαλλομένων από κλαθρίνη (12, 51). Οπότε η

Hsc70 θεωρείται ως ένα θεμελιώδες για την επιβίωση γονίδιο γι αυτό άλλωστε και δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα διαγονιδιακό ποντίκι που να παρουσιάζει έλλειψη της (111). Αναλογικά και η γονιδιακή αποσιώπηση της *Hsc70* με τεχνολογία *siRNA* σε διάφορους κυτταρικούς τύπους έχει οδηγήσει σε μαζικούς θανάτους (90).

Πρόσφατα η *Hsc70* έχει επωμιστεί έναν ενδιαφέροντα ρόλο στην εμπλεκόμενη από κυτοκίνη (cytokine) μετα-μεταγραφική ρύθμιση της *Bim* (μέλος της προαποπτωτικής οικογένειας Bcl-2) στα ανθρώπινα κύτταρα αίματος (112). Η *Hsc70* προσδένεται σε σημεία πλούσια σε AU στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA της πρωτεΐνης *Bim* (Bcl2 interacting mediator of cell death) και έτσι το σταθεροποιεί με τρόπο εξαρτώμενο από την παρουσία ομο-συνοδού πρωτεΐνης. Αυτό δείχνει ότι οι δυνατότητες της *Hsc70*, ως συνοδού πρωτεΐνης, δεν περιορίζονται μόνο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών.

7. *Hsp70-9*

Το γονίδιο *HSPA-9* εδράζεται στο χρωμόσωμα 5 και δεν επάγεται από στρες. Η πρωτεΐνη *Hsp70-9* (mtHsp70) έχει ομολογία 52% με την *Hsp70-1a* και 65% με την SSC1 (αντίστοιχη μιτοχονδριακή Hsp70 στη ζύμη) (53, 113-115). Ένα ειδικό σήμα 42 αμινοξέων στη δομή της μεταφέρει την *Hsp70-9* στη μιτοχονδριακή μήτρα, όπου αλληλεπιδρά με τις εισερχόμενες πρωτεΐνες και τις βοηθάει στη σωστή αναδίπλωση μετά τη διαμεμβρανική μεταφορά τους (115). Η έλλειψη της *Ssc1* στη ζύμη είναι θανατηφόρος (116), ενώ δεν έχει κατασκευαστεί ακόμη διαγονιδιακό ποντίκι με την ίδια έλλειψη.

1.1.8. Hsps και καρκίνος

Οι Heat shock proteins, όπως η Hsp70, Hsp27 και Hsp90, καταστέλλουν την απόπτωση, μέσω της απευθείας αλληλεπίδρασης με τα αποπτωτικά μόρια, και επίσης υπερεκφράζονται σε διάφορα καρκινικά κύτταρα. Όπως στην περίπτωση της HSP27, η οποία ενισχύει την καρκινογένεση των κυττάρων του καρκίνου του παχέως εντέρου (117). Η HSP70 εκφράζεται πολύ συχνά σε όγκους του καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο. Η ύπαρξη της HSP90 έχει αναφερθεί στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη (118).

Οι HSPs προσδένονται στις κασπάσες, καταστέλλοντας την ενεργοποίησή τους (119). Η μειορρυθμική της Hsp70 από τα καρκινικά κύτταρα μέσω διαφόρων μεθόδων επάγει την απόπτωσή τους (120). Η μειορρυθμική της Hsp90 στα καρκινικά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου. Η γήρανση και διάφορες ασθένειες, όπως η νευροεκφυλιστικές ασθένειες, επάγουν την συσσώρευση των κατεστραμμένων πρωτεϊνών λόγω του οξειδωτικού στρες.

Οι όγκοι υπόκεινται σε γρήγορη ανάπτυξη, χάρη στον αυξημένο πολλαπλασιασμό. Όλες οι συμβατικές αντικαρκινικές θεραπείες (χημειοθεραπεία, ραδιοθεραπεία, υπερθερμία κ.ο.κ.) επάγουν τις heat shock πρωτεΐνες στα κύτταρα που επιβιώνουν. Η υπερέκφραση της Hsp70 μπορεί να βοηθήσει σε συσσώρευση των κρυφών μεταλλάξεων στους καρκινικούς όγκους, κάτι που μπορεί να βοηθήσει στην μετέπειτα εξέλιξή τους σε πιο επιθετικές μορφές μεταστατικών κυττάρων (23, 121). Πράγματι, η επαγωγή της Hsp70 από την υπερθερμία και τα αντικαρκινικά φάρμακα έχει μελετηθεί και αποδείχθηκε ότι ήταν πιο αποτελεσματική σε χημειοανθεκτικούς καρκινικούς όγκους (122).

Σε αντίθεση με τα κανονικά κύτταρα, η αναστολή της Hsp70, Hsp90 και Hsp27 είναι θανατηφόρος για τα κύτταρα όγκου (123). Μια μείωση των επιπέδων έκφρασης της Hsp70 σκοτώνει τα καρκινικά κύτταρα, είτε αυτά βρίσκονται σε καλλιέργεια κυττάρων *in vitro*, είτε *in vivo* σε μοντέλα μοσχεύματος όγκου σε ποντικούς (123). Τα καρκινικά κύτταρα που σταματούν να εκφράζουν την Hsp70, συνήθως πεθαίνουν μέσω του λυσοσωμικού αποπτωτικού μονοπατιού (124). Η Hsp70 αναστέλλει την απόπτωση (125, 126). Οι Hsp90 και Hsp70 δρουν αντι-αποπτωτικά εξουδετερώνοντας άμεσα το αποπτώσωμα μέσω του καθοδηγούμενου μονοπατιού από την κασπάση-9- (127), ή εμποδίζοντας τους, ανεξάρτητους από τις κασπάσες, παράγοντες κυτταρικού θανάτου, όπως ο παράγοντας ενεργοποίησης της απόπτωσης (AIF) (127, 128). Η Hsp70 αναστέλλει την μιτοχονδριακή οδό απόπτωσης, αναστέλλοντας την Araf-1-εξαρτώμενη ενεργοποίηση των κασπασών 9 και 3 και αναστέλλει επίσης τη δραστηριότητα της κασπάσης 3 (129).

Η μείωση της Hsp70 στο κύτταρο, οδηγεί σε πρόωρη γήρανση σε αρκετές καρκινικές κυτταρικές σειρές (130), η οποία μπορεί να προκληθεί από αναστολές του κυτταρικού κύκλου p16 και p21 (131). Υψηλά επίπεδα Hsp70-1 και Hsp70-2 προκαλούν μείωση στην p53 που με τη σειρά της μπορεί ή να προκαλέσει επαγωγή της p21 και να οδηγήσει σε

γήρανση (90, 132) ή να προκαλέσει αντίθετα αποτελέσματα (μείωση της ρ_{21}) και να οδηγήσει το κύτταρο σε απόπτωση (133-135).

1.2. ANΕΣΤΙΑ

1.2.1 Αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος μέσω ανέστιας

Ο όρος ανέστια αποδίδεται στον κυτταρικό θάνατο που προέρχεται από την αποκόλληση των κυττάρων από το φυσιολογικό τους υπόστρωμα. Χρησιμοποιήθηκε πρωταρχικά από τους *Frisch* και *Meredith*, στις αρχές της δεκαετίας του '90, για να περιγράψει την επαγωγή απόπτωσης σε επιθηλιακά κύτταρα *MDCK* (Madin-Darby canine kidney cells) και σε ινοβλάστες, αντίστοιχα, που είχαν χάσει την επαφή τους με το υπόστρωμα. Η λέξη ανέστια αποδόθηκε στο φαινόμενο αυτό, από τους μελετητές, καθώς αντιστοιχούσε στη λέξη άν-οικος η οποία περιγράφει τον άστεγο (136, 137). Η ανέστια έχει παρατηρηθεί, από τότε, σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, όπως ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα του μαστού, του εντέρου και του νεφρού, καθώς και σε νευρικά κύτταρα (138). Φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, ενώ πιστεύεται ότι συμβάλλει στη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών (138).

Ωστόσο, η ανέστια έχει συσχετισθεί και με την παθογένεια ορισμένων νοσημάτων. Για παράδειγμα, σε παθήσεις του δέρματος η απώλεια της επαφής μεταξύ των κυττάρων οδηγεί τα κερατινοκύτταρα σε απόπτωση, ενώ σε περιπτώσεις ισχαιμίας, τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου αποκολλούνται από τις λάχνες και οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο (139). Επιπλέον, η μελέτη της ανέστιας θεωρείται ότι προσφέρει σημαντικά στην έρευνα της φυσιολογίας της νεοπλασίας, καθώς υποστηρίζεται ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα εμφανίζουν χαρακτηριστικά, που τα καθιστούν ανθεκτικά στην ανέστια και γι' αυτό έχουν την ικανότητα της μετάστασης (140).

Οι παραπάνω έρευνες, λοιπόν, υποδεικνύουν ότι ορισμένα κύτταρα χρειάζονται την επαφή, τόσο με το κυτταρικό υπόστρωμα όσο και με τα γειτονικά κύτταρα, για να αποφύγουν τον αποπτωτικό θάνατο. Αυτό συμβαίνει, γιατί τα κύτταρα

πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται μόνο σε κατάλληλο για αυτά ιστικό περιβάλλον και υποβάλλονται σε αποπτωτικό θάνατο όταν απομακρυνθούν από αυτό. Έτσι, έχουν αναπτύξει, γι' αυτό το σκοπό, την ικανότητα να «αισθάνονται» τη θέση τους, με τη βοήθεια αλληλεπιδράσεων τόσο με το εξωκυττάριο υπόστρωμα όσο και με τα γειτονικά κύτταρα. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές βασίζονται σε μόρια προσκόλλησης, όπως για παράδειγμα είναι οι ιντεγκρίνες. Στην επαγωγή της απόπτωσης, που ακολουθεί την αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα, έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν μόρια της οικογένειας *Bcl-2*. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η ανέστια δεν επάγεται από μία μοναδική οδό μεταγωγής σήματος, και γι' αυτό θεωρείται ένα αρκετά πολύπλοκο βιολογικό φαινόμενο που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Παρακάτω αναφέρονται ορισμένοι πιθανοί μηχανισμοί της ανέστιας (141).

1.2.2 Μηχανισμοί επαγωγής της ανέστιας

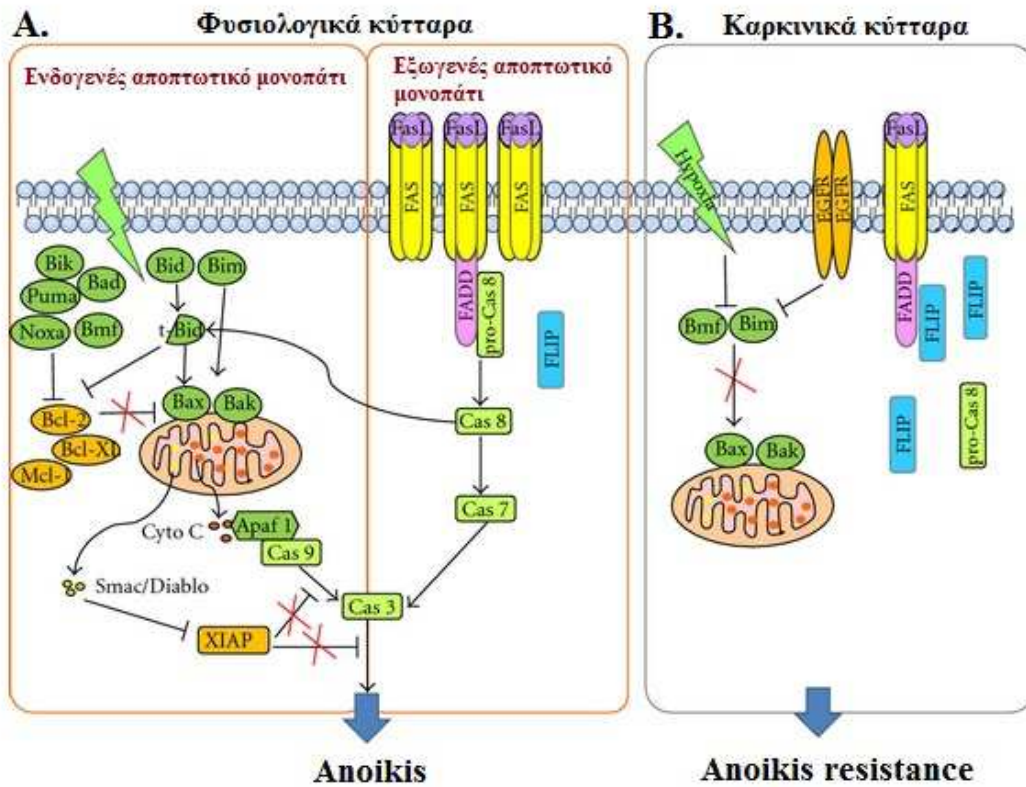
Όπως προαναφέρθηκε, σε ορισμένους ιστούς, η επαφή των κυττάρων με το υπόστρωμα και με τα γειτονικά κύτταρα είναι απαραίτητη για την επιβίωσή τους. Έχει, επίσης, αποδειχθεί ότι οι αλληλεπιδράσεις αυτές, ρυθμίζονται από την ενεργοποίηση υποδοχέων προσκόλλησης και την επακόλουθη διέγερση ενδοκυττάρων οδών σηματοδότησης, παρέχοντας έτσι, στα κύτταρα τα επονομαζόμενα μηνύματα επιβίωσης. Οι ιντεγκρίνες θεωρείται ότι δρουν με έναν τρόπο αντίστοιχο με αυτό των υποδοχέων των παραγόντων ανάπτυξης (GFR, growth factor receptors) και ότι σε ορισμένες περιπτώσεις αντιδρούν με τους τελευταίους, προάγοντας την επιβίωση των κυττάρων (141). Η ύπαρξη του φαινομένου της ανέστιας επιβεβαιώνει, επίσης, ότι η σηματοδότηση μέσω των ιντεγκρινών συμμετέχει σε αποπτωτικούς μηχανισμούς. Έχει δειχθεί, ότι η ρυθμιζόμενη προσκόλληση των κυττάρων, που εξασφαλίζεται με τη δράση των ιντεγκρινών, καθορίζεται από τις ίδιες οδούς σηματοδότησης που ελέγχουν την απόπτωση σε διάφορες κυτταρικές συνθήκες, όπως στην επιβίωση που ορίζεται από τους παράγοντες ανάπτυξης, στις αποκρίσεις που ακολουθούν τη βλάβη του *DNA* ή στην ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου (142).

Στη μεταγωγή σήματος μέσω των ιντεγκρινών σημαντικό ρόλο έχει αποδειχθεί ότι παίζει η κινάση *FAK* (Focal adhesion kinase), η δράση της οποίας θεωρείται ότι

προστατεύει τα κύτταρα από την ανέστια. Η κινάση *FAK* ενεργοποιείται μέσω αυτό-φωσφορυλίωσης, ύστερα από την προσκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμα, και διεγείρει ενδοκυττάριας οδούς, που καταλήγουν στην ενεργοποίηση άλλων μορίων, όπως οι κινάσες της οικογένειας *MAP* και η κινάση *PI3K* (142). Η αναστολή της δράσης της κινάσης *FAK* σε νεοπλασματικά κύτταρα οδηγεί στην επαγωγή θανάτου, ύστερα από την αποκόλληση των κυττάρων (143).

Ο κυτταρικός θάνατος, που ακολουθεί την αποκόλληση από το υπόστρωμα, εμφανίζει τα κλασικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα αποκολλημένα κύτταρα παραμένουν για κάποιο διάστημα βιώσιμα, ενόσω ενεργοποιούνται τα αποπτωτικά μόρια. Όσον αφορά την επαγωγή της απόπτωσης, έχει αναφερθεί ότι σε ορισμένα είδη κυττάρων η ενεργοποίηση των κασπασών είναι επαρκής, ενώ σε άλλα είδη η ενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών μορίων της οικογένειας *Bcl-2* από τις κασπάσες είναι απαραίτητη. Στην περίπτωση του φαινομένου της ανέστιας δεν είναι ακόμα εμφανές ποια από τις δύο οδούς απαιτείται (141). Ωστόσο, έρευνες των τελευταίων ετών υποστηρίζουν ότι η επαγωγή της απόπτωσης, μέσω ανέστιας, ρυθμίζεται από μία εξωγενή και από μία ενδογενή οδό σηματοδότησης. Η πρώτη - εξωγενής οδός (Εικόνα 3^A δεξιό ένθετο) περιλαμβάνει τη διέγερση υποδοχέων θανάτου, όπως ο *Fas* και ο *TNFR* και ακολούθως την ενεργοποίηση των κασπασών, ενώ η δεύτερη - ενδογενής οδός (Εικόνα 3^A αριστερό ένθετο) περιλαμβάνει τη διαπερατότητα των μιτοχονδρίων, που συμβαίνει ως συνέπεια της ενεργοποίησης των κασπασών, και στην οποία συμμετέχουν μόρια της οικογένειας *Bcl-2* (141).

Μελέτες έχουν υποδείξει ότι η αποκόλληση των κυττάρων αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του αποπτωτικού μορίου *Fas*, ενώ παράλληλα ενεργοποιεί διαδοχικά και τα μόρια των κασπασών (138). Αντίθετα, η προσκόλληση στο υπόστρωμα έχει βρεθεί ότι καταστέλλει την ενεργοποίηση του υποδοχέα *Fas*, μέσω της επαγωγής του μορίου *cFLIP*, ενός ανταγωνιστή της κασπάσης 8 (144). Παραμένει, όμως, υπό διερεύνηση ποιο είναι το βιοχημικό γεγονός που συνδέει τη διάσπαση της δράσης των ιντεγκρινών, η οποία οδηγεί στην αποκόλληση των κυττάρων, με την ενεργοποίηση των παραπάνω αποπτωτικών οδών.



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση των ενδογενών και εξωγενών οδών της ανοικίς. Όταν τα κύτταρα αποκολλώνται από την εξωκυττάρια ουσία (ECM), τα φυσιολογικά κύτταρα επάγουν την ανοικίς απόπτωση, μέσω τόσο ενδογενών και εξωγενών οδών. Μετά την αποκόλληση του κυττάρου, τα μόρια FAS και FasL αυξο-ρυθμίζονται και το μόριο flip μειο-ρυθμίζεται, οδηγώντας σε ενεργοποίηση της κασπάσης 8, που ακολουθείται από την ενεργοποίηση της κασπάσης-7 και κασπάσης-3. Η απώλεια της κυτταρικής προσκόλλησης αυξάνει επίσης και ενεργοποιεί τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 (Bik, Puma, Bad, Noxa, BMF, Bid, Bim, Bax και Bak), οι οποίες απενεργοποιούν τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1), και έτσι προκαλούν τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης, μέσω του ολιγομερισμού των Bax / Bak. Η έξοδος του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια ενεργοποιεί την κασπάση-9 και ακολούθως την κασπάση-3. Η Smac / DIABLO απελευθερώνεται και αναστέλλει τον αναστολέα XIAP, έναν αναστολέα της απόπτωσης, οδηγώντας σε ενεργοποίηση της κασπάσης-3. Η ενεργοποίηση αυτών των οδών οδηγεί σε ανοικίς απόπτωση. Ωστόσο, η αυξημένη έκφραση FLIP σε καρκινικά κύτταρα αναστέλλει την εξωγενή οδό και την έκφραση των ογκογονιδίων, όπως ο EGFR και η υποξία μειο-ρυθμίζουν τα BMF και Bim, με αποτέλεσμα την αναστολή της μιτοχονδριακής οδού σε κύτταρα αποκολλημένα από την ECM και αιωρούμενα. Συνεπώς, τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν αντίσταση στην ανοικίς απόπτωση (anoikis resistance) (145).

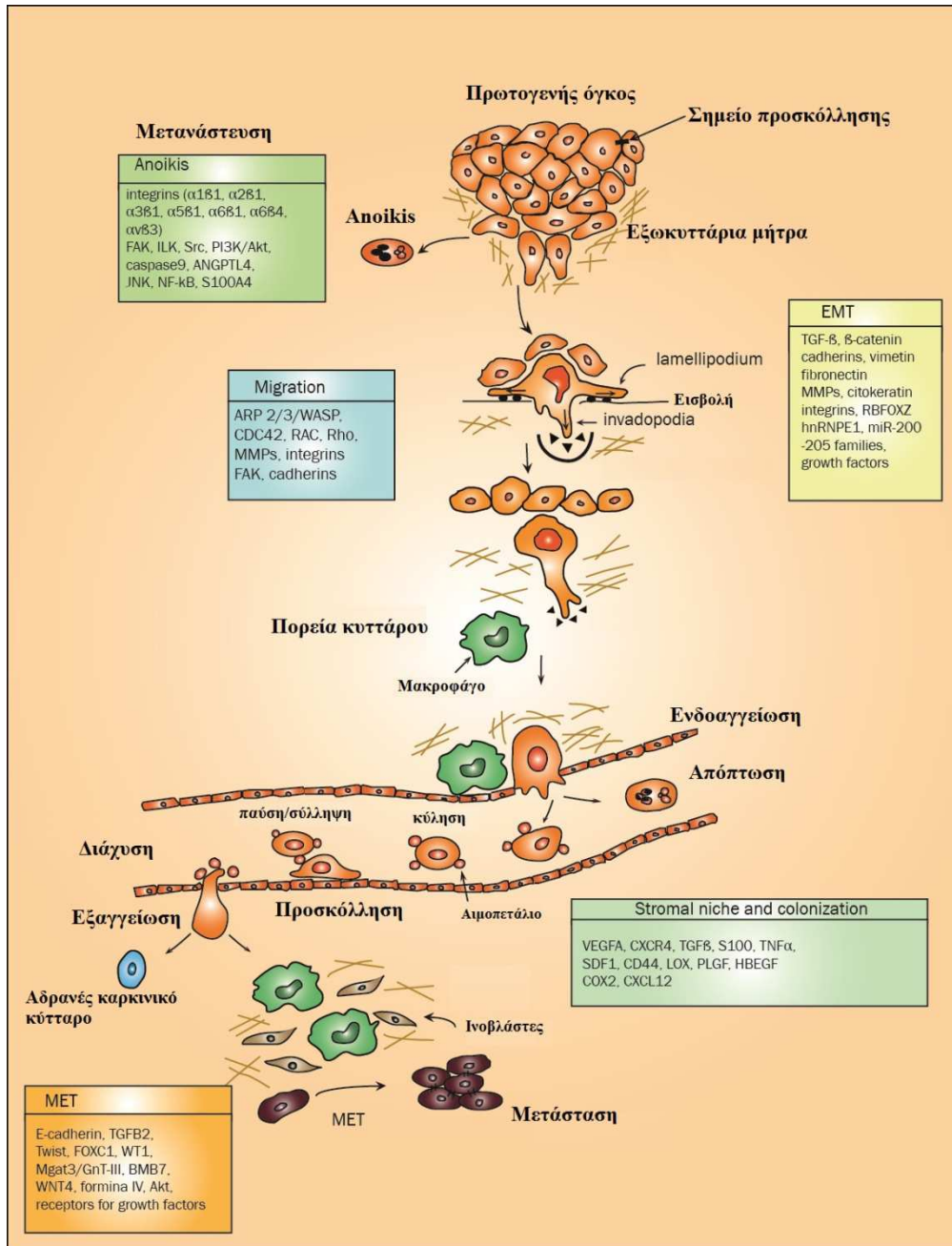
1.2.3 Ανέστια και μεταστατικότητα

Κατά την διάρκεια της διαδικασίας της ογκογένεσης, μερικά κύτταρα διαχωρίζονται από τον υπόλοιπο όγκο για να εισβάλουν σε απομακρυσμένους ιστούς. Η κυτταρική μετανάστευση σε αυτή την διαδικασία μοιάζει με τις διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την εμβρυακή ανάπτυξη και την επούλωση των πληγών. Σε αντίθεση όμως με αυτές

τις δύο υγιείς διαδικασίες, οι οποίες περιλαμβάνουν την δημιουργία μιας δομής ή την θεραπεία ενός ιστού, η μετάσταση έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία μιας κυτταρικής μάζας η οποία, αν δεν εξουδετερωθεί, οδηγεί στον θάνατο του οργανισμού. Η διαδικασία της μετανάστευσης συμπεριλαμβάνει την εισβολή, στην βασική μεμβράνη και στον γειτονικό της ιστό, από καρκινικά κύτταρα και την ενδαγγείωση προς τα αιμοφόρα αγγεία ή την διείσδυση στα λεμφαγγεία.

Την εισβολή ακολουθεί η λειτουργία των μηχανισμών επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων σε αυτά τα αγγεία και η εξαγγείωση τους σε διαφορετικούς ιστούς του οργανισμού, εκεί όπου θα έχουν την δυνατότητα να πολλαπλασιαστούν. Αυτή η διαδικασία απαιτεί έναν ακριβή συγχρονισμό διαφόρων σηματοφόρων μονοπατιών, τα οποία επιτρέπουν στα κύτταρα να κινούνται μέσα από την κυτταρική μεμβράνη, να μεταφέρουν τους εαυτούς τους μέσω της κυκλοφορίας (146) και να δημιουργούν τις κατάλληλες συνθήκες, για την μετεγκατάστασή τους σε ένα διαφορετικό όργανο (Εικόνα 4).

Παρόλο που η εξερεύνηση αυτής της περίπλοκης διαδικασίας της κινητικότητας και της εισβολής των καρκινικών κυττάρων είναι θεμελιώδης για την εμφάνιση της κατανόησης της μετάστασης (147), πολλά πράγματα παραμένουν μυστηριώδη, παρά τον τεράστιο όγκο της έρευνας που διεξάγεται σε αυτόν τον τομέα. Και σε συνθήκες *in vitro*, και σε συνθήκες *in vivo*, ο χρόνος που απαιτείται για την ανάλυση της εξέλιξης αυτής της παθογένειας είναι τεράστιος. Σήμερα, ο καλύτερος τρόπος για την διενέργεια λειτουργικών εκτιμήσεων των γενετικών αλλαγών που λαμβάνουν χώρα στους ανθρώπους με μετάσταση, είναι με την χρήση ζωικών μοντέλων. Παρόλο που είναι χρονοβόρο, μια πλήρης ακολουθία μπορεί να καταγραφεί από την πλήρη αυτή διαδικασία, από την στιγμή της εμφάνισης του πρωταρχικού όγκου, μέχρι τις στρατηγικές που χρησιμοποιούνται από τα καρκινικά κύτταρα για να διαφύγουν από τον έλεγχο της προσκόλλησης, την αλληλεπίδρασή τους με τα ενδοθηλιακά κύτταρα κατά την διάρκεια της μετάστασης, και την εγκαθίδρυση ενός δευτερεύοντος όγκου μέσω της προετοιμασίας ενός καινούργιου μικροπεριβάλλοντος, κατάλληλο για την ανάπτυξη όγκων στο προσβεβλημένο όργανο.



Εικόνα 4: Η μεταστατικότητα των κυττάρων έπεται από ανέστια. Ο διαχωρισμός των καρκινικών κυττάρων από έναν πρωτογενή όγκο και η μετανάστευσή τους, για την είσοδό τους σε αιμοφόρο αγγείο και τη διάδοσή τους σε μια δευτερεύουσα θέση, είναι μια πολύ σύνθετη διαδικασία που περιλαμβάνει αλλαγές στην έκφραση πολλαπλών γονιδίων, τα οποία εμπλέκονται στην κυτταρική προσκόλληση, την επιβίωση, χημειοπροσέλκυση, αυξητικούς παράγοντες και miRNAs (μετάφραση από (148)).

1.2.4 Κυτταρική εισβολή

Τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να αποκτήσουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, προκειμένου να λάβει χώρα η κυτταρική μετανάστευση, όπως η πόλωση και ο

αποσυσχετισμός τους από το σημείο προέλευσής τους. Μετέπειτα, αυτά τα κύτταρα πρέπει να περάσουν από πολλαπλούς κύκλους διαστολής και συστολής, και ταυτόχρονα προσκολλώνται και απελευθερώνονται από το υπόστρωμα (149) για να μετακινηθούν από το ένα μέρος στο άλλο. Στην διάρκεια αυτής της διαδικασίας, η φυσική τους μορφή αλλάζει ριζικά.

Η δυνατότητα των κυττάρων να μεταναστεύουν, μελετήθηκε από το 1863, μετά την ανακάλυψή της από τον *Virchow*, τους επιτρέπει να φέρνουν εις πέρας διάφορες διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων της εμβρυογένεσης, της αγγειογένεσης και της επούλωσης των πληγών μετά την ενεργοποίησής τους από τον ανοσοποιητικό σύστημα (150). Η κυτταρική μετανάστευση μπορεί να χωριστεί σε στάδια, ανάλογα με τις αλλαγές που παρατηρούνται στην μορφολογία του κυττάρου: πόλωση, προεξοχή, προσκόλληση, μετατόπιση του σώματος του κυττάρου, και σύμπτυξη (Εικόνα 4). Η φυσιολογία της κυτταρικής μετανάστευσης είναι περίπλοκη, εξαρτώμενη από τον τύπο του εμπλεκόμενου κυττάρου (151). Για παράδειγμα, οι ινοβλάστες και τα μελανοκύτταρα γενικά μεταναστεύουν μεσεγγυματικά, ως αυτόνομα κύτταρα με υψηλό βαθμό προσκόλλησης (152, 153). Αυτά τα κύτταρα σχηματίζουν ειδικές προεξοχές στην μεμβράνη τους, ανάμεσα στις οποίες είναι τα ελασματοπόδια, οι οποίες είναι προβολές ακτίνης του κυτταρικού σκελετού που σχηματίζεται στο ακραίο μπροστινό τμήμα του εν κινήσει κυττάρου, και τα ψευδοπόδια, τα οποία είναι ενεργές πρωτεολυτικές προεξοχές της πλασματικής μεμβράνης, υπεύθυνες για την εστιακή υποβάθμιση των συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας (ECM).

1.2.5. Επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης

Η μεταστατική διαδικασία έχει διάφορα αργά βήματα, και συνεπώς μόνο μια μειονότητα των καρκινικών κυττάρων μπορούν να φτάσουν σε απομακρυσμένα μέρη. Έχει προταθεί ότι περίπου το 0,01% των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων μπορούν να καταφέρουν να προκαλέσουν μια μετάσταση (154). Η Ταλίνη 1 είναι μια από τις πρωτεΐνες της οποίας η αλλαγμένη έκφραση επιτρέπει την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Μπορεί να επιστρατεύσει τις πρωτεΐνες ειδικής πρόσδεσης *ILK*, *FAK* και *Src* μέσω της αλληλεπίδρασής της με την ιντεγκρίνη β, με αποτέλεσμα την προαγωγή της επιβίωσης, της

εισβολής και της αγγειογένεσης στα καρκινικά κύτταρα. Η υπερέκφρασή της επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να ενεργοποιήσουν τα σήματα επιβίωσης και να αντισταθούν στον θάνατο λόγω ανέστιας (155). Με αυτή την έννοια, τα σηματοφόρα μονοπάτια *PI3K/Akt* και *Wnt/b-κατενίνης*, μαζί με τις μεταλλάξεις στην *p53* και στα άλλα γονίδια, διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην αποφυγή του θανάτου από τα μεταστατικά κύτταρα.

Η προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (**ECM: ExtraCellular Matrix**) δεν είναι επαρκής για την επαγωγή του μονοπατιού της επιβίωσης. Οι αλλαγές στον κυτταροσκελετό που σχετίζονται με τα σήματα της προσκόλλησης είναι κρίσιμες για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Οι *Halder* και *Johnson* (156) υποδεικνύουν ότι, το προσφάτως εγκαθιδρυμένο μονοπάτι του καταστολέα *Hippo* (το οποίο ρυθμίζει το μέγεθος των οργάνων μέσω της διατήρησης της ισορροπίας ανάμεσα στον πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση σε φυσιολογικές συνθήκες), μπορεί να εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Τα *Hippo* μονοπάτια φωσφορυλιώνουν και επάγουν τον μεταγραφικό συν-ενεργοποιητή (YAP), ένα σημαντικό ογκογονίδιο για την ρύθμιση του μεγέθους των οργάνων. Αυτή η απενεργοποίηση πυροδοτείται από την αναδιάταξη του κυτταρικού σκελετού.

1.2.6. Ο ρόλος των ιντεγκρινών στην κυτταρική επιβίωση και στην απόπτωση (ανέστια)

Η απώλεια την ισορροπίας μεταξύ της κυτταρικής διαίρεσης και του κυτταρικού θανάτου είναι συνήθης στον καρκίνο, λόγω της μείωσης του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου, κάτι που οδηγεί στην εξέλιξή του σε καρκινικό όγκο. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι με τους οποίους ένα κακόηθες καρκινικό κύτταρο αποτρέπει ή αντιστέκεται στην απόπτωση.

Τα διακριτά μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης είναι η συμπύκνωση της χρωματίνης και ο μετέπειτα κατακερματισμός τους πυρήνα, συνοδευόμενος από μια μείωση του κυτταρικού όγκου, μια σύμπτυξη των ψευδοποδιών, και τον σχηματισμό των κενотоπίων, όπου όλα οδηγούν στην απώλεια της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης (157). Οι βιοχημικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την απόπτωση είναι: i) η ενεργοποίηση

των κασπασών, ii) η θραύση του *DNA* και των πρωτεϊνών, και iii) οι αλλαγές στην μεμβράνη που σχετίζονται με αναγνώρισή της από τα φαγοκύτταρα (158).

Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αποφύγουν την απόπτωση με αλλαγή της ισορροπίας των προ- και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, μειώνοντας την λειτουργία των κασπασών, και αλλάζοντας τα σήματα των υποδοχέων που σχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο. Ένα καρκινικό κύτταρο σε ξένο μέρος, είτε κοντά σε έναν κυρίως όγκο, είτε στην πορεία προς ένα δευτερεύον όργανο, μπορεί να χρησιμοποιήσει διάφορους μηχανισμούς για να αποφύγει την διαδικασία της απόπτωσης, γνωστή ως ανέστια. Μέσω της ανέστιας, ένα υγιές κύτταρο σε μια ακατάλληλη τοποθεσία ενεργοποιεί τον προγραμματισμένο θάνατό του, με τον διαχωρισμό του από τους γείτονες και το μικροπεριβάλλον του, και συνεπώς εξαλείφεται. Η ανέστια είναι συνεπώς ένα φράγμα έναντι στον σχηματισμό και στην επιβίωση των πιθανώς ογκογενετικών κλώνων. Μόνο τα μη-προσκολλώντα κύτταρα, όπως τα λευκοκύτταρα και τα ώριμα αιματοποιητικά κύτταρα, προστατεύονται από την ανέστια (155).

Οι κύριοι δραστικοί μηχανισμοί της ανέστιας είναι η αυτοφαγία και η απόπτωση (156). Ένα κρίσιμο βήμα στην σειρά των αλλαγών μέσω των οποίων περνά ένα καρκινικό κύτταρο με σκοπό να αποφύγει την απόπτωση, είναι η αλλαγή στην έκφραση των ιντεγκρινών, οι οποίες είναι μια οικογένεια υποδοχέων που λαμβάνουν σήματα από το *ECM*. Αυτή η αλλαγή βασίζεται σε γενετικές και επιγενετικές αλλαγές, που μπορούν να συμβούν μόνο στο μικροπεριβάλλον ενός όγκου (159), επιτρέποντας σε καρκινικά κύτταρα να αγνοήσουν τα σήματα από τα *ECM* και να ενεργούν σαν να βρίσκονται στο κατάλληλο μικροπεριβάλλον. Εκτός από αυτό, στο εξωγενές μονοπάτι, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν επίσης να αποφύγουν την απόπτωση με την πρόκληση βλάβης στα μιτοχόνδρια, ένα ενδογενές μονοπάτι που επιτρέπει σε αυτά τα κύτταρα να υπερ-ενεργοποιούν μηχανισμούς επιβίωσης και πολλαπλασιασμού (160). Ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας στην ανέστια είναι η ακεραιότητα του κυτταροσκελετού (161), αφού πολλές προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των *BIM* και *BMF*, συστεγάζονται με τον κυτταρικό σκελετό.

Στα σπονδυλωτά, οι ιντεγκρίνες είναι μια οικογένεια υποδοχέων που αποτελείται από 18 υπομονάδες α και 8 υπομονάδες β, ο συνδυασμός των οποίων δημιουργεί συνολικά 24 τύπους τέτοιων υποδοχέων. Αλλαγές στις ιντεγκρίνες που λειτουργούν ως υποδοχείς για τα *ECM* είναι σημαντικές για την αποφυγή της ανέστιας. Η κανονική λειτουργία αυτών των

υποδοχέων, όχι μόνο παρέχει ένα φυσικό σύνδεσμο με τα *ECM*, αλλά επίσης εγκαθιστά μια πλατφόρμα η οποία εξαρτάται από τα σήματα των προσκολλητικών μορίων, συμπεριλαμβανομένων των προσαρμοστικών πρωτεϊνών και των κινασών (162, 163). Για παράδειγμα, οι ιντεγκρίνες $\alpha 1\beta 1, \alpha 2\beta 1, \alpha 3\beta 1, \alpha 5\beta 1, \alpha 6\beta 1, \alpha 6\beta 4$ και $\alpha \nu\beta 3$ έχουν έντονο αντίκτυπο στην κυτταρική επιβίωση (164).

1.3. ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ ΠΡΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΒΑΣΗ (EMT)

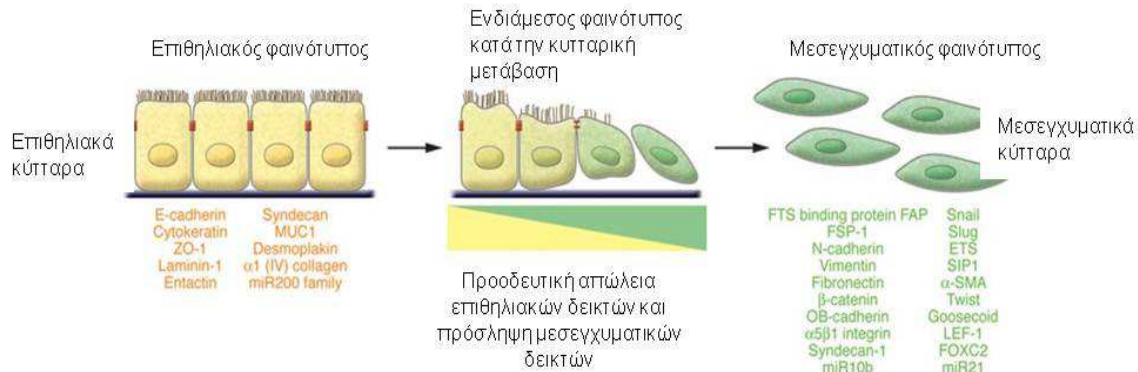
1.3.1 Επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση - *EMT*

Η επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση (*EMT*—*Epithelial to Mesenchymal Transition*) αντιπροσωπεύει την αλλαγή του φαινοτύπου των επιθηλιακών κυττάρων προς κύτταρα μεσεγχυματικού τύπου. Οι περισσότεροι ιστοί, προέρχονται από κύτταρα που έχουν υποστεί είτε επιθηλιακή προς μεσεγχυματική ή μεσεγχυματική προς επιθηλιακή μετάβαση (*MET*) (165).

Τα επιθηλιακά κύτταρα εμφανίζουν πολικότητα στα άκρα και διατηρούν στενές διακυττάρικες συνδέσεις με γειτονικά τους κύτταρα μέσω μορίων προσκόλλησης (*Cell Adhesion Molecules, CAMs*), ο σημαντικότερος εκπρόσωπος των οποίων είναι η *E*-καδερίνη. Η ανταλλαγή πληροφοριών επιτελείται μέσω ειδικών διακυτταρικών συνδέσεων. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα εμφανίζουν διακλαδώσεις με αποφυάδες και χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να διαπερνούν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται μέσω διακυτταρικής επαφής που προκαλεί έκκριση ειδικών ενζύμων, που διασπούν τις πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα εμφανίζουν χαλαρή οργάνωση μέσα στην τρισδιάστατη εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Τόσο τα επιθηλιακά κύτταρα έχουν την ικανότητα κάτω από συγκριμένες συνθήκες να αλλάζουν φαινότυπο και να μετατρέπονται σε μεσεγχυματικά (*EMT*), όσο και τα μεσεγχυματικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε επιθηλιακά (*MET*) (166).

Μετάβαση των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά συμβαίνει κατά την εμβρυογένεση και σε καταστάσεις φλεγμονής και επούλωσης των ιστών. Η μετάβαση αυτή χαρακτηρίζεται από απώλεια των διακυτταρικών συνδέσεων, της κυτταρικής πολικότητας των επιθηλιακών κυττάρων και από απόκτηση μεταναστευτικών και διεισδυτικών

ιδιοτήτων (167). Παράλληλα συμβαίνει αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, μείωση της έκφρασης ειδικών επιθηλιακών δεικτών (π.χ. της E-καδερίνης) και αλλαγή φαινοτύπου ο οποίος μοιάζει με αυτόν των ινοβλαστών και των μυοϊνοβλαστών (Εικόνα 5) (168).



Εικόνα 5: Η διαδικασία της EMT περιλαμβάνει λειτουργική μετάβαση πολωμένων επιθηλιακών κυττάρων, σε κινητά μεσεγγυματικά κύτταρα, τα οποία εκκρίνουν στοιχεία που διασπούν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Αναφέρονται οι επιθηλιακοί και οι μεσεγγυματικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται από τους ερευνητές της EMT διαδικασίας. Συνύπαρξη δεικτών και από τις δύο ομάδες υπογραμμίζει έναν ενδιάμεσο φαινότυπο EMT και χαρακτηρίζει κύτταρα που δεν έχουν ολοκληρώσει την διαδικασία της EMT. Η ύπαρξη κυττάρων που εκφράζουν ταυτόχρονα δείκτες επιθηλιακών και μεσεγγυματικών κυττάρων, καθιστά αδύνατη την αναγνώριση όλων των μεσεγγυματικών που προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα διαμέσου EMT, καθώς τα μεσεγγυματικά κύτταρα καλύπτουν τους επιθηλιακούς δείκτες με την ολοκλήρωση της διαδικασίας της EMT (169).

Η EMT συμβάλλει στην αποκατάσταση και επούλωση της ιστικής βλάβης αλλά μπορεί να οδηγήσει και σε υπερβολική συσσώρευση συνδετικού ιστού (ίνωση) ή σε καρκινική ανάπτυξη. Η EMT εμπλέκεται στην διαδικασία καρκινογένεσης συμβάλλοντας στο να αποκτήσουν τα γενετικά ασταθή καρκινικά κύτταρα μεσεγγυματικό φαινότυπο, που διευκολύνει την τοπική και συστηματική διασπορά. Τα κύτταρα που ευρίσκονται σε μεσεγγυματική κατάσταση όχι μόνο εμφανίζουν μεταναστευτικές και διεισδυτικές ικανότητες σε απόμακρα όργανα, αλλά ταυτόχρονα διατηρούν βλαστοκυτταρικές ιδιότητες, που τους επιτρέπουν να αυτο-ανανεώνονται και να διαφοροποιούνται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους κατά την έναρξη της μετάστασης (166, 170).

1.3.2 Η επιθηλιακή προς μεσεγγυματική μετάβαση (EMT) σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο

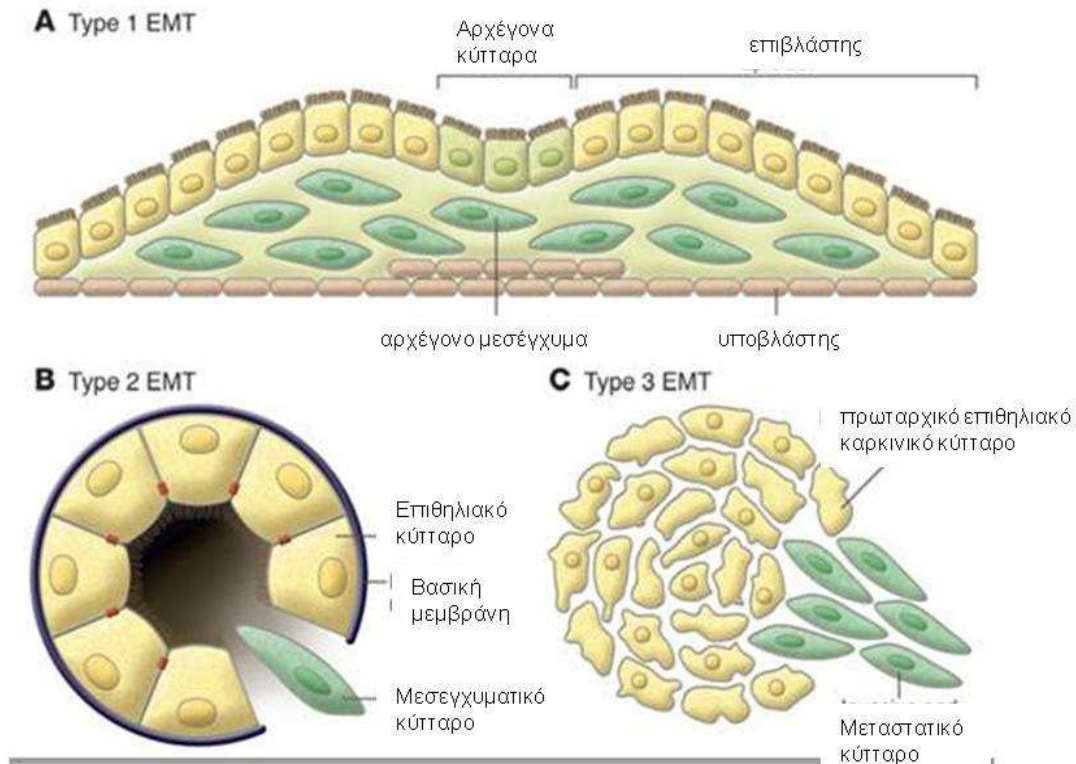
Όπως προαναφέρθηκε, η επαφή των επιθηλιακών κυττάρων, που γίνεται μέσω E-καδερίνης, χάνεται κατά την διαδικασία της EMT. Η E-καδερίνη φυσιολογικά

σταθεροποιεί τους δεσμούς μεταξύ των κυττάρων και εμποδίζει την μετανάστευση τους. Οι ιντεγκρίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά την *EMT*. Επάγουν την διακυτταρική επικοινωνία, μέσω συνδέσεων και σηματοδότησης με την θεμέλια ουσία, διαμέσου ενός εκτενούς δικτύου κυτταροσκελετικών μορίων.

1.3.3 Ταξινόμηση της επιθηλιακής προς μεσεγχυματική μετάβαση (*EMT*)

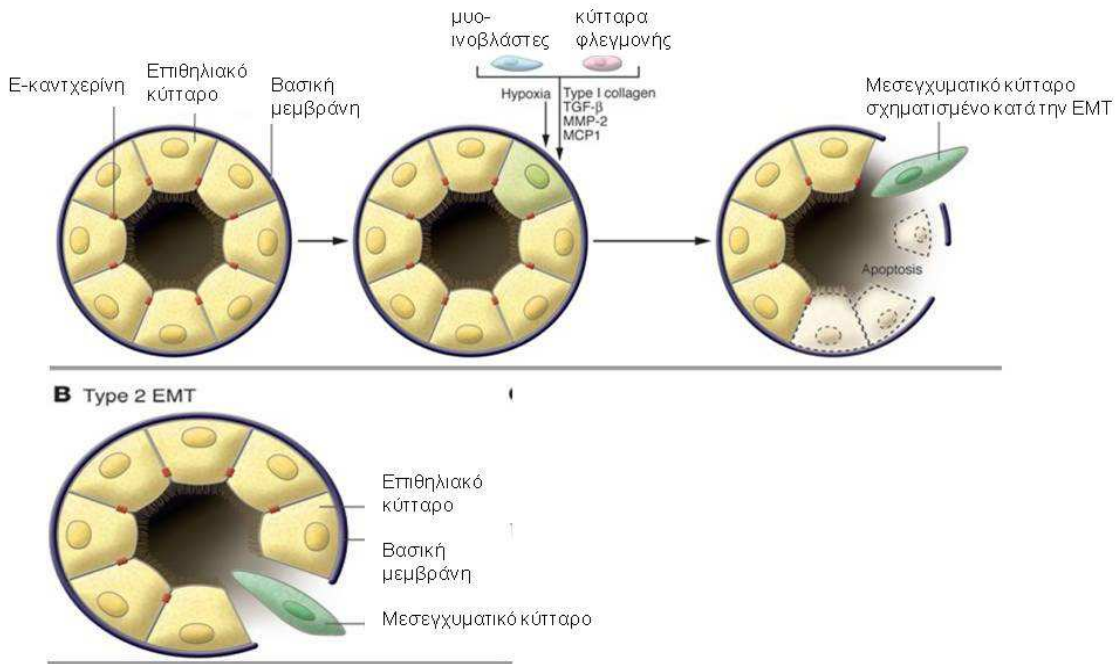
Η *EMT* ταξινομείται σε τρεις τύπους:

EMT τύπου I: σχετίζεται με την έμβρυο- και οργανογένεση και είναι υπεύθυνη για την δημιουργία κυττάρων που μοιράζονται τον ίδιο μεσεγχυματικό φαινότυπο και συγκεκριμένους βιολογικούς δείκτες. Διαδραματίζει ρόλο στην δημιουργία του εσωτερικού ενδοδέρματος, στη μορφογένεση των πνευμόνων, των νεφρών και του επιθηλίου των γαλακτοφόρων οδών. Κατά την οργανογένεση, δημιουργείται η πρώτη ομάδα μεσεγχυματικών κυττάρων, που είναι γνωστά ως πρωταρχικό μεσέγχυμα (μέσω *EMT*) (171). Τα εμβρυικά κύτταρα που μετατρέπονται σε μεσεγχυματικά, αναπτύσσουν έναν μηχανισμό εισβολής και εγκατάστασης στην θεμέλια ουσία, που βασίζεται στην κυτταροπλασματική ακτίνη. Κατά την διάρκεια της μετανάστευσης, λαμβάνουν εξειδικευμένες πληροφορίες από την θεμέλια ουσία και στην συνέχεια εκκρίνουν παράγοντες που τροποποιούν την θεμέλια ουσία. Καθώς ο ιστός επεκτείνεται, το πρωταρχικό μεσέγχυμα γεννά τα δευτερεύοντα επιθηλιακά κύτταρα μέσω *MET*, όπως συμβαίνει και κατά την διάρκεια της νεφρικής ανάπτυξης (Εικόνα 6)



Εικόνα 6: (Α) Η πρώτη μορφή της EMT (τύπος I) ξεκινά από την εμφύτευση και επισυμβαίνει κατά την εμβρυϊκή ζωή. Δημιουργεί το μεσόδερμα, το ενδόδερμα και τα νευρικά κύτταρα. Ο αρχέγονος επιθηλιακός ιστός, και κυρίως ο επιβλάστης, δημιουργεί τον αρχέγονο μεσεγχυματικό ιστό, μέσω της διαδικασίας της EMT. Το αρχέγονο μεσέγχυμα μπορεί να επαχθεί εκ νέου και να δημιουργήσει δευτερογενή επιθηλιακό ιστό διαμέσου της διαδικασίας της MET. Θεωρείται ότι κύτταρα του δευτερογενούς επιθηλίου, διαφοροποιούνται περαιτέρω για να δημιουργήσουν άλλους τύπους επιθηλιακών ιστών και υπόκεινται πάλι σε διαδοχικές EMT με σκοπό την δημιουργία κυττάρων του συνδετικού ιστού, συμπεριλαμβανομένων αστροκυττάρων, λιποκυττάρων, χονδροκυττάρων, οστεοβλαστών και μυϊκών κυττάρων. Β) Η διαδικασία της EMT εμφανίζεται εκ νέου στα πλαίσια της φλεγμονής και της ίνωσης και χαρακτηρίζει την δεύτερη μορφή της EMT (τύπος II). Σε αντίθεση με την τύπου I, η τύπου II EMT, εκφράζεται για μακρά χρονικά διαστήματα και μπορεί να οδηγήσει ακόμα και στην καταστροφή του προσβαλλόμενου οργάνου, αν δεν αρθεί το αίτιο. Ο τύπος III της EMT αφορά στον καρκίνο (169).

EMT τύπου II: σχετίζεται με την ιστική αποκατάσταση και την ίνωση. Σε περιπτώσεις ιστικής βλάβης ή φλεγμονής συμβαίνει επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση και ενεργοποίηση ινοβλαστών η οποία οδηγεί σε επούλωση. Συνήθως με την ολοκλήρωση της επούλωσης η διαδικασία της EMT διακόπτεται. Εάν η διαδικασία της EMT δεν διακοπεί τότε προκαλείται ίνωση με τελική συνέπεια την καταστροφή του ιστού (172).

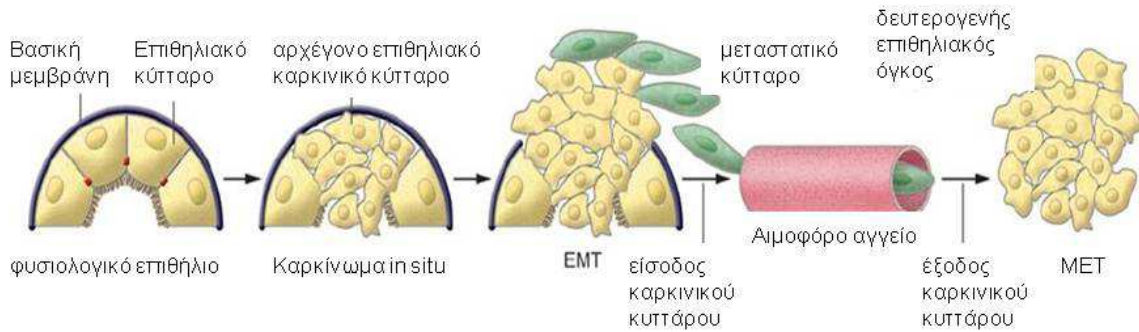


Εικόνα 7: Η EMT που αφορά στην ίνωση, σχετίζεται με την δημιουργία μορίων, διαμέσου κυττάρων φλεγμονής και μυο-ινοβλαστών. Αυτά τα μόρια προκαλούν διάσπαση των επιθηλιακών στρωμάτων μέσω αποδόμησης της βασικής μεμβράνης. Τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν την πολικότητά τους και είτε υπόκεινται σε απόπτωση (ή πλειοψηφία των κυττάρων) είτε σε EMT (169).

EMT τύπου III: προκαλεί αποτελέσματα πολύ διαφορετικά από εκείνα που παρατηρούνται στους άλλους δυο τύπους EMT. Τα κύτταρα που προέρχονται από την EMT τύπου III μπορούν να προσβάλλουν κάποιο όργανο αλλά και να μεταφερθούν σε άλλα όργανα μέσω της κυκλοφορίας προκαλώντας συστηματικές εκδηλώσεις νεοπλασματικής νόσου. Αν και γνωρίζουμε αρκετά για τα βήματα που σχετίζονται με την EMT τύπου I και II, δεν είναι ακόμα γνωστό ποιοί σηματοδοτικοί μηχανισμοί προκαλούν την τύπου III EMT στα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα.

1.3.4 EMT και καρκίνος

Η EMT φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση και ειδικότερα σε νεοπλασίες ανθεκτικές σε διάφορα θεραπευτικά σχήματα. Ευθύνεται για τη δημιουργία καρκινικών κυττάρων με χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων (173), που έχουν την τάση να εισβάλουν στον περιβάλλοντα ιστό και ταυτόχρονα να αντιστέκονται σε συγκεκριμένες θεραπευτικές παρεμβάσεις (Εικόνες 6,7).



Εικόνα 8: Η εξέλιξη από φυσιολογικό επιθήλιο σε διηθητικό καρκίνωμα περιλαμβάνει διάφορα στάδια. Στο διηθητικό στάδιο, τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν την πολικότητά τους και αποκόπτονται από την βασική μεμβράνη. Επίσης, αλλάζει η σύσταση της βασικής μεμβράνης, λόγω αμφίδρομων αντιδράσεων μεταξύ κυττάρων, θεμέλιας ουσίας και σηματοδοτικών δικτύων (169).

Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την διαδικασία της *EMT* και την αγγειογενετική μετατροπή, που χαρακτηρίζει την κακοήθη φάση της ανάπτυξης του όγκου. Η εξέλιξη, σε μεταστατικό καρκίνωμα, περιλαμβάνει πάλι την διαδικασία της *EMT*, η οποία διευκολύνει τα καρκινικά κύτταρα να εισέλθουν στην κυκλοφορία και να εξέλθουν σε κάποια απομακρυσμένη θέση, δημιουργώντας μικρο- ή μακρο-μεταστάσεις. Τα μεταστατικά κύτταρα υπόκεινται στην αντίθετη διαδικασία την *MET*, αποκτώντας πάλι επιθηλιακό φαινότυπο.

Οι παράγοντες που επάγουν την *EMT* στα πρώιμα στάδια οργανογένεσης ενοχοποιούνται για την καρκινογένεση και την εξέλιξη του καρκίνου (174). Ο ρόλος της *EMT* επικεντρώνεται κυρίως στα όψιμα στάδια της καρκινογένεσης και υποδηλώνει την ύπαρξη κυττάρων που δεν αναγνωρίζουν τα γειτονικά τους κύτταρα, γεγονός που αποτελεί και όχημα για την εξάπλωση του καρκίνου (Εικόνες 6,7). Υπάρχουν όμως ενδείξεις ότι *EMT* συμβαίνει και σε πρώιμα στάδια καρκινογένεσης, σε ορισμένους τύπους καρκίνου, με συνέπεια την εμφάνιση πρώιμων μεταστάσεων, πριν από την ολοκλήρωση της δημιουργίας του αρχικού κακοήθους όγκου. Όταν τα μεταφερόμενα με την κυκλοφορία καρκινικά κύτταρα, που προκύπτουν από την τύπου *III EMT*, εγκατασταθούν σε άλλους ιστούς, σχηματίζουν δευτερογενείς όγκους με επιθηλιακό φαινότυπο. Σημαντικός είναι ο ρόλος του *TGF-β*, ο οποίος σε πρώιμα στάδια μπορεί να καταστείλει την καρκινική ανάπτυξη, ενώ σε όψιμα στάδια παραγόμενος από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα, επάγει την *EMT*. Σε θεραπευτικά μοντέλα νεοπλασιών *in vitro*, η χρήση αντισώματος ενάντια στον *TGF-β*, περιορίζει την διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 8)

Η *EMT* είναι αντιστρεπτή διαδικασία, ακόμα και σε επιθετικούς καρκίνους, όπως ο καρκίνος του πνεύμονα, εφόσον τα κύτταρα μπορούν να επανα-δημιουργήσουν δεσμούς με την συμμετοχή της E-καδερίνης. Θεωρείται ότι στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης ανακεφαλαιώνονται κατά την καρκινογένεση (175). Η πλαστικότητα των καρκινικών κυττάρων που χαρακτηρίζεται από μετάβαση επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά και μεσεγχυματικών κυττάρων σε επιθηλιακά σχετίζεται με την ετερογένεια των όγκων και την εμφάνιση μεταστάσεων και μπορεί να αποτελεί στόχο της θεραπείας που ίσως βελτιώσει τα ποσοστά μακροχρόνιας επιβίωσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι η διαδικασία της *EMT*, σχετίζεται με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους, όπως το ιστολογικό στάδιο και την υποκατηγορία του καρκίνου (176). Ένα σύνθετο δίκτυο μονοπατιών σηματοδότησης και παράγοντες μεταγραφής φαίνεται να ανταποκρίνεται σε διάφορους αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες που απελευθερώνονται από στρωματικά και νεοπλασματικών στοιχεία, την τροφοδότηση του συστήματος με άφθονες ρυθμιστικές ευκαιρίες (177).

1.3.5. Μόρια που συμμετέχουν στην *EMT*

E-καδερίνη

Η E-καδερίνη (Εικόνα 4, πλαίσιο MET) ανήκει σε μια μεγάλη οικογένεια γονιδίων που κωδικοποιούν μόρια κυτταρικής προσκόλλησης εξαρτώμενα από ασβέστιο (calcium-dependent adhesion molecules CAMs). Εντοπίζεται κυρίως στις περιοχές προσκόλλησης γειτονικών κυττάρων και ρυθμίζεται από τις ιντεγκρίνες. Ο ρόλος της είναι να σταθεροποιεί τις ζώνες πρόσφυσης και να αναστέλλει την κυτταρική μετανάστευση. Για το λόγο αυτό η μείωσή της οδηγεί σε χαλάρωση των συνδέσεων των κυττάρων (χαρακτηριστικό γεγονός την *EMT*) και σε μετανάστευση των κυττάρων (178).

Ένα από τα γεγονότα σταθμούς στη διαδικασία της *EMT* είναι η κυτταροπλασματική έκφραση της E-καδερίνης, είτε η καταστολή της μεταγραφής του *mRNA* της E-καδερίνης. Η απώλεια της E-καδερίνης από την κυτταρική μεμβράνη γίνεται μέσα από πολλαπλούς μηχανισμούς. Ένας σημαντικός μηχανισμός για την εξαφάνιση της E-καδερίνης είναι η αρνητική ρύθμιση της μεταγραφής της μέσω αναστολής του υποκινητή του γονιδίου της λόγω επικάλυψης από μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι *Snail*, *Slug*, *Twist*.

N-καδερίνη

Η μετάσταση περιλαμβάνει διάφορα στάδια, συμπεριλαμβανόμενης της αποκόλλησης από τον πρωτογενή όγκο, τη μετανάστευση, την ενδαγγείωση και την εγκατάσταση σε έναν νέο ιστό (Εικόνα 4). Η N-καδερίνη (Εικόνα 5) φαίνεται πως είναι ένας παράγοντας ο οποίος συμμετέχει στην μετάσταση. Σε πολλές περιπτώσεις καρκίνου, η έκφραση της N-καδερίνης φαίνεται να είναι αυξημένη. Αυτή η έκφραση της N-καδερίνης σε συνδυασμό με την απώλεια της E-καδερίνης, η οποία έχει ογκοκατασταλτική δράση, είναι ένα χαρακτηριστικό της επιθηλιακής προς μεσεγχυματική μετάπτωσης *EMT*, η οποία συμβαίνει κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του καρκίνου, και η οποία φαίνεται πως κατέχει σημαντικό ρόλο στη μεταστατικότητα των καρκινικών κυττάρων (179).

Βιμεντίνη

Η βιμεντίνη (Εικόνα 5) είναι πρωτεΐνη που σχηματίζει νημάτια της κατηγορίας των ενδιάμεσων νηματίων του κυτταροσκελετού και ο ρόλος της είναι η συγκράτηση των οργανιδίων στη θέση τους. Η έκφρασή της σε επιθηλιακά κύτταρα πιθανόν εξηγεί την επιτέλεση μιας μεσεγχυματικής μετάβασης. Η έκφραση της βιμεντίνης έχειδειχθεί πως σχετίζεται με την ενεργοποίηση ενός σημαντικού εκτελεστικού μορίου της *EMT*, της *Src35*, κάτω από την επίδραση της οποίας ασκείται αρνητική ρύθμιση στην έκφραση της E-καδερίνης. Έχειδειχθεί πως η παρουσία της βιμεντίνης είναι απαραίτητη για την οργάνωση των N-καδερινών στη μεμβράνη του καρκινικού κυττάρου, κάτι το οποίο είναι καθοριστικό για τη δράση των N-καδερινών. (180-182).

Slug

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν πως ο *Slug* (*Snai-2*) (Εικόνα 5) είναι σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας και κατέχει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της *EMT*. Η έκφρασή του αυξάνεται έπειτα από την επίδραση των σηματοδοτικών μονοπατιών *FGF*, *TGF-β*, *Wnt*. Ο *Slug* είναι μεταγραφικός καταστολέας της E-καδερίνης και λειτουργεί ως παράγοντας μεταγραφής μελανοκυττάρων και προδιαθέτει σε μετάσταση του μελανώματος (183). Τέλος, έχειδειχθεί ότι η υπερέκφραση του παράγοντα *Slug* επάγει τη βλαστική ικανότητα των κυττάρων και προωθεί την εισβολή και τη μετάσταση των κυττάρων ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (184).

1.3.6. *EMT* και *Hsp70*

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (*Hsps*) αρχικά ταυτοποιήθηκαν ως πρωτεΐνες, οι οποίες εκφράζονται έπειτα από έκθεση των κυττάρων σε περιβαλλοντικό στρες. Ωστόσο, η λειτουργία τους στη διαδικασία του *EMT* στα *PMC* κύτταρα (peritoneal mesothelial cells) παραμένει αδιευκρίνιστη.

Η γλυκοζυλίωση είναι ένα βιοχημικό φαινόμενο, που δημιουργείται όταν η περίσσεια γλυκόζη του αίματος προσκολλάται στις πρωτεΐνες του οργανισμού (αιμοσφαιρινή, κολλαγόνο κ.α.) , με αποτέλεσμα να σχηματίζονται νέα επιβλαβή μόρια τα *AGEs* (Προχωρημένα Προϊόντα Γλυκοζυλίωσης). Σύμφωνα με μελέτες, η επίδραση της *Hsp70* στα τελικά προχωρημένα προϊόντα γλυκοζυλίωσης (*AGEs*) επάγει την *EMT* διαδικασία των κυττάρων *PMC*. Αλλαγές στα τελικά προϊόντα της γλυκοζυλίωσης σχετίζονται με την *EMT* διαδικασία, συμπεριλαμβάνοντας την απώλεια της Ε-καδερίνης και την αύξηση της *α-smooth muscle actin* . επιπλέον, τα τελικά προϊόντα της γλυκοζυλίωσης επάγουν την έκφραση της *Hsp70*, η οποία οδηγεί σε μερική αναστολή της *EMT* διαδικασίας στα *PMC* κύτταρα. Έτσι, η *Hsp70* αναστέλλει τη διαδικασία της *EMT* μειώνοντας την έκφραση του *TGF-β/ Smad* και την ενεργοποίηση του *MARK/ERK* σηματοδοτικού μονοπατιού. Τα ευρήματα προτείνουν ότι η *Hsp70* αυξάνει την κυτταρική άμυνα μέσω της αναστολής των *TGF-β/Smad* και *MAPK/EPK* σηματοδοτικών μονοπατιών, προστατεύοντας έτσι τα κύτταρα από την *EMT* διαδικασία (185).

1.4 Η ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ *P53*

Βαπτισμένη ως «ο φύλακας του γονιδιώματος» (186) και ο «κλειδοκράτορας του κυττάρου», η πρωτεΐνη *p53* δρα συμμετέχοντας στη μετάδοση μια ευρείας γκάμας σημάτων, που επάγουν κυτταρικό στρες και στην παρεμπόδιση πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Συνεπώς, η *p53* μπορεί να ενεργοποιηθεί έπειτα από ζημιά που θα πάθει το *DNA*, από μια ογκογονιδιακή ενεργοποίηση, ή από υποξία, η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί μια σειρά βιολογικών σημάτων όπως η κυτταρική απόπτωση, η φαγοκυττάρωση και ο γηρασμός του κυττάρου (187-189). Είναι σημαντικό το γεγονός ότι οι ογκοκατασταλτικές λειτουργίες της *p53* επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες,

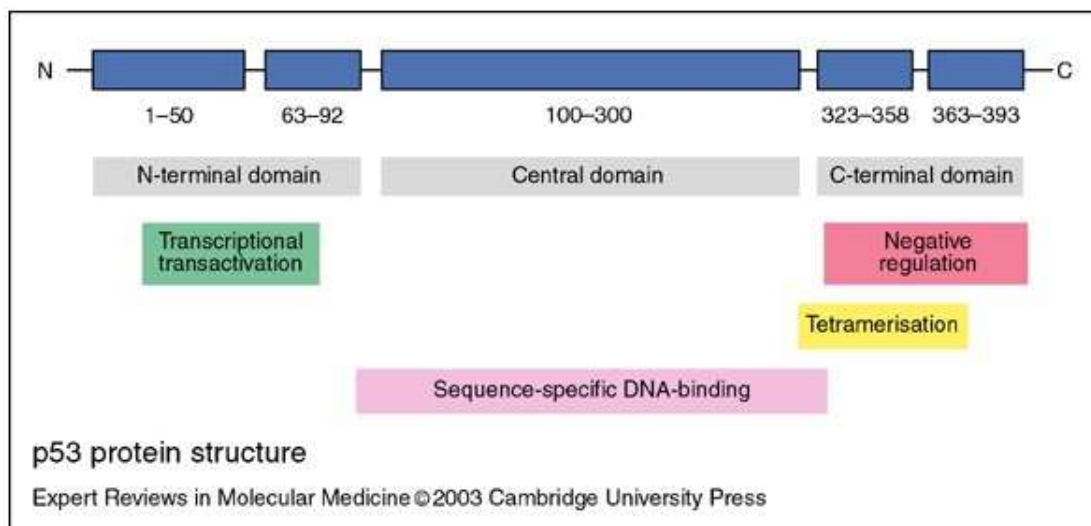
συμπεριλαμβανομένων του τύπου του κυττάρου, το μικροπεριβάλλον και διάφορα ογκογενετικά γεγονότα τα οποία συνέβησαν κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του όγκου. Αυτό σημαίνει ότι, παρόλο που η έκφραση πολλών γονιδίων στο δίκτυο της *p53* μπορεί να αλλάξει σε μερικούς όγκους, τα κρίσιμα σημεία του δικτύου μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με το περιβάλλον του όγκου. Η πρόκληση σε εμάς είναι να κατανοήσουμε ποιόι στόχοι ή ποιές λειτουργίες της *p53* είναι σημαντικές για την ανάπτυξη διαφορετικών μορφών όγκων, καθώς αυτό μπορεί τελικά να προσδιορίσει τις ενέργειες για την διατήρηση ενός όγκου και να προτείνει τους στόχους για τις θεραπευτικές επεμβάσεις.

1.4.1 Η δομή της *p53*

Ο μεταγραφικός παράγοντας *p53*, αποτελεί το πρώτο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που ανακαλύφθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1970. Αρχικά θεωρήθηκε ως ογκογονίδιο δεσμευμένο στο μεγάλο T-αντιγόνο (Tag) σε μετασχηματισμένα κύτταρα από τον ιό *SV40*, όμως οι γενετικές και λειτουργικές μελέτες που ακολούθησαν δέκα χρόνια μετά την ανακάλυψή του ανέδειξαν την ογκοκατασταλτική του δράση. Μέχρι σήμερα είναι το περισσότερο μελετημένο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που αφορά τον καρκίνο (190).

Το γονίδιο *p53* βρίσκεται στο χρωμόσωμα *17p13.1* και αποτελείται από 11 εξόνια και 10 ιντρόνια. Ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου σε θηλαστικά, αμφίβια, πτηνά και ψάρια αποκάλυψε πέντε υψηλά συντηρημένες περιοχές εκ των οποίων οι τέσσερις μεγαλύτερες εμπεριέχονται στα εξόνια 5 έως 8 του γονιδίου. (Εικόνα 9)

Κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 53 kDa 393 αμινοξέων η οποία διαχωρίζεται δομικά και λειτουργικά σε τέσσερις περιοχές. Οι περιοχές αυτές εμπλέκονται με την μεταγραφική επαγωγή και αναστολή (αμινοτελικό άκρο, αμινοξέα 1-42), την δέσμευση με το *DNA* και το *RNA* (κεντρική συντηρημένη περιοχή, αμινοξέα 96-292), την πυρηνική εντόπιση και τον τετραμερισμό (καρβοξυτελικό άκρο, αμινοξέα 324-365) και την αρνητική ρύθμιση της πρωτεΐνης (καρβοξυτελικό άκρο, αμινοξέα 363-393) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Σχηματική δομή και οργάνωση της *p53*. Φαίνονται οι τέσσερις υψηλά συντηρημένες περιοχές.

1.4.2 Λειτουργίες της *p53*

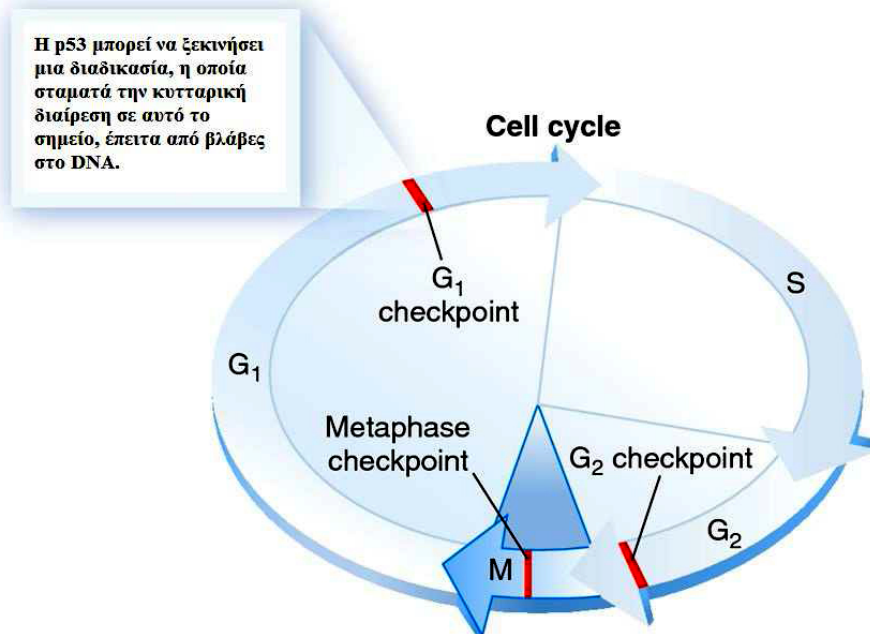
Γενετικές μελέτες σε κυτταρικές σειρές αλλά και σε πειραματόζωα (ποντίκια) έχουν εμπλέξει την *p53* σε μια ποικιλία από αντι-πολλαπλασιαστικές λειτουργίες, κάθε μια από τις οποίες, υπό τις κατάλληλες συνθήκες, μπορεί να υποστηρίξει τις ογκοκατασταλτικές ιδιότητες της *p53*.

1 Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου

Κύρια λειτουργία της *p53* είναι να ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο, ώστε να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό μη φυσιολογικών κυττάρων, προλαμβάνοντας έτσι τη νεοπλασματική δημιουργία.

Σε φυσιολογικές συνθήκες για το κύτταρο η *p53* διατηρείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις και σε μια ανενεργή κατάσταση αναμονής. Η ισορροπία αυτή διατηρείται μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη MDM2, η οποία αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της *p53*. Ενεργοποίηση της *p53* συμβαίνει ως απόκριση σε διάφορους παράγοντες κυτταρικού στρες, όπως βλάβη στο *DNA*, υποξία, γήρανση, υπερέκφραση ογκογονιδίων κ.α. Η αύξηση των επιπέδων και η ενεργοποίηση της *p53* επηρεάζει τη μεταγραφική ενεργότητα μεγάλου

αριθμού γονιδίων όπως τα *p21*, *MDM2*, *cyclin G*, *bax* κ.α. Ως αποτέλεσμα αναστέλλεται η κυτταρική αύξηση και διαίρεση, είτε μέσω ακινητοποίησης του κυτταρικού κύκλου στη φάση *G1* είτε μέσω επαγωγής της απόπτωσης (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Σημείο δράσης της *p53* στον κυτταρικό κύκλο. Η *p53* μπορεί να ξεκινήσει μια διαδικασία, η οποία σταματά την κυτταρική διαίρεση στο σημείο ελέγχου *G1*, έπειτα από τυχόν βλάβες του DNA.

Τα γονίδια- μεταγραφικοί στόχοι της *p53* ανάλογα με τη λειτουργία τους είναι επιγραμματικά τα εξής (191):

✓ **Αναστολείς του κυτταρικού κύκλου:** Πρωτεΐνες αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDKs), όπως η *p16* και κυρίως η *p21* kDa. Η αναστολή των *CDKs* μπλοκάρει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης *RB* η οποία απαιτείται για να προχωρήσει το κύτταρο σε διαίρεση, καθώς και την αποδέσμευση των μεταγραφικών παραγόντων *E2F* από την πρωτεΐνη *RB*. Ως αποτέλεσμα αναστέλλεται η μεταγραφή των γονιδίων που απαιτούνται για την είσοδο στην S φάση και το κύτταρο παραμένει στην φάση *G1*.

✓ **Ρυθμιστές απόπτωσης:** Προαποπτωτικές πρωτεΐνες που επάγονται απευθείας από την *p53* περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, τις *Bax*, *NOXA*, *p53AIP1* (και οι τρεις αυτές πρωτεΐνες εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια και όταν υπερεκφράζονται επάγουν την απόπτωση του κυττάρου), *Araf1*, *PUMA* και *PIDD*.

✓ **Γονίδια επιδιόρθωσης του DNA:** Η *p53* παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της γενωμικής σταθερότητας, καθώς ενεργοποιεί άμεσα γονίδια που συμμετέχουν σε μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA, όπως το γονίδιο ριβονουκλεοτιδικής ρεδοκτάσης *p53R2* και το *GADD45*. Υπάρχουν επίσης πρόσφατες μελέτες που αναφέρουν ότι η *p53* πιθανόν να συμμετέχει το ίδιο στην επιδιόρθωση λάθους βάσης στο DNA, δεσμευμένο άμεσα στο μόριο του DNA.

✓ **Αναστολείς της αγγειογένεσης της μετάστασης:** Το πιο σημαντικό ίσως μέλος αυτής της κατηγορίας *p53* επαγόμενων γονιδίων είναι ο αναστολέας πρωτεάσης σερίνης των θηλαστικών που αναστέλλει την αγγειογένεση, τη διήθηση και τη μετάσταση. Άλλες αναγνωρισμένες πρωτεΐνες καταστολείς της μετάστασης, οι *TSP1*, *BAIL*, *GDAIF*, και *KAI1* έχουν επίσης αναφερθεί πως επάγονται από την *p53*. Η *p53* μπορεί επίσης να αλληλεπιδράσει με διάφορες ιικές ογκοπρωτεΐνες, οι οποίες την οδηγούν στη λειτουργική της απενεργοποίηση και εξάλειψη της ογκοκατασταλτικής της δράσης. Τέτοιες είναι οι *E6* και *E7* ογκοπρωτεΐνες του ιού *HPV* και το μεγάλο T-αντιγόνο του ιού *SV40*.

2 Απόπτωση

Παρόλο που η ικανότητα της *p53* να ενεργοποιεί την φαγοκυττάρωση είχε ανακαλυφθεί πρώτη, η λειτουργία της στον έλεγχο της απόπτωσης είναι αυτή που έχει μελετηθεί εκτενέστερα. Ένα πρόγραμμα που περιείχε απόπτωση που εξαρτάται από την *p53* είχε πρώτα καταγραφεί, έπειτα από την ακτινοβολία σε ποντικούς (192, 193). Σύντομα, αποδείχθηκε ότι η ογκογένεση μπορούσε να ενεργοποιήσει τον ογκοκαταστολέα της *p53*, οδηγώντας στην απόπτωση του, και ότι η *p53* είναι απαραίτητη για την απόπτωση, που προκαλείται από συγκεκριμένους παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA (193). Αυτές οι μελέτες αποκάλυψαν πως η *p53* δρα ως μέρος ενός μηχανισμού διασφάλισης της αποφυγής των μεταλλάξεων και καθιέρωσαν ένα πρότυπο για την κατανόηση των γονιδίων και των διεργασιών που καθορίζουν την αποτελεσματικότητα των θεραπειών του καρκίνου.

Πολλά ακόμα γονίδια-στόχοι της *p53* έχουν εμπλακεί στην απόπτωση, σε σχέση με τους υπόλοιπους τελεστές της, δείχνοντας ότι ο έλεγχος της *p53* για την απόπτωση είναι πολύ περίπλοκος. Οι τρέχουσες ενδείξεις υποδεικνύουν ότι η αποπτωτική λειτουργία της *p53* είναι στενά συνδεδεμένη και επηρεάζεται από μια σειρά από ποσοτικά και ποιοτικά

γεγονότα που καθορίζουν το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της *p53* (194). Η απόπτωση μπορεί να ενσωματωθεί σε ένα ευρύτερο ογκοκατασταλτικό δίκτυο της *p53*, το οποίο ελέγχεται από διάφορα σήματα, περιβαλλοντικούς παράγοντες και κυτταρικούς τύπους (194).

Όταν ενεργοποιηθεί η *p53* μπορεί με τη σειρά της να ενεργοποιήσει μια σειρά από γονίδια που μετέχουν στην απόπτωση, συμπεριλαμβανομένων των *Bax*, *PIG3*, *Killer/DR5*, *CD95* (Fas), *p53AIP1*, *Perp*, και τις *BH3-only* πρωτεΐνες *Noxa* και *PUMA* (*p53* ρυθμιστές της απόπτωσης) (188). Πολλοί από τους στόχους είναι μέλη της προ-αποπτωτικής *Bcl-2* ομάδας γονιδίων.

Η *p53* επιπρόσθετα σε αυτές τις δραστηριότητές της στον πυρήνα του κυττάρου, κατέχει επίσης κυτοσολική δράση που μπορεί να προκαλέσει την απόπτωση με έναν τρόπο ανεξάρτητο από τη μεταγραφή (189). Συγκεκριμένα, ως αντίδραση σε διάφορα σήματα για τον κυτταρικό θάνατο, όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία, η *p53* συσσωρεύεται γρήγορα στα μιτοχόνδρια. Στα μιτοχόνδρια, η *p53* μπορεί να προκαλέσει διαπερατοποίηση της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων (MOMP), προκαλώντας έτσι την απελευθέρωση των προ-αποπτωτικών παραγόντων από τον μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό χώρο. Η *p53* μπορεί να αλληλεπιδράσει με τις *Bcl2*, *Bcl-X_L* και την *Bak* στα μιτοχόνδρια, και έχει προταθεί ότι μπορεί να δρα σαν *BH3-only* πρωτεΐνη, είτε ως ο άμεσος ενεργοποιητής της *Bax* και της *Bak*, είτε ως καταστολέας.

Οι μηχανισμοί που εξαρτώνται ή όχι από την μεταγραφή της *p53* έχουν πρόσφατα συνδεθεί, μέσω του γονιδίου-στόχου *PUMA* της *p53* (195). Συγκεκριμένα, ως αντίδραση στο κυτταρικό στρες, η *p53* ενεργοποιεί το *PUMA*. Το *PUMA* στην συνέχεια μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια, όπου μπορεί να δεσμεύσει την *Bcl-X_L* πρωτεΐνη, και συνεπώς να απελευθερωθεί η *p53* και να ενεργοποιήσει με την σειρά της την *Bax*. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα στοιχεία του δικτύου της *p53* που εξαρτώνται από την μεταγραφή είναι απαραίτητα για την λεπτομερή επαγωγή της απόπτωσης, και το *PUMA* παίζει ένα κρίσιμο ρόλο σε αυτή την διαδικασία.

1.4.3 Μοντέλα ενεργοποίησης της *p53*

Σε ένα φυσιολογικό κύτταρο, η πρωτεΐνη *p53* διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα μέσω του γρήγορου καταβολισμού της. Επιπροσθέτως, η *p53* πιθανότατα να υπάρχει σε μια λανθάνουσα, ανενεργή μορφή (196, 197). Διάφορες στρεσογόνες καταστάσεις, όπως οι βλάβες στο *DNA*, η έλλειψη οξυγόνου, η στέρση των παραγόντων ανάπτυξης του κυττάρου, και η απώλεια του στρώματος πρόσδεσης του κυττάρου ή η απώλεια πρόσδεσης μεταξύ των κυττάρων, μπορεί να προκαλέσουν την ενεργοποίηση της *p53* (198). Η ενεργοποίηση της *p53* μπορεί να διαμορφωθεί σε 3 επίπεδα:

- ✓ Μια αύξηση στην συγκέντρωση της πρωτεΐνης *p53* είτε μέσω της αυξημένης μετάφρασης είτε μέσω της αυξημένης ημιζωής
- ✓ Η αλλαγή της πρωτεΐνης *p53* από την αδρανή στην ενεργή μορφή
- ✓ Η μετεγκατάσταση της πρωτεΐνης *p53* από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα

Ενώ συγκεκριμένες μελέτες έχουν γίνει σχετικά με την ενεργοποίηση της *p53* στα δύο πρώτα στάδια, λίγες έχουν πραγματοποιηθεί για την ρύθμιση της κυτταρικής τοποθεσίας της *p53*.

Η άποψη που περιγράφει την ενεργοποίηση της *p53*, ως αντίδραση στο κυτταρικό στρες, περιλαμβάνει τρία βασικά βήματα: ενεργοποίηση της *p53*, δέσμευση του *DNA* σε συγκεκριμένη ακολουθία, και ενεργοποίηση μέσω μεταγραφής των επιθυμητών γονιδίων (187). Η ενεργοποίηση της *p53* επιτυγχάνεται πρωτίστως μέσω των γεγονότων που διακόπτουν την αλληλεπίδρασή της με τον *MDM2*, έναν αρνητικό παράγοντα ρύθμισης της *p53* που μεσολαβεί στη παρεμπόδιση ουβικιτινίωσης της *p53*. Για παράδειγμα, όταν το *DNA* υποστεί ζημιά από την ιονίζουσα ακτινοβολία ή από συγκεκριμένους χημικοθεραπευτικούς παράγοντες, η *p53* τροποποιείται μετα-μεταφραστικώς, συμπεριλαμβανομένης της φωσφορυλίωσης του αμινοτελικού άκρου της *p53* σε συγκεκριμένα αμινοξέα, με διάφορες κινάσες, συμπεριλαμβανομένων των *ATM*, *ATR*, *DNA-PK*, *Chkl*, και *Chk2* (199). Η αμινοτελική φωσφορυλίωση της *p53* εμποδίζει την πρόσδεση του *MDM2*, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της *p53*.

Μετά την ενεργοποίησή της, η *p53* προσδένεται σε συγκεκριμένη αλληλουχία του *DNA*. Η περιοχή πρόσδεσης της *p53* στο *DNA* είναι ένα σημείο με υψηλές πιθανότητες

μετάλλαξης, καθώς η πλειοψηφία των μεταλλάξεων που σχετίζονται με όγκους στην *p53* παρατηρούνται σε αυτή την περιοχή (200). Αυτό το εύρημα τονίζει την σπουδαιότητα της πρόσδεσης της *p53* στην κατάλληλη θέση στην αλληλουχία του *DNA*. Η *p53* περιέχει ακόμα μια περιοχή βασικής πρόσδεσης στο *DNA* με το καρβοξυ-τελικό άκρο.

Έπειτα από την ενεργοποίηση και την στοχευμένη πρόσδεση στο *DNA*, η *p53* ενεργοποιεί ή καταστέλλει τα στοχευμένα της γονίδια. Η κοινή άποψη προτείνει ότι η *p53* προωθεί την μεταγραφική ενεργοποίηση ή καταστολή των στοχευμένων γονιδίων, μέσω της αλληλεπίδρασης με γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες όπως η *TFIID* / *TAFs*. Όμως, ένα τέτοιο μοντέλο υποτιμά την πολυπλοκότητα της επιλογής του υποκινητή. Στην πραγματικότητα η επιλογή του γίνεται μέσα από διάφορα κριτήρια, συμπεριλαμβανομένων των μετα-μεταγραφικών αλλαγών της *p53*, που μπορούν να επηρεάσουν την επιλογή συγκεκριμένων *p53* πρωτεϊνών σε συγκεκριμένους υποκινητές. Για παράδειγμα, η *p53* μπορεί να αλληλεπιδράσει με πολλούς μεταγραφικούς ενεργοποιητές, όπως η ιστόνη ακετυλο-τρανσφεράση *CBP/p300*, και μεταγραφικούς καταστολείς και συν-καταστολείς, όπως η ιστόνη δεασυτυλάση (201, 202), για την ρύθμιση της μεταγραφής. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της *p53* και της *CBP/p300* διευκολύνει την ακετυλίωση της ιστόνης και της *p53*, με αποτέλεσμα μια πιο ενεργητική *p53* πρωτεΐνη.

Βασισμένοι στους *Kruse* και *Gu*, οι οποίοι πρότειναν ένα βελτιστοποιημένο μοντέλο τριών βημάτων για την ενεργοποίηση της *p53*, ανάλογα με τον υποκινητή.

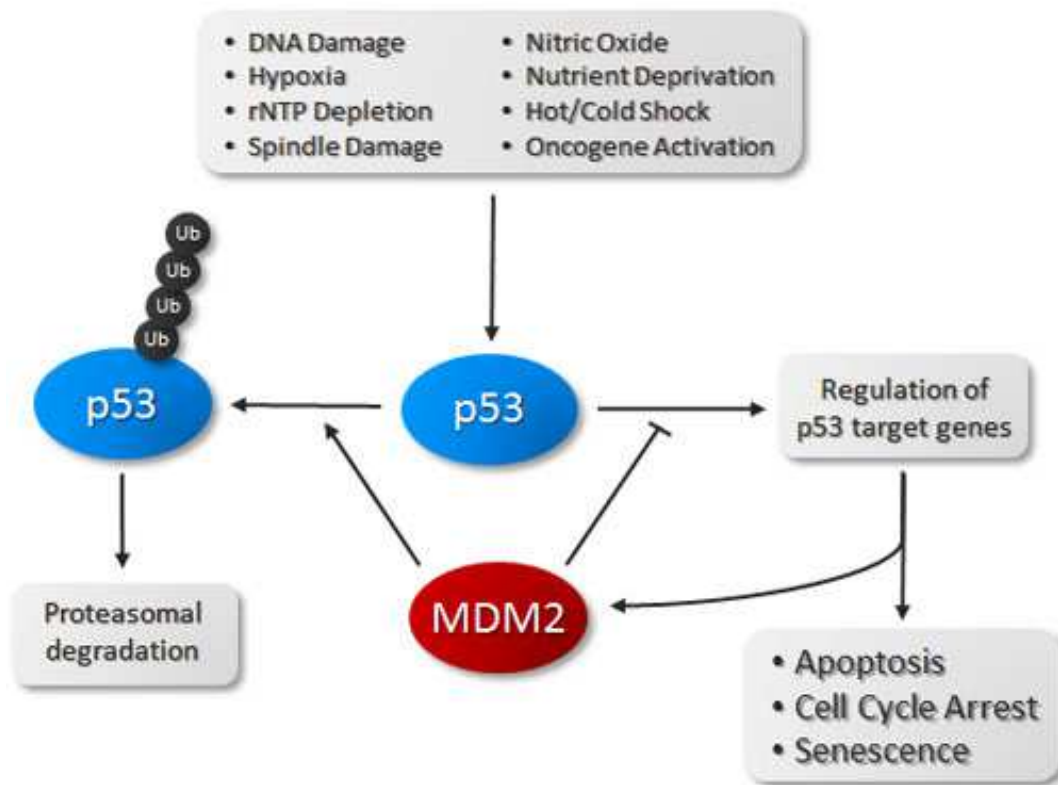
- ✓ Το πρώτο βήμα είναι η σταθεροποίηση της *p53* μέσω του στρες, που μπορεί να συμβεί μέσω διαφόρων μηχανισμών, πολλοί εκ των οποίων λειτουργούν μέσω της αναστολής της δυνατότητας της *MDM2* να ουβικιτινλώνει και να διασπά την *p53*.
- ✓ Το δεύτερο βήμα είναι η απελευθέρωση της *p53* από την αναστολή της λειτουργίας της που επιβάλουν οι *MDM2* και *Mdmx*. Αυτό το βήμα απαιτεί την ακετυλίωση της *p53* σε διαλύματα συγκεκριμένων αμινοξέων, και έχει ως αποτέλεσμα στην επιλεκτική ενεργοποίηση ενός υποσυνόλου των γονιδίων που στοχεύει η *p53*.
- ✓ Το τρίτο βήμα είναι η πλήρης ενεργοποίηση συγκεκριμένων υποκινητών, η οποία διευκολύνεται με την επιστράτευση και την αλληλεπίδραση πολλών συν-

παραγόντων της *p53*. Αυτοί οι συν-παράγοντες μπορούν να τροποποιήσουν την *p53*, τις ιστόνες και άλλους μεταγραφικούς παράγοντες.

Δεν έχουν διασαφηνιστεί πλήρως οι ακριβείς μηχανισμοί μέσω των οποίων η *p53* στοχεύει σε συγκεκριμένα γονίδια, τα οποία σχετίζονται με την απόπτωση, το γήρας, την φαγοκυττάρωση, ή την αυτοφαγία, παρόλο που αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν συγκεκριμένους συνδυασμούς από συν-παράγοντες και μετα-μεταγραφικές αλλαγές. Πράγματι, διάφοροι συνδυασμοί μετα-μεταγραφικών μεταλλάξεων της *p53*, συμπεριλαμβανομένης της φωσφορυλίωσης, της ουβικιτινίωσης, της μεθυλοποίησης, και της ακετυλίωσης, μπορούν να παίξουν τον ρόλο ενός κωδικού, δίνοντας την δυνατότητα στην *p53* να ενεργοποιήσει συγκεκριμένους υποκινητές.

1.4.4 MDM2 και p53

Η πρωτεΐνη *MDM2* είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της δράσης της *p53* (Εικόνα 11). Η *MDM2* προσδένεται στο μεταγραφικό πεδίο ενεργοποίησης, στο αμινοτελικό άκρο της *p53* (203). Μπορεί επίσης να προάγει τον καταβολισμό της *p53* μέσω ενός συστήματος ουβικιτινίωσης (204, 205). Η *MDM2* έχει συνδεθεί με την ρύθμιση της πυρηνοκυτταροπλασματικής μετατόπισης της *p53* με δυο τρόπους. Πρώτον, η *MDM2* αλληλεπιδρά με την *p53* στον πυρήνα και μεταφέρει την *p53* από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου μεσολαβεί για την ανενεργοποίηση της *p53* (206, 207). Εναλλακτικά, η *MDM2* μπορεί να μεσολαβήσει για την ουβικιτινίωση της *p53* στον πυρήνα, η οποία ενεργοποιεί την εξαγωγή από τον πυρήνα ξεμπλοκάροντας το σήμα *NES* της *p53*.



Εικόνα 11: Η αλληλεπίδραση της p53 με την MDM2. Στα φυσιολογικά κύτταρα, η MDM2 οδηγεί την p53 σε ουβικιτινίωση και τελικά σε αποδόμησή της. Σε μη φυσιολογικά κύτταρα, απουσία της MDM2, η p53 οδηγεί σε ρύθμιση κυτταρικού κύκλου ή σε απόπτωση (PMV Pharma, 2015).

Η ανάμειξη της MDM2 στην ρύθμιση της τοποθέτησης της p53 στο κύτταρο επιδεικνύεται από την παρατήρηση ότι η δράση της MDM2 συνδέεται άμεσα με την εξαγωγή από τον πυρήνα της p53 σε ένα υποσύνολο των όγκων, όπως τα νευροβλαστώματα και ο καρκίνος του στήθους (208). Η καταστολή της έκφρασης της MDM2 μέσω ενός αντικωδικοποιούντος ολιγονουκλεοτιδίου, ή η καταστολή της δράσης της MDM2 από την πρωτεΐνη P19(ARF), που χρησιμοποιείται για τον περιορισμό των όγκων, οδηγεί σε μια μετατόπιση της ελεύθερου-τύπου p53 από το κυτταρόπλασμα προς τον πυρήνα. Από την άλλη, έχει αναφερθεί ότι η εξαγωγή της p53 από τον πυρήνα είναι ανεξάρτητη από την πρόσδεση της MDM2. Αυτή η αναφορά είναι βασισμένη στην παρατήρηση ότι η μεταλλαγμένη p53, που δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με την MDM2, πάλι υπόκειται σε πυρηνο-κυτταροπλασματική μετατόπιση (209). Φαίνεται ότι η MDM2 θα μπορούσε, σε ορισμένες περιπτώσεις, να ελέγξει την πυρηνο-κυτταροπλασματική μετατόπιση της p53 μέσω των ξεχωριστών μηχανισμών που μπορεί να εξαρτώνται από τον τύπο των κυττάρων.

1.4.5 Η φωσφορυλίωση της *p53*

Η διαδικασία της φωσφορυλίωσης έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει την εισαγωγή και την εξαγωγή από τον πυρήνα διαφόρων πρωτεϊνών (210). Η *p53* είναι γνωστό ότι φωσφορυλιώνεται σε πολλά σημεία, τα οποία βρίσκονται στα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα (211). Έχει αναφερθεί ότι ο παράγοντας ανάπτυξης I, που μοιάζει με την ινσουλίνη, μπορεί να επιφέρει ένα αυξημένο επίπεδο φωσφορυλίωσης της *p53* και μια μετατόπιση της *p53* από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα στα *MCF7* ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού (212). Παρόλο που δεν είναι σαφές αν η αυξημένη φωσφορυλίωση της *p53* εμπλέκεται άμεσα με την πυρηνο-κυτταροπλασματική μετατόπιση της *p53*, υπάρχει η πιθανότητα η φωσφορυλίωση να επηρεάζει την τοποθέτηση της *p53* μέσα στο κύτταρο.

Υπάρχουν αρκετά φωσφορυλιωτικά γεγονότα τα οποία μπορεί να σχετίζονται με την ρύθμιση της τοποθέτησης της *p53* μέσα στο κύτταρο. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση αναστέλλει το δέσιμο της *MDM2* με την *p53* και ίσως εμπλέκεται στην ρύθμιση της τοποθέτησης της *p53* μέσα στο κύτταρο. Αυτό επιβεβαιώνεται και με υπάρχοντα δεδομένα με συγκεκριμένη φωσφορυλίωση της *p53* στη *Ser15* η οποία μπορεί να επηρεάσει την εισαγωγή της *p53* στον πυρήνα (213-215). Η φωσφορυλίωση που μπορεί άμεσα ή έμμεσα να επηρεάσει την προσβασιμότητα των *NLS* (Nuclear Localization Signal) και *NES* (Nuclear Export Signal) στους υποδοχείς τους, μπορεί επίσης να εμπλέκεται στην ρύθμιση της τοποθέτησης της *p53* μέσα στο κύτταρο. Μελέτες πραγματοποιούνται για να δοκιμάσουν την συσχέτιση μεταξύ αυτών των φωσφορυλίωσεων και την τοποθέτηση της *p53* μέσα στο κύτταρο.

1.4.6 Η μεταφορά της *p53* από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα

Λειτουργώντας κυρίως ως ένας μεταγραφικός παράγοντας, η εισαγωγή στον πυρήνα ή ο έλεγχος της *p53* είναι βασικός παράγοντας για την ομαλή λειτουργία της ως πρωτεΐνη που καταστέλλει την ανάπτυξη (216, 217) ή την έναρξη της απόπτωσης (218). Έτσι, κυτταρικοί μηχανισμοί πρέπει να υπάρχουν για την ρύθμιση της δυναμικής πυρηνο-κυτταροπλασματικής μεταφοράς της *p53*, είτε μέσω της αυξημένης εισαγωγής στον πυρήνα, είτε μέσω της μειωμένης εξαγωγής από τον πυρήνα. Μελέτες έχουν δείξει ότι η

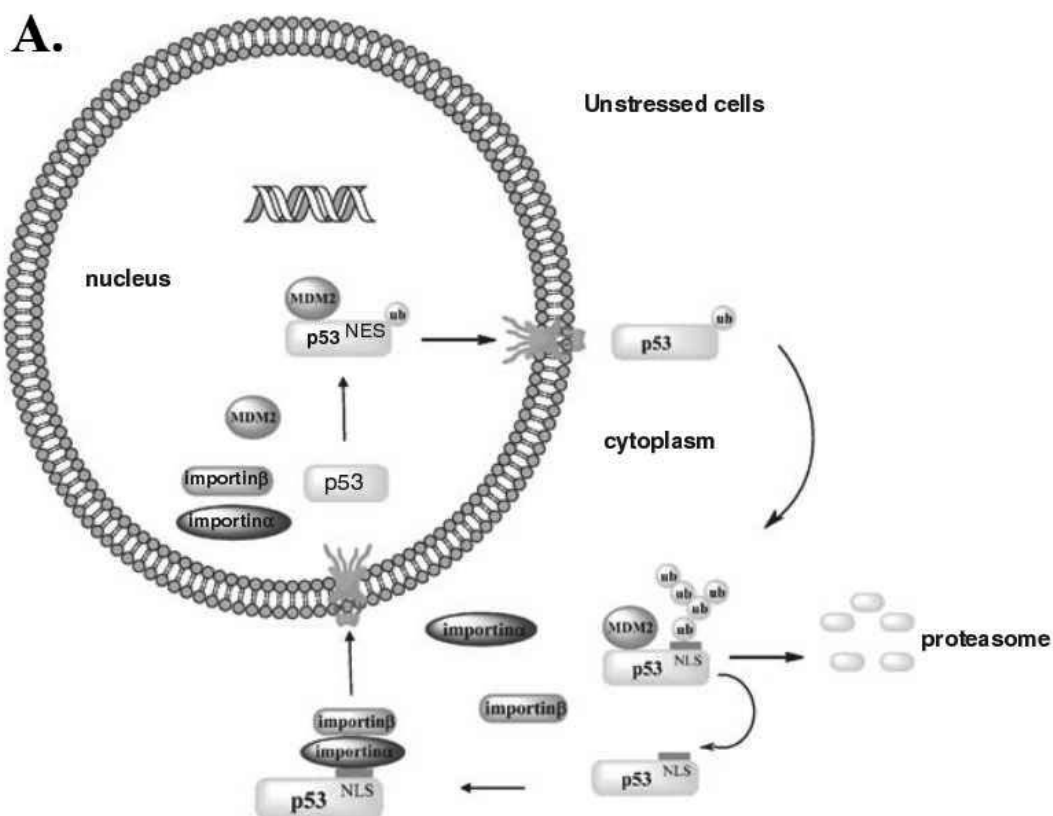
ελεύθερου-τύπου *p53* είναι κατανεμημένη ακανόνιστα στο κυτταρόπλασμα σε ένα υποσύνολο των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων, όπως ο καρκίνος του μαστού, ο καρκίνος του παχέως εντέρου και το νευροβλάστωμα (219-221). Παρόλο που δεν είναι ξεκάθαρο εάν ο φαινότυπος συνδέεται άμεσα με την κακοήθεια των κυττάρων, υπάρχει η υποψία ότι η ογκογένεση μπορεί να είναι το αποτέλεσμα μιας δυσλειτουργίας της ρύθμισης της εισαγωγής της *p53* στον πυρήνα.

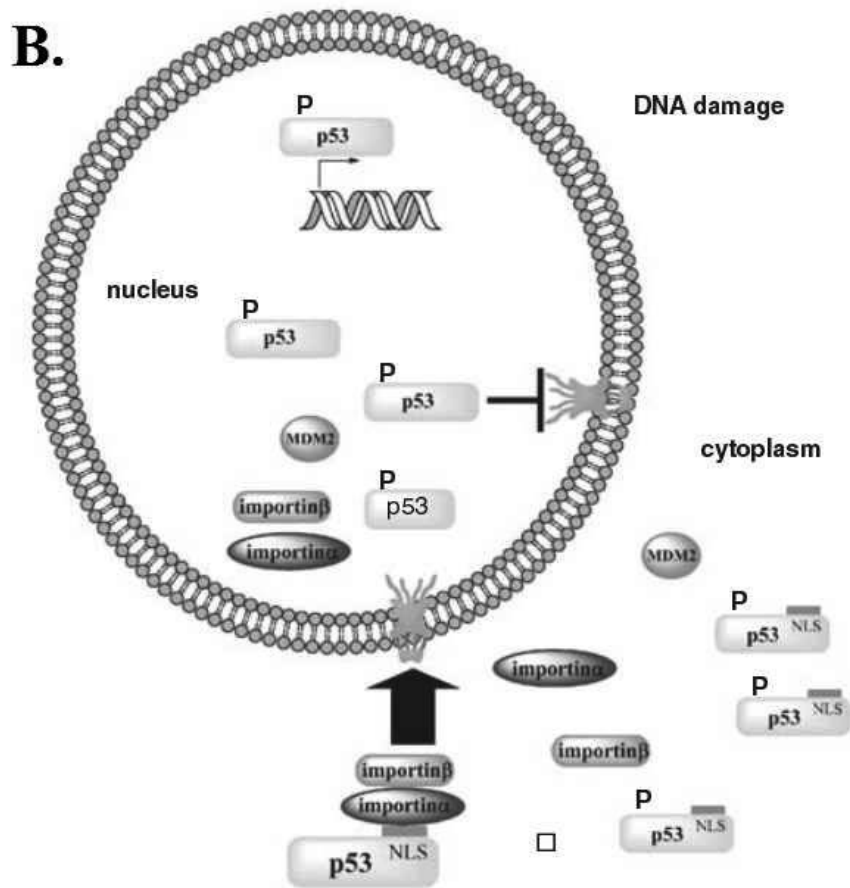
Το σήμα πυρηνικού εντοπισμού της *p53* (NLS) και το σήμα της εξαγωγής από τον πυρήνα (NES) είναι τα ουσιώδη δομικά στοιχεία για την πρωτεΐνη, η οποία υπόκειται σε πυρηνο-κυτταροπλασματική μεταφορά (Εικόνα 12 A, B). Το τυπικό *NLS* είναι είτε μονομερές είτε διμερές. Το μονομερές *NLS* αποτελείται από μια μονή και σύντομη αλυσίδα από διάφορα βασικά αμινοξέα. Το διμερές *NLS* αποτελείται από δυο ξεχωριστές δομές. Η εισαγωγή στον πυρήνα ξεκινά από την πρόσδεση του *NLS* στα συμπλέγματα των μορίων εισαγωγής α και β , τα οποία μεσολαβούν για την υποδοχή των πρωτεϊνών στο σύμπλεγμα των πυρηνικών πόρων (222, 223). Από την άλλη το σήμα *NES* χαρακτηρίζεται από μια αλληλουχία που είναι πλούσια σε λευκίνη, στην οποία αλληλουχία το μόριο εξαγωγής 1 μπορούν να προσδεθούν και να διευθύνουν την πρωτεϊνική εξαγωγή από τον πυρήνα (224-226).

Τρία μονομερή *NLS* έχουν ταυτοποιηθεί αρχικώς στο καρβοξυ-τελικό άκρο της *p53*, με την χρήση της ανάλυσης των ακολουθιών και της ανάλυσης των μεταλλάξεων (227). Το *NLS I* είναι το πιο δραστήριο από τα τρία στην διαχείριση της εισαγωγής της *p53* στον πυρήνα. Τα άλλα δυο *NLS*, τα *II* και *III*, είναι πολύ πιο αδύναμα. Το *NLS I* έχει παρουσιασθεί να έχει την δυνατότητα να διαχειριστεί την εισαγωγή στον πυρήνα μιας κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης (228). Παρόλα αυτά, ανακαλύφθηκε πρόσφατα ότι το *NLS I* δεν είναι λειτουργικό όταν είναι μόνο του, για την εισαγωγή της *p53* στον πυρήνα (229). Ένα βασικό μοτίβο το οποίο περιέχει την *Lys305-Arg306* και έναν διαχωριστή μεταξύ αυτού του μοτίβου και του *NLS I*, είναι απαραίτητα για την είσοδο της *p53* στον πυρήνα (229, 230). Επιπλέον, μια πλήρης αλληλουχία από την *Lys205* στο *NLS I* έχει ισχυρότερο δέσιμο με την importin α , από ότι έχει το *NLS I* μόνο του (229). Έτσι, το διμερές *NLS* φαίνεται ότι είναι πιο δραστικό, σε σχέση με το μονομερές.

Ένα εξαιρετικά διατηρημένο, πλούσιο σε λευκίνη, *NES* έχει ταυτοποιηθεί στον τετραμερισμό της *p53*. Το συγκεκριμένο σήμα *NES* είναι ταυτόχρονα και απαραίτητο και

επαρκές για να χειριστεί την εξαγωγή της *p53* από τον πυρήνα της (209). Ομοίως με άλλες πρωτεΐνες που περιέχουν πλούσιο σε λευκίνη *NES*, η εξαγωγή της *p53* από τον πυρήνα γίνεται με την παρέμβαση της *exportin 1* και μπορεί να κατασταλεί από την λεπτομυκίνη B, ένα φάρμακο που είναι γνωστό ότι προσδένεται στην *exportin 1* (231).





Εικόνα 12: Διευρυμένο μοντέλο της εισαγωγής και εξαγωγής της πρωτεΐνης p53 στον πυρήνα του κυττάρου με τη βοήθεια των σημάτων NLS (B) και NES (A) αντίστοιχα (232).

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

2.1.1. Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας ευκαρυωτικών κυττάρων

Η καλλιέργεια των διαφόρων κυτταρικών σειρών έγινε σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο, ο οποίος διατηρείται στείρος με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας. Προκειμένου να αποφευχθούν οι μολύνσεις, όλοι οι χειρισμοί οι σχετικοί με τα κύτταρα, πραγματοποιήθηκαν μέσα σε εστία νηματικής ροής (GELMAN Instrument Laminar Air Flow class 100). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο (Forma Scientific CO2 Incubator, Model 311 - Forma Scientific Inc.) σταθερής θερμοκρασίας 37°C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂ για τη διατήρηση του pH στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Ανάλογα με τις απαιτήσεις, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε τρυβλία ή σε πολυτρυβλία πολυστηρενίου (CELLSTAR – Greiner bio-one), όλα μίας χρήσης. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Olympus IM) ενώ η μακρόχρονη συντήρησή τους έγινε σε δοχείο υγρού αζώτου (-192°C).

2.1.2. Κυτταρική σειρά *MCF 7*

Για τις πειραματικές ανάγκες της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά *MCF7*. Η *MCF7* είναι μια κυτταρική σειρά που απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1970 από τον ιστό του μαστού μιας 69-χρονης καυκάσιας γυναίκας. Από τις δύο μαστεκτομές που υπεβλήθη, η πρώτη αποκάλυψε ότι ο ιστός που αφαιρέθηκε ήταν καλοήθεις. Πέντε χρόνια αργότερα, μια δεύτερη επέμβαση αποκάλυψε κακοήθες αδενοκαρκίνωμα, από το οποίο ελήφθησαν κύτταρα προς μελέτη, τα *MCF7*. Η γυναίκα υποβλήθηκε σε θεραπεία για τον καρκίνο του μαστού με ακτινοθεραπεία και ορμονοθεραπεία. *MCF7* επομένως, είναι μια ανθρώπινη κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος του μαστού και έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στην έρευνα.

2.1.3. Υλικά κυτταρικής καλλιέργειας

Επανακαλλιέργεια κυτταρικής σειράς

Για την ανάπτυξη των κυτταρικών σειρών χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό *Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)* με 4500 mg *glucose*/L, 100mg *sodium pyruvate*/L και *L-glutamine* (Sigma #D6429) και διατηρήθηκε σε θερμοκρασία 4 °C. Πριν τη χρήση του προστέθηκαν 5ml/500ml από τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (PenStrep– Gibco #15070-063) σε συγκεντρώσεις 5×10^4 U και 5×10^5 μg αντίστοιχα ανά λίτρο καθώς και 10% ορός *FBS*.

1. Διάλυμα έκπλυσης - *PBS*

Οι εκπλύσεις των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων - *PBS*, ελλειμματικού σε ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} , pH 7.2: 139 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.37 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.44 mM KH_2PO_4 , 4.16 mM NaHCO_3 . Μετά την παρασκευή του, το διάλυμα ρυθμίζεται σε pH 7,3 με τη βοήθεια φωσφορικού οξέως 85% και αποστειρώνεται για 25 λεπτά, στους 121°C, σε αυτόκαυστο (Dr Morand S.A., Switzerland) και διατηρείται στους 4°C.

2. Ορός - *FBS*

Σε όλες τις κυτταρικές καλλιέργειες το θρεπτικό υλικό εμπλουτίζεται αμέσως πριν τη χρήση του με ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum - Gibco®) σε τελική συγκέντρωση 10% (κατ' όγκο ή κατά βάρος;). Η προσθήκη του ορού είναι απαραίτητη για τον εμπλουτισμό του θρεπτικού υλικού με αναπτυξιακούς παράγοντες αναγκαίους για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

3. Διάλυμα θρυψίνης - *Trypsin*

Η αποκόλληση των κυττάρων από το ταπήτιο των τρυβλίων της κυτταροκαλλιέργειας επιτυγχάνεται με τη χρήση 10% διαλύματος θρυψίνης (2,5% trypsin 10x - Gibco®) σε ρυθμιστικό διάλυμα *PBS* ελλειμματικού σε ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} . Η επίδραση με τρυψίνη για 3-5 λεπτά βοηθά στη αποδιάταξη των πρωτεϊνών της

εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM), για να επιτευχθεί η δημιουργία μονοκύτταρου κυτταρικού εναιωρήματος.

2.1.4. Αποθήκευση ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών σε υγρό άζωτο

Αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με διάλυμα *PBS* (1x). Στη συνέχεια προστίθεται στο ταπήτιο διάλυμα θρυψίνης και τα κύτταρα μετά την αποκόλλησή τους συλλέγονται σε θρεπτικό υλικό. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1.500 rpm, για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε κατάλληλο υλικό αποθήκευσης, το οποίο αποτελείται από *FBS* (90%) και *DMSO* (10%), ενώ η πυκνότητα των κυττάρων είναι περίπου 6×10^6 κύτταρα ανά 1 ml υλικού αποθήκευσης. Παρενθετικά ως σημειωθεί πως το *DMSO* περιβάλλει την κυτταρική μεμβράνη και τη σταθεροποιεί έναντι της θραύσης της, έναντι της χαμηλής θερμοκρασίας. Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε σωληνάριο ψύξης (cryovial 1,5 ml – Greiner Bio-one), το οποίο καταψύχεται σταδιακά, αρχικά στους -20°C , έπειτα στους -80°C για 24 ώρες και στη συνέχεια σε δοχείο υγρού αζώτου, στους -192°C .

2.1.5. Απόψυξη ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών από το υγρό άζωτο

Η απόψυξη των κυττάρων έλαβε χώρα με ταχεία μεταφορά των φιαλιδίων κατάψυξης από το υγρό άζωτο στο υδατόλουτρο και σε θερμοκρασία 37°C . Εκεί τα φιαλίδια διατηρήθηκαν μέχρι αποψύξεως, υπό ήπια ανάδευση. Το εναιώρημα των κυττάρων υπέστη αραίωση σε 20 ml *DMEM* και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε (3.000 στροφές ανά λεπτό/5min) σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό *DMEM*, όντας έτοιμο για περαιτέρω καλλιέργεια.

2.1.6. Ικανότητα των κυττάρων να δημιουργούν αποικίες (Colony Efficiency)

Στόχος είναι να μελετηθεί η ικανότητα των κυττάρων να αναπτύσσουν μεγάλες αυτοσυντηρούμενες αποικίες έπειτα από επώασή τους στις εκάστοτε ακραίες συνθήκες, σε σύγκριση με την ικανότητα αυτή των κυττάρων στα οποία δεν έχει συμβεί κάποια αλλαγή (control).

Από ένα αρχικό τρυβλίο 10 cm πληρότητας 100%, τρυψινοποιούμε τα κύτταρα σε τελικό όγκο κύτταρα σε *DMEM* 10 ml, τα οποία συλλέγονται σε *Universal* των 30ml

(Greiner #201170). Από αυτό το δείγμα συλλέγονται 10 μ l και τοποθετούνται σε πλάκα *Neu Bauer*, ώστε να γίνει καταμέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Σε τρυβλία 60 mm προστίθενται 40.000 κύτταρα και ο τελικός όγκος του κάθε τρυβλίου συμπληρώνεται με θρεπτικό υλικό ως τα 5 ml. Τα τρυβλία τοποθετούνται στον επωαστή για 24 ώρες.

Μετά την πάροδο των 24 ωρών γίνεται η τοποθέτηση των τρυβλίων σε διαφορετικά υδατόλουτρα, ρυθμισμένα σε ακραίες θερμοκρασίες τις οποίες απαιτεί η πειραματική διαδικασία. Μετά το πέρας του χρόνου το τρυβλίο επανατοποθετείται στον επωαστή για τον επιθυμητό κάθε φορά χρονικό διάστημα (recovery).

Μετά την πάροδο του χρόνου επώασης, καταμετρούνται 5.000 κύτταρα από κάθε τρυβλίο και μεταφέρονται σε νέο τρυβλίο 60 mm. Τα κύτταρα αφήνονται να αναπτυχθούν για περίπου 10 ημέρες με καθημερινή οπτική παρακολούθηση, ενώ πραγματοποιείται αλλαγή θρεπτικού υλικού κάθε 3 ημέρες.

Έπειτα από την πάροδο των 10 ημερών ακολουθεί χρώση των αποικιών. Πραγματοποιείται πλύση των τρυβλίων και προσθήκη 10 ml μίγματος αιθανόλης – οξικού οξέος 3:1. Τα τρυβλία τοποθετούνται στους -20°C για 10 λεπτά, ώστε να μονιμοποιηθούν τα κύτταρα. Στη συνέχεια απορρίπτεται το μείγμα μεθανόλης – οξικού οξέος και τα τρυβλία αφήνονται στον απαγωγό να στεγνώσουν. Στη συνέχεια προστίθενται 5 ml *Giemsa*/νερό βρύσης 1:10 και τα τρυβλία τοποθετούνται σε θερμοκρασία δωματίου για μισή ώρα περίπου, περιμένοντας να βαφτούν οι αποικίες. Απορρίπτεται η χρωστική και τα τρυβλία ξεπλένονται καλά με νερό βρύσης. Όταν στεγνώσουν πραγματοποιείται η μέτρηση των αποικιών.

2.1.7. Ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων

Τα κύτταρα θρυψινοποιούνται σε τελικό όγκο *DMEM*/κυττάρων 10 ml και μεταφέρονται σε σωληνάρια *Universal* των 30ml (Greiner #201170). Λαμβάνονται 100 μ l και γίνεται μέτρηση των κυττάρων σε πλάκα *New Bauer* στο μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης. Στη συνέχεια υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός των κυττάρων καθώς και η ποσότητα που απαιτείται για την προσθήκη του επιθυμητού αριθμού των κυττάρων (3×10^5 κύτταρα) σε κάθε τρυβλίο 60 mm. Ο τελικός όγκος του κάθε τρυβλίου πρέπει να είναι 5 ml και συμπληρώνεται με *DMEM*. Τα τρυβλία τοποθετούνται στον επωαστή στους 37°C και

σε 5% CO₂ για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών τα κύτταρα θρυψινοποιούνται ξανά και καταμετρούνται. Το αποτέλεσμα καταγράφεται και το συγκεκριμένο δείγμα απορρίπτεται. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται κάθε 24 ώρες και κάθε φορά η καταμέτρηση γίνεται σε νέο τρυβλίο με νέο δείγμα. Οι καταμετρήσεις καταγράφονται και στο τέλος κατασκευάζεται η καμπύλη πολλαπλασιασμού των κυττάρων.

2.2. ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ – ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΕΚΧΕΙΛΙΣΜΑΤΑ

2.2.1. Λύση κυττάρων – Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα

Κύτταρα που σχηματίζουν μονή στριβάδα σε τρυβλίο, αφήνονται να αναπτυχθούν, έως ότου καταλάβουν το 100% περίπου της επιφάνειας του ταπητίου ενός τρυβλίου διαμέτρου 10 cm. Το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και ακολουθεί διπλή έκπλυση των κυττάρων με 10 ml (ανά έκπλυση) διαλύματος *PBS* (1x).

Με ένα φύλο σιλκόνης τα κύτταρα αποκολλούνται από το ταπήτιο του τρυβλίου, συλλέγονται σε 10 ml *PBS* (1x), μεταφέρονται σε αποστειρωμένα φυγοκεντρικά σωληνάκια και φυγοκεντρώνται (Sigma - #D-37520) στις 2.000 rpm για 3 λεπτά στους 4°C.

Μετά τη φυγοκέντρηση αφαιρείται το υπερκείμενο, τα κυτταρικά ιζήματα επαναιωρούνται σε 1 ml *PBS* (1x) και μεταφέρονται σε *Eppendorf* μικροφυγοκεντρικά σωληνάκια. Τα δείγματα διατηρούνται στον πάγο. Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 10 δευτερόλεπτα (short spin) στις 11.000 rpm στη φυγόκεντρο *Eppendorf centrifuge 5417C*, σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρείται το υπερκείμενο πλήρως με αναρρόφηση υπό κενό (στο σημείο αυτό τα κύτταρα μπορούν να αποθηκευτούν και να φυλαχτούν στους -80°C για σύντομο χρονικό διάστημα) και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 300 μl διαλύματος *RIPA* (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton-X-100, 1% (w/v) Sodium deoxycolate, 0.1% (w/v) SDS), παρουσία 1 mM *PMSF*, 1 μg/ml *leupeptin* και 1 μg/ml *pepstatin*.

Το εναιώρημα επωάζεται για 20 λεπτά στον πάγο, με αναδεύσεις ανά 5 λεπτά. Στα 5 πρώτα λεπτά διευκολύνεται η λύση των κυττάρων περνώντας το εναιώρημα από σύριγγα 1 ml *Kessler* (#SH.K01), μέσα από βελόνα 21x1,5 G (Unoloksingleuse needles) και ανάδευση σε *Vortex* (K-550-GE). Για την τελική διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών, το

εναιώρημα οδηγείται σε συσκευή υπερήχων (Vibra Cell VCX 130 PB) όπου και εφαρμόζονται σε αυτό διαδοχικοί παλμοί των 30 sec στα 30 Watt, οι οποίοι εναλλάσσονται σε ισόχρονα διαστήματα εναπόθεσης στον πάγο (για να αποφευχθεί η υπερθέρμανσή του) και για συνολικό χρόνο 2 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα 14.800 rpm για 20 λεπτά στους 4°C σε μικροφυγοκεντρικό *Eppendorf*. Το υπερκείμενο το οποίο αποτελεί και το ολικό κυτταρικό εκχύλισμα των πρωτεϊνών, συλλέγεται και μεταφέρεται σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα *Eppendorf*. Το υπερκείμενο, το οποίο αποτελεί και το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων, συλλέγεται και μεταφέρεται σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα *Eppendorf*, όπου επαναιωρείται σε διάλυμα φόρτωσης 5x (3,785% w/v Trizma base, 15% w/v SDS, 50% v/v γλυκερόλη 87%, 25% v/v 2-μερκαπτεθανόλη), ρυθμισμένο σε pH 6,8 και εμπλουτισμένο με 0,5% w/v κυανό της βρωμοφαινόλης. Στη συνέχεια το δείγμα (πρωτεϊνικό εκχύλισμα και διάλυμα φόρτωσης) θερμαίνεται προς αποδιάταξη στους 100°C για 5 min σε θερμική συσκευή (Test Tube Heater SHT 10).

2.2.2. Λύση κυττάρων – Διαχωρισμός των πυρηνικών πρωτεϊνών από τις κυτταροπλασματικές

Για τον διαχωρισμό των πυρηνικών πρωτεϊνών από τις κυτταροπλασματικές χρησιμοποιείται το ακόλουθο κιτ: *Nuclear & Cytoplasmic Extraction* (G-Biosciences Cat #786-182). Συγκεκριμένα ακολουθείται το πρωτόκολλο του κιτ με τα αντίστοιχα διαλύματα για κυτταρικό ίζημα 50 μl.

2.2.3. Λύση κυττάρων – Απομόνωση πυρηνίσκων σε βαθμιδώσεις σακχαρόζης

Για την απομόνωση των πυρηνίσκων, χρησιμοποιήθηκε παλαιότερο πρωτόκολλο (233) με τις κατάλληλες τροποποιήσεις όπου αυτό κρίθηκε απαραίτητο για τις εκάστοτε πειραματικές συνθήκες.

Συλλέγονται τα κύτταρα από 4 τρυβλία των 10 cm πληρότητας 80% σε παγωμένο PBS 1x και φυγοκεντρώνται στα 500 g για 5 min. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1,5 ml υποτονικού διαλύματος (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl και 1 mM MgCl₂) και αφήνονται στον πάγο για 30 min προκειμένου να υποστούν οσμωτική λύση. Στη συνέχεια προστίθεται σε κάθε δείγμα μίγμα αναστολέων πρωτεόλυσης (1 μg πεπτατίνη A (Sigma -

#P5318), 1 μg λευπεπτίνη (Sigma - #L2023), 1 mM *PMSF* (Sigma - #P7626) και η λύση υποβοηθείται με την προσθήκη 0.004% v/v *Nonidet P-40* (NP40) (Roche Applied Science - #11754599001) και ομογενοποίηση (RZR 0 - Heidolph, Germany). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1.200 g για 3 min και οι πυρήνες (ίζημα) επαναιωρούνται σε 500 μl διαλύματος 0.25 M σακχαρόζης με περιεκτικότητα 10 mM MgCl_2 , ενώ το υπερκείμενο απορρίπτεται.

Οι πυρήνες καθαρίζονται, περνώντας τους από 500 μl διαλύματος 0.88 M σακχαρόζης με περιεκτικότητα 0.05 μM MgCl_2 , αφού φυγοκεντρηθούν στα 1.200 g για 10 min. Οι καθαροί πυρήνες επαναιωρούνται σε 250 μl διαλύματος 0.34 M σακχαρόζης περιεκτικότητας 0.05 mM σε MgCl_2 , με την προσθήκη 2 U απυράσης (Sigma - #A6410) και η πυρηνική μεμβράνη τους διασπάται με τρία σετ υπέρηχων των 30 δευτερολέπτων με ενδιάμεσες παύσεις του 1 min για να αποφευχθεί η υπερθέρμανση του δείγματος. Το διάλυμα που προκύπτει μετά τους υπέρηχους, το περνάμε από ένα στρώμα 250 μl διαλύματος 0.88 M σακχαρόζης, περιεκτικότητας 0.05 μM σε MgCl_2 φυγοκεντρώντας στα 2.000 g για 20 min, ώστε να καθαριστούν οι πυρηνίσκοι από το πυρηνόπλασμα.

2.2.4. Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών (Bio-Rad protein assay)

Η μέτρηση της ποσότητας των πρωτεϊνών έγινε με χρήση υλικών της εταιρείας *Bio-Rad*. Ο τρόπος υπολογισμού της πρωτεΐνης βασίζεται στη μέθοδο *Bradford*, κατά την οποία η ερυθρόχρωμη χρωστική *Coomassie Brilliant Blue G-250* αλλάζει μέγιστο απορρόφησης από τα 460 nm στα 595 nm, όταν αυτή δεσμευτεί σε μία πρωτεΐνη. Έτσι μετρώντας σε ένα φασματοφωτόμετρο τις τιμές απορρόφησης στα 595 nm διαφορετικών αραιώσεων μίας πρωτεΐνης αγνώστου συγκέντρωσης και συγκρίνοντας αυτές με μία πρότυπη καμπύλη τιμών απορρόφησης που αντιστοιχούν σε γνωστές συγκεντρώσεις μίας πρωτεΐνης (συνήθως καθαρής αλβουμίνης βοός), είναι δυνατός ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού μας διαλύματος.

Η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης για μικρές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών γίνεται παρασκευάζοντας διαδοχικές αραιώσεις, από 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ως 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, της πρωτεΐνης γνωστής συγκέντρωσης, καθώς και κατάλληλες αραιώσεις της άγνωστης πρωτεΐνης. Όλες οι αραιώσεις γίνονται σε dH_2O και έχουν τελικό όγκο 0,8 ml. Ταυτόχρονα ετοιμάζουμε και

ένα δείγμα που περιέχει μόνο dH_2O και το οποίο θα αποτελέσει τον μάρτυρα κατά τη φωτομέτρηση.

Στη συνέχεια προστίθενται σε όλα τα δείγματα 0,2 ml διαλύματος χρωστικής (Bio-Rad -#500-0006) και αναδεύονται ήπια αρκετές φορές. Μετά από 5 λεπτά επώασης, ακολουθεί φωτομέτρηση (BECKMANDU520) σε μήκος κύματος 595 nm και με δείγμα αναφοράς τον αρνητικό μάρτυρα, και κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη και υπολογίζεται η άγνωστη συγκέντρωση.

Καθ' όλη τη διάρκεια της μεθόδου, θα πρέπει τα δείγματα να φιλτράρονται ώστε να μην εμφανίζονται συσσωματώματα, τα οποία θα έχουν τον κίνδυνο ψευδούς αύξησης της οπτικής πυκνότητας του δείγματος.

2.2.5. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών, υπό αποδιατακτικές συνθήκες, πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση μίας διαστάσεως σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου-*SDS*, σύμφωνα με τη μέθοδο *Laemli* (234). Κατά την ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιείται σύστημα δύο κάθετων γυάλινων πλακών, στα άκρα των οποίων βρίσκονται δύο ειδικά διαχωριστικά (spacers Bio-Rad - #1652932) και στο ενδιάμεσο όλων υπάρχει κενό, εκεί όπου στοιβάζονται η πηκτές πολυακρυλαμιδίου, οι οποίες χωρίζονται σε δύο μέρη:

- ✓ Την επάνω πηκτική επιστοίβαξης, με τελική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 5% (H_2O , 30% Acrylamide mix, 1 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 10% APS, TEMED) με μεγάλο μέγεθος πόρων και
- ✓ Την πηκτική διαχωρισμού, με μεταβλητή τελική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου από 6% έως 15% αναλόγως το μέγεθος των πρωτεϊνών που επιθυμούμε να δούμε στην πηκτική. Για τελική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 10% (H_2O , 30% Acrylamide mix, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 10% SDS, 10% APS, TEMED) με μικρότερο μέγεθος πόρων.

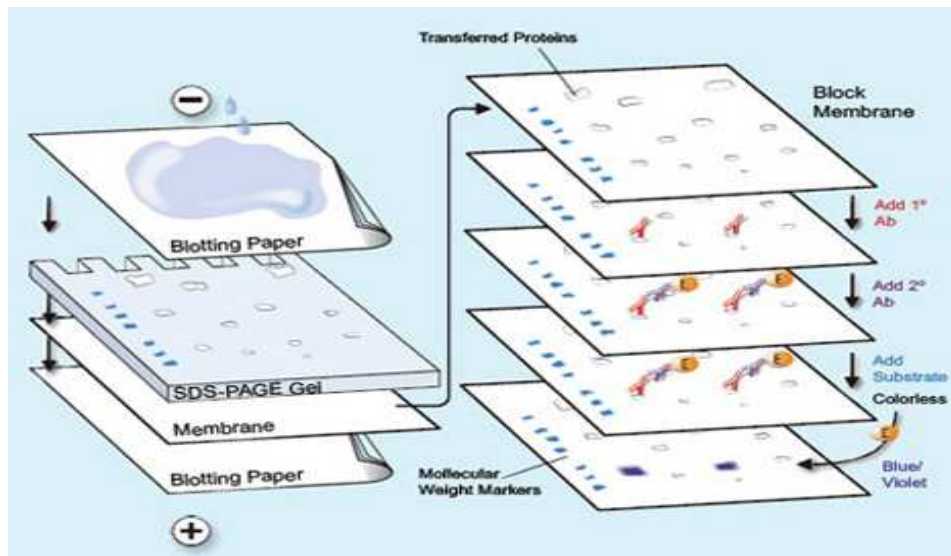
Τα μίγματα των δύο πηκτών, μετά την παρασκευή τους, πολυμερίζονται με προσθήκη *ammonium persulfate* (Sigma - #A3678) και *TEMED* (Sigma - #T8133). Ο πολυμερισμός της πηκτικής έγινε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 λεπτά. Πριν την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα των πρωτεϊνών ξηραίνονται σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτή

κενού, επαναιωρούνται σε 20-30 μl διάλυμα φόρτωσης (62.5 mM Tris-HCl, 3% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol, 0.01% (w/v) bromophenolblue) και θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 95-100°C. Ακολούθως, φορτώνονται στην πηκτή με σύριγγα *Hamilton* 50 μl (#705N). Η ηλεκτροφόρηση ολοκληρώνεται σε περίπου 120 mAmp ή στα 100V για περίπου δύο ώρες σε κατάλληλο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer: 25 mM Tris- HCl, 192 mM Glycine, 0.1% SDS). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης οι πρωτεΐνες γίνονται ορατές με χρώση της πηκτής για 30 λεπτά περίπου, υπό ανάδευση, σε διάλυμα χρωστικής *Coomassie* [0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue , 9.2% (v/v) acetic acid, 45.5% methanol]. Ο αποχρωματισμός γίνεται, υπό ολονύκτια ανάδευση, σε διάλυμα αποχρωματισμού [25% (v/v) methanol, 7% (v/v) acetic acid].

2.2.6.Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blot)

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης και εφόσον λάβει χώρα η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης, ακολουθεί η διαδικασία μεταφοράς των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Whatman - #10401196). Η πηκτή καταβυθίζεται σε διάλυμα μεταφοράς [0.58% (w/v) Tris-HCl, 0.292% Glycine, 20% (v/v) Methanol], για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Στο ίδιο διάλυμα μεταφέρονται και 4 κομμάτια απορροφητικού χαρτιού *Whatman* 3mm (#3030917), καθώς και ένα κομμάτι μεμβράνης νιτροκυτταρίνης *Whatman* (cellulose nitrate membrane- GE Healthcare – Life sciences), τα οποία έχουν ακριβώς τις ίδιες διαστάσεις με αυτές της πηκτής, δηλαδή 8,4 cm x 5,5 cm.

Στη συνέχεια και προκειμένου για πηκτές μικρών διαστάσεων (minigels), τα κομμάτια τα εμποτισμένα με το διάλυμα μεταφοράς, φέρονται στην επιφάνεια του ακίνητου ηλεκτροδίου συσκευής ημίξηρης πρωτεϊνικής ηλεκτρομεταφοράς (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad) με την ακόλουθη σειρά: 2 φύλλα χαρτιού *Whatman* – 1 φύλλο μεμβράνης νιτροκυτταρίνης – πηκτή - 2 φύλλα χαρτιού *Whatman*. Με τη βοήθεια πιπέτας *Pasteur*, απομακρύνουμε τις φυσαλίδες μεταξύ των κομματιών και εν συνεχεία διαβρέχουμε και τα δύο ηλεκτρόδια με το διάλυμα μεταφοράς που αναφέραμε προηγουμένως και τέλος εφαρμόζουμε στην επιφάνειά τους το δεύτερο ηλεκτρόδιο της συσκευής (αρνητικός πόλος). Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται σε σταθερή τάση 15 Volt για 30 λεπτά.



Εικόνα 13: Ημίξηρη πρωτεϊνική μεταφορά. Απεικόνιση της ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών από την πήκτη στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και στη συνέχεια απεικόνιση της επώασης της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα.

Μετά το τέλος αυτής, η μεμβράνη μεταφέρεται σε διάλυμα *PBS* (1x) παρουσία σκόνης μη λιπαρού γάλακτος 3% (w/v), και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση, για τουλάχιστον 2h, προκειμένου να καλυφθούν οι θέσεις της μεμβράνης στις οποίες δεν υπάρχουν πρωτεΐνες που θα μπορούσαν να δώσουν μη ειδικές συνδέσεις κατά τη διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης.

Ακολούθως η μεμβράνη υφίσταται 2 διαδοχικές εκπλύσεις, διάρκειας 5 λεπτών η κάθε μία, με 300 ml διαλύματος *PBS* (1x). Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με το ειδικό πρωτογενές αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που θέλουμε να ανιχνεύσουμε σε 10 ml διαλύματος *PBS* (1x), παρουσία *BSA* 3% (w/v), σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 1h υπό ανακίνηση ή στους 4°C υπό ολονύκτια ανάδευση.

Μετά το τέλος της επώασης, η μεμβράνη υφίσταται 2 διαδοχικές εκπλύσεις, διάρκειας 5 λεπτών η κάθε μία, με 300 ml διαλύματος *PBS* (1x), παρουσία *Tween-20*, 0.05% (w/v), προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος. Κατόπιν η μεμβράνη επωάζεται με αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών του είδους προέλευσης του πρωτογενούς αντισώματος. Η επώαση γίνεται σε 10 ml διαλύματος 3% *BSA/PBS* (1x) και διαρκεί για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση.

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής πρωτογενή αντισώματα:

- ✓ *anti-Hsp70* (Enzo Life Sciences - #ADI-SPA-810 - κλώνος C92F3A-5) (αραίωση 1:5000),
- ✓ *anti-PARP-1* (Santa Cruz Biotechnology, sc-7150) (αραίωση 1:1000),
- ✓ *p53* (DO-1) (Santa Cruz Biotechnology, sc-126) (αραίωση 1:100 - 1:1000),
- ✓ *phospho-p53* (Ser 15) (Cell Signalling - #9284S) (αραίωση 1:1000),
- ✓ *anti- α tubulin* (Sigma - #T5168 - κλώνος B-5-1-2) (αραίωση 1:5000),
- ✓ *anti-PCNA* [PC10] (Abcam - ab29)

Επίσης χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο κιτ:

Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Antibody Sampler Kit (Cell Signaling #9782)

- ✓ *Vimentin* (D21H3) XP rabbit mAb #5741 (αραίωση 1:1000)
- ✓ *N-Cadherin* (D4R1H) XP rabbit mAb #13116 (αραίωση 1:1000)
- ✓ *Slug* (C19G7) rabbit mAb #9585 (αραίωση 1:1000)
- ✓ *E-Cadherin* (24E10) rabbit mAb #3195 (αραίωση 1:1000)

Το δευτερογενές αντίσωμα φέρει συζευγμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης του ραπανιού (HRP), το οποίο είναι υπεύθυνο για την αντίδραση χημειοφωταύγειας. Η επώαση γίνεται σε 10 ml διαλύματος *PBS* (1x) που περιέχει 2.5% (w/v) μη λιπαρού γάλα και διαρκεί για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής δευτεροταγή αντισώματα:

- ✓ *anti-mouse IgG* (H+L) *Peroxidase conjugated* (Pierce, 31430) (αραίωση 1:5000),
- ✓ *anti-rabbit IgG* (H+L) *Peroxidase conjugated* (Pierce, 31460) (αραίωση 1:5000),
- ✓ *anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody* (Cell Signaling #7074) (αραίωση 1:1000)

Μετά και την επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα, η μεμβράνη υφίσταται 2 εκπλύσεις με διάλυμα 0,05% v/v *Tween 20/PBS* 1x, και ακολουθεί η τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (*ECL*) προκειμένου να εμφανιστούν οι ζώνες των

επιθυμητών πρωτεϊνών. Μετά το πέρας της εμφάνισης, η μεμβράνη εκπλένεται από το *ECL* με *Tween 20/ PBS* και είτε φυλάσσεται για μελλοντική χρήση σε *PBS* στους 4°C είτε επωάζεται με νέο αντίσωμα.

2.2.7.Χρώση των πρωτεϊνών στην πηκτή με *Coomasie blue*

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, έπειτα από τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε φύλλο νιτροκυτταρίνης, οι πρωτεΐνες που έχουν διατρέξει την πηκτή γίνονται ορατές μετά από χρώση της πηκτής σε διάλυμα *Coomasie Brilliant Blue* (0,25% w/v *Coomasie Brilliant Blue G250* (Fluka - #27815), 9,2% v/v οξικό οξύ, διάλυμα μεθανόλης 50%), για τουλάχιστον 2 ώρες.

Η παραμονή στο διάλυμα χρώσης βάφει ολόκληρη την πηκτή, γι αυτό είναι απαραίτητος ο αποχρωματισμός της προκειμένου να εμφανιστούν μόνο οι ζώνες των πρωτεϊνών, οι οποίες παραμένουν χρωματισμένες. Ο αποχρωματισμός πραγματοποιείται σε διάλυμα αποχρωματισμού 25% v/v μεθανόλης – 7% v/v οξικού οξέως υπό ολονύκτια ανάδευση. Μετά την πάροδο 2 ωρών στο διάλυμα αποχρωματισμού, προκειμένου να επιταχυνθεί η διαδικασία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί αλλαγή του διαλύματος αποχρωματισμού με νέο και με προσθήκη απορροφητικού χαρτιού κουζίνας, το οποίο δεσμεύει την περίσσεια της χρωστικής.

2.2.8.Χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με *PonceauS*

Προκειμένου να ελέγξουμε εάν έχει πραγματοποιηθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδιου στο φύλλο νιτροκυτταρίνης, μπορούμε να βάψουμε τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με διάλυμα *PonceauS* (Sigma – #P3504) (2% w/v *PonseauS*, 50% v/v TCA και 30% w/v θειο-σαλικυλικό οξύ (Sigma #S3147)). Το πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής έγκειται στην ικανότητα επαναχρησιμοποίησης της μεμβράνης, καθώς η χρωστική απομακρύνεται πλήρως από τη μεμβράνη μετά από πλύσεις με *PBS 1x*.

Η μεμβράνη τοποθετείται σε δοχείο και εμβαπτίζεται σε διάλυμα *PonceauS*, όπου και παραμένει υπό ανάδευση για 5 min. Αφού ολοκληρωθεί η χρώση της μεμβράνης, η χρωστική επιστρέφεται στο δοχείο της και δύναται να επαναχρησιμοποιηθεί. Η εμφάνιση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη γίνεται με σταδιακό αποχρωματισμό της με τη χρήση

ddH₂O μέχρι του επιθυμητού βαθμού αποχρωματισμού. Ο πλήρης αποχρωματισμός επιτυγχάνεται με διαδοχικές πλύσεις της μεμβράνης με *PBS* 1x, υπό ανάδευση.

2.2.9.Ανοσοκαθίζηση πρωτεϊνών (Immunoprecipitation)

Προκειμένου να ελέγξουμε τις ειδικές αλληλεπιδράσεις των προς εξέταση πρωτεϊνών χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο της ανοσοκαθίζησης.

Λαμβάνεται το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από κύτταρα που καλύπτουν πλήρως την επιφάνεια του ταπητίου τρυβλίου διαμέτρου 10 cm. Στο κυτταρικό εκχύλισμα προσθέτουμε 20 μl σφαιριδίων σεφαρόζης (GE Healthcare - #17-0618-01), τα οποία φέρουν στην επιφάνειά τους συζευγμένη πρωτεΐνη *G*. Ακολουθεί επώαση υπό ανακίνηση, στους 4°C για 2 h, προκειμένου να επιτευχθεί η προ-προσρόφηση του κυτταρικού εκχυλίσματος, κατά την οποία απομακρύνονται πρωτεΐνες οι οποίες συνδέονται μη ειδικά με την πρωτεΐνη *G*.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2.500 rpm, στους 4°C για 5 λεπτά. Συλλέγεται το υπερκείμενο και μεταφέρεται σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα, όπου προστίθεται ποσότητα 1 μg του αντισώματος έναντι της εξεταζόμενης πρωτεΐνης, καθώς και διάλυμα *BSA* (1 mg/ml) για την κάλυψη μη ειδικών θέσεων στα σφαιρίδια σεφαρόζης. Το δείγμα επωάζεται υπό ανακίνηση, στους 4°C, ολονύκτια. Στο δείγμα προστίθενται 20 μl εναιωρήματος αποτελούμενο από σφαιρίδια σεφαρόζης και πρωτεΐνη *G* και η επώαση συνεχίζεται στις ίδιες συνθήκες για επιπλέον 2 h.

Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρώνται στις 2.500 rpm, στους 4°C για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο (μη δεσμευμένη πρωτεΐνη) συλλέγεται, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας, για τον τελικό προσδιορισμό της ποσότητας της πρωτεΐνης που δεσμεύτηκε στο αντίσωμα. Το ίζημα υφίσταται 3 διαδοχικές εκπλύσεις με 1 ml διαλύματος *RIPA* κάθε φορά και κάτω από τις ίδιες συνθήκες φυγοκέντρησης, όπως και προηγουμένως, προκειμένου να απομακρυνθεί η ποσότητα του ασύζευκτου αντισώματος.

Μετά το τέλος και της τρίτης φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 40 μl διάλυμα φόρτωσης *SDS-PAGE* (1,5x). Πριν την ηλεκτροφόρηση σε *SDS-PAGE*, το δείγμα υφίσταται αφενός μεν, βρασμό στους 100°C και ισχυρή ανάδευση ώστε να απελευθερωθεί η πρωτεΐνη από τα σφαιρίδια σεφαρόζης, αφετέρου δε, φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 5 sec σε μικροφυγόκεντρο *Eppendorf* έτσι

ώστε να ιζηματοποιηθούν πάλι τα σφαιρίδια τα οποία μπορούν να παρεμποδίσουν την ομαλή ροή των πρωτεϊνών εντός της πηκτής και να μείνουν στο υπερκείμενο οι πρωτεΐνες.

2.2.10.Ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών (Immunofluorescence)

Ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός των εξεταζομένων πρωτεϊνών κατέστη δυνατός με τη χρήση της τεχνικής του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Κατά τη διαδικασία του ανοσοφθορισμού, τα κύτταρα τοποθετούνται πάνω σε αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες 2x2 cm (Deltalab - #D102222) εντός τρυβλίου διαμέτρου 10 cm, σε πυκνότητα $2,5 \times 10^6$ κύτταρα/τρυβλίο και αφήνονται να αναπτυχθούν για μια ημέρα.

Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και ακολουθεί διπλή έκπλυση των κυττάρων με 10 ml (ανά έκπλυση) διαλύματος *PBS* 1x. Κατόπιν τα κύτταρα μονιμοποιούνται για 10 λεπτά με διάλυμα παραφορμαλδεΐδης (Riedel-de Haen - #16005) 2% w/v σε *PBS* 1x σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά την μονιμοποίησή τους, τα κύτταρα εκπλένονται 2-3 φορές με διάλυμα *PBS* 1x και επώάζονται με παγωμένη καθαρή μεθανόλη για 3-5 λεπτά στους -20°C , προκειμένου να ανοίξουν οι πόροι στην πυρηνική μεμβράνη. Ακολουθεί ξανά έκπλυση των κυττάρων με διάλυμα *PBS* 1x και επώαση αυτών με διάλυμα *PBS* 1x παρουσία *BSA* 3% (w/v) για 60 λεπτά στους 37°C για κάλυψη των μη ειδικών θέσεων.

Στη συνέχεια οι καλυπτρίδες επώάζονται με κατάλληλη αραίωση του ειδικού αντισώματος, έναντι της πρωτεΐνης που εξετάζουμε, σε διάλυμα *PBS* 1x παρουσία *BSA* 1% (w/v) για 40 λεπτά στους 37°C .

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα:

- ✓ *Anti-Hsp70* (Enzo Life Sciences - #ADI-SPA-810 - κλώνος C92F3A-5) (αραίωση 1:200),
- ✓ *Anti-p53* (DO-1) (Santa Cruz Biotechnology, sc-126) (αραίωση 1:50)
- ✓ *Anti-phospho-p53* (Ser 15) (Cell Signalling - #9284S) (αραίωση 1:400)
- ✓ *Vimentin*(V9) (Santa Cruz Biotechnology, sc-6260) (αραίωση 1:200),
- ✓ *Anti-E-cadherin* (BD Transduction Laboratories #610182) (αραίωση 1:200)

Ακολουθούν ξανά δύο φορές έκπλυση των κυττάρων με διάλυμα *PBS* (1X) και επώαση αυτών με κατάλληλη αραίωση αντισώματος, έναντι ανοσοσφαιρινών είδους προέλευσης του πρώτου αντισώματος και συγκεκριμένα

- ✓ *Anti-mouse IgG FITC conjugate* (Sigma – Aldrich, F 5897) (αραίωση 1:400) για πράσινο ανοσοφθορισμό ή
- ✓ *Anti-rabbit IgG TRIC conjugate* (Texas Red) (Sigma – Aldrich, T 6778) (αραίωση 1:400) για κόκκινο ανοσοφθορισμό.

Το αντίσωμα βρίσκεται σε διάλυμα *PBS* (1x), παρουσία *BSA* 1% (w/v) και η επώαση γίνεται στους 37°C και διαρκεί για 40 λεπτά. Καθ' όλη τη διαδικασία του ανοσοφθορισμού προσέχουμε μη μας στεγνώσουν τα δείγματα, μιας και οι ποσότητες του διαλύματος των αντισωμάτων, επάνω στις καλυπτρίδες είναι μικρές

Τέλος οι καλυπτρίδες εκπλένονται με διάλυμα *PBS* (1x), μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες (Isolab Laborgerate), οι οποίες έχουν εμποτιστεί με μια σταγόνα *Vectashied* (Vector Laboratories - #H-1000), προκειμένου να αποφευχθεί το ξεθώριασμα των χρωμάτων της καλυπτρίδας, και ακολουθεί παρατήρηση των δειγμάτων σε συνεστιακό μικροσκόπιο *Leica TCSSPE*.

Σε περίπτωση που τα προς μελέτη αντισώματα τα οποία χρησιμοποιούμε στον ανοσοφθορισμό ήταν φωσφορυλιωμένα, δεν πραγματοποιήθηκαν εκπλύσεις με *PBS*, αλλά αντικαταστήθηκαν με *TBS*.

2.3.ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ (Confocal Microscopy)

Για να ανοίξουμε το συνεστιακό μικροσκόπιο ακολουθούμε τα παρακάτω βήματα.

- ✓ Ανοίγουμε τον ενσωματωμένο διακόπτη του μικροσκοπίου για τη φωτεινή πηγή και τη χειροκίνητη εστίαση
- ✓ Ανοίγουμε την εξωτερική πηγή για τη λάμπα του υπεριώδους φωτός
- ✓ Ανοίγουμε τον διακόπτη ψύξης του λέιζερ
- ✓ Γυρνάμε το κλειδί έναρξης του λέιζερ
- ✓ Ανοίγουμε τον διακόπτη των ηλεκτρονικών
- ✓ Ανοίγουμε τον υπολογιστή καθώς και τις οθόνες του

- ✓ Ξεκινούμε το λογισμικό του συνεστιακού μικροσκοπίου

Για την παρατήρηση των δειγμάτων θα πρέπει να προετοιμάσουμε τις ρυθμίσεις του μικροσκοπίου μέσα από το λογισμικό. Πιο συγκεκριμένα, από την επιλογή *beam* ρυθμίζουμε το μήκος κύματος σάρωσης στο *FITC/TRITC*, ρυθμίζουμε τον φακό στο 63x, το μέγεθος της εικόνας στο 512 x 512 *pixels*, τον άξονα σάρωσης στο *xyz*, τη μεγέθυνση στο 1 και το διάφραγμα στο *Airy 1*.

Για να φωτογραφίσουμε το δείγμα, τοποθετούμε λάδι στον επιλεγμένο φακό, τοποθετούμε την αντικειμενοφόρο πλάκα ανεστραμμένη (με την καλυπτρίδα προς τα κάτω) στην ειδική θέση του μικροσκοπίου και περιστρέφουμε το δίσκο στο φίλτρο που θέλουμε (*FITC, TRITC*). Παρατηρούμε το δείγμα, εστιάζουμε και τραβάμε το έμβολο του μικροσκοπίου που στέλνει τη δέσμη στον ανιχνευτή για φωτογράφιση. Παράλληλα περιστρέφουμε τον δίσκο στη θέση *scan*. Ρυθμίζουμε τα όρια φωτογράφισης (μιας και αυτό που επιθυμούμε είναι εγκάρσιες φωτογραφίες – τομές, κατά μήκος των κυττάρων) από το *z-position* και τσεκάρουμε το *begin* για την αρχή των τομών και το *end* για το πέρας. Ρυθμίζουμε την ένταση του λέιζερ από το διακόπτη έτσι ώστε η ένδειξη να δείχνει στο «παρά τέταρτο» και από τα *PMT 2* και *3* αυξάνουμε ή μειώνουμε την ένταση του κάθε λέιζερ (πράσινο και κόκκινο αντίστοιχα). Για να έχουμε πιο ευκρινείς εικόνες ρυθμίζουμε το *averaging* από 4 έως 8. Με τον τρόπο αυτόν καθορίζουμε πόσες φορές θα φωτογραφηθεί η κάθε τομή, έτσι ώστε να έχουμε όσο το δυνατόν μέγιστο αριθμό πληροφοριών. Από τη ρύθμιση *section* ρυθμίζουμε το πάχος της τομής στα 0,35 μm και φωτογραφίζουμε πατώντας το εικονίδιο *series* στο λογισμικό για διαδοχικές τομές ή το εικονίδιο *single scan* για μεμονωμένη φωτογραφία.

2.4. ΈΛΕΓΧΟΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ MTT (MTT assay)

Ο έλεγχος της βιωσιμότητας όλων των τύπων κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε πολυτρυβλία των 96 φρεατίων. Από το αρχικό τρυβλίο στο οποίο διατηρούνται τα κύτταρα πραγματοποιείται τρυψινοποίηση των κυττάρων σε τελικό όγκο 10 ml. Μεταφέρεται το δείγμα σε *Universal* των 30 ml (Greiner #201170). Λαμβάνονται 10 μl και γίνεται μέτρηση των κυττάρων σε πλάκα *New Bauer* στο μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης. Στη συνέχεια υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός των κυττάρων καθώς και η ποσότητα που απαιτείται για

την προσθήκη του επιθυμητού αριθμού των κυττάρων (5.000 κύτταρα) σε κάθε φρεάτιο του πολυτρυβλίου. Ο τελικός όγκος του κάθε φρεατίου πρέπει να είναι 100 μl και συμπληρώνεται με *DMEM*. Η συνολική ποσότητα κυττάρων και *DMEM* που απαιτούνται σε συνολικό όγκο 100 μl τοποθετούνται σε κάθε φρεάτιο με τη χρήση της πολυπιπέτας. Το πολυτρυβλίο τοποθετείται για 24 ώρες στον επωαστή σε θερμοκρασία 37°C και 5% CO₂.

Μετά την πάροδο των 24 ωρών γίνεται η προσθήκη της εκάστοτε ουσίας στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Ο τελικός όγκος σε κάθε φρεάτιο είναι 200 μl. Το πολυτρυβλίο τοποθετείται ξανά στον επωαστή για όσο χρόνο χρειάζεται η επίδραση της εκάστοτε ουσίας.

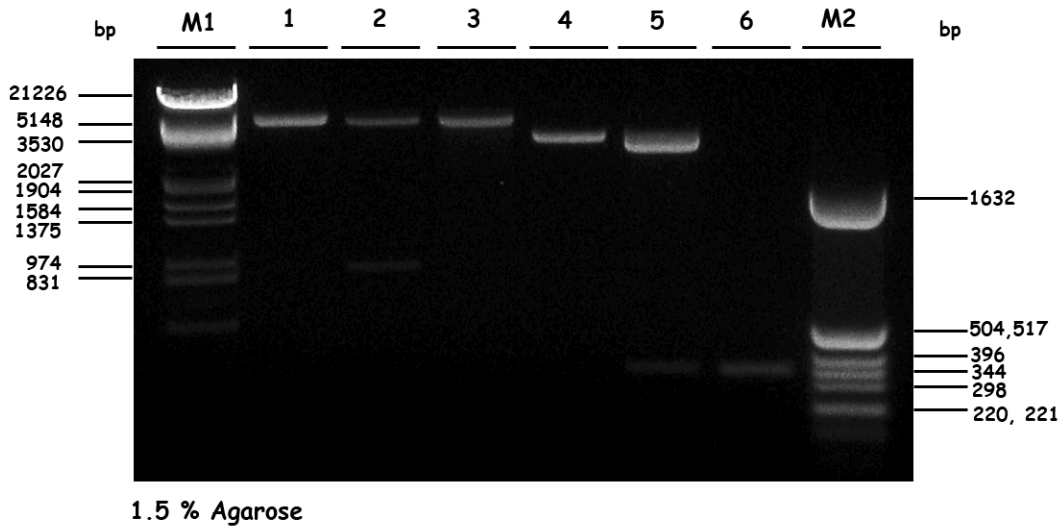
Η μέτρηση των ζωντανών κυττάρων πραγματοποιείται με τη μέθοδο του *MTT* (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide – Sigma -#M5655-1G). Το *MTT* (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) έχει κίτρινο χρώμα (απορρόφηση στα 690 nm) και ανάγεται από το μιτοχονδριακό συνένζυμο Q (ουβικινόνη), με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ιζήματος χρώματος μωβ (απορρόφηση 540 nm) στα ζωντανά κύτταρα. Με τον τρόπο αυτό, σε αυξανόμενα ποσοστά βιωσιμότητας το μωβ χρώμα είναι πιο έντονο στα φρεάτια. Σε κάθε φρεάτιο τοποθετούνται 50 μl *MTT* (0,2g *MTT* σε 100 ml PBS) και τα πολυτριβλία παραμένουν για 3 ώρες στον επωαστή.

Μετά την πάροδο των τριών ωρών το υπερκείμενο αναρροφάται προσεκτικά και προστίθενται 200 μl *DMSO* [Dimethyl Sulfoxide (Certified ACS) Fisher Chemical - #67-68-5] σε κάθε φρεάτιο. Ακολουθεί καλή ανάδευση και μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο (μήκος κύματος 540 – 570 nm και φίλτρο αναφοράς 690 nm). Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον σε 3 επαναλήψεις από τρεις ανεξάρτητες πειραματικές διαδικασίες με τις ίδιες συνθήκες.

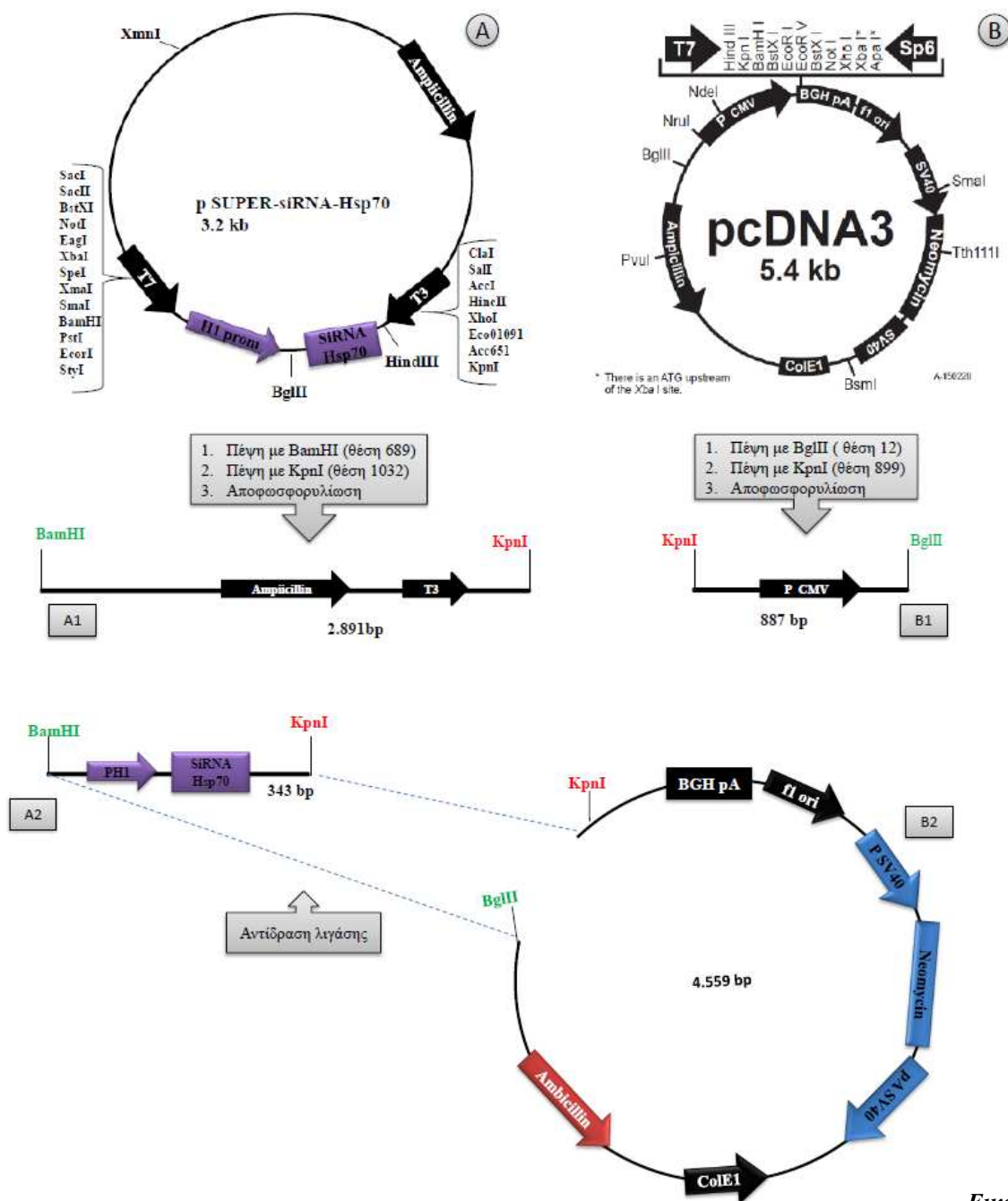
2.5. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ *pcDNA3-siRNA-HSP70*

Για τη μελέτη του ρόλου της *Hsp70* στην «άνευ-οίκου» (ανέστια) απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων κρίθηκε απαραίτητη η δημιουργία μετασχηματισμένων κλώνων *HMEC-1* κυττάρων οι οποίοι δεν θα εκφράζουν την *Hsp70*. Για το λόγο αυτό κατασκευάστηκε το πλασμίδιο *pcDNA3-siRNA-HSP70* (P. Kasioumi et al, αδημοσίευτα

αποτελέσματα), το οποίο φέρει ένθετο *siRNA* για την αποσιώπηση της *Hsp70* και γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη για επιλογή σε ευκαρυωτικά κύτταρα και εν συντομία παρουσιάζεται παρακάτω.



Εικόνα 14: Έλεγχος της πλασμιδιακής κατασκευής *pcDNA3-siRNA-HSP70* μετά από ενζυμική πέψη και απομόνωση των τμημάτων DNA. **[M1]:** μάρτυρας μοριακών μεγεθών DNA προερχόμενο από κοπή με *Hind III/EcoRI* επώαση. **[1]** πέψη του *pcDNA3* με το περιοριστικό ένζυμο *Bgl II*, **[2]:** διαδοχική πέψη του *pcDNA3* με τα περιοριστικά ένζυμα *Bgl II* και *Kpn I*, **[3]:** απομόνωση του *pcDNA3* πλασμιδιακού φορέα από πηκτή αγαρόζης, **[4]:** πέψη του *pSUPER-siRNA-Hsp70* με το περιοριστικό ένζυμο *BamHI*, **[5]:** διαδοχική πέψη του *pSUPER-siRNA-Hsp70* με τα περιοριστικά ένζυμα *BamHI* και *KpnI*, **[6]:** απομόνωση του ενθέματος από πηκτή αγαρόζης, **[M2]:** μάρτυρας μοριακών μεγεθών μετά από πέψη του *pBR322 DNA* *HinfI* (P. Kasioumi et al, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

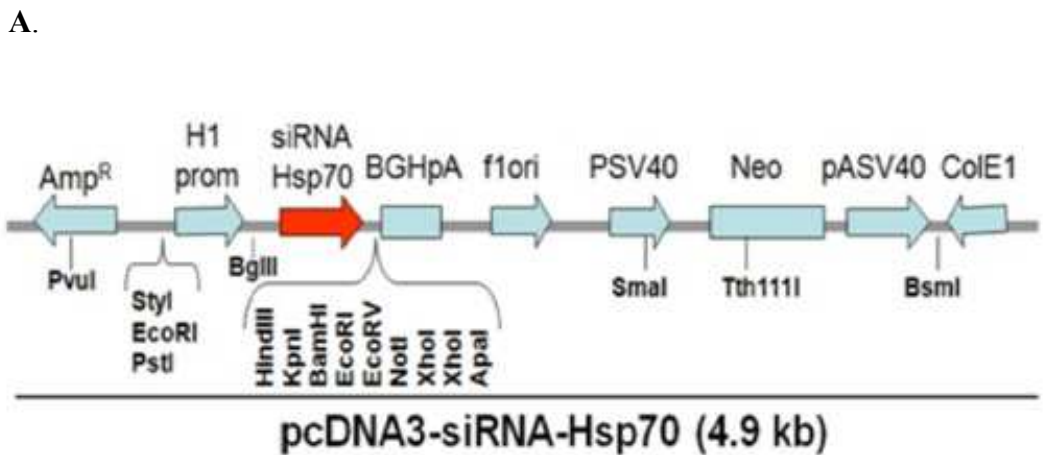


Εικόνα 15: Συνοπτική απεικόνιση της κατασκευής του *pcDNA3-siRNA-Hsp70* (P. Kasioumi et al, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

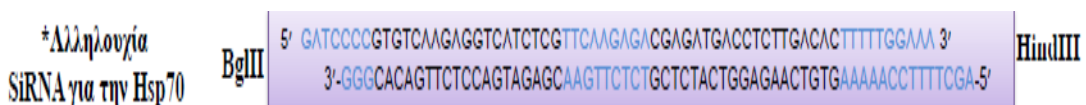
Για την κατασκευή του πλασμιδίου αυτού χρησιμοποιήθηκαν το πλασμίδιο *pcDNA3* (Invitrogen #V790-20), καθώς και το *pSuper* (Oligoengine #VEC-PBS-0002), στο οποίο έχει εντεθεί το *siRNA* για την πρωτεΐνη *Hsp70* (Εικόνες 15.A,15.B). Αρχικά πραγματοποιήθηκε διαδοχική πέψη του *pSUPER-siRNA-Hsp70* με τα περιοριστικά ένζυμα BamHI και KpnI και προέκυψαν δύο τμήματα DNA 2.891 bp (Εικόνα 15 A1) και 343 bp (Εικόνα 15 A2). Ομοίως πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές πέψεις του *pcDNA3* με τα

περιοριστικά ένζυμα *Bgl*III (δημιουργεί συμβατά άκρα με το *Bam*HI) και *Kpn*I δημιουργώντας δύο τμήματα *DNA* 887 bp (Εικόνα 15 B1) και 4.559 bp (Εικόνα 15 B2). Μετά από κάθε ολονύχτια πέψη πραγματοποιήθηκε έλεγχος με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης τόσο πριν, όσο και μετά τον καθαρισμό και απομόνωση των τμημάτων *DNA* που προκύπτουν.

Η ζώνη μήκους 343 bp αντιστοιχεί στο ένθεμα, το οποίο περιέχει το *siRNA* για την *Hsp70* κάτω από τον ανθρώπινο υποκινητή *H1* και υποκλωνοποιήθηκε μέσω αντίδρασης με *DNA* λιγάση στον πλασμιδιακό φορέα καταλήγοντας στη δημιουργία του πλασμιδίου *pcDNA3-siRNA-HSP70* (Εικόνα 16 A).



B.



Εικόνα 16: (A) Πλασμιδιακός χάρτης του *pcDNA3-siRNA-Hsp70*. Το πλασμίδιο περιέχει *siRNA* για την αποσιώπηση της *Hsp70* κάτω από τον έλεγχο του ανθρώπινου υποκινητή *H1*, γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικιλίνη για αντιβιοτική επιλογή σε βακτήρια, γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη για αντιβιοτική επιλογή σε ευκαρυωτικά κύτταρα, που βρίσκεται καθοδικά του υποκινητή *SV40* και καταλήγει στο σήμα πολύ *A* αυτού, σήμα πολυαδενυλίωσης αναπτυξιακής ορμόνης βοοειδών (*bgh-PolyA*), περιοχή έναρξης της αντιγραφής, προερχόμενη από φάγο, περιοχή έναρξης της αντιγραφής, προερχόμενη από *E. coli*. (B) Η αλληλουχία του *siRNA* για την αποσιώπηση της πρωτεΐνης *Hsp70* (P. Kasioumi et al, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

2.6. ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΡΗΣΗΣ (Transfection with electroporation)

Η ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) είναι μια ιδιαιτέρως αποτελεσματική μέθοδος διαμόλυνσης κυττάρων. Η τεχνική στηρίζεται σε σύντομης διάρκειας ηλεκτρικό παλμό που καθιστά την κυτταρική μεμβράνη παροδικά διαπερατή σε αρνητικά φορτισμένα νουκλειικά οξέα, τα οποία οδηγούνται στο εσωτερικό των κυττάρων. Η τεχνική αυτή πρωτοεμφανίστηκε το 1982 από τον *Neumann* σε κύτταρα ποντικού χρησιμοποιώντας ένα αυτοσχέδιο θάλαμο ηλεκτροδιάτρησης. Στις επόμενες δεκαετίες έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στα *in vitro* πειράματα διαμόλυνσης κυτταρικών σειρών (235) αλλά και αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου φαίνεται να εξαρτάται από το μέγεθος των κυττάρων, τη θερμοκρασία, τους χειρισμούς μετά τη διαμόλυνση καθώς και το είδος των ηλεκτροδίων αλλά και της σύστασης του διαλύματος που βρίσκονται τα κύτταρα (236). Ένα μειονέκτημα της ηλεκτροδιάτρησης φαίνεται να είναι η αυξημένη θνησιμότητα των κυττάρων, αλλά σε αρκετές περιπτώσεις δε φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά την ερευνητική διαδικασία.

Η διαδικασία περιγράφεται περιληπτικά παρακάτω. 24 ώρες πριν τη διαμόλυνση των κυττάρων γίνεται η κατάλληλα αραίωσή τους ώστε την ημέρα της διαμόλυνσης να εμφανίσουν 50-60% πληρότητα. Οι κυβέττες οι οποίες έχουν προηγουμένως πλυθεί με *ddH₂O* και 70% διάλυμα αιθανόλης, τοποθετούνται στη λάμπα *UV* για 20 λεπτά, έτσι ώστε να επιτευχθεί ή πλήρης αποστείρωσή τους και διατηρούνται κλειστές για σύντομο χρονικό διάστημα. Την ημέρα της ηλεκτροδιάτρησης, τα κύτταρα θρυψινοποιούνται με 1ml θρυψίνης για 3 λεπτά. Στα κύτταρα προστίθενται 4 ml θρεπτικό πλήρες (με την προσθήκη FBS και αντιβιοτικών) και φυγοκεντρώνται στις 3.000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης φροντίζουμε να έχουμε ανοίξει τη συσκευή ηλεκτροδιάτρησης (BTXECM 630-Harvard Apparatus) στις κάτωθι συνθήκες:

- ✓ Ένταση $V=210V$
- ✓ Αντίσταση $R= None$
- ✓ Χωρητικότητα $C=950\mu F$

Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, απορρίπτεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 400 μl *DMEM* καθαρό από ορό *FBS* και αντιβιοτικά. Στο διάλυμα

προστίθεται και 10 μg πλασμιδίου/ηλεκτροδιάτρηση. Το διάλυμα κυττάρων/πλασμιδίου, καθ' όλη την πειραματική διαδικασία βρίσκεται σε *Eppendorf* και διατηρείται στον πάγο. Μεταφέρουμε το διάλυμα κυττάρων/πλασμιδίου άμεσα στην ειδικά αποστειρωμένη κυβέτα ηλεκτροδιάτρησης (προσέχουμε στην κυβέτα να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες, γιατί ίσως να μπλοκάρουν την αγωγιμότητα) και ακολουθεί ηλεκτροδιάτρηση.

Αμέσως μετά την ηλεκτροδιάτρηση τα κύτταρα μεταφέρονται σε νέο τρυβλίο 10cm και τους προστίθεται 10 ml *DMEM* κυτταροκαλλιέργειας (με ορό FBS και αντιβιοτικά). και μεταφέρεται στον επωαστή για 48 ώρες. Επίσης, οι κυβέτες πλένονται με *ddH₂O* και 70% διαλύματος αιθανόλης.

Μετά το πέρας των 48 ωρών, δηλαδή την τρίτη μέρα, ξεκινά η χορήγηση αντιβιοτικού νεομυκίνης με 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και η οποία φτάνει έως και 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ κατά την 23^η ημέρα. Παράλληλα με το τρυβλίο με κύτταρα που έχουν υποστεί ηλεκτροδιάτρηση υπάρχει και ένα τρυβλίο με ίδιο αριθμό *MCF7* κυττάρων μάρτυρες που δεν έχουν υποστεί κάποια διεργασία (control). Σε αυτό χορηγείται η ίδια ποσότητα υδρομυκίνης στην ίδια χρονική περίοδο. Όταν έχουν θανατωθεί όλα τα κύτταρα του τρυβλίου μάρτυρας, γιατί δεν έχουν γονίδια για αντοχή στο αντιβιοτικό, τότε δύο μέρες μετά σταματάμε τη χορήγηση αντιβιοτικού και στα τρυβλία με τα προς μελέτη κύτταρα που έχουν επιζήσει.

Με αυτή την διαδικασία γνωρίζουμε πλέον ποια είναι η κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού που πρέπει να χορηγηθεί στα κύτταρα μάρτυρες και σε ποια χρονική στιγμή, έτσι ώστε να υπάρχει 100% θανάτωσή τους. Επομένως όσα κύτταρα έχουν επιζήσει στα προς μελέτη τρυβλία υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να έχουν πάρει ενδοκυτταρικά το επιθυμητό πλασμίδιο, το οποίο περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη.

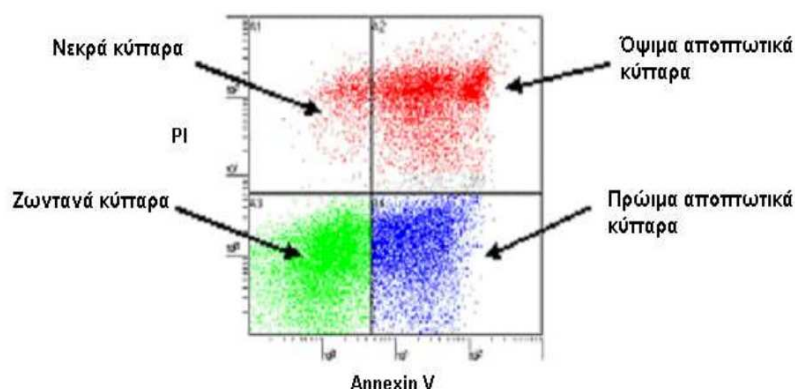
2.7. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Το κυτταρόμετρο ροής είναι ένα όργανο που ρίχνει φως στα κύτταρα (ή σε άλλα σωματίδια), τα οποία ρέουν μεμονωμένα μέσω πίεσης μέσα από μια κυψελίδα και μπροστά από μια πηγή φωτός που προέρχεται από κάποιο λέιζερ. Στη συνέχεια το φως αυτό λαμβάνεται από μία διάταξη η οποία ανιχνεύει και συσχετίζει τα σήματα, ταξινομώντας τα με βάση κάποιες ιδιότητες για τις οποίες έχει ρυθμιστεί ο ανιχνευτής (μέγεθος, κοκκίωση,

ένταση φθορισμού) και στη συνέχεια μας δείχνει μέσω ειδικού λογισμικού το αποτέλεσμα, σε ηλεκτρονικό υπολογιστή (237).

2.8. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ *MCF7* ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Για την ανάλυση της έκφρασης της *Hsp70* στους κυτταρικούς κλώνους που κατασκευάστηκαν μέσω *siRNA* τεχνολογίας χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής (Partec Cy Flow ML). Για την ανίχνευση της *Hsp70* στα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο (238). Συγκεκριμένα, τα κύτταρα εκπλύθηκαν 2 φορές με παγωμένο *PBS* 1x και επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα 1 % w/v παραφορμαλδεΐδης σε *PBS* σε συγκέντρωση 1×10^6 κύτταρα/ml και επώστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας ποσότητα 1,5 μ g μονοκλωνικού αντισώματος ειδικού για την επαγόμενη *Hsp70*.



Εικόνα 17: Ενδεικτικό στικτόγραμμα κυτταρομετρίας ροής. Τα ποσοστά των κυττάρων με πρώιμα αποπτωτικά, όψιμα αποπτωτικά και νεκρωτικά κύτταρα χαρακτηριστικά σημειώνονται στο κάτω δεξιά, άνω δεξιά και άνω αριστερά τεταρτημόριο αντίστοιχα.

Με την κυτταρομετρία ροής αναλύθηκε και η απόπτωση των κυττάρων *MCF7-siRNA-Hsp70* που δεν εκφράζουν *Hsp70* σε σύγκριση με τα πατρικά κύτταρα *MCF7*. Συγκεκριμένα, κύτταρα *MCF7* και *MCF7-siRNA-Hsp70* πυκνότητας 1×10^6 κύτταρα/ml, αφού εκτέθηκαν σε διάφορα χρονικά διαστήματα στην ακραία θερμοκρασία των 45°C και επανήλθαν για 90 λεπτά στους 37°C , επώστηκαν με *Annexin/PI* για 60 λεπτά και αναλύθηκαν με κατάλληλο πρόγραμμα (Partec Flow Max software) για την απόπτωση που εμφάνιζαν (Εικόνα 17).

2.9. ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΑΝΟΙΚΙΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

1. Προετοιμασία *poly-HEMA* τρυβλίων

Για κάθε τρυβλίο 10cm χρειάζονται περίπου 10-20 mg/ml *poly-HEMA* (Sigma - #P3932). Τα τρυβλία μπορούν να προετοιμαστούν μέρες πριν και να φυλαχθούν στους 4°C έχοντας πρώτα επικαλυφθεί με παραφίλμ (Parafilm® M, SPI Supplies) έως ότου χρησιμοποιηθούν. Τα τρυβλία πρέπει να επιστρωθούν με ουσία *poly-HEMA* τουλάχιστον 24 ώρες πριν, αφού πρέπει να στεγνώσουν και έπειτα να χρησιμοποιηθούν.

Αρχικά διαλύεται η κατάλληλη ποσότητα *poly-HEMA* σε 95% αιθανόλη/*ddH₂O* για την εξισορρόπηση 20 mg/ml διαλύματος *poly-HEMA*. Το διάλυμα τοποθετείται σε ογκομετρικό σωλήνα, καλά σφραγισμένο, ώστε να μην εξατμιστεί η αιθανόλη. Αναδεύεται με μαγνήτη και παράλληλα θερμαίνεται ελαφρώς έως ότου διαλυθεί πλήρως (για 1 ώρα περίπου)

Σε αποστειρωμένο απαγωγό κυτταροκαλλιέργειας επιστρώνουμε 3 ml διαλύματος σε 60 mm τρυβλία. Αναδεύουμε ελαφρώς τα τρυβλία ώστε το διάλυμα να φτάσει ως και τα τοιχώματά τους. Τα τρυβλία αφήνονται μερικώς καλυμμένα με το καπάκι τους. Περιοδικά ανακινούνται ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη κάλυψή τους μέχρι να εξατμιστεί η αιθανόλη και το *poly-HEMA* να σταθεροποιηθεί. Αφήνονται να στεγνώσουν ολονύκτια.

2. Επίστρωση των κυττάρων σε *poly-HEMA* τρυβλία

Τα κύτταρα θρυψινοποιούνται και καταμετρούνται ώστε σε όλα τα τρυβλία *poly-HEMA* να τοποθετηθεί ίσος αριθμός κυττάρων. Τα τρυβλία πριν τη χρήση τους πλένονται 3 φορές έκαστο, με ρυθμιστικό διάλυμα *PBS* 1x, έτσι ώστε να αφαιρεθούν τυχόν υπολείμματα αιθανόλης. Προστίθεται ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων σε κάθε τρυβλίο και συμπληρώνεται θρεπτικό υλικό *DMEM*, σε μέγιστη ποσότητα 4 ml/τρυβλίο 60 mm. Τα τρυβλία τοποθετούνται στον επωαστή 37°C και 5% *CO₂* για τον κατάλληλο χρόνο που επιβάλει η πειραματική διαδικασία.

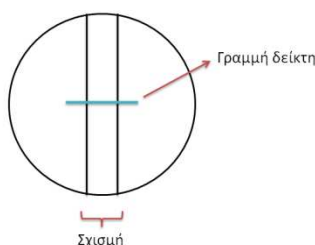
2.10. ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΈΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΠΟΛΥΩΡΗ ΕΠΩΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΤΡΥΒΑΙΑ ΕΠΙΣΤΡΩΜΕΝΑ ΜΕ *POLY-HEMA*

Ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός των εξεταζομένων πρωτεϊνών κατέστη δυνατός με τη χρήση της τεχνικής του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Κατά τη διαδικασία του ανοσοφθορισμού, οι σφαίρες που προέκυψαν από τα κύτταρα, έπειτα από την επώασή τους σε τρυβλία *poly-HEMA*, για διαφορετικούς χρόνους, και τα οποία πλέον βρίσκονται σε εναίωρημα, αφαιρούνται από το τρυβλίο, με αναρρόφηση, με πιπέττα 5 ή 10 ml, και σταγόνες δείγματος –θεραπευτικού και σφαιρών-.τοποθετούνται επάνω σε αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες διαμέτρου 2 cm (Deltalab - #D102222) εντός τρυβλίου

Τα τρυβλία με τις καλυπτρίδες τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο 37°C και 5% CO₂ όπου αφήνονται για διάστημα 1-2 ώρες ώστε να προσκολληθούν στην καλυπτρίδα. Πριν τη διαδικασία του ανοσοφθορισμού τα τρυβλία ελέγχονται στο ανεστραμμένο μικροσκόπιο (Inverted microscopy) για να διαπιστωθεί εάν το μεγαλύτερο ποσοστό των σφαιρών έχει προσκολληθεί στην καλυπτρίδα. Σε περίπτωση που δεν έχουν προσκολληθεί, αυξάνουμε τον χρόνο επώασης. . Ο ανοσοφθορισμός, πέραν των παραπάνω τροποποιήσεων, πραγματοποιείται όπως στο πρωτόκολλο που αναφέρεται παραπάνω.

2.11. ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ

Το πείραμα προσομοίωσης της επούλωσης τραύματος (Wound Healing assay) ελέγχει την ικανότητα των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται και ταυτόχρονα να μεταναστεύουν. Συγκεκριμένα δημιουργώντας μια τεχνητή χαραγή (πληγή) στην επιφάνεια της μονόστιβης κυτταροκαλλιέργειας και αφήνοντας τα κύτταρα για 24 ώρες μπορεί να διαπιστωθεί η ικανότητα επούλωσης πληγών των κυττάρων (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Απεικόνιση της χαραγής (σχισμής) στην επιφάνεια του μονόστιβης κυτταρικής καλλιέργειας. Αρχικά σχηματίζεται η γραμμή δείκτη με μαρκαδόρο και έπειτα η σχισμή της καλλιέργειας με τη βοήθεια χάρακα και κίτρινο τιπ των 200 μl. Η γραμμή δείκτη ορίζεται ως το σημείο μελέτης της επούλωσης τραύματος.

Σε τρυβλίο διαμέτρου 60 mm μεταφέρονται κύτταρα και επωάζονται στον επωαστικό θάλαμο μέχρι να καλύψουν πλήρως τον πυθμένα αυτού. Μόλις η μικροσκοπική παρατήρηση επιβεβαιώσει την πλήρη κάλυψη του πυθμένα του τρυβλίου (πληρότητα τρυβλίου 100%), το υπερκείμενο υγρό θρεπτικό μέσο απομακρύνεται, τα κύτταρα εκπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα *PBS* 1x. Μέσα στον θάλαμο νηματικής ροής για την ύπαρξη στειρών συνθηκών, το τρυβλίο ιχνηθετείται από την έξω πλευρά του πυθμένα με μια ευθεία γραμμή (ένδειξη αρχή και τέλους της σχισμής) χρησιμοποιώντας χάρακα/μαρκαδόρο και το τρυβλίο επαναφέρεται στη θέση του. Με τη χρήση του ρύγχους ενός αποστειρωμένου κίτρινου τιπ (πιπέττας μικρής ογκομετρικής δυνατότητας των 200 μl), και με χρήση αποστειρωμένου χάρακα, χαράσσεται ευθεία γραμμή κάθετη στην προηγούμενη γραμμή με μαρκαδόρο και έτσι αποκολλούνται κύτταρα από τον πυθμένα. Τα αποκολλημένα κύτταρα απομακρύνονται με χαλαρές εκπλύσεις με διάλυμα *PBS*. Στο τρυβλίο προστίθεται νέο υγρό θρεπτικό μέσο *DMEM* (με 10% FBS και αντιβιοτικά). Το τρυβλίο μεταφέρεται στον επωαστικό θάλαμο και σε τακτά χρονικά διαστήματα παρατηρείται στο μικροσκόπιο και φωτογραφίζεται η πορεία της κάλυψης της χαραγμένης επιφάνειας από τα μεταναστεύοντα κύτταρα. Κατά την ανάλυση μετριούνταν η συνολική περιοχή που δεν είχε καλυφθεί από κύτταρα και ο μεταναστευτικός ρυθμός υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$(At_0 - At) \times 100 / At_0$$

Όπου At_0 η απόσταση της σχισμής την ώρα που πραγματοποιείται και At η απόσταση έπειτα από χρόνο t .

2.12.ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

2.12.1.Υγρή καλλιέργεια βακτηρίων

Η υγρή καλλιέργεια πραγματοποιείται μέσα σε βακτηριακά φυγοκεντρικά σωληνάκια των 10ml (*Aptaca*), ή σε φυγοκεντρικά σωληνάκια *Universal* των 30 ml (*Greiner* #201170) για τις καλλιέργειες μικρού όγκου ή σε γυάλινες κωνικές για καλλιέργειες μεγαλύτερου όγκου. Η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιείται σε στείρες συνθήκες σε κλειστό κλίβανο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας (*Model G25 Incubator Shaker*) στους 37°C για 16-20 ώρες, έως τα βακτήρια να φτάσουν στη κορυφή της εκθετικής φάσης ανάπτυξής τους. Καθ'

όλη τη διάρκεια πολλαπλασιασμού τους βρίσκονται υπό συνεχή ανάδευση στις 250 rpm, προκειμένου σε όλον τον όγκο του υγρού να υπάρχει καλός αερισμός.

Η επιλογή των κατάλληλων κλώνων μπορεί να γίνει είτε με επιλογή με την κατάλληλη συγκέντρωση κάποιου αντιβιοτικού, ειδικό για το γονίδιο ανθεκτικότητας, είτε με τη χρήση ουσιών ή γονιδίων, οι οποίες δίνουν χρώμα στις επιθυμητές αποικίες.

2.12.2. Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων

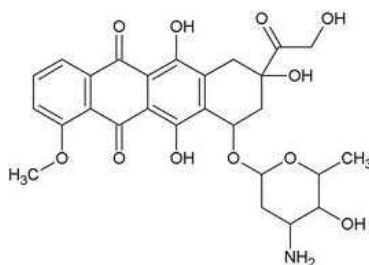
Ποσότητα 800 μl βακτηριακής καλλιέργειας, που έχει αναπτυχθεί ολονύκτια υπό ανάδευση 250 rpm σε θερμοκρασία 37°C, τη μεταφέρουμε σε ειδικό σωληνάριο ψύξης (cryovial 1,5 ml – Greiner Bio-one) και προσθέτουμε 200 μl γλυκερόλη. Αναδεύουμε ήπια το δείγμα και το αποθηκεύουμε στους -80°C. Η διαδικασία πραγματοποιείται κάτω από στείρες συνθήκες, υπό τη φλόγα του εργαστηριακού λύχνου (καμινέτο).

2.12.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (Midi prep procedure)

Στην περίπτωση που επιθυμούμε να εξάγουμε DNA από βακτήρια και επιθυμούμε το DNA αυτό να έχει μεγάλη καθαρότητα, ακολουθούμε τη διαδικασία απομόνωσης σε μεσαία κλίμακα (Midi prep procedure), που πραγματοποιείται με το κιτ *PureLink™ HiPure Plasmid Kits* (Invitrogen Life Technologies - #K2100-05), με βάση της οδηγίες της εταιρείας.

2.13. ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

1. Δοξορουβικίνη (Doxorubicin: DOX)



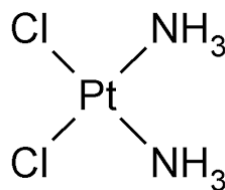
Εικόνα 19: Χημική αναπαράσταση της Δοξορουβικίνης (DOX) με συστηματική ονομασία (8S,10S)-10-(4-amino-5-hydroxy-6-methyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yl-oxy)-6,8,11 trihydroxy-8-(2-hydroxyacetyl)-1-methoxy-7,8,9,10 tetrahydrotetracene-5,12-dione

Η ιστορία της *DOX* (Εικόνα 19) μπορεί να παραπεμφθεί στην δεκαετία του 1950 όταν Ιταλική ερευνητική εταιρεία ξεκίνησε μία προσπάθεια εύρεσης αντικαρκινικών συστατικών από μικρόβια. Στην συνέχεια ένα νέο αντιβιοτικό απομονώθηκε από ένα βακτηρίδιο (*Streptomyces Peuceitius*) το οποίο βρέθηκε να έχει καλή ενεργότητα ενάντια σε όγκους ποντικών. Στην δεκαετία του 1960, κλινικές δοκιμές απέδειξαν ότι το φάρμακο έδειξε θεραπευτική επιτυχία ενάντια στην οξεία λευχαιμία και λέμφωμα (239).

Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της *DOX* είναι μπλεγμένος και κατά κάποιο τρόπο αζεκαθάριστος, αν και θεωρείται να αντιδρά με το *DNA* δια παρεμβολής και να αναστέλλει την βιοσύνθεση του μακρομορίου (240). Αυτό σταματά την πρόσβαση του ενζύμου τοποϊσομεράση II, το οποίο ξετυλίγει τις αλυσίδες του *DNA* για μεταγραφή. Η *DOX* σταθεροποιεί το σύμπλεγμα της τοποϊσομεράσης μετά από το σπάσιμο της αλυσίδας προς μεταγραφή, εμποδίζοντας έτσι την διπλή αλυσίδα από την επανακόλληση προκαλώντας έτσι το σταμάτημα του *DNA* διπλασιασμού.

Η *DOX* χρησιμοποιείται συνήθως για την θεραπεία μερικών λευχαιμιών, λεμφώματος του *Hodgkin's* καθώς επίσης και καρκίνων της ουροδόχου κύστεως, του μαστού, του στομάχου, του πνεύμονα, των ωοθηκών, του θυρεοειδούς, του πολλαπλού μυελώματος και του μαλακού ιστικού σαρκώματος.

2. Σισπλατίνη (*Cisplatin*)



Εικόνα 20: Χημική αναπαράσταση της *Cisplatin* με συστηματική ονομασία *dichloroplatinum azanide*.

Η *Cisplatin* (Εικόνα 20), *cisplatinum* ή *cis-diamminedichloroplatinum (II)* (CDDP) αποτελεί ένα χημειοθεραπευτικό φάρμακο που αφορά πολλά είδη καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων τα σαρκώματα, μερικά καρκινώματα, λεμφώματα και νεοπλάσματα που προέρχονται από γενετικά κύτταρα. Ήταν το πρώτο μέλος μίας κατηγορίας φαρμάκων η οποία τώρα συμπεριλαμβάνει τα *carboplatin* και *oxaliplatin*. Το υδατοποιημένο πρόσδεμα της *Cisplatin* είναι πάρα πολύ ενεργό, επιτρέποντας την

Cisplatin να σταυροδένει το *DNA* με διάφορους τρόπους μη επιτρέποντας κατά αυτόν τον τρόπο τον αναδιπλασιασμό του *DNA* κατά την μίτωση σε ταχέως αναδιπλασιαζόμενα κύτταρα. Το *DNA* που έχει υποστεί βλάβες θέτει σε ενέργεια τους μηχανισμούς επιδιόρθωσής του οι οποίοι ενεργοποιούν την απόπτωση όταν η επιδιόρθωση δεν επιτυγχάνεται.

2.14 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι \pm σταθερή απόκλιση. Για το προσδιορισμό στατιστικής σημαντικότητας χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test και η ανάλυση two-way analysis of variance (ANOVA) για τη ανίχνευση στατιστικά σημαντικά διαφορών, ανάμεσα στις ομάδες των αποτελεσμάτων, στα διαφορετικά χρονικά σημεία. Η ανάλυση και η απεικόνιση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογιστικό πακέτο Excel 2003 (Microsoft® Office 2003, Microsoft Corporation, USA). Τιμές $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

3. ΣΚΟΠΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Η εμπλοκή της *Hsp70* στον καρκίνο και στη μεταστατικότητα είναι ένα αμφιλεγόμενο θέμα, με διαφορετικά αποτελέσματα και προσεγγίσεις στη διεθνή βιβλιογραφία. Δεδομένου ότι η *apoptosis* απόπτωση και η μετάσταση των καρκινικών κυττάρων διαθέτουν κοινά βήματα στην εξέλιξή τους, όπως η αποκόλληση και η μεταναστευτικότητα, μελετήσαμε την εμπλοκή της *Hsp70* σε αυτά τα στάδια.

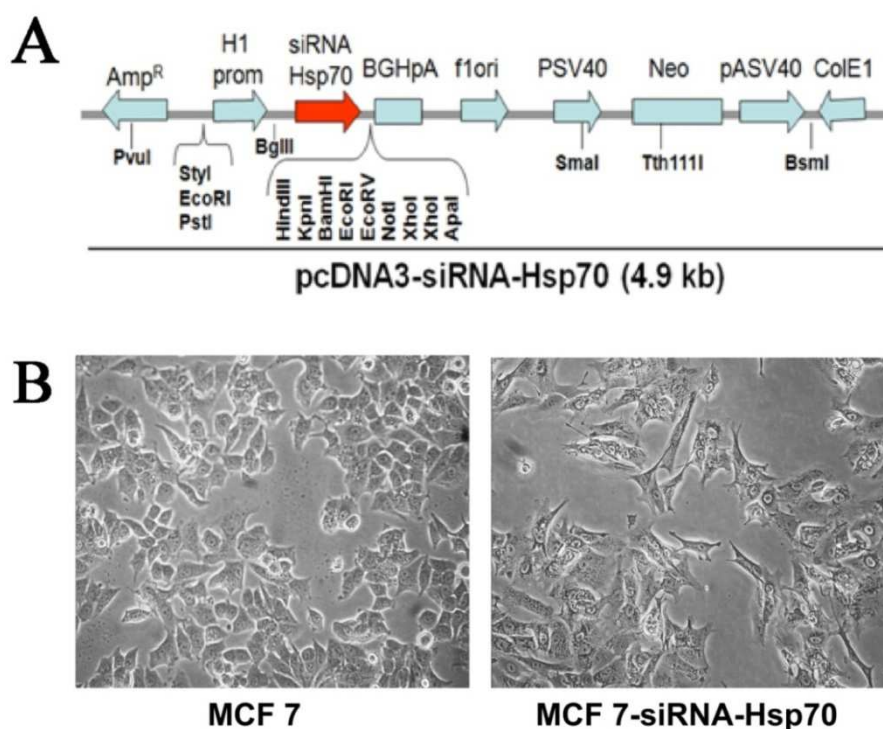
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Η ΑΠΟΥΣΙΑ ΤΗΣ *HSP70* ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ *MCF7* ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΒΑΣΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΟΠΩΣ Ο ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ, Η ΘΕΡΜΟΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ Η ΑΠΟΠΤΩΣΗ.

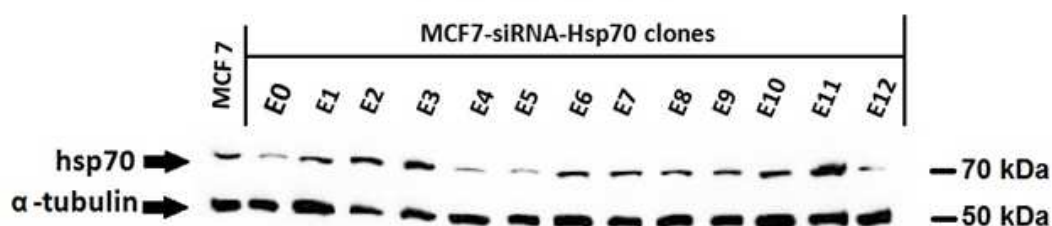
4.1.1. Γονιδιακή αποσιώπηση της *Hsp70*

Για τη διαμόλυνση των *MCF7* κυττάρων με το πλασμίδιο *pcDNA3-siRNA-Hsp70* (Kasioumi et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα), χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation). Μέσω της μεθόδου αυτής διανοίγονται, με τη βοήθεια του ηλεκτρικού πεδίου, οι πόροι στην κυτταρική μεμβράνη και μέσω των κυτταρικών αυτών πόρων εισέρχεται το κατασκευασμένο πλασμίδιο (Εικόνα 21Α) στα κύτταρα *MCF7* (Εικόνα 21Β).



Εικόνα 21: (Α) Πλασμιδιακός χάρτης του *pcDNA3-siRNA-Hsp70* (Kasioumi P., αδημοσίευτα αποτελέσματα). Το πλασμίδιο περιέχει siRNA για την αποσιώπηση της *Hsp70* κάτω από τον έλεγχο του ανθρώπινου υποκινητή *H1*, γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικιλίνη για αντιβιοτική επιλογή σε βακτήρια, γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη για αντιβιοτική επιλογή σε ευκαρυωτικά κύτταρα, που βρίσκεται καθοδικά του υποκινητή *SV40* και καταλήγει στο σήμα πολύ *A* αυτού, σήμα πολυαδενυλίωσης αναπτυξιακής ορμόνης βοοειδών (*bgh-PolyA*), περιοχή έναρξης της αντιγραφής προερχόμενη από φάγο, περιοχή έναρξης της αντιγραφής προερχόμενη από *E. Coli*. (Β) Μορφολογικές φωτογραφίες. *MCF7* πατρικής κυτταρικής σειράς και *MCF7-siRNA-Hsp70* κυτταρικού κλώνου, έπειτα από αποσιώπηση της *Hsp70* με siRNA τεχνολογία.

Στο παρελθόν είχαν επιχειρηθεί επανειλημμένες απόπειρες αποσιώπησης της *Hsp70* σε *MCF7* κύτταρα με μικρή όμως επιτυχία (αποσιώπησης της τάξης ποσοστού ~50%). Δεν υπήρχε δυνατότητα να μεγαλώσουν αποικίες με μεγάλο ποσοστό γονιδιακής αποσιώπησης της *Hsp70*. Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε, για αυτή την αποσιώπηση, ήταν το *pSUPER-Hsp70-siRNA* (233). Η μείωση της έκφρασης της *Hsp70* που επετεύχθη ήταν σε ποσοστό 60-70% (Εικόνα 22, κλώνος E5).

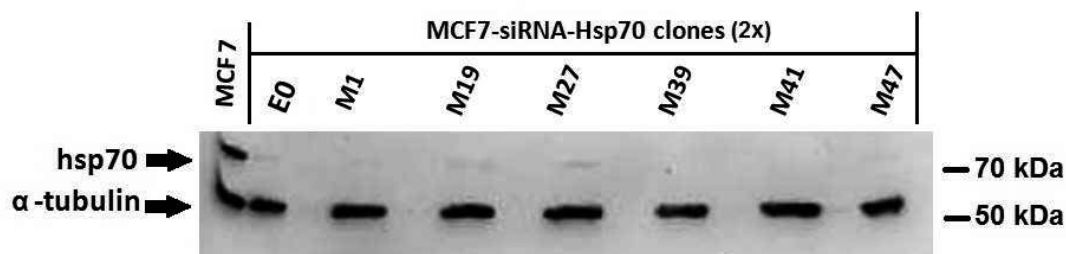


Εικόνα 22: Γονιδιακή αποσιώπηση της *Hsp70*: Διαφορετικοί κλώνοι (E0-E12) *MCF7-siRNA-Hsp70*, έπειτα από την διαμόλυνση με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης με το πλασμίδιο *pcDNA3-siRNA-HSP70*, ελέγχθησαν με ανοσοαποτύπωση κατά western με αντισώματα ειδικά για την *Hsp70* (πρωτεΐνη προς μελέτη) και *α-tubulin* για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

Αποσιώπηση της *Hsp70* σε ποσοστό πάνω από 90% επετεύχθη χρησιμοποιώντας την ήδη υπάρχουσα κυτταρική σειρά *MCF7-siRNA-Hsp70* (*MCF7-siRNA-Hsp70*, κλώνος E5), η οποία περιέχει το πλασμίδιο *pSUPER-Hsp70-siRNA* (ειδικό για την αντίσταση στην υγρομυκίνη), το οποίο και προσέδιδε μία μείωση της έκφρασης της *Hsp70* κατά 60-70%. Η εκ νέου διαμόλυνση των κυττάρων αυτών, με το πλασμίδιο *pcDNA3-siRNA-Hsp70*, το οποίο φέρει ως δείκτη επιλογής το γονίδιο της γενετισίνης. Η επιλογή των αποικιών που έγινε με *G-418* οδήγησε στην δημιουργία μιας νέας κυτταρικής σειράς, την *MCF7 siRNA Hsp70* (2x) (διπλή αποσιώπηση της *Hsp70* με δύο διαφορετικά πλασμίδια), με αποσιώπηση της *Hsp70* σε ποσοστό άνω του 90%.

Έτσι η διπλή διαμόλυνση (2X) των κυττάρων *MCF7* έγινε με τα πλασμίδια *pSUPER* και *pcDNA3*, που φέρουν τα ειδικά *siRNAs* για την πρωτεΐνη *Hsp70* και η επιλογή των σταθερών μετασχηματισμένων κλώνων έγινε με τα αντιβιοτικά Υγρομυκίνη (*Hygromycin*) και Γενετισίνη (*G418*). Τα εκχυλίσματα των κλώνων που συλλέχθηκαν αναλύθηκαν με *SDS-PAGE* και ανοσοαποτύπωση, χρησιμοποιώντας αντι-*Hsp70* ειδικά αντισώματα για την ανίχνευση της πρωτεΐνης στους κυτταρικούς κλώνους, σε φυσιολογικές συνθήκες. Η χρήση του αντισώματος ειδικού για την *α-tubulin* έγινε για τον έλεγχο της ισοφόρτωσης των

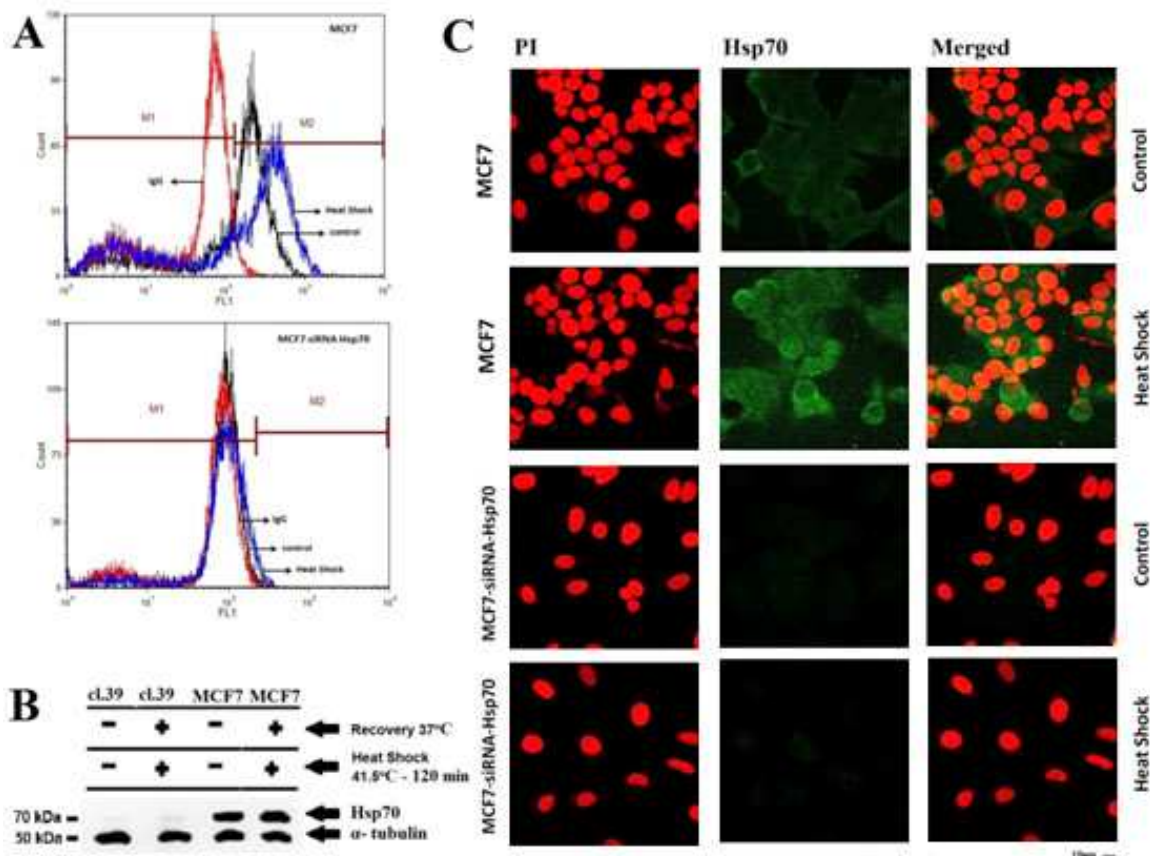
δειγμάτων. Οι κλώνοι που επιβίωσαν και πολλαπλασιάστηκαν μελετήθηκαν διεξοδικά. Από τους κλώνους που επιλέχθηκαν, οι M39 και M41, είχαν αποσιώπηση της *Hsp70* σε ποσοστό πάνω του 90% (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Επιλογή κυτταρικών κλώνων MCF7 που δεν εκφράζουν τις *Hsp70*. Οι σταθερά μετασηματισμένες κυτταρικές σειρές MCF7, που δεν εκφράζουν *Hsp70*, κατασκευάστηκαν με ηλεκτροδιάτρηση των γονικών κυττάρων με τα πλασμίδια *pSUPER-Hsp70-siRNA* και *pcDNA3-siRNA-HSP70*, που φέρνουν αλληλουχίες για έκφραση *Hsp70* siRNAs. Οι κυτταρικοί κλώνοι επιλέχθηκαν μετά από καλλιέργεια των κυττάρων παρουσία των αντιβιοτικών *Hygromycin* και *G418*, όπως περιγράφεται στα υλικά και τις μεθόδους. Τα εκχυλίσματα κυττάρων από διάφορους αντιπροσωπευτικούς κλώνους προετοιμάστηκαν και υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE ανάλυση και περαιτέρω σε ανοσοαποτύπωση με τα αντίστοιχα ειδικά αντισώματα για την *Hsp70* και α -τουμπουλίνη (έλεγχος ισοφόρτωσης).

4.1.2 Η *Hsp70* διατηρείται υπό γονιδιακή αποσιώπηση (knockdown) στα *MCF7-siRNA-Hsp70* κύτταρα ακόμη και υπό συνθήκες θερμικού σοκ.

Η ανάλυση της έκφρασης της *Hsp70* στους δύο κυτταρικούς κλώνους που κατασκευάστηκαν μέσω *siRNA* τεχνολογίας έγινε με τρεις διαφορετικές μεθόδους (Εικόνα 24). Εκτός από την μελέτη με *western blotting* (Εικόνα 24B), χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής (Partec CyFlow ML) (Εικόνα 24A) και ανοσοφθορισμός σε συνεστιακό μικροσκόπιο (Εικόνα 24C). Κύτταρα MCF7 και οι δύο σταθερά μετασηματισμένες κυτταρικές σειρές, που δεν εκφράζουν την *Hsp70*, *MCF7-siRNA-Hsp70* κλώνος 39 και *MCF7-siRNA-Hsp70* κλώνος 41, καθώς και οι ίδιες κυτταρικές σειρές έπειτα από έκθεσή τους σε θερμικό στρες 41,5°C για 120 λεπτά και επαναφορά τους στους 37°C για 90 λεπτά, προετοιμάστηκαν για την περαιτέρω ανάλυση σε κάθε μία από τις μεθόδους.



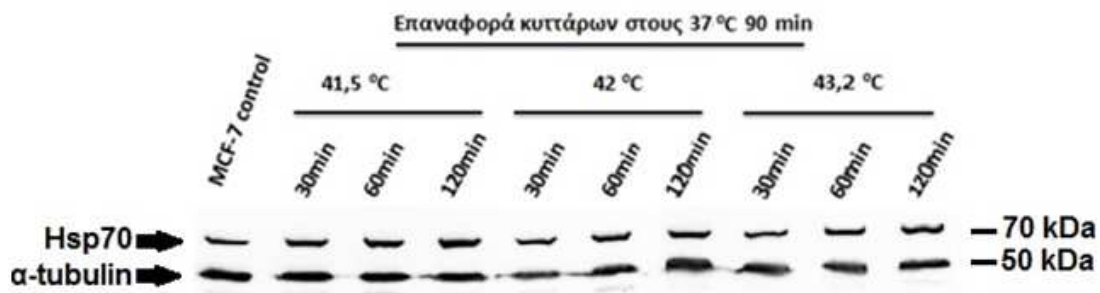
Εικόνα 24: Έλεγχος γονιδιακής αποσιώπησης της *Hsp70* σε *MCF7* κύτταρα. **(Α)** Κύτταρα *MCF7* (επάνω) και *MCF7-siRNA-Hsp70 cl 39* (κάτω) που υπέστησαν ή όχι θερμικό σοκ ελέγχθηκαν για την επαγωγή της *Hsp70*, χρησιμοποιώντας Αννεξίνη V/Ιωδιούχο προπίδιο και τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, όπως αναφέρει η διαδικασία στα υλικά και μεθόδους. Μετρήθηκε ο φθορισμός της *Hsp70* σε κάθε περίπτωση και ακολούθως μελετήθηκε η επαγωγή συγκρίνοντας τις καμπύλες φθορισμού, αφαιρώντας ανά περίπτωση τον αυτοφθορισμό που προέρχεται από το δευτερογενές αντίσωμα. **(Β)** Κύτταρα *MCF7* και κύτταρα *MCF7-siRNA-Hsp70 κλώνος 39* εκτέθηκαν σε θερμικό σοκ $41,5^{\circ}\text{C}$ για 120 λεπτά και επαναφορά στους 37°C για 90 λεπτά και ελέγχθηκε η επαγωγή της *Hsp70* με ανοσοαποτύπωση κατά western. Η α -τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισοφόρτωσης. **(Γ)** Κύτταρα *MCF7* (επάνω ένθετο) και κύτταρα *MCF7-siRNA-Hsp70 κλώνος 39* (κάτω ένθετο), αναλύθηκαν με ανοσοφθορισμό υπό φυσιολογικές συνθήκες και μετά από θερμικό σοκ για την έκφραση και την εντόπιση της *Hsp70*. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Οι πυρήνες φαίνονται κόκκινοι έπειτα από χρώση τους με ιωδιούχο προπίδιο (PI).

Η απόκριση στο θερμικό σοκ και η επαγωγή της *Hsp70* παρατηρήθηκαν αρκετά στα *MCF7* πατρικά κύτταρα και ελάχιστα έως καθόλου στα *MCF7-siRNA-Hsp70 κλώνος 39* (Εικόνα 24B). Στην κυτταρομετρία ροής τόσο ο ιστοτυπικός μάρτυρας (IgG) όσο και τα κύτταρα μάρτυρες *MCF7-siRNA-Hsp70 κλώνος 39* παρουσιάζουν σχεδόν ολοκληρωτική αρνητική ρύθμιση της *Hsp70* (Εικόνα 24A κάτω μέρος). Το ίδιο, περί απουσίας έκφρασης της *Hsp70*, επιβεβαίωσε και η τεχνική του ανοσοφθορισμού, υπό την έκθεση ή μη-έκθεση των κυττάρων *MCF7-siRNA-Hsp70 κλώνος 39*, σε θερμικό σοκ. Έτσι και οι 3 τεχνικές επιβεβαίωσαν την υψηλού ποσοστού έλλειψη της *Hsp70* από τα κύτταρα *MCF7-siRNA-*

Hsp70 κλώνος 39. Ο ίδιος κυτταρικός κλώνος 39 χρησιμοποιήθηκε και στα επόμενα πειράματα ως κυτταρικό σύστημα μελέτης της λειτουργίας κυρίως της *Hsp70* στην ανένστια απόπτωση των κυττάρων και στη μεταναστευτικότητα τους.

4.1.3 Η απουσία της *Hsp70* αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό του *MCF7-siRNA-Hsp70*.

Οι *Hsps* (Heat shock proteins) επάγονται έπειτα από διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα, όπως το θερμικό σοκ. Με σκοπό την μελέτη της θερμικής απόκρισης της νέας κυτταρικής σειράς, κύτταρα εκτέθηκαν σε θερμικά σοκ διαφορετικών θερμοκρασιών και διάρκειας και ακολούθως μελετήθηκε η επαγωγή της *Hsp70* σε αυτά.

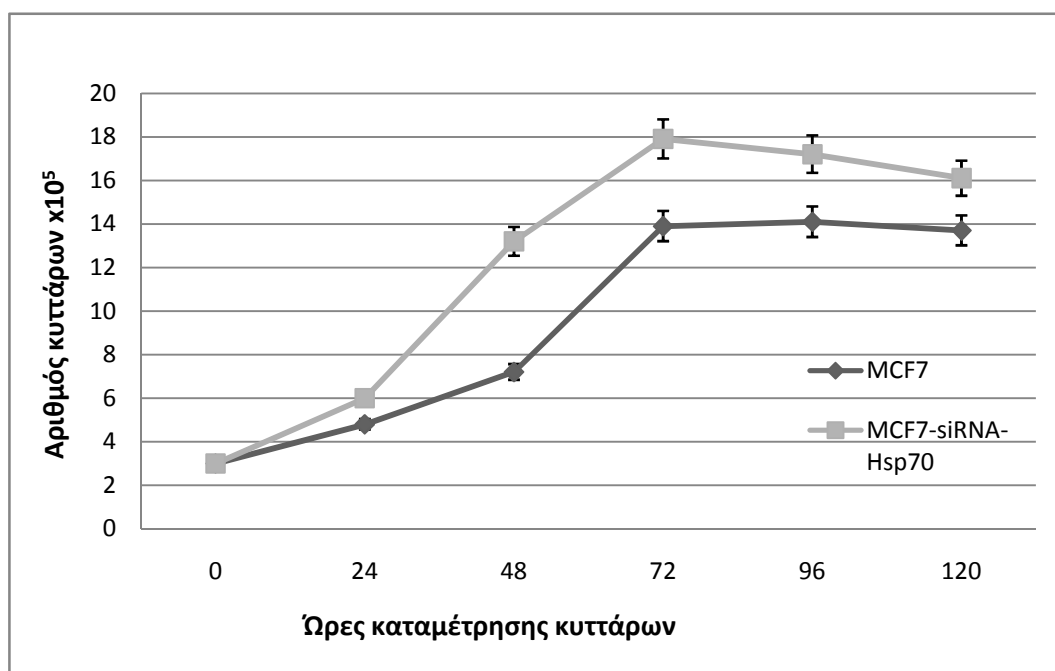


Εικόνα 25: Έλεγχος επαγωγής της *Hsp70* σε *MCF7* κύτταρα μετά την έκθεσή τους σε θερμικό σοκ. Κύτταρα *MCF7* (control) και *MCF7-siRNA-Hsp70* κλώνου 39 εκτέθηκαν σε ακραίες θερμοκρασίες 41,5, 42, 43,2°C για χρονικό διάστημα από 30 ως 120 λεπτά και επαναφορά τους στους 37°C για 90 λεπτά. Η επαγωγή της *Hsp70* ελέγχθηκε με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά western. Η α-τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισοφόρτωσης.

Παρατηρήθηκε η μέγιστη επαγωγή της *Hsp70*, έπειτα από επώαση στους 41,5°C για 120 λεπτά και επαναφορά των κυττάρων στους 37°C για 90 λεπτά (Εικόνα 25). Σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες δεν παρατηρήθηκε τόσο μεγάλη αύξηση της επαγωγής της *Hsp70*, όσο στη θερμοκρασία που αναφέρθηκε. Επίσης, παρατηρώντας την συμπεριφορά των *MCF7* κυττάρων στο θερμικό σοκ παρατηρούμε ότι με έκθεσή τους για 30-120 λεπτά σε θερμοκρασίες μεταξύ 41,5-43,2°C δεν παρουσιάζουν αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης (βλέπε έκφραση ακτίνης). Αντίθετα υπάρχει αύξηση της συσσώρευσης της *Hsp70* με την αύξηση του χρόνου στο στρες (Εικόνα 25). Θα πρέπει επίσης να σημειώσουμε ότι κάτω από την έκθεση σε αυτές τις θερμοκρασίες και χρονικές περιόδους η πλειονότητα των κυττάρων κατορθώνουν να επιβιώσουν.

Στην συνέχεια μελετήθηκε και συγκρίθηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των πατρικών κυττάρων *MCF7* και του *MCF7-siRNA-Hsp70* – κλώνος 39 (κλώνου με αποσιωπημένη την πρωτεΐνη *Hsp70*) και δημιουργήθηκε η καμπύλη ανάπτυξής τους. Στην καμπύλη ανάπτυξης (Εικόνα 26) παρατηρούνται οι εξής φάσεις:

- ✓ Φάση καθυστέρησης (0-12 ώρες)
- ✓ Φάση επιτάχυνσης (12-24 ώρες)
- ✓ Φάση εκθετικής ανάπτυξης (24-72 ώρες)
- ✓ Φάση επιβράδυνσης (72-84 ώρες)
- ✓ Στάσιμη φάση (84-96 ώρες)
- ✓ Φάση θανάτου ή αποδόμησης (96-100 ώρες)

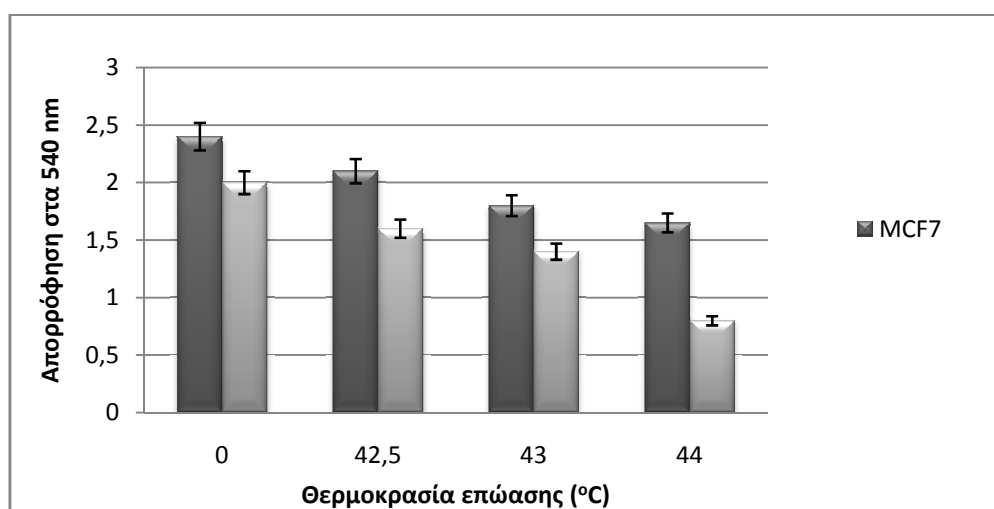


Εικόνα 26: Καμπύλη Ανάπτυξης των κυτταρικών σειρών *MCF7* και *MCF7-siRNA-Hsp70*. Κύτταρα *MCF7* και *MCF7-siRNA-Hsp70* κλώνος39 καταμετρήθηκαν ανά 24 ώρες (ώστε να έχουν ολοκληρώσει μία κυτταρική διαίρεση) οι τιμές τους καταγράφονταν και σχεδιάστηκε η καμπύλη ανάπτυξης. Οι τιμές που παρουσιάζονται καθώς και τα *SD* προέρχονται από τρία πειράματα τριών τρυβλίων, με $P < 0.006$.

Όπως φαίνεται (Εικόνα 26) τα κύτταρα που δεν εκφράζουν την *Hsp70*, δηλαδή τα *MCF7-siRNA-Hsp70* κλώνος 39, πολλαπλασιάζονται ταχύτερα από τα πατρικά *MCF7*, τα οποία σε αντίθεση εκφράζουν υψηλά ποσά *Hsp70*.

4.1.4 Η απουσία της *Hsp70* προκαλεί θερμοευαισθησία στα καρκινικά *MCF7* κύτταρα και μειωμένη ικανότητα δημιουργίας κυτταρικών αποικιών.

Στα επόμενα πειράματα θέλαμε να μελετήσουμε τον ρόλο της *Hsp70* στην επιβίωση των κυττάρων, έναντι του θερμικού στρες, λόγω ακραίων θερμοκρασιών. Έτσι, σε κύτταρα *MCF7* και *MCF7 siRNA Hsp70* - κλώνος 39 εφαρμόστηκε θερμικό σοκ διαφορετικής έντασης 42.5°C, 43°C και 44°C για 120 λεπτά και ακολούθησε επαναφορά των κυττάρων για 90 λεπτά σε επωαστικό κλίβανο υπό συνθήκες 37°C και 5% CO₂. Μετρήθηκε η επιβίωση των κυττάρων με τη χρήση του αντιδραστηρίου *MTT* [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. Πρόκειται για μια χρωματομετρική μέθοδο που βασίζεται στην αναγωγή του *MTT* σε ένα μωβ προϊόν φορμαζάνης από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες των ζωντανών κυττάρων. Η ένταση του μωβ χρώματος αποτελεί μέτρο του αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Η απορρόφηση στα 540 nm μετράται με φασματοφωτόμετρο (Multiscan Spectrum, Thermo Fisher Scientific, Whatman, USA). Για τα *SD* χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές από τρία πειράματα τριών δειγμάτων ανά χρονικό διάστημα έκθεσης στο θερμικό σοκ, με $P < 0.005$.

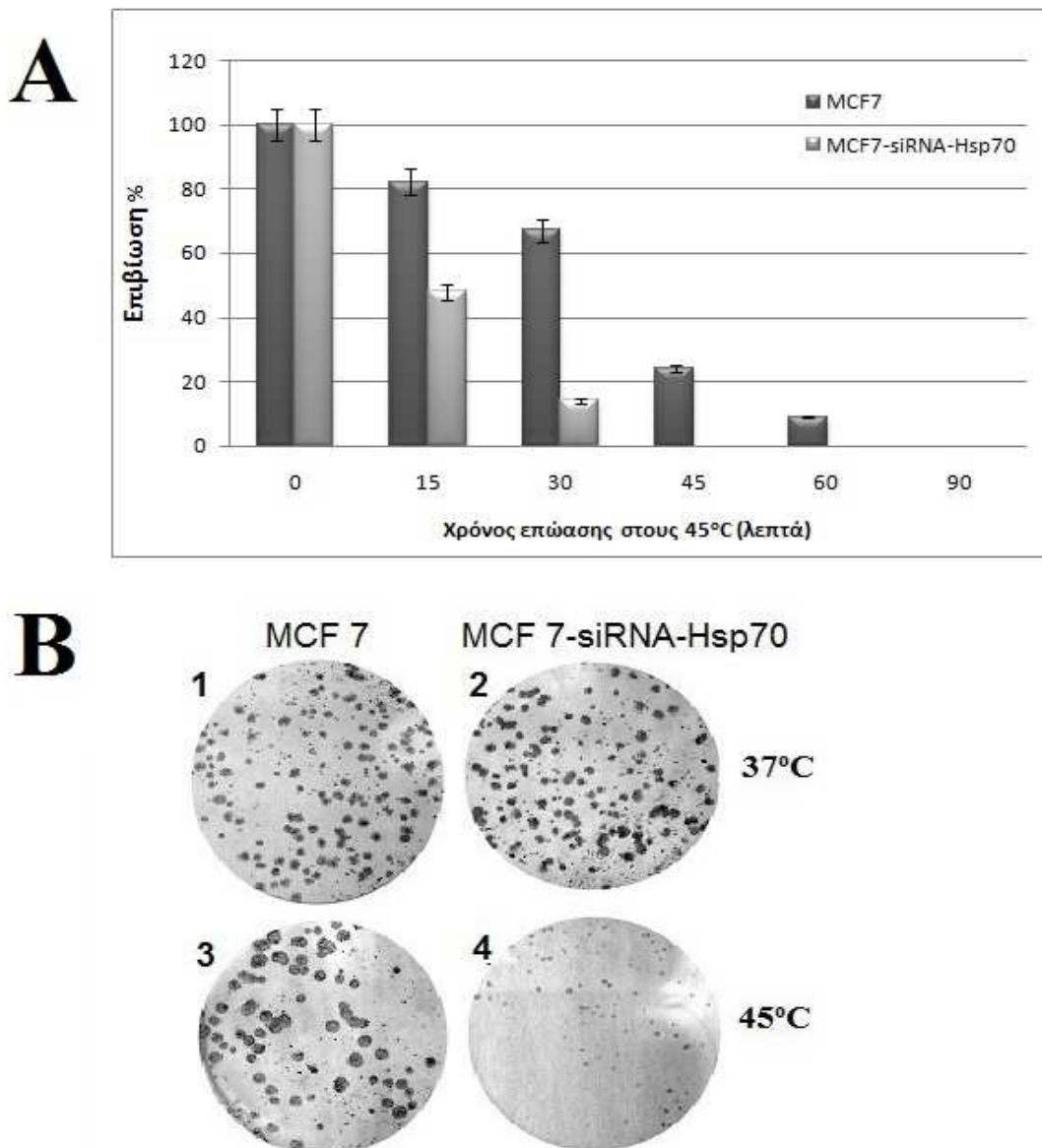


Εικόνα 27: Διαγραμματική απεικόνιση της απορρόφησης των κυττάρων στα 540 nm μετά από θερμικό σοκ διαφορετικής έντασης. Συγκεκριμένα, επιστρώθηκαν κύτταρα *MCF7* και *MCF7-siRNA-Hsp70* σε πολυτρυβλία των 96 θέσεων και επωάστηκαν για 24h σε συνθήκες 37°C, 5% CO₂. Στη συνέχεια τα κύτταρα υπέστησαν θερμικό σοκ διαφορετικής έντασης (42.5°C, 43°C και 44°C) για 120 λεπτά ενώ ακολούθησε επαναφορά των κυττάρων για 90 λεπτά σε συνθήκες 37°C, 5% CO₂. Τρεις ώρες πριν το τέλος του πειράματος προστίθεται το αντιδραστήριο *MTT* στο θρεπτικό μέσο και ακολουθεί επώαση για 3 ώρες στους 37°C. Μετά την επώαση και τον έλεγχο στο μικροσκόπιο μέσο, τα κύτταρα διαλυτοποιούνται σε *DMSO*. Η απορρόφηση μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο, στα 540 nm. Οι τιμές που παρουσιάζονται καθώς και τα *SD* προέρχονται από τρία πειράματα ανά χρονικό διάστημα έκθεσης στο θερμικό σοκ, με $P < 0.005$.

Παρατηρείται, εικόνα 27, πως όσο αυξάνει η τιμή της ακραίας θερμοκρασίας επώασης, τόσο μεγαλύτερο ποσοστό κυτταρικού θανάτου έχουμε στον κυτταρικό κλώνο 39 από τον οποίον απουσιάζει η *Hsp70*. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, τα κύτταρα με αποσιωπημένη την *Hsp70* είναι πιο θερμοευαίσθητα σε σύγκριση με τα πατρικά κύτταρα μάρτυρες (Εικόνα 27).

Στην συνέχεια συγκρίναμε τα κύτταρα σε σχέση με την κυτταρική επιβίωση και την ικανότητά τους να δημιουργήσουν αποικίες έπειτα από ένα αυξανόμενο σε χρόνο θανατηφόρο θερμικό σοκ των 45°C. Τα πειράματα αυτού του τύπου δείχνουν ότι τα κύτταρα μετά από ένα ακραίο στρες μπορούν ή δεν μπορούν να επανακάμψουν πλήρως, να ξεπεράσουν τον θάνατο και να προχωρήσουν φυσιολογικά την ζωή τους πολλαπλασιαζόμενα και δημιουργώντας αποικίες.

Για την μελέτη της ικανότητας δημιουργίας αποικιών (colony formation assay) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *MCF7* και *MCF7-siRNA-Hsp70 κλώνος39* τα οποία και υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ 45°C για διάφορα χρονικά διαστήματα των 0, 15, 30, 45, 60 και 90 λεπτών και επαναφορά στους 37°C για 90 λεπτά. Έπειτα από 12 ημέρες οι αποικίες βάφτηκαν με χρωστική *Giemsa* και καταμετρήθηκαν σε κάθε τρυβλίο. Τα ποσοστά των αναπτυχθέντων αποικιών υπολογίστηκαν επί τοις εκατό (Εικόνα 28Α).



Εικόνα 28: Η απουσία της *Hsp70* μειώνει τη θερμοανθεκτικότητα των κυττάρων. **(Α)** Κύτταρα *MCF7* και *MCF7-siRNA-Hsp70* (κλώνος 39) υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ 45°C για διάφορα χρονικά διαστήματα 0, 15, 30, 45, 60 και 90 λεπτών και επαναφορά στους 37°C και ελέγχθηκε η ικανότητά τους για δημιουργία αποικιών. Οι αποικίες καταμετρήθηκαν και τα ποσοστά υπολογίστηκαν επί τοις 100. **(Β)** Ενδεικτική εικόνα αποικιών των κυττάρων *MCF7* και *MCF7-siRNA-Hsp70* (κλώνος 39), τα οποία υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ 45°C για 30 λεπτά και κυττάρων *control* στους 37°C. Οι τιμές που παρουσιάζονται καθώς και τα *SD* προέρχονται από τρία πειράματα ανά χρονικό διάστημα έκθεσης στο θερμικό σοκ, με $P < 0.004$.

Στα κύτταρα *MCF7-siRNA-Hsp70* κλώνος 39, εμφανίστηκαν λιγότερες αποικίες σε σχέση με τα πατρικά *MCF7*, έπειτα από έκθεσή τους στους 45°C για 15 και 30 λεπτά. Δεν εμφανίστηκαν καθόλου αποικίες για την έκθεσή τους στους 45°C για 45, 60 και 90 λεπτά. Επομένως, η απουσία της *Hsp70* μειώνει τη θερμοανθεκτικότητα των κυττάρων ή αντίστροφα αυξάνει την θερμοευαισθησία τους.

4.1.5 Η γονιδιακή αποσιώπηση της *Hsp70* οδηγεί τα *MCF7* κύτταρα σε απόπτωση.

Για την επιβεβαίωση της αποπτωτικής ικανότητας των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε και η κυτταρομετρία ροής με τη χρήση Αννεξίνης *V* (Annexin *V*) και ιωδιούχου προπιδίου (PI). Κύτταρα *MCF7* και η σταθερά μετασηματισμένη κυτταρική σειρά που δεν εκφράζει *Hsp70* (*MCF7-siRNA-Hsp70* κλώνος 39) αναπτύχθηκαν, υπό φυσιολογικές συνθήκες, και αναλύθηκαν για την απόπτωσή τους σε φυσιολογικές συνθήκες, αλλά και έπειτα από θερμικό σοκ. Όταν τα κύτταρα έφτασαν σε πυκνότητα 100%, ο κάθε κυτταρικός τύπος χωρίστηκε σε πέντε διαφορετικές ομάδες πληθυσμού $1,5 \times 10^6$ κυττάρων η κάθε μία. Η μία ομάδα αναλύθηκε αμέσως μόνο με την προσθήκη διαλύματος ασβεστίου, ενώ η άλλη ομάδα κυττάρων υποβλήθηκε σε θερμικό σοκ 42.5, 43, 44°C για 90 λεπτών και επαναφορά σε 37°C για επιπλέον 90 λεπτά.

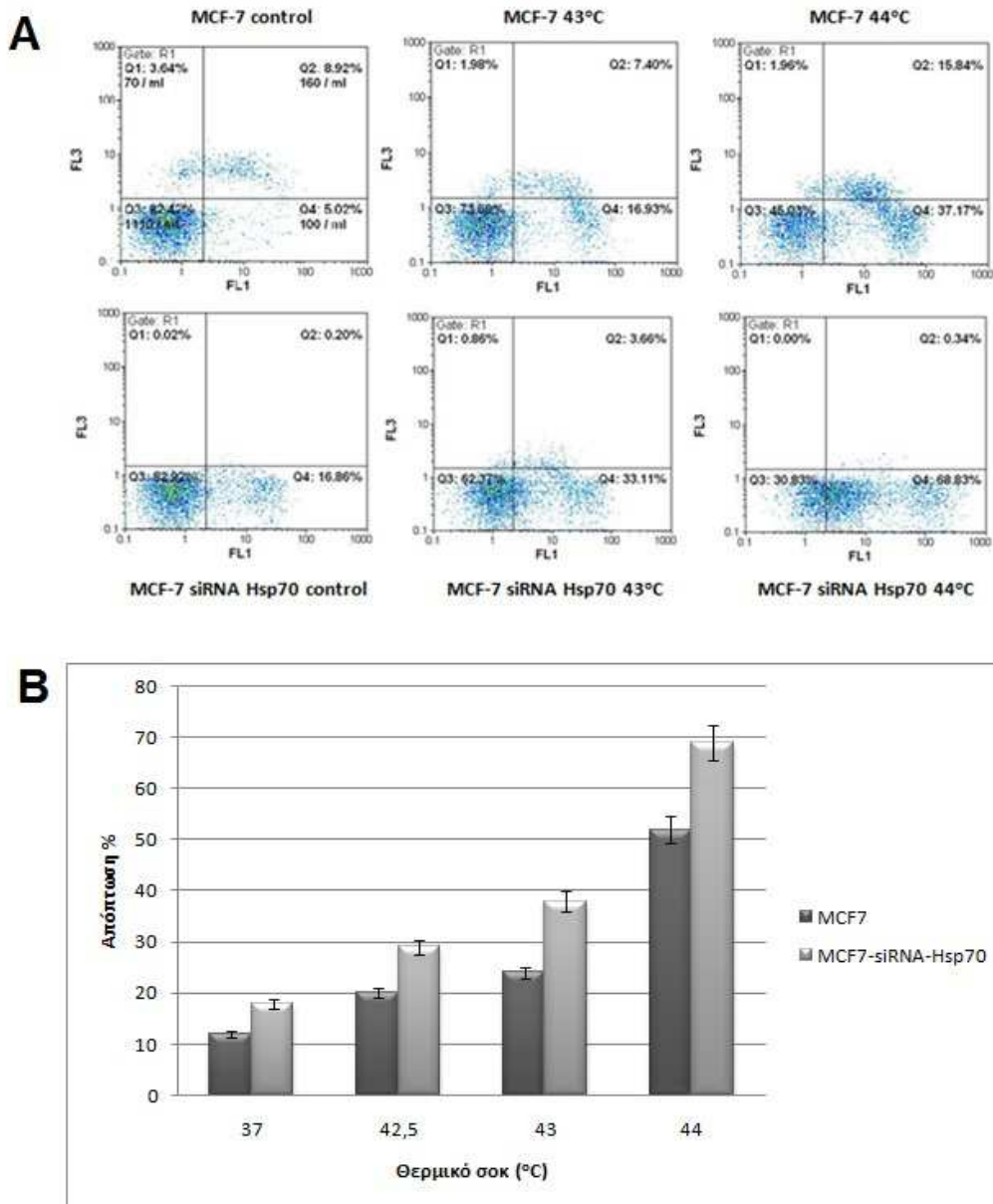
Ομάδα διαλύματος ασβεστίου (μάρτυρας)

- ✓ *MCF7* (διαλύματος ασβεστίου)
- ✓ *MCF7 Heat Shock* (διαλύματος ασβεστίου)
- ✓ *MCF7-siRNA-Hsp70* (διαλύματος ασβεστίου)
- ✓ *MCF7-siRNA-Hsp70 Heat Shock* (διαλύματος ασβεστίου)

Ομάδα *PI/Annexin*

- ✓ *MCF7* (*PI/Annexin*)
- ✓ *MCF7 Heat Shock* (*PI/Annexin*)
- ✓ *MCF7-siRNA-Hsp70* (*PI/Annexin*)
- ✓ *MCF7-siRNA-Hsp70 Heat Shock* (*PI/Annexin*)

Ο έλεγχος έγινε με κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιώντας *PI/Annexin*.



Εικόνα 29: Η αρνητική ρύθμιση της *Hsp70* ακολουθείται από αύξηση της απόπτωσης των κυττάρων *MCF7-siRNA-Hsp70*. (A) Ενδεικτική απεικόνιση απόπτωσης σε κυτταρόμετρο ροής σε κύτταρα *MCF7* και *MCF7-siRNA-Hsp70*, έπειτα από έκθεση σε θερμικό στρες 43 και 44°C. (B) Κύτταρα *MCF7* και *MCF7-siRNA-Hsp70* υπέστησαν ή όχι θερμικό σοκ 42.5, 43, 44°C για 90 λεπτών και επαναφορά σε 37°C για επιπλέον 90 λεπτά. Η μέτρηση της απόπτωσης των κυττάρων έγινε με τη χρήση Αννεξίνη V (*Annexin V*) και ιωδιούχου προπιδίου (*PI*), με κυτταρομετρία ροής. Οι τιμές που παρουσιάζονται καθώς και τα SD προέρχονται από τρία πειράματα ανά χρονικό διάστημα έκθεσης στο θερμικό σοκ, με $P < 0.008$.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η απουσία της *Hsp70* προκαλεί αυξημένη αποπτωτική ενεργότητα των κυττάρων *MCF7-siRNA-Hsp70*, ιδίως έπειτα από επώαση σε θερμοκρασίες 43 και 44°C, συγκρινόμενη με αυτή των πατρικών *MCF7* κυττάρων όπου η *Hsp70* εκφράζεται σε αρκετά υψηλά επίπεδα (Εικόνα 29). Τα παραπάνω αποτελέσματα

συμφωνούν με προηγούμενα δεδομένα (77), που αναφέρουν ότι η *Hsp70* αποτελεί ένα από τα κύρια αντι-αποπτωτικά μέλη και τα κύτταρα που στερούνται της *Hsp70* οδηγούνται σε αποπτωτικό θάνατο, που προκαλείται από τη θερμότητα.

4.2 HSP70 ΚΑΙ ΑΝΟΙΚΙΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

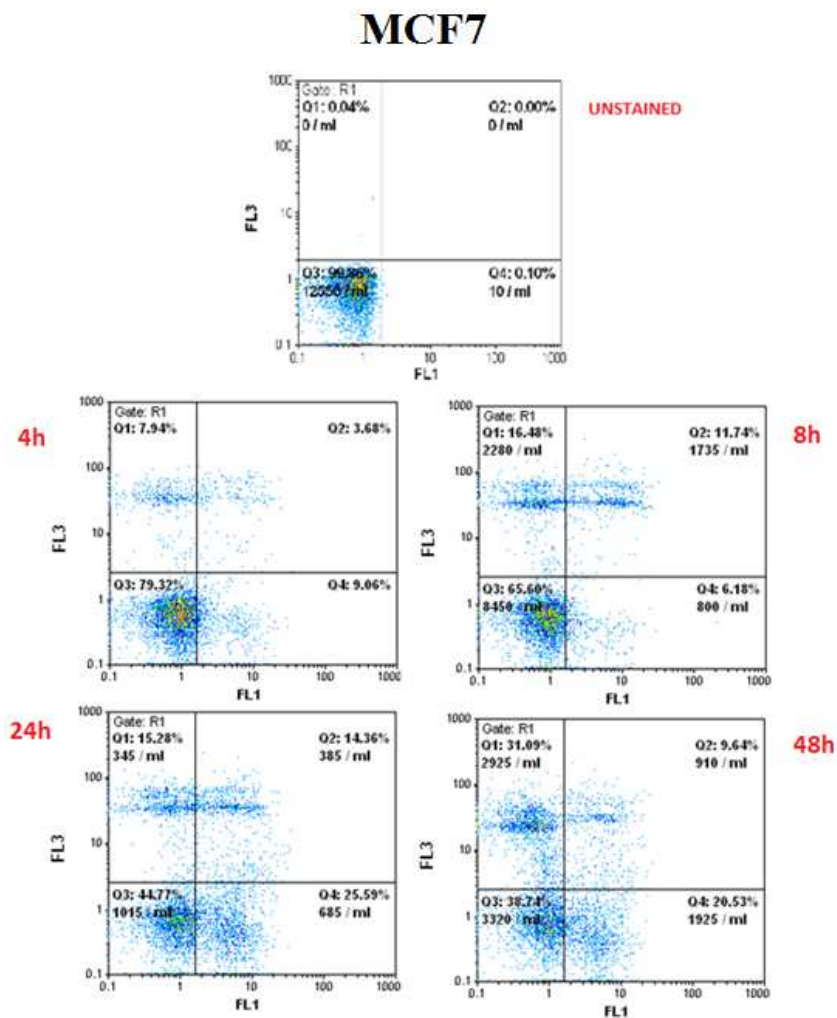
Αφού κατασκευάστηκαν και ελέγχθηκαν για την αξιοπιστία τους τα απαραίτητα βιοτεχνολογικά προϊόντα, προχωρήσαμε στο δεύτερο στάδιο, που αφορούσε τον ρόλο της *Hsp70* πρωτεΐνης στα ανθρώπινα *MCF7* καρκινικά κύτταρα στήθους και ιδιαίτερα την διαλεύκανση του ρόλου της *Hsp70*, στο μονοπάτι της *anoikis* απόπτωσης. Η επιλογή αυτή έγινε με το σκεπτικό ότι η ανέστια ενσωματώνει στο μονοπάτι της το στάδιο της αποκόλλησης των κυττάρων από το υπόστρωμα, ένα στάδιο ανάλογο με το πρώτο στάδιο ενός καρκινικού κυττάρου που ξεκινά με αποκόλλησή του και συνεχίζει για μετανάστευση, κατά την διαδικασία της μετάστασης. Έτσι θεωρήσαμε ότι για την εύρεση του ρόλου της *Hsp70* στην μετάσταση των καρκινικών *MCF7* κυττάρων, η μελέτη της ανέστιας έμμεσα θα βοηθούσε προς αυτή την κατεύθυνση.

Για την πρόκληση της *anoikis* απόπτωσης χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία επικαλυμμένα με την ουσία *poly-HEMA*, η οποία δεν επιτρέπει στα κύτταρα να προσκολληθούν στο πυθμένα των τρυβλίων δημιουργώντας ταπήτιο.

Ο ρόλος της *Hsp70* στο μονοπάτι της ανέστιας, μελετήθηκε με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά western και της χρήσης αντισωμάτων έναντι των *PARP* (αποπτωτικός δείκτης), *p53* (πρωτεΐνη δείκτης απόπτωσης, συγκεκριμένα προκαλεί απόπτωση στις επιθηλιακές κυτταρικές σειρές) και *phospho-p53* (Serine 15) (φωσφορυλιωμένη μορφή της *p53* στη σερίνη 15) ικανής για να συμμετάσχει στην επιδιόρθωση βλαβών του *DNA*.

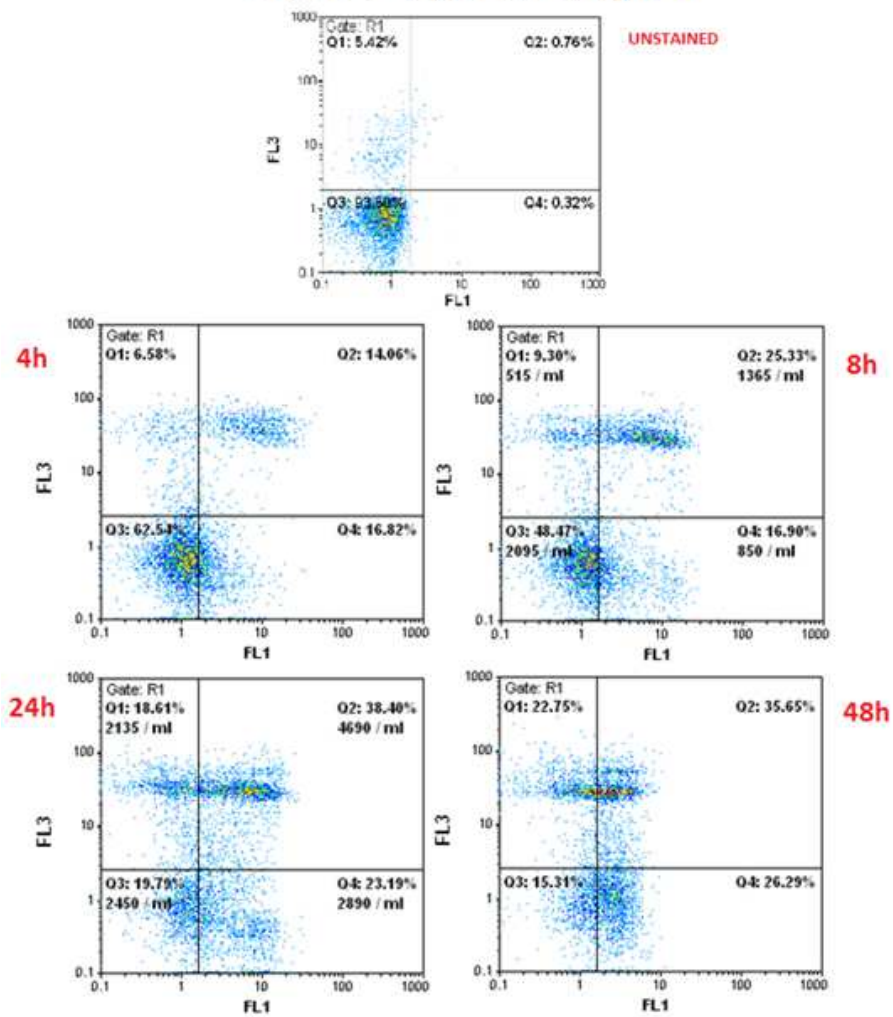
4.2.1 Η απουσία της *Hsp70* καθιστά τα κύτταρα πιο ευαίσθητα στην *apoptosis* απόπτωση

Κύτταρα μάρτυρες *MCF7* και κύτταρα *MCF7* με αποσιωπημένη την *Hsp70* (*MCF7*-siRNA-*Hsp70* κλώνος 39) καλλιεργήθηκαν, σε τρυβλία, που έχουν επιστρωθεί με *poly-HEMA*, για διαφορετικά χρονικά διαστήματα 0, 4, 8, 24 και 48 ώρες, έτσι ώστε να παρεμποδιστεί η προσκόλλησή τους στο ταπήτιο και να επαχθεί η διαδικασία της *apoptosis* απόπτωσης. Τα ποσοστά της απόπτωσης υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής (Εικόνες 30, 31) έπειτα από επίδραση των ουσιών Αννεξίνη *V* και ιωδιούχου προπιδίου (PI/Annexin V).

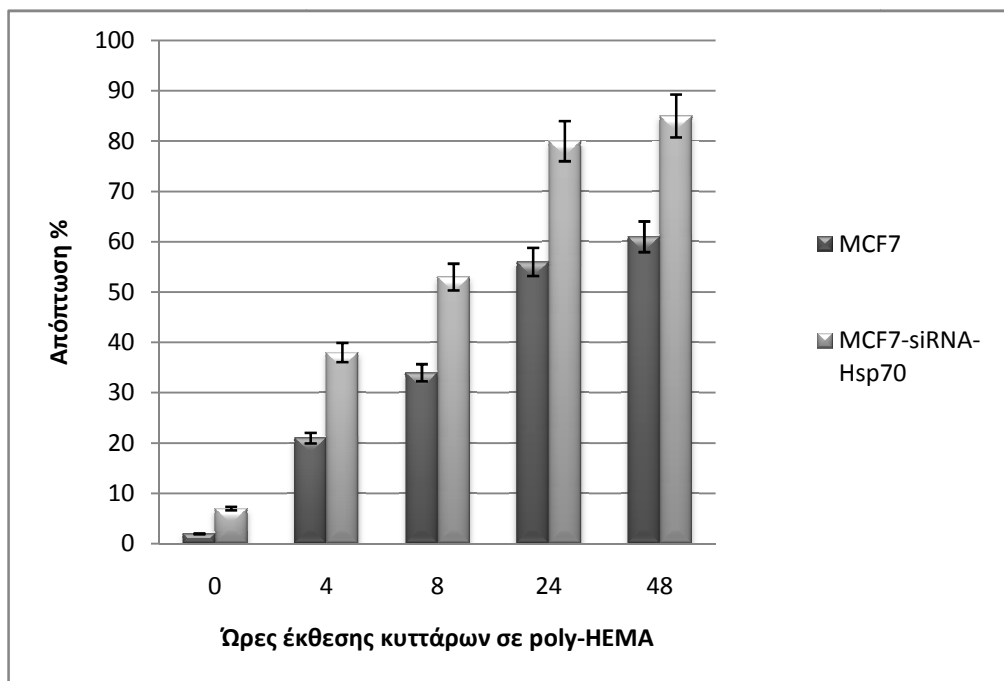


Εικόνα 30: Μέτρηση της απόπτωσης με τη χρήση κυτταρόμετρον ροής. Κύτταρα *MCF7* καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία επικαλυμμένα με *Poly-HEMA* για 0, 4, 8, 24 και 48 ώρες, έτσι ώστε να προκληθεί ανέστια απόπτωση (*apoptosis*). Η απόπτωση των κυττάρων, για τους διαφορετικούς χρόνους ανέστιας, μετρήθηκε με Αννεξίνη *V* και ιωδιούχο προπίδιο, σε κυτταρόμετρο ροής.

MCF7-siRNA-Hsp70



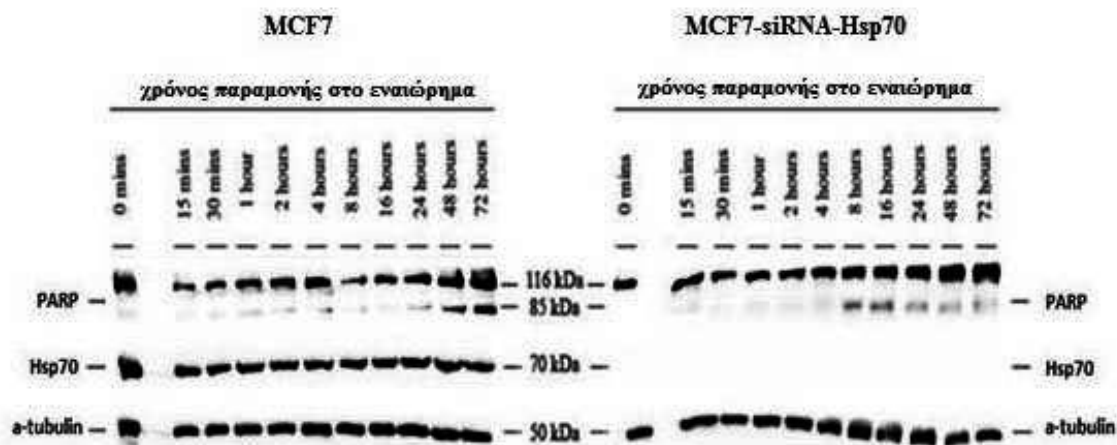
Εικόνα 31: Μέτρηση της απόπτωσης με τη χρήση κυτταρόμετρου ροής. Κύτταρα MCF7-siRNA-Hsp70 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία επικαλυμμένα με Poly-HEMA για 0, 4, 8, 24 και 48 ώρες, έτσι ώστε να προκληθεί ανέστια απόπτωση. Η απόπτωση των κυττάρων, για τους διαφορετικούς χρόνους ανέστιας, μετρήθηκε με Αννεζίνη V και ιωδιούχο προπίδιο, σε κυτταρόμετρο ροής.



Εικόνα 32: Η απουσία της Hsp70 καθιστά τα κύτταρα ευαίσθητα στην ανέστια απόπτωση. Κύτταρα MCF7 και MCF7-siRNA-Hsp70 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία επικαλυμμένα με Poly-HEMA για 0, 4, 8, 24 και 48 ώρες, έτσι ώστε να προκληθεί ανέστια απόπτωση. Η απόπτωση των κυττάρων μετρήθηκε με Αννεξίνη V και ιωδιούχο προπίδιο σε κυτταρόμετρο ροής. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων μεταφέρθηκαν σε ραβδόγραμμα. Οι τιμές που παρουσιάζονται καθώς και τα SD προέρχονται από τρία πειράματα ανά χρονικό διάστημα έκθεσης σε τρυβλία επικαλυμμένα με την ουσία poly-HEMA, με $P < 0.007$.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, παρατηρείται πως στην κυτταρική σειρά, από την οποία απουσιάζει η Hsp70, υπάρχει μεγαλύτερο ποσοστό κυτταρικού θανάτου σε σχέση με τα πατρικά κύτταρα (Εικόνες 30, 31). Αυτό επιβεβαιώνεται με την δημιουργία ραβδογράμματος που εμπεριέχει τιμές από πολλαπλά δείγματα (Εικόνα 32). Είναι σημαντικό ότι από τις 8 ώρες το ποσοστό κυτταρικού θανάτου είναι άνω του 50%. Σε αντίθεση η πατρική κυτταρική σειρά MCF7, παρουσία Hsp70, είναι πιο ανθεκτική και παρουσιάζει μικρότερο ποσοστό απόπτωσης, με το πέρασμα των ωρών στην ανέστια. Επομένως, η απουσία της Hsp70 καθιστά τα κύτταρα πιο ευαίσθητα στην ανοικis απόπτωση.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ο γνωστός αποπτωτικός δείκτης PARP, για τη επιβεβαίωση της εμπλοκής της Hsp70 στο ειδικό αυτό αποπτωτικό μονοπάτι.

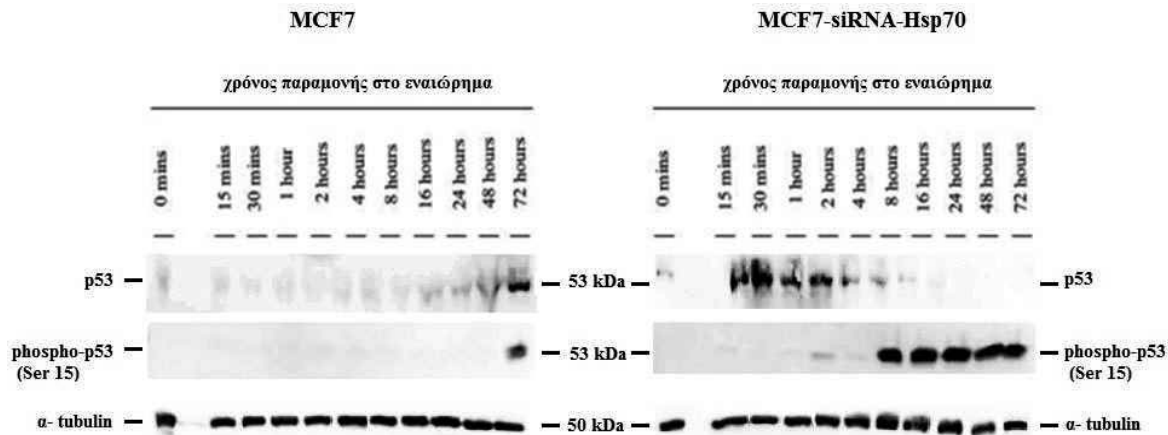


Εικόνα 33: Η απουσία της πρωτεΐνης *Hsp70* οδηγεί στην αύξηση της ανέστιας απόπτωσης των κυττάρων *MCF7*. Κύτταρα *MCF7* και *MCF7-siRNA-Hsp70* καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία τα οποία στερούνταν προσκόλλησης. Κυτταρικά εκχυλίσματα προετοιμάστηκαν, υποβλήθηκαν σε ανοσοαποτύπωση κατά western, χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα για την *PARP-1* (αποπτωτικός δείκτης), την *Hsp70* (δείκτης παρουσίας της πρωτεΐνης) και την α -τουμπουλίνη (δείκτης ισοφόρτωσης).

Όπως φαίνεται (Εικόνα 33), η *PARP*, η οποία όταν ξεκινά η διάσπασή της λειτουργεί ως δείκτης της απόπτωσης, ενεργοποιείται γρηγορότερα, περίπου στις 8 ώρες ανέστιας, στα κύτταρα που απουσιάζει η *Hsp70*. Έτσι, η απόπτωση, που προκαλείται λόγω της ανέστιας, ξεκινά γρηγορότερα στα κύτταρα *MCF7-siRNA-Hsp70*, απουσίας της *Hsp70*.

4.2.2 Η *Hsp70* εμποδίζει την ενεργοποίηση της ανέστιας μέσω *p53*.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τη διαλεύκανση της εμπλοκής της *Hsp70* στο ειδικό αυτό αποπτωτικό μονοπάτι, της *anoikis* απόπτωσης μέσω της *p53*. Θα πρέπει να υπενθυμίσουμε ότι ο πληθυσμός της *p53*, που είναι φωσφορυλιωμένος στην σερίνη 15, εμπλέκεται στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (241, 242). Αρχικά ελέγχθηκε η έκφραση και ο εντοπισμός των *p53* και *phospho-p53* (Ser 15), κατά την *anoikis* απόπτωση και για αυτό χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές ανοσοαποτύπωσης κατά western.



Εικόνα 34: Η απουσία της *Hsp70* έπειτα από πολύωρη ανέστια οδηγεί στην ενεργοποίηση της φωσφορυλιωμένης *p53* (Ser 15). Κύτταρα *MCF7* και *MCF7-siRNA-Hsp70* καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία επιστρωμένα με *poly-HEMA* προκαλώντας τους έτσι συνθήκες ανέστιας, για διαφορετικούς χρόνους. Τα πρωτεϊνικά τους εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά western και ελέγχθηκαν οι πρωτεΐνες *p53* (πρωτεΐνη προς μελέτη), *phospho-p53* (Ser 15) (πρωτεΐνη προς μελέτη) και *α-tubulin* (δείκτης ισοφόρτωσης δειγμάτων).

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν οι 2 κυτταρικές σειρές, η σειρά *MCF7* (εκφράζει την *Hsp70* σε υψηλά επίπεδα) και η *MCF7-siRNA-Hsp70* (δεν εκφράζει την *Hsp70*). Όπως παρατηρούμε, στα κύτταρα *MCF7* (Εικόνα 34, αριστερό ένθετο) η ενεργοποίηση της *apoptosis* απόπτωσης, παρατηρώντας τον φωσφορυλιωμένο πληθυσμό της *p53*, καθυστερεί και εμφανίζεται να ενεργοποιείται έπειτα από 24 ώρες. Θεωρούμε ότι αυτό συμβαίνει, διότι τα *MCF7* υπερεκφράζουν την *Hsp70*. Σε αντιπαράθεση, στα κύτταρα από τα οποία απουσιάζει η *Hsp70*, δηλαδή στα *MCF7-siRNA-Hsp70*, η ενεργοποίηση της *apoptosis* απόπτωσης ξεκινά στο διάστημα από τις 2 ώρες, έπειτα από την σπορά των κυττάρων σε τρυβλία επιστρωμένα με *poly-HEMA* (Εικόνα 34, δεξιό ένθετο). Φαίνεται ότι σε αυτά τα κύτταρα η έντονη στρεσογόνος κατάσταση, λόγω *poly-HEMA*, είναι χρονικά μικρότερη και ένα μέρος του *p53* πληθυσμού φωσφορυλιώνεται γρηγορότερα σε *phospho-p53* (Serine 15).

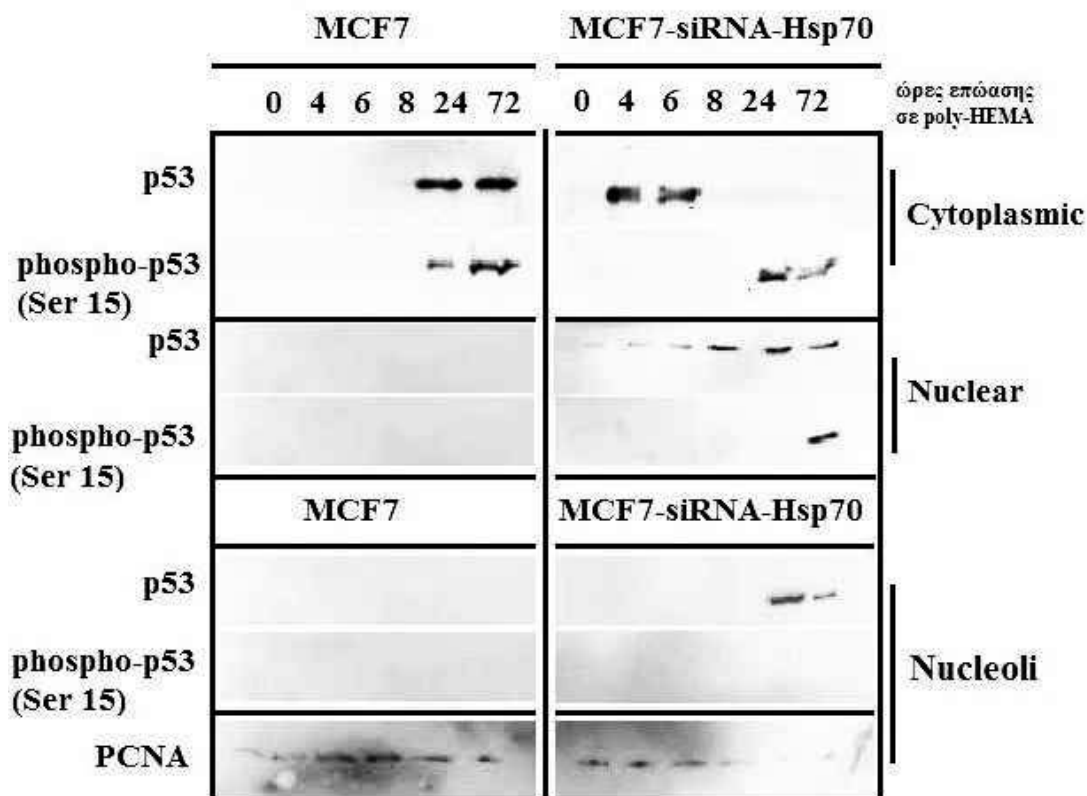
Εάν θα μπορούσαμε να δώσουμε μια εξήγηση για αυτήν την παρατήρηση, θα μπορούσαμε να πούμε ότι πιθανόν αυτό να συμβαίνει γιατί στην κυτταρική σειρά *MCF7* η παρουσία της *Hsp70*, έπειτα από ήπιο στρες των κυττάρων, μπορεί να οδηγεί την *p53* στο αποπτώσωμα και στη συνέχεια στον καταβολισμό της, ρυθμίζοντας έτσι την συσσώρευσή της. Αυτό ενισχύεται από πρότερες δημοσιεύσεις, που αποδεικνύουν ότι η *Hsp70*, έπειτα από στρες, μετατοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου, οπότε αποδεσμεύει την *p53* στο κυτταρόπλασμα (243). Αυτή η ταχύτερη αντίδραση του κυττάρου γίνεται, γιατί απουσιάζει

η προστασία της *Hsp70* και τα κύτταρα επείγονται να ενεργοποιήσουν τα μονοπάτια της επιδιόρθωσης του *DNA*, μέσω ενεργοποίησης της *p53* ή για να τα οδηγήσει στην απόπτωση μέσω της *phospho-p53* (Serine 15) (Βλέπε εικόνα 49, Συζήτηση).

4.2.3 Κυτταρικός εντοπισμός της *p53* και *phospho-p53* (Serine 15) υπό φυσιολογικές και στρες συνθήκες.

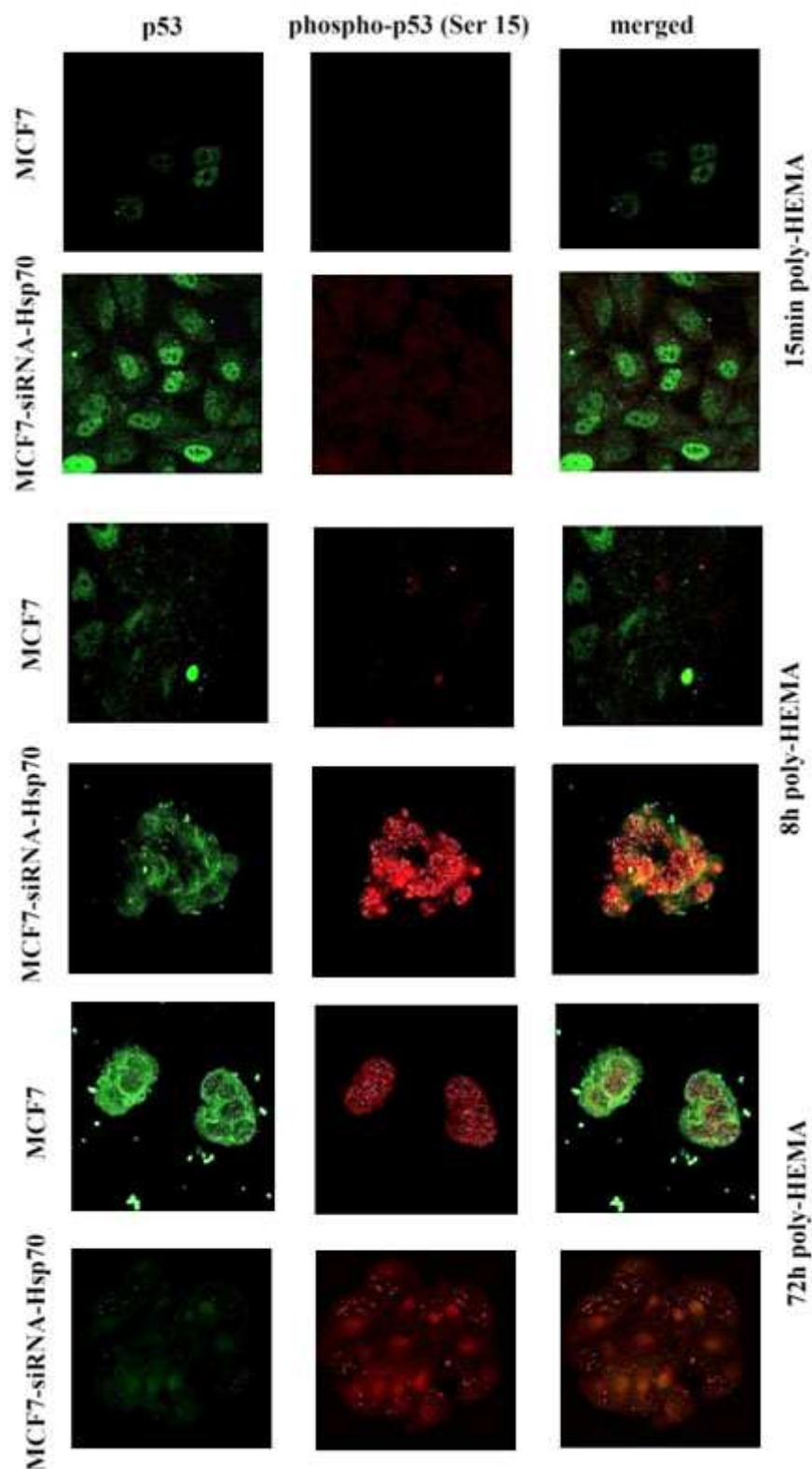
Θέλοντας να μελετήσουμε περαιτέρω τον εντοπισμό της *p53* στο κύτταρο και τη μετατόπισή της ή την φωσφορυλίωσή της σε σερίνη 15 συνεχίσαμε με πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά western καθώς και ανοσοφθορισμού με αντισώματα ειδικά για την *p53* και *phospho-p53* (Ser15).

Κυτταροπλασματικά, πυρηνικά και πυρηνισκικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά western, για την μελέτη των *p53* πληθυσμών, κάτω από αποπτωτικό ερέθισμα (*poly-HEMA*) παρουσία ή απουσία της *Hsp70*. Στα *MCF7* κύτταρα παρατηρήθηκε πως η *p53* αρχίζει να συσσωρεύεται, 24 ώρες έπειτα από την σπορά των κυττάρων σε τρυβλία *poly-HEMA*, στο κυτταρόπλασμα, ενώ ένα μέρος του γενικού πληθυσμού υφίσταται κατά τον ίδιο χρόνο και στο ίδιο κυτταρικό διαμέρισμα (κυτταρόπλασμα) υπό φωσφορυλιωμένη μορφή, *phospho-p53* (Ser15), η οποία όμως δεν μετακινείται στον πυρήνα (Εικόνα 35). Συγκριτικά, στα κύτταρα *MCF7-siRNA-Hsp70*, η *p53* εμφανίζεται να συσσωρεύεται στις 4 ώρες μετά την σπορά των κυττάρων σε *poly-HEMA*. Όμως, στην συνέχεια μεταφέρεται και συσσωρεύεται στον πυρήνα, όσο αυξάνεται ο χρόνος του στρες από το *poly-HEMA* (Εικόνα 35). Έτσι, έπειτα από έντονο στρες ανέστιας για 72 ώρες, μόνο στα *MCF7-siRNA-Hsp70* εμφανίζεται η ταυτόχρονη συσσώρευση τόσο της *p53* όσο και της *phospho-p53* (Ser15) στον πυρήνα. Στα ίδια κύτταρα, η αντίγνωση πληθυσμού της *p53* στους πυρηνίσκους, πιθανόν να συσχετίζεται με την επιδιόρθωση του πυρηνισκικού *DNA*. Κατά τον ίδιο χρόνο, 72 ώρες στρες λόγω ανέστιας, στα *MCF7* κύτταρα υπάρχει έντονη έκφραση και παρουσία τόσο της *p53* όσο και της *phospho-p53* (Ser15), αλλά μόνο στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 35). Αυτό σημαίνει ότι τα κύτταρα προστατεύονται από αυτό το χρονικό διάστημα ανέστιας και, προς το παρόν, δεν οδεύουν προς τον κυτταρικό θάνατο.



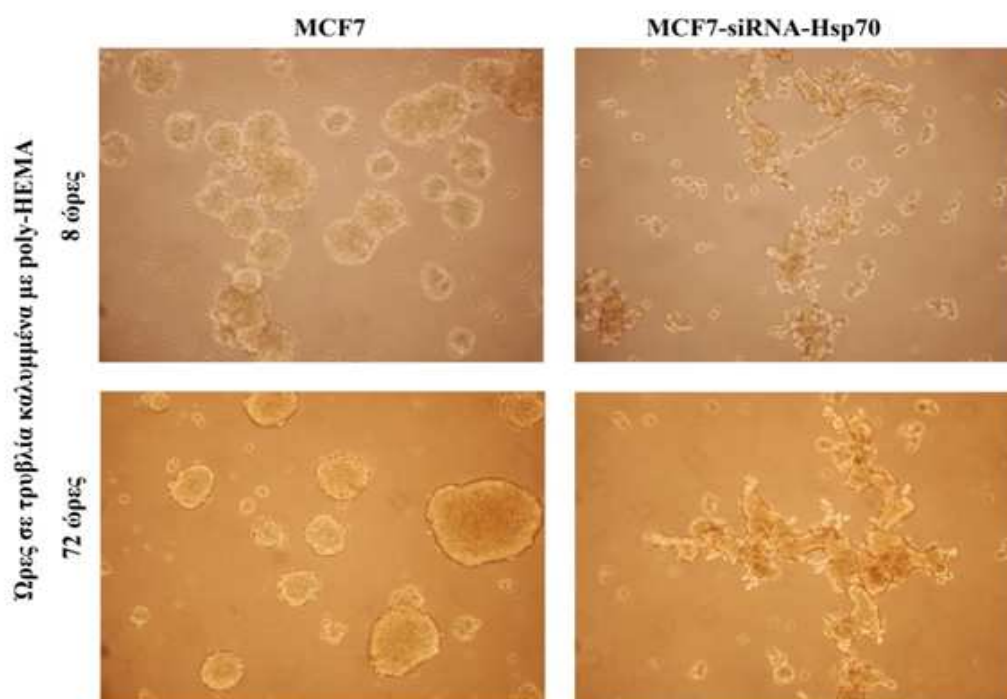
Εικόνα 35: Ο κυτταρικός εντοπισμός της p53 και της φωσφορυλιωμένης p53 στη σερίνη 15. Κύτταρα MCF7 και MCF7-siRNA-Hsp70 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία επιστρωμένα με poly-HEMA προκαλώντας τους έτσι συνθήκες ανέστιας, για διαφορετικούς χρόνους. Τα πρωτεϊνικά τους εκχυλίσματα διαχωρίστηκαν σε κυτταροπλασματικό, πυρηνικό και πυρηνισκικό. Αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά western και ελέγχθησαν οι πρωτεΐνες p53 (πρωτεΐνη προς μελέτη), phospho-p53 (Ser 15) (πρωτεΐνη προς μελέτη) και PCNA (P10) (δείκτης ισοφόρτωσης πυρηνικών πρωτεϊνών).

Τα προηγούμενα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και με πειράματα ανοσοφθορισμού σε συνεστιακό μικροσκόπιο (Εικόνα 36).



Εικόνα 36: Ο κυτταρικός εντοπισμός της p53 και της φωσφορυλιωμένης p53 στη σερίνη 15. Κύτταρα MCF7 και MCF7-siRNA-Hsp70 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία επιστρωμένα με poly-HEMA προκαλώντας τους έτσι συνθήκες ανέστιας, για διαφορετικούς χρόνους. Υπερκείμενο δείγμα κυτταρικών συσσωμάτων, διαφορετικών ωρών επώασης, μεταφέρθηκε σε καλυπτρίδες, φιζαρίστηκε, μονιμοποιήθηκε και επώαστηκε με τα αντισώματα p53 και phospho-p53 (Ser15). Τα αποτελέσματα φωτογραφήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

Κάτω από αυξανόμενο στρες λόγω ανέστιας, παρατηρείται η συσσώρευση κυττάρων τα οποία επιπλέον στο θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα δημιουργούν σφαίρες που δημιουργούνται, έπειτα από σπορά των κυτταρικών σειρών σε τρυβλία επικαλυμμένα με *poly-HEMA*, για 8 και 72 ώρες. Πειράματα μελέτης των σφαιρών αυτών απέδειξε ότι τα κύτταρα τους είναι ζωντανά και έχουν, τουλάχιστον μέρος αυτών, την ικανότητα να επικάθονται και να προσκολλώνται σε τρυβλία χωρίς *poly-HEMA*. Τα κύτταρα αυτών των σφαιρών (Εικόνα 37) χρησιμοποιήθηκαν για την πειραματική διαδικασία του ανοσοφθορισμού (Εικόνα 36).



Εικόνα 37: Μορφολογικές φωτογραφίες *MCF7* πατρικής κυτταρικής σειράς και *MCF7-siRNA-Hsp70* κυτταρικού κλώνου. Οι σφαίρες που αποτελούνται από κύτταρα δημιουργούνται έπειτα από επώαση των κυττάρων σε τρυβλία επιστρωμένα με *poly-HEMA* για 8 και 72 ώρες.

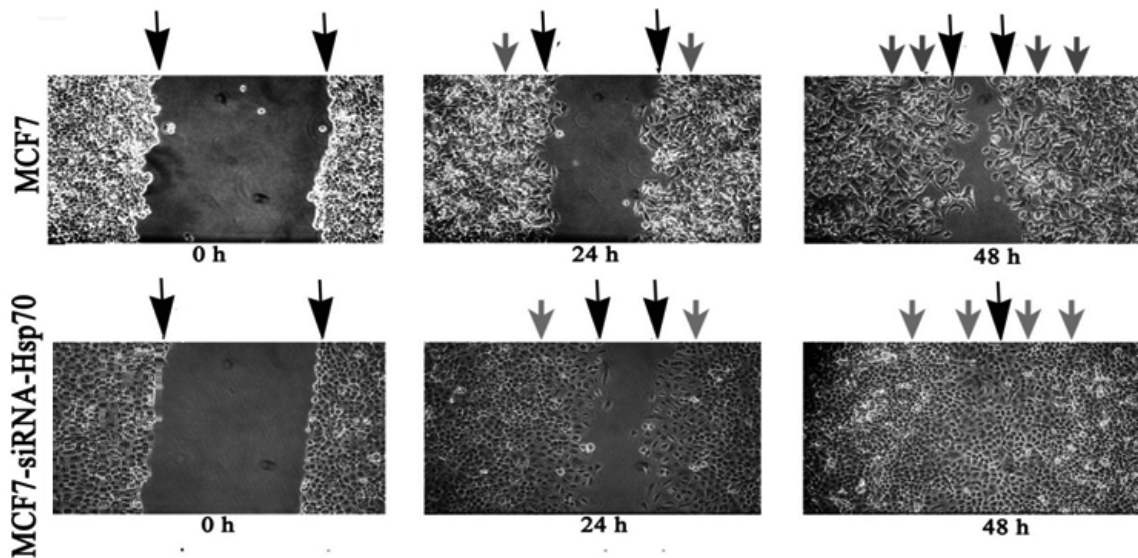
4.3 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ *HSP70* ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ *MCF7* ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Κατά τη διάρκεια των επόμενων πειραμάτων, προσπαθήσαμε να μελετήσουμε τον τρόπο με τον οποίον η παρουσία ή η απουσία της πρωτεΐνης *Hsp70* επηρεάζει τη κινητικότητα ή μεταναστευτικότητα, άρα και τη μεταστατικότητα των *MCF7* κυττάρων. Ολα αυτά βέβαια στην βάση ότι το επόμενο στάδιο της αποκόλλησης είναι η

μετανάστευση. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος επούλωσης τραύματος (wound healing), η οποία μετρά την ικανότητα των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται και ταυτόχρονα να μεταναστεύουν.

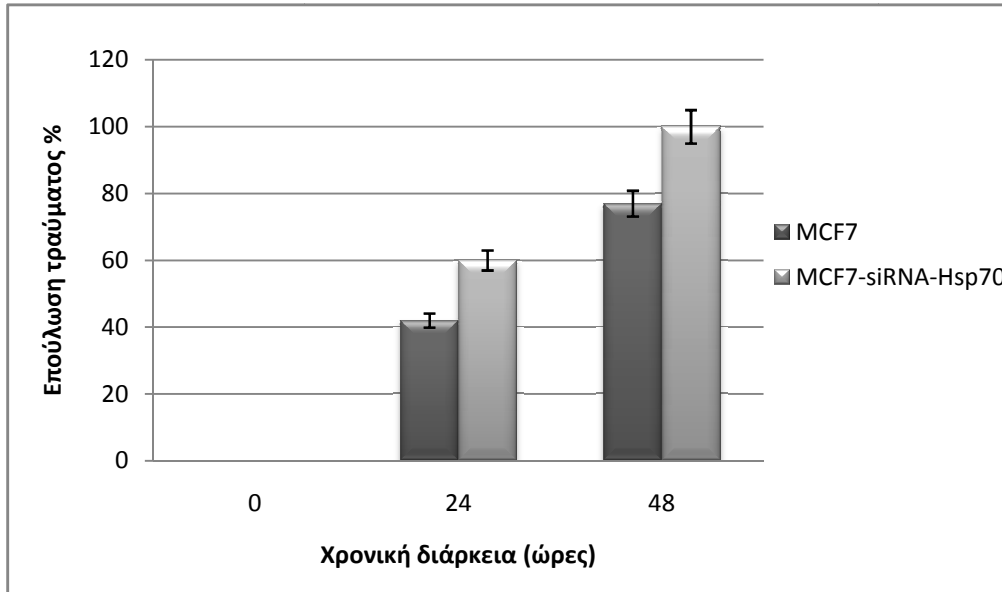
4.3.1 Η απουσία της *Hsp70* από τα *MCF7* κύτταρα ευνοεί την ικανότητά τους προς μετανάστευση

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε πολυτρυβλία των 6 θέσεων με 100% πληρότητα κυττάρων για τις ίδιες 2 κυτταρικές σειρές. Προκλήθηκε χαραγή στη μέση και κατά μήκος της μονόστιβης επιφάνειας των κυτταροκαλλιεργειών του κάθε τρυβλίου, με κίτρινο ακρομύτιο (tip) πιπέτας και με τη βοήθεια χάρακα. Η χαραγή φωτογραφίζεται ανά 24ωρο και έτσι διαπιστώνεται η ικανότητα επούλωσης των τραυμάτων σε κάθε περίπτωση.



Εικόνα 38: Μέθοδος επούλωσης τραύματος (Wound Healing): Προκλήθηκε σχισμή κατά μήκος της μονόστιβης επιφάνειας των κυτταροκαλλιεργειών *MCF7* (επάνω) και *MCF7-siRNA-Hsp70* κλώνος 39 (κάτω). Παρακολουθήσαμε την επούλωση τραύματος έπειτα από 24 και 48 ώρες. Τα γκρι-μικρότερα βέλη δείχνουν την πορεία του τραύματος, ενώ τα μαύρα-μεγαλύτερα βέλη δείχνουν την τελική θέση της επούλωσης του τραύματος.

Τα αποτελέσματα αποτυπώθηκαν και σε ραβδογράμματα όπως φαίνεται ακολούθως.



Εικόνα 39: Ικανότητα επούλωσης τραύματος στα *MCF7* (σκούρο γκρι) και *MCF7-siRNA-Hsp70* κλώνος **39** (ανοιχτό γκρι): Στο παραπάνω ραβδόγραμμα παρουσιάζεται το ποσοστό επούλωσης τραύματος, έπειτα από 24 και 48 ώρες από τη χαραγή. Οι τιμές που παρουσιάζονται καθώς και τα *SD* προέρχονται από έξι πειράματα έξι τρυβλίων ανά χρονικό διάστημα, με $P < 0.009$.

Παρατηρήθηκε πως η χαραγή που δημιουργήθηκε στα κύτταρα *MCF7-siRNA-Hsp70* κλείνει γρηγορότερα από εκείνη στα κύτταρα μάρτυρες. (Εικόνα 38, 39). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται, κινούνται και μεταναστεύουν πιο γρήγορα. Έτσι λοιπόν, οδηγηθήκαμε στο συμπέρασμα πως η παρουσία της πρωτεΐνης *Hsp70*, στην καρκινική κυτταρική σειρά *MCF7*, καθυστερεί τη μεταναστευτικότητα των κυττάρων. Αντιθέτως, η απουσία της *Hsp70* πρωτεΐνης από τα κύτταρα «ευνοεί» τη μεταναστευτικότητά τους.

4.4 ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΗΣ *HSP70* ΚΑΙ ΤΩΝ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΘΑΝΑΤΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΜΕΤΑΚΙΝΗΣΗ (MIGRATION)

Όλες οι συμβατικές αντικαρκινικές θεραπείες, μεταξύ των οποίων η χημειοθεραπεία, η ραδιοθεραπεία και η υπερθερμία, επάγουν τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ, στα κύτταρα που επιβιώνουν. Η υπερέκφραση της *Hsp70* μπορεί να βοηθήσει σε συσσώρευση των μεταλλάξεων στους καρκινικούς όγκους, κάτι που μπορεί να βοηθήσει στην μετέπειτα εξέλιξή τους, σε πιο επιθετικές μορφές μεταστατικών κυττάρων (23, 121).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η χρήση χημειοθεραπευτικών όπως η Δοξορουβικίνη (DOX: Doxorubicin) και Σισπλατίνη (Cisplatin). Αρχικά δοκιμάστηκε η αντίσταση στον θάνατο των κυττάρων (παρουσία ή απουσία Hsp70), έπειτα από έκθεσή τους στα συγκεκριμένα χημειοθεραπευτικά, υπολογίζοντας τις τιμές IC_{50} οι οποίες και εντοπίστηκαν με αρχικά πειράματα. Είναι γνωστό ότι η τιμή IC_{50} είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου που απαιτείται για να επιτευχθεί κυτταρικός θάνατος της τάξης του 50%. Ακολούθησαν πειράματα επούλωσης τραύματος (Wound Healing) με σκοπό τη μελέτη της δράσης της Hsp70 στην μεταναστευτικότητα των κυττάρων παρουσία των χημειοθεραπευτικών (καθένα χωριστά). Τέλος, έγιναν πειράματα επούλωσης τραύματος (Wound Healing) με ταυτόχρονη παρουσία και των δυο χημειοθεραπευτικών, με σκοπό την ύπαρξη τυχόν συνεργιστικού φαινομένου των χημειοθεραπευτικών και πως αυτό λειτουργεί παρουσία ή απουσία της Hsp70 στις κυτταρικές σειρές.

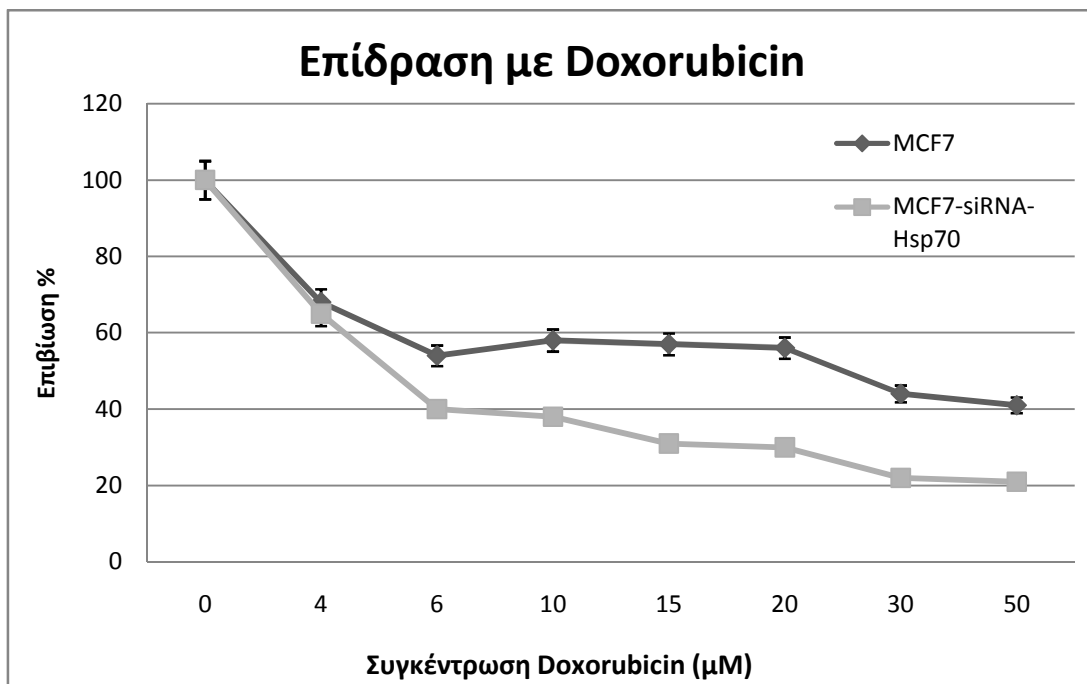
4.4.1 Η απουσία της Hsp70 καθιστά τα κύτταρα πιο ευαίσθητα έπειτα από έκθεσή τους σε χημειοθεραπευτικά. Ανάλυση με τη μέθοδο MTT.

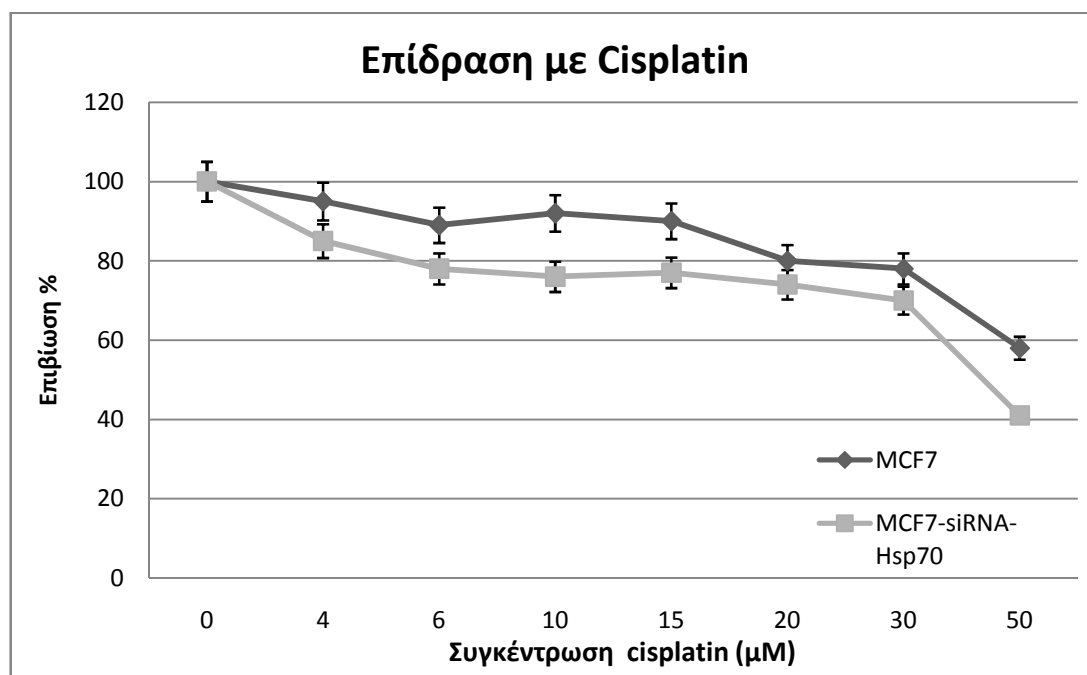
Ακολούθως, παρουσιάζεται η μελέτη της αντίδρασης των κυττάρων σε χημειοθεραπευτικά *doxorubicin* και *cisplatin* παρουσία ή απουσία της Hsp70. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε επίδραση των χημειοθεραπευτικών στις ίδιες κυτταρικές σειρές και υπολογίστηκαν οι τιμές IC_{50} ξεχωριστά για κάθε κυτταρική σειρά.

Ο υπολογισμός της τιμής IC_{50} πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο MTT (MTT colorimetric assay). Η μέθοδος στηρίζεται στο κίτρινου χρώματος άλας τετραζολίου, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT, Sigma) που οξειδώνεται από τις αφυδρογονάσεις των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων και παράγονται πορφυρού χρώματος κρύσταλλοι φορμαζάνης, οι οποίοι συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου. Η οξείδωση του MTT πραγματοποιείται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικώς ενεργά και συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης είναι απευθείας ανάλογη του αριθμού βιώσιμων κυττάρων. Το προϊόν της αντίδρασης διαλυτοποιείται με την προσθήκη (DMSO, dimethylsulphoxide) και το χρώμα που παράγεται υπολογίζεται φασματοφωτομετρικά στα 540 nm.

Έπειτα από την επίστρωση κύτταρων *MCF7* και *MCF7-siRNA-Hsp70* σε ξεχωριστά πολυτρυβλία 96 θέσεων και την επίδραση με διαφορετικές συγκεντρώσεις των χημειοθεραπευτικών *Doxorubicin* (0, 4, 6, 10, 15, 20, 30, 50 μM) και *Cisplatin* (0, 4, 6, 10, 15, 20, 30, 50 μM) για 24 ώρες, έγινε ο υπολογισμός των τιμών IC_{50} με την χρήση του αντιδραστήριου *MTT*. Η απορρόφηση υπολογίστηκε με φωτομέτρηση με *ELISA* στα 540 nm.

Παράλληλα με τα παραπάνω δείγματα, χρησιμοποιήθηκαν και πολυτρυβλία μάρτυρες για κάθε συγκέντρωση χημειοθεραπευτικού φαρμάκου. Πιο συγκεκριμένα, δύο επιπλέον πολυτρυβλία, έπειτα από την επίστρωσή τους με κύτταρα, που εκφράζουν ή δεν εκφράζουν την *Hsp70*, επώαστηκαν την επόμενη μέρα με τα χημειοθεραπευτικά *Doxorubicin* (0, 4, 6, 10, 15, 20, 30, 50 μM) και *Cisplatin* (0, 4, 6, 10, 15, 20, 30, 50 μM) για 24 ώρες. Δεν πραγματοποιήθηκε επίδραση με το αντιδραστήριο *MTT*, αλλά προσθήκη απευθείας 200 μl *DMSO* και ήπια ανάδευση με τη χρήση πολυπιπέτας. Η κυτταροτοξική δράση των ουσιών *Doxorubicin* και *Cisplatin* εκφράζεται ως η σχετική επιβίωση των κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες.





Εικόνα 40: Η απουσία της Hsp70 καθιστά τα κύτταρα πιο ευαίσθητα έπειτα από έκθεσή τους σε χημειοθεραπευτικά. Κύτταρα MCF7 και MCF7-siRNA-Hsp70 καλλιεργήθηκαν σε 96 θέσεων πολυτρυβλία. Έπειτα από 24 ώρες επωάστηκαν με καθένα από τα χημειοθεραπευτικά doxorubicin (επάνω ένθετο) και cisplatin (Κάτω ένθετο) για 24h. Για τον υπολογισμό των τιμών IC_{50} χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο MTT. Η απορρόφηση υπολογίστηκε με φωτομέτρηση με ELISA στα 540 nm. Οι τιμές που παρουσιάζονται καθώς και τα SD προέρχονται από τρία πειράματα τριών πολυτρυβλίων ανά χρονικό διάστημα έκθεσης στην κάθε ουσία, με $P < 0.006$ (επάνω) και $P < 0.09$ (κάτω).

Πρέπει αρχικά να αναφερθεί πως τα δείγματα μάρτυρες, στα οποία δεν χρησιμοποιήσαμε MTT αλλά μόνο τα χημειοθεραπευτικά, δεν έδειξαν σημαντικές τιμές στην απορρόφηση. Οι τιμές αυτές ήταν από 0,0054 έως 0,0091, όταν οι τιμές σε κανονικά δείγματα μετά από επίδραση με MTT είναι 3,7445 και 3,3516. Οπότε, στα αποτελέσματα δεν έχει συνυπολογιστεί η αυτο-απορρόφηση των ουσιών, μιας και είναι ελάχιστη. Οι τιμές IC_{50} των διαφορετικών κυτταρικών σειρών για τα δύο χημειοθεραπευτικά εξάγονται από την παραπάνω εικόνα και φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Εικόνα 40, Πίνακας 2).

ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	ΠΡΟΣΘΗΚΗ	IC_{50}
MCF7	Doxorubicin	23,2 μM
MCF7-siRNA-Hsp70	Doxorubicin	7,023 μM
MCF7	Cisplatin	51,48 μM
MCF7-siRNA-Hsp70	Cisplatin	42,25 μM

Πίνακας 2: Τα IC_{50} των κυτταρικών σειρών MCF7 και MCF7-siRNA-Hsp70-cl39

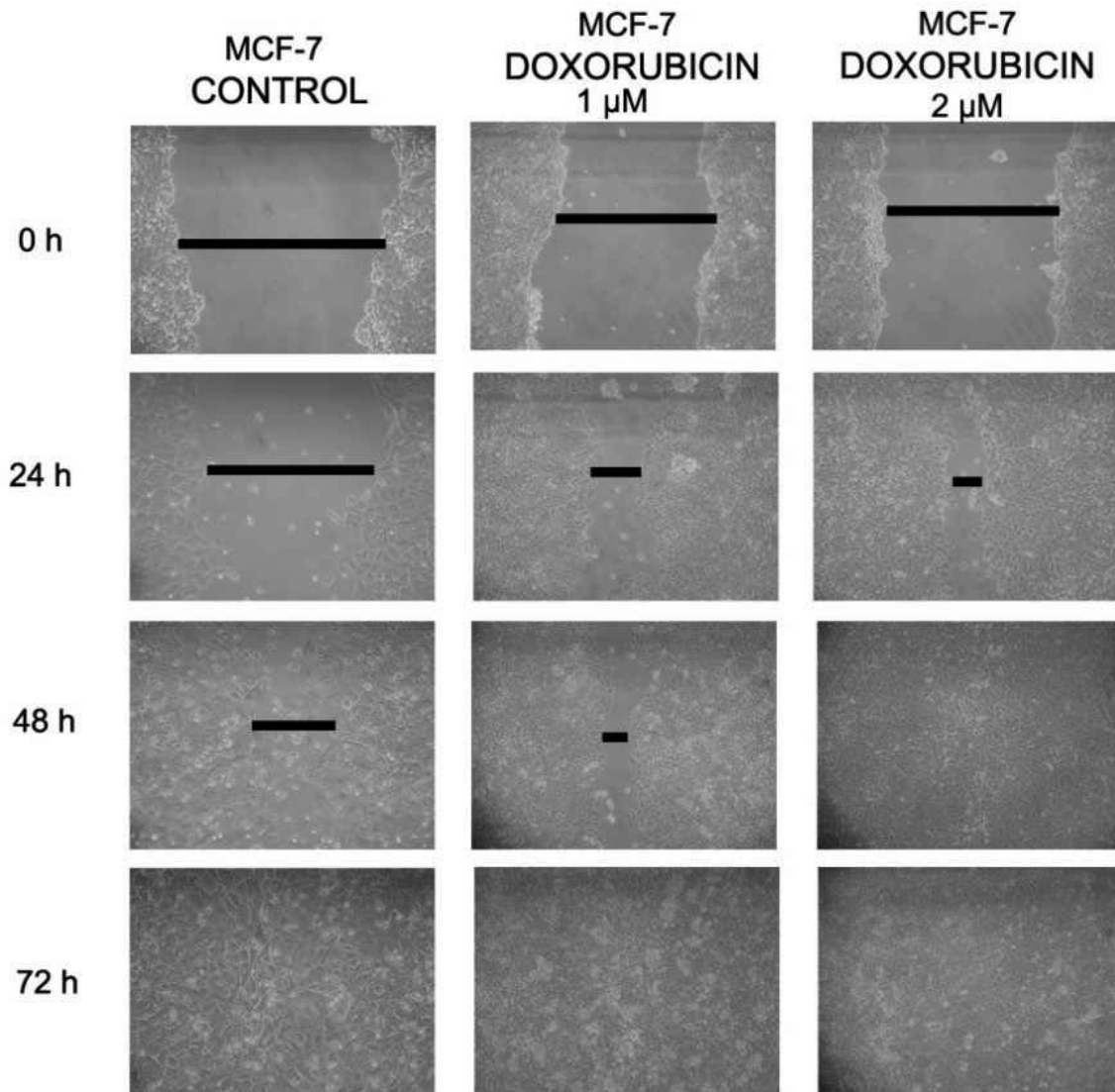
Από τα αποτελέσματα αποδεικνύεται ότι η απουσία της *Hsp70* καθιστά τα κύτταρα πιο ευαίσθητα στα χημειοθεραπευτικά *doxorubicin* και *cisplatin*. Τα πατρικά κύτταρα *MCF7* είναι πιο ανθεκτικά στη δράση των χημειοθεραπευτικών *doxorubicin* και *cisplatin*, καθώς χρειάζονται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις για να πεθάνει το 50% του πληθυσμού τους (Εικόνα 40). Επίσης φαίνεται ότι η *doxorubicin* είναι περισσότερο τοξική από την *cisplatin* συγκρίνοντας τα αντίστοιχα IC_{50} .

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι ο προστατευτικός ρόλος, που προσδίδει η *Hsp70* για την αποφυγή του θανάτου από τις χρησιμοποιούμενες κυτταρικές σειρές, θα μπορούσε να οδηγήσει τις χημειοθεραπείες στην χρήση μικρότερων ποσοτήτων φαρμάκων για το ίδιο αποτέλεσμα, αρκεί να ρυθμίσουμε αρνητικά τις ποσότητες της *Hsp70*, στα υπό θεραπεία καρκινικά κύτταρα. Έτσι, συγκρίνοντας τα IC_{50} στα *MCF7* και *MCF7-siRNA-Hsp70*-κλώνος 39 (απουσία *Hsp70*), έπειτα από έκθεσή τους σε *Doxorubicin* παρατηρούμε ότι η απαιτούμενη ποσότητα *Doxorubicin* για να πεθάνει το 50% των κυττάρων μειώνεται κατά 3 φορές όταν απουσιάζει η *Hsp70* (Πίνακας 2).

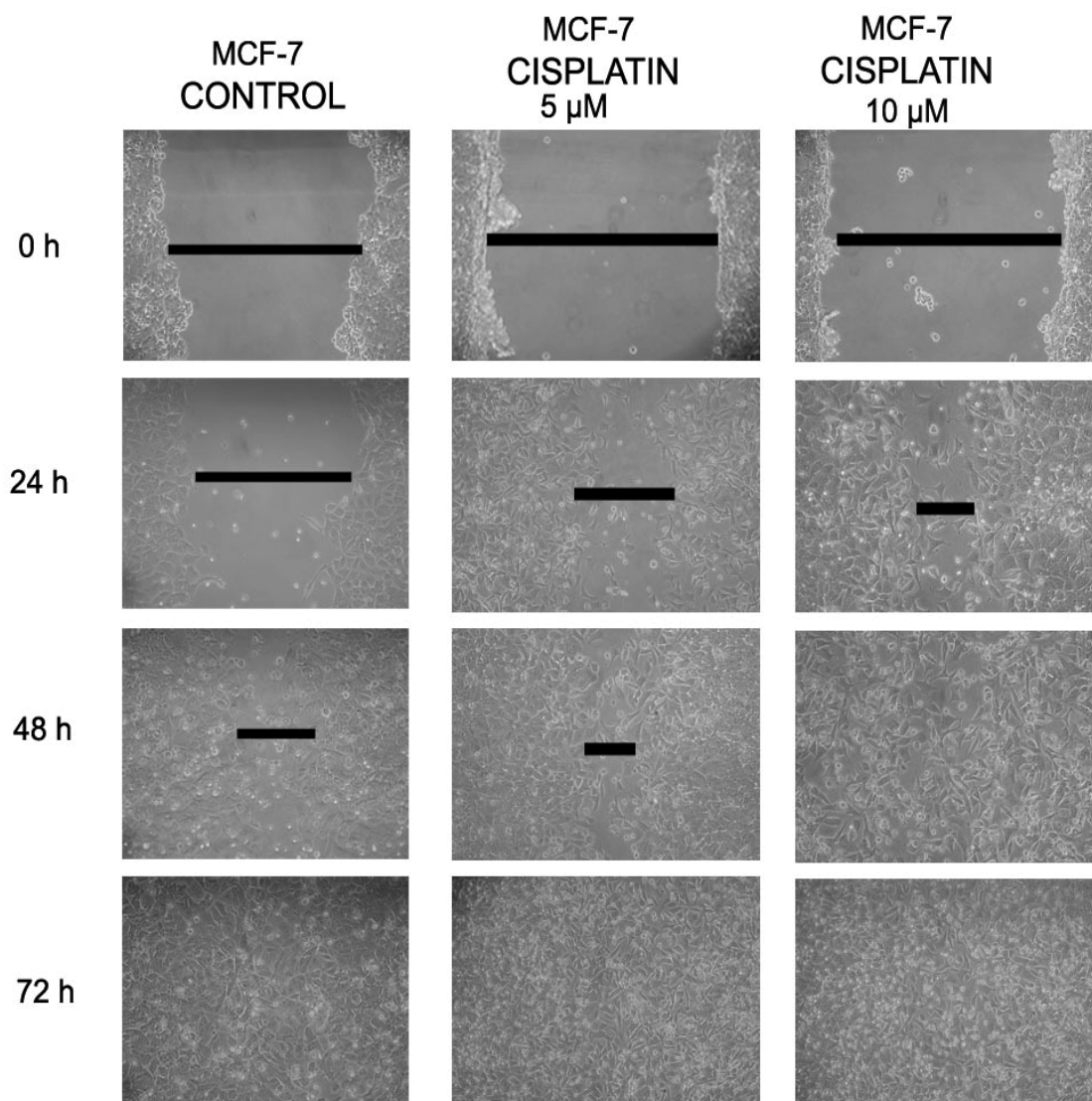
4.4.2 Η απουσία της *Hsp70* και τα χημειοθεραπευτικά *Doxorubicin* ή *Cisplatin* προωθούν τη μετανάστευση (μεταστατικότητα) των καρκινικών κυττάρων.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, μελετήσαμε τον τρόπο με τον οποίον η παρουσία ή η απουσία της πρωτεΐνης *Hsp70* επηρεάζει *in vitro* τη κινητικότητα, και, κάνοντας μια αυθαίρετη προέκταση, την *in vivo* μεταστατικότητα των *MCF7* κυττάρων. Ταυτόχρονα με την παρουσία των χημειοθεραπευτικών *doxorubicin* ή *cisplatin*, προσπαθήσαμε να προσδιορίσουμε εάν επηρεάζεται περαιτέρω η κινητικότητά τους (μεταναστευτικότητα: migration). Η μέθοδος επούλωσης τραύματος (wound healing) μας επιτρέπει να μελετήσουμε την κυτταρική μετανάστευση.

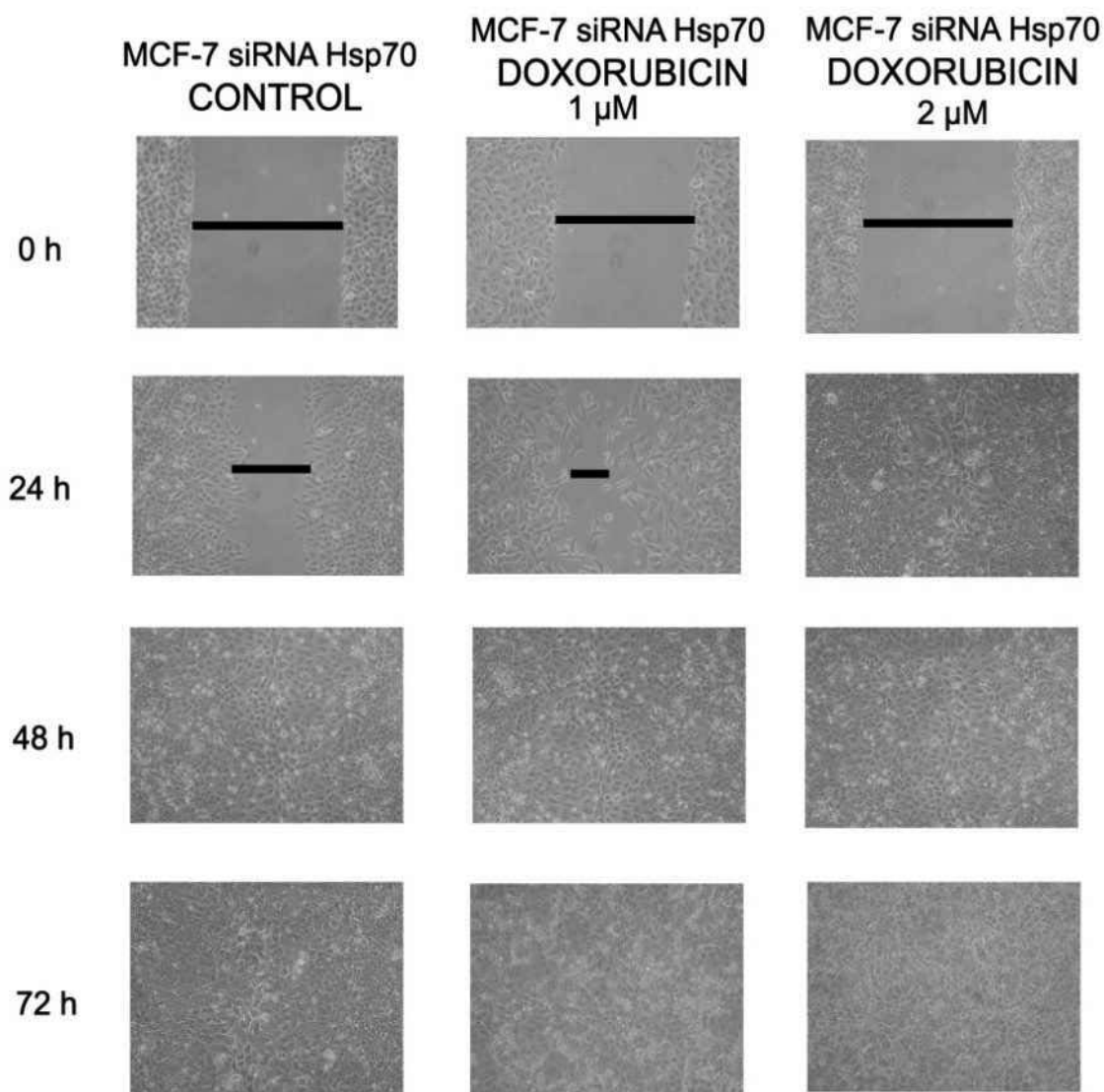
Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε πολυτρυβλία των 6 θέσεων με 100% πληρότητα κυττάρων για τις κυτταρικές σειρές *MCF7* και *MCF7-siRNA-Hsp70* - κλώνος 39. Προκλήθηκε χαραγή στη μέση και κατά μήκος του κάθε τρυβλίου, με κίτρινο ακρομύτιο (tip) πιπέτας (Gilson) και με τη βοήθεια χάρακα. Έπειτα από την προσθήκη των χημειοθεραπευτικών *doxorubicin* και *cisplatin*, η χαραγή φωτογραφήθηκε ανά 24ωρο.



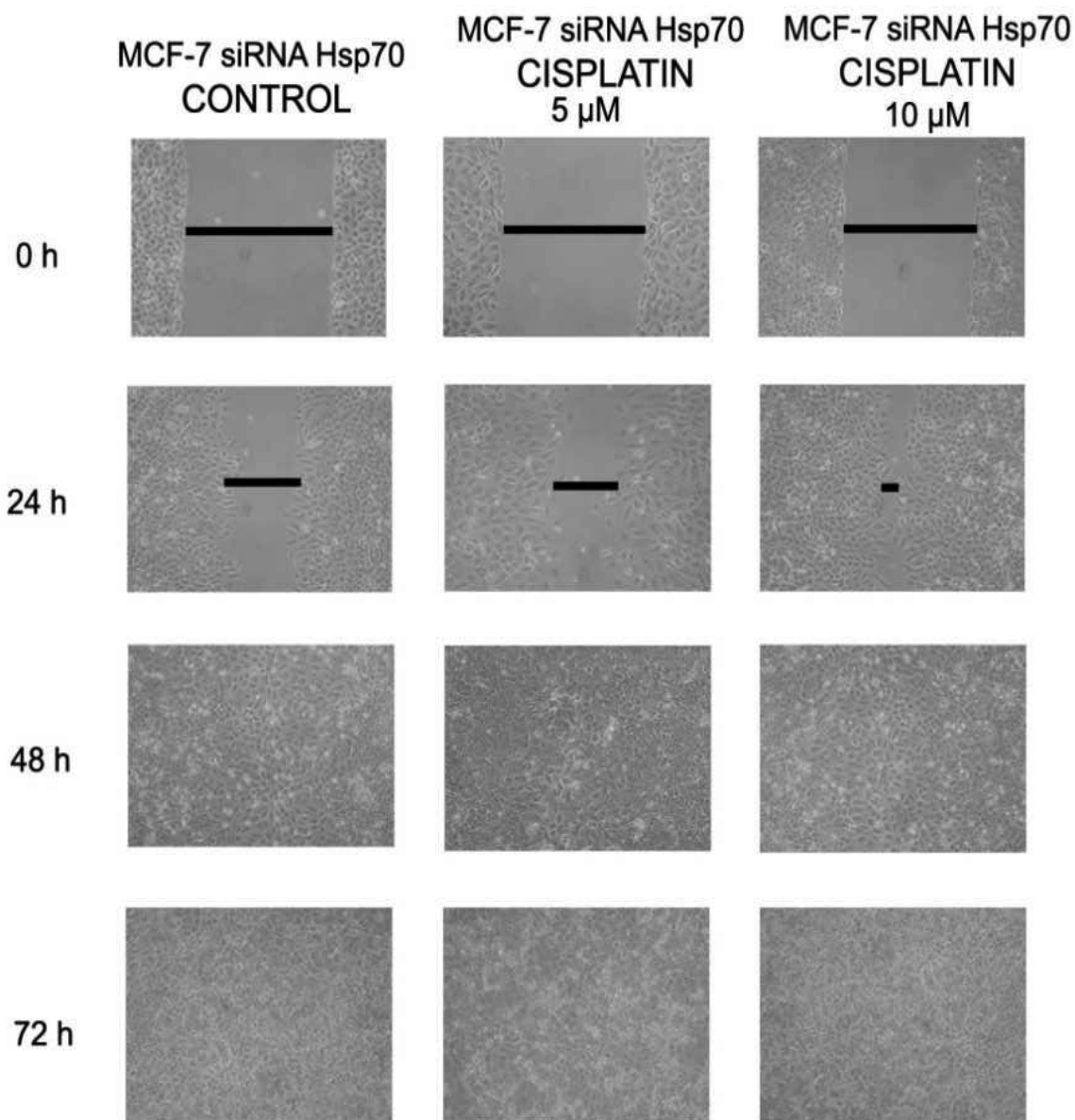
Εικόνα 41: Έλεγχος της μετανάστευσης των MCF7 κυττάρων υπό την έκθεσή τους σε DOXORUBICIN. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος επούλωσης τραύματος (wound healing): Η σχισμή προκλήθηκε κατά μήκος της μονόστιβης επιφάνειας των κυττάρων σε πολυτρυβλίο 6 θέσεων με 100% πληρότητα σε MCF7 κύτταρα. Προστέθηκε το χημειοθεραπευτικό doxorubicin (DOX) σε συγκεντρώσεις 1 μM και 2 μM αντίστοιχα. Παρακολοιμήθηκε η επούλωση τραύματος έπειτα από 0, 24, 48 και 72 ώρες.



Εικόνα 42: Έλεγχος της μετανάστευσης των MCF7 κυττάρων υπό την έκθεσή τους σε Cisplatin. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος επούλωσης τραύματος (wound healing): Η σχισμή προκλήθηκε κατά μήκος της μονόστιβης επιφάνειας των κυττάρων σε πολυτροβλίο 6 θέσεων με 100% πληρότητα σε MCF7 κύτταρα. Προστέθηκε το χημειοθεραπευτικό cisplatin σε συγκεντρώσεις 5 μ M και 10 μ M αντίστοιχα. Παρακολοιμήθηκε η επούλωση τραύματος έπειτα από 0, 24, 48 και 72 ώρες.



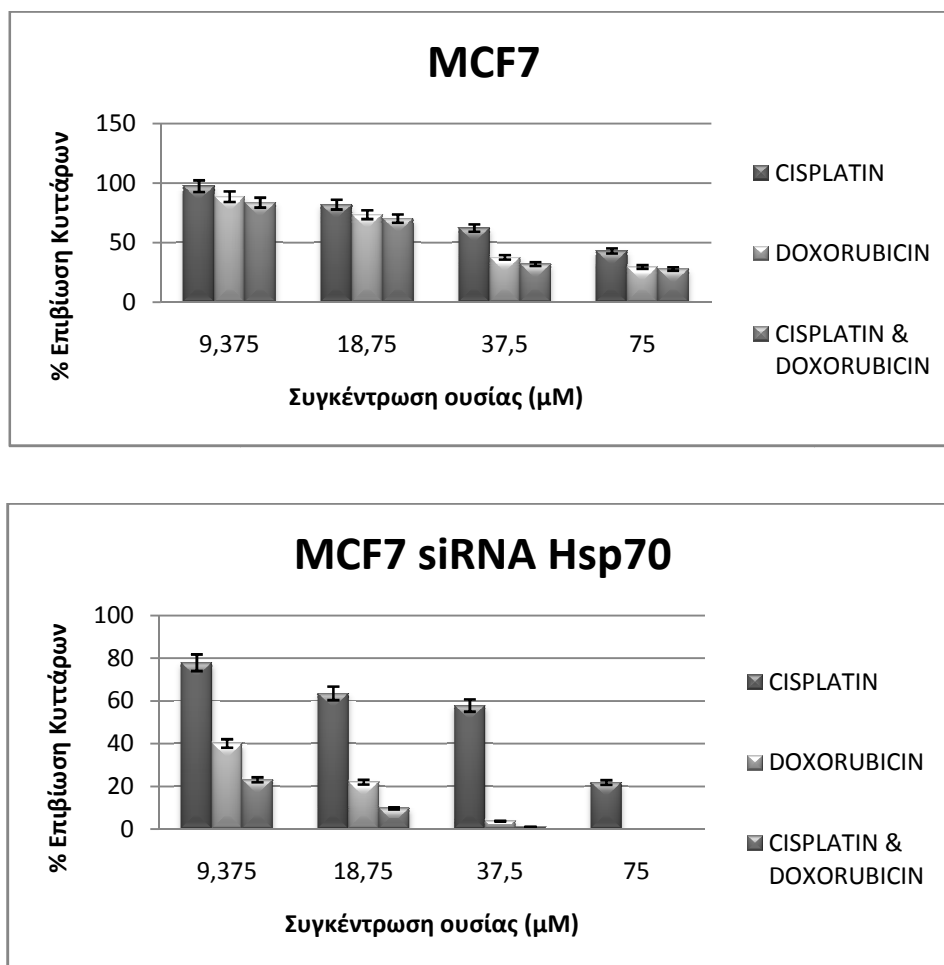
Εικόνα 43: Έλεγχος της μετανάστευσης των MCF7 κυττάρων υπό την έκθεσή τους σε DOXORUBICIN. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος επούλωσης τραύματος (*wound healing*). Η σχισμή προκλήθηκε κατά μήκος της μονόστιβης επιφάνειας των κυττάρων σε πολυτρυβλίο 6 θέσεων με 100% πληρότητα σε MCF7-siRNA-Hsp70 (κλώνος 39) κύτταρα. Προστέθηκε το χημειοθεραπευτικό doxorubicin σε συγκεντρώσεις 1 μ M και 2 μ M αντίστοιχα. Παρακολογήθηκε η επούλωση τραύματος έπειτα από 0, 24, 48 και 72 ώρες.



Εικόνα 44: Έλεγχος της μετανάστευσης των MCF7 κυττάρων υπό την έκθεσή τους σε Cisplatin. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος επούλωσης τραύματος (wound healing): Η σχισμή προκλήθηκε κατά μήκος της μονόστιβης επιφάνειας των κυττάρων σε πολυτρυβλίο 6 θέσεων με, 100% πληρότητα σε MCF7-siRNA-Hsp70 (κλώνος 39) κύτταρα. Προστέθηκε το χημειοθεραπευτικό cisplatin σε συγκεντρώσεις 5 μ M και 10 μ M αντίστοιχα. Παρακολούθηθηκε η επούλωση τραύματος έπειτα από 0, 24, 48 και 72 ώρες.

Σε προηγούμενα πειράματα, αποδείχτηκε πως η κυτταρική σειρά MCF7-siRNA-Hsp70, από την οποία απουσιάζει η Hsp70, εμφανίζεται με μεγαλύτερη μεταναστευτική ικανότητα, συγκρινόμενη με αυτή των πατρικών κυττάρων, στα οποία η Hsp70 είναι παρούσα (Εικόνα 38). Σε κύτταρα MCF7 τόσο η απουσία της Hsp70 όσο και η παρουσία δοξορουβικίνης ή σισπλατίνης, αυξάνει κατά πολύ τη μεταστατικότητα των κυττάρων, σε σχέση με το δείγμα μάρτυρα. Η σισπλατίνη αυξάνει τη μεταστατικότητα των κυττάρων,

αλλά σε μικρότερο ποσοστό (Εικόνα 44), σε σχέση με τη δράση της δοξορουβικίνης (Εικόνα 43). Δεδομένου ότι τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα ενδείκνυνται για την θεραπεία του καρκίνου, αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν έμμεσα ότι η χρήση τους μπορεί να ωθεί κατά προτεραιότητα στον θάνατο των καρκινικών κυττάρων, όμως ταυτόχρονα ωθεί τα κύτταρα και σε μετανάστευση. Άρα, προεκτείνοντας τα *in vitro* αποτελέσματα, θα μπορούσαμε κατά αναλογία να υποθέσουμε ότι *in vivo* ωθούν τα καρκινικά κύτταρα σε μετάσταση.



Εικόνα 45: Έλεγχος επιβίωσης των κυττάρων έπειτα από ταυτόχρονη χορήγηση των χημειοθεραπευτικών. Σε κύτταρα MCF7 (επάνω) και MCF7-siRNA-Hsp70 (κάτω) χορηγήθηκαν ταυτόχρονα τα χημειοθεραπευτικά doxorubicin και cisplatin σε ίδιες αυξανόμενες συγκεντρώσεις για 24 ώρες. Τρεις ώρες πριν το τέλος του πειράματος προστίθεται το αντιδραστήριο MTT στο θρεπτικό μέσο και ακολουθεί επώαση για 3 ώρες στους 37°C. Κάθε τρίτη στη σειρά στήλη (cisplatin και doxorubicin) υποδηλώνει την επίδραση της αναγραφόμενης από κάτω συγκέντρωσης ταυτόχρονα και από τα δύο χημειοθεραπευτικά (για παράδειγμα 9,375μM cisplatin και 9,375μM doxorubicin). Μετά την επώαση και τον έλεγχο στο μικροσκόπιο μέσο, τα κύτταρα διαλυτοποιούνται σε DMSO. Η απορρόφηση μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο, στα 540 nm. Οι τιμές που παρουσιάζονται καθώς και τα SD προέρχονται από τρία πειράματα τριών πολυτροβλίων ανά χρονικό διάστημα έκθεσης στην κάθε ουσία, με $P < 0.09$ (η μεγαλύτερη τιμή που σημειώθηκε).

Στα παραπάνω πειράματα (Εικόνα 45) παρατηρούνται τα εξής:

- ✓ Ότι η *Doxorubicin* είναι περισσότερο τοξική από ότι η *Cisplatin*.
- ✓ Αμφότερα τα χημειοθεραπευτικά δρουν συνεργιστικά με την απουσία της *Hsp70* (κάτω ένθεμα).
- ✓ Η συνεργασία των χημειοθεραπευτικών δίνει καλύτερα αποτελέσματα, όσον αφορά την απόπτωση των κυττάρων, υπό την απουσία της *Hsp70*. Όμως, σε κάθε δείγμα υπάρχει διπλή δόση φαρμάκου της ενδεικνυόμενης τιμής στο ραβδόγραμμα, μία τιμή της *Doxorubicin* και μια της *Cisplatin*.

Το θέμα της συνεργιστικότητας χρειάζεται περαιτέρω μελέτη και ίσως τα βελτιωμένα αποτελέσματα στο θέμα της μεταναστευτικότητας να οφείλονται στο ότι δρουν σε διαφορετικά σημεία των κυτταρικών μονοπατιών.

4.5 Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΗΣ *HSP70* ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΣΕ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (EMT).

Έπειτα από την αποσιώπηση της *Hsp70*, η νέα κυτταρική σειρά *MCF7-siRNA-Hsp70* άλλαξε φαινοτυπικά και τα κύτταρα γινόταν πιο μακρόστενα και πεπλατυσμένα (Εικόνα 21B). Παράλληλα με αυτά, υπήρχε και μια αύξηση στην μεταναστευτικότητά τους (Εικόνες 38, 39). Το φαινόμενο αυτό εξηγήθηκε ότι οι αλλαγές αυτές ήταν αποτέλεσμα της απουσίας της *Hsp70* και ότι τα κύτταρα ίσως ακολουθούσαν την πορεία της επιθηλιακής προς μεσεγχυματική μετάβαση (EMT: Epithelial to Mesenchymal Transition). Η μετάβαση (EMT) αυτή αντιπροσωπεύει την αλλαγή του φαινοτύπου των επιθηλιακών κυττάρων προς κύτταρα μεσεγχυματικού τύπου. Το φαινόμενο αυτό συμβαίνει κατά την εμβρυογένεση και σε καταστάσεις φλεγμονής και επούλωσης των ιστών. Η μετάβαση αυτή χαρακτηρίζεται από απώλεια των διακυτταρικών συνδέσεων και από απόκτηση μεταναστευτικών και διεισδυτικών ιδιοτήτων. Το χαρακτηριστικό αυτό χρησιμοποιείται από κακοήθεις όγκους επιθηλιακών κυττάρων για την εξάπλωσή τους (244-246). Κατά τη διαδικασία της *EMT*, λαμβάνουν μέρος πολλά μόρια μεταξύ των οποίων οι E-Καδερίνες, οι N-Καδερίνες, η Βιμεντίνη και η Slug.

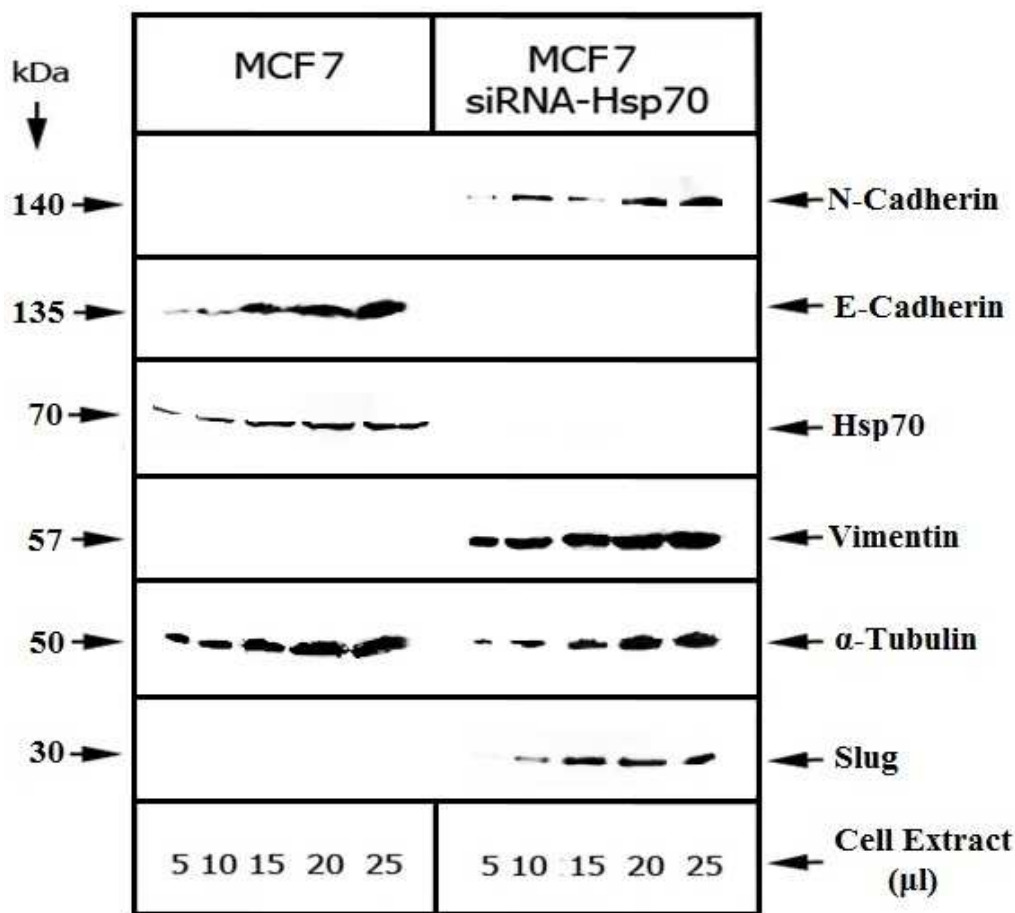
Οι καδερίνες μεσολαβούν στην προσκόλληση μεταξύ δύο κυττάρων και παίζουν σημαντικό ρόλο στην φυσιολογική ανάπτυξη ενός ιστού. Πιο συγκεκριμένα, η E-καδερίνη θεωρείται ενεργός καταστολέας της εισβολής και της ανάπτυξης πολλών καρκινικών κυττάρων (247-249). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως τα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα έχουν αυξημένα ποσά N-καδερίνης και απώλεια της E-καδερίνης. Αυτή η αλλαγή στην έκφραση των καδερινών ονομάζεται «διακόπτης καδερίνης» (cadherin switch). Η μειορρύθμιση της E-καδερίνης είναι ένα από τα χαρακτηριστικά της *EMT* διαδικασίας.

Η πρωτεΐνη *Slug* (*SNAI2*) είναι ένας ευρέως εκφραζόμενος μεταγραφικός καταστολέας και μέλος της οικογένειας *Snail* (250). Ομοίως με την πρωτεΐνη *Snail*, η *Slug* συνδέεται στον υποκινητή της E-καδερίνης, μια περιοχή που καταστέλλει τη μεταγραφή της (251). Η σύνδεση της *Slug* στον υποκινητή των ιντεγκρινών καταστέλλει την έκφραση των ιντεγκρινών και ως αποτέλεσμα οδηγεί σε μειωμένη κυτταρική προσκόλληση (252).

Για να αποδείξουμε ότι η φαινοτυπική αλλαγή των MCF7 καρκινικών κυττάρων οφείλεται στην μετακύλισή τους από επιθηλιακά κύτταρα σε μεσεγχυματικά χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι ειδικοί δείκτες που δείχνουν το είδος των κυττάρων.

4.5.1 Η απουσία της *Hsp70* από την κυτταρική σειρά MCF7 ωθεί στην μετατροπή των κυττάρων από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά

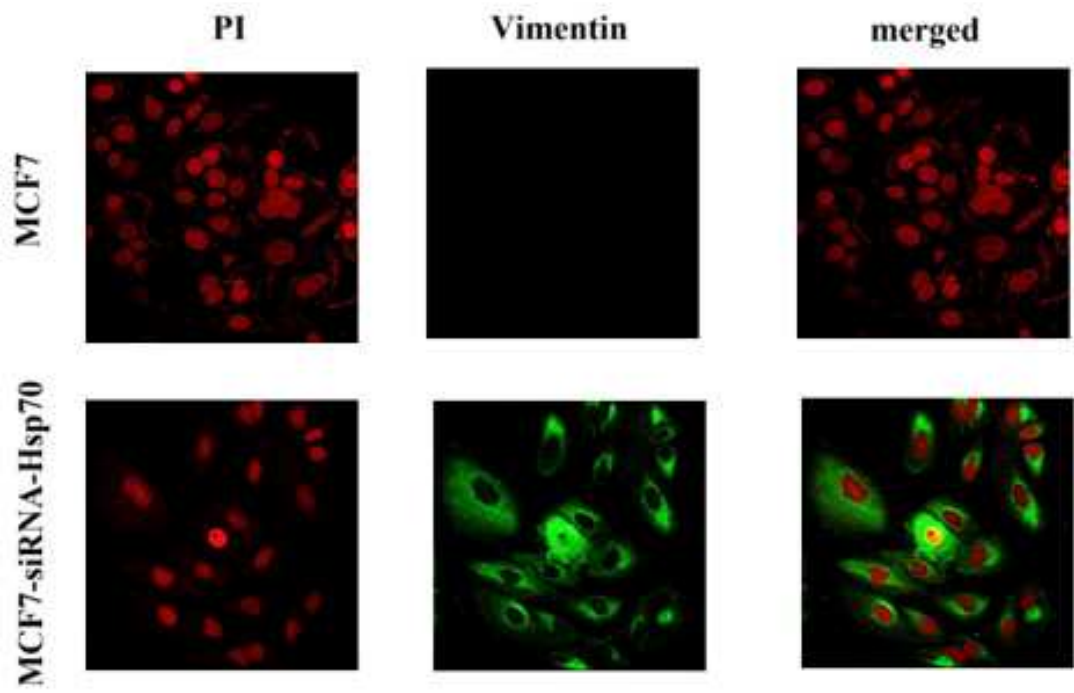
Όπως προαναφέραμε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, η γονιδιακή αποσιώπηση της *Hsp70* αλλάζει τον φαινόμενο των κυττάρων τα οποία από επιθηλιακά που είναι φαίνεται να μεταπίπτουν σε μεσεγχυματικά. Για να επιβεβαιώσουμε αυτή την παρατήρηση χρησιμοποιήθηκαν οι πρωτεΐνες N-καδερίνη, βιμεντίνη και *Slug* (ως δείκτες μεσεγχυματικής μετάβασης, ενώ η E-καδερίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας επιθηλιακού φαινοτύπου). Η *Hsp70* χρησιμοποιήθηκε για την απόδειξη απουσίας της από τον κυτταρικό κλώνο *MCF7-siRNA-Hsp70* και τέλος η τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης των επιπέδων πρωτεΐνης των δειγμάτων. Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών αυτών χρησιμοποιήθηκαν ειδικά αντισώματα.



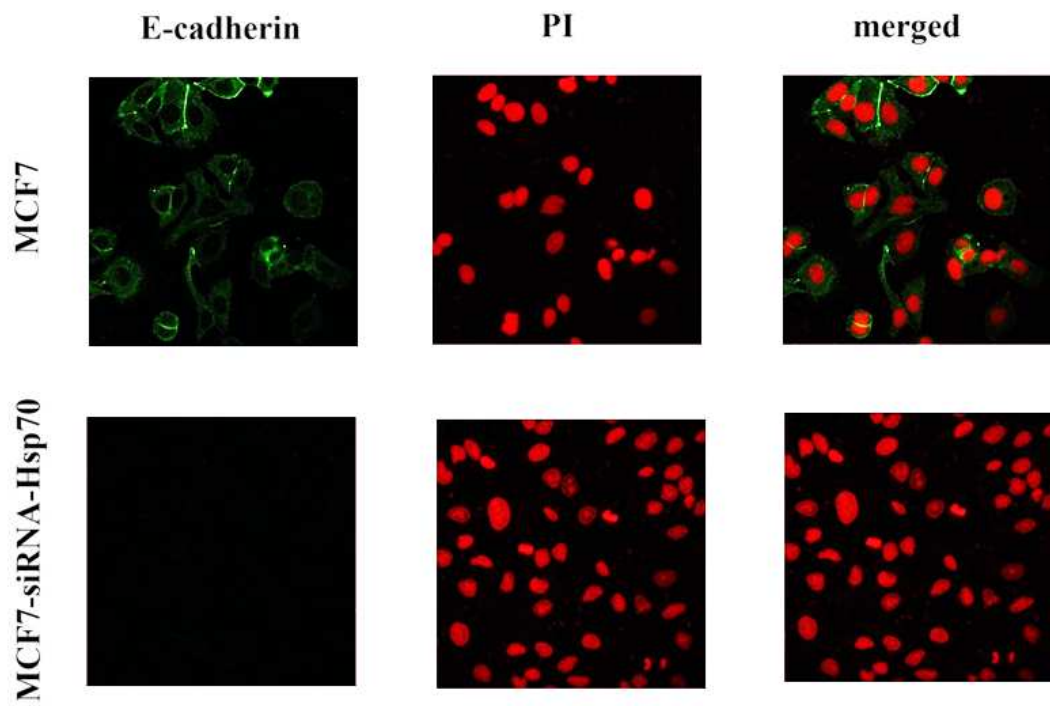
Εικόνα 46: Η επιθηλιακή κυτταρική σειρά MCF7 έπειτα από αποσίωψη της Hsp70, μεταπίπτει σε μεσεγχυματική. Αυξανόμενες τιμές πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων προερχόμενες από κύτταρα MCF7 και MCF7-siRNA-Hsp70 ελέγχθησαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western, ώστε να αξιολογηθούν τα επίπεδα των πρωτεϊνών μεσεγχυματικού φαινοτύπου N-καδερίνης, Βιμεντίνης, Slug και της πρωτεΐνης επιθηλιακού φαινοτύπου E-καδερίνης. Επίσης ελέγχθησαν και τα ποσά της Hsp70. Η α-τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισοφόρτωσης.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα, συμπεραίνουμε ότι η έκφραση των Βιμεντίνης, N-καδερίνης και Slug δεικτών μεσεγχυματικών κυττάρων παρουσιάζεται μόνο σε κύτταρα, στα οποία δεν εκφράζεται η Hsp70 (MCF7-siRNA-Hsp70). Αντίθετα, στα πατρικά MCF7 κύτταρα εκφράζεται μόνο η πρωτεΐνη μάρτυρας επιθηλιακών κυττάρων E-καδερίνη (Εικόνα 46). Τα ίδια αποτελέσματα (Εικόνα 47, Α, Β, Γ) επιβεβαιώνονται και με την ανίχνευση των δεικτών Βιμεντίνης, E-καδερίνης και Slug, σε πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακού μικροσκοπίου (Confocal microscopy). Επομένως, τα κύτταρα τα οποία υπέστησαν αποσίωψη της Hsp70 φαίνεται να μετατρέπονται σε μεσεγχυματικά και έτσι να αυξάνεται η ικανότητα μετακίνησής τους (migration) και ίσως κατά αυτόν τον τρόπο να αυξάνεται η μεταστατικότητα τους *in vivo* (244-246).

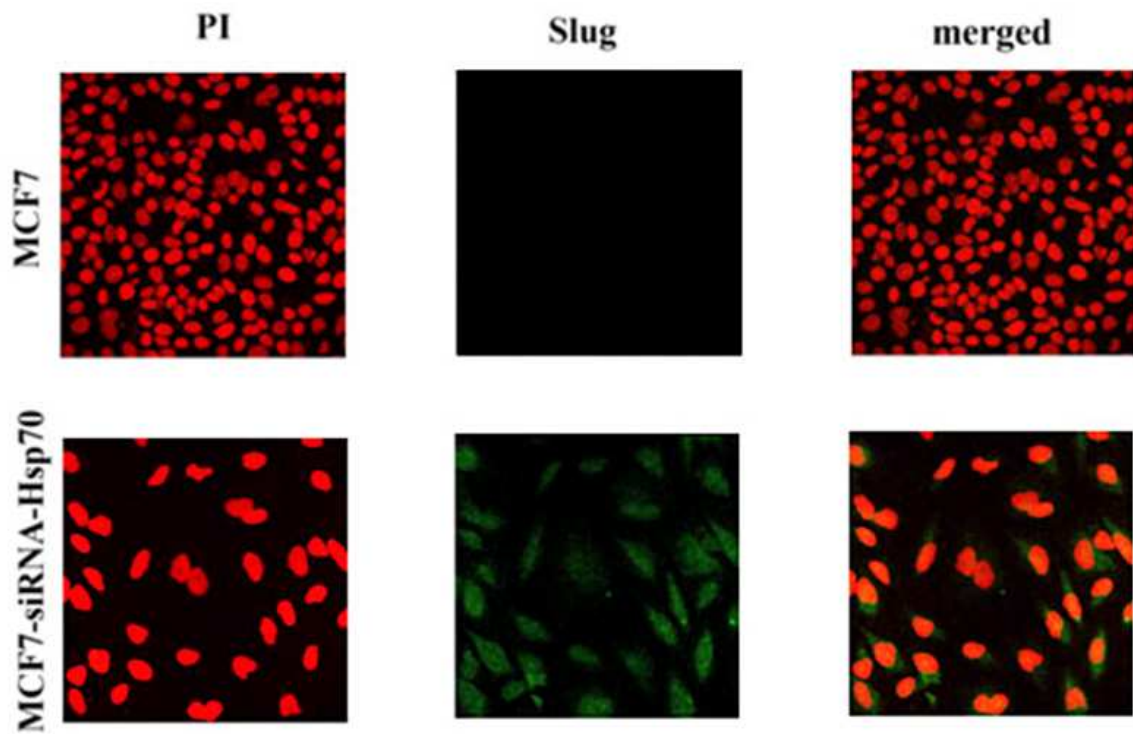
A.



B.



Γ.



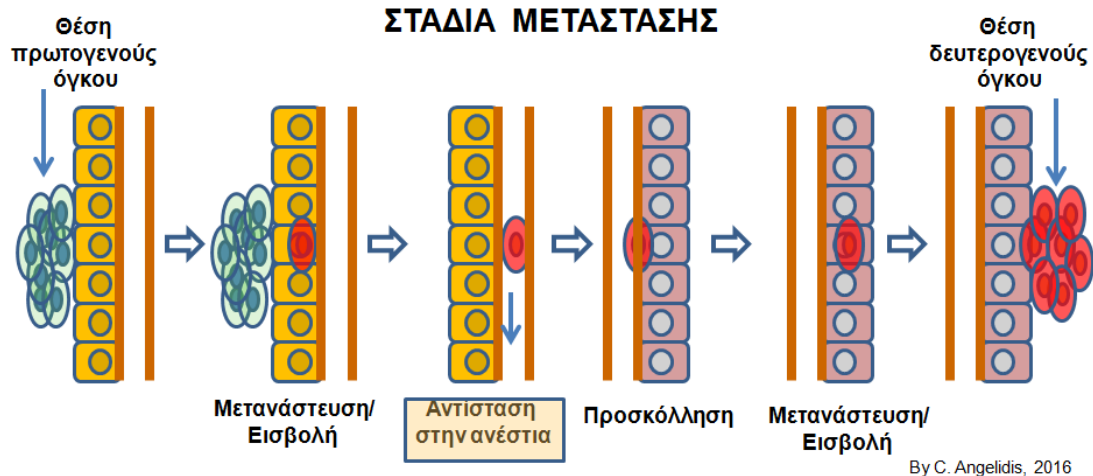
Εικόνα 47: Η επιθηλιακή κυτταρική σειρά MCF7 έπειτα από αποσιώπηση της Hsp70, μεταπίπτει σε μεσεγχυματική. Οι κυτταρικές σειρές MCF7 και MCF7-siRNA-Hsp70 μονιμοποιήθηκαν και επωάστηκαν με τα αντισώματα Vimentin (A), E-καδερίνη (B) και Slug (Γ). Οι πυρήνες βάφτηκαν με ιωδιούχο προπίδιο (PI).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η λέξη μετάσταση είναι ελληνική και προέρχεται από το σύνθετο μετά (next) και ἴσθημι (exist). Μόνο τα κύτταρα ενός κακοήθη όγκου ή τα μολυσμένα κύτταρα μπορούν να κάνουν μετάσταση, ενώ η ανέστια, ως αποπτωτική διαδικασία η οποία ισχύει στα φυσιολογικά κύτταρα, θα πρέπει να ξεπερασθεί για να ακολουθηθεί η διαδικασία της μετάστασης. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να δραπετεύσουν από τον πρωτογενή όγκο, να κυκλοφορήσουν δια μέσου του κυκλοφορικού και να προσκολληθούν σε έναν άλλον φυσιολογικό ιστό σε άλλο σημείο του σώματος. Η μετάσταση συνιστά ένα από τα 3 χαρακτηριστικά σημεία της κακοήθειας (malignancy). Οι περισσότεροι όγκοι και τα νεοπλάσματα μπορούν να πραγματοποιήσουν μετάσταση, αν και με διαφορετική ικανότητα και βαθμό (253).

Έτσι, η μετάσταση συνιστά ένα πολλαπλό βιολογικό σύστημα και είναι ο πρώτος σημαντικός λόγος, που σχετίζεται με την επιβίωση από καρκίνο. Για τον λόγο αυτόν οι θεραπείες που εμποδίζουν την μετάσταση θα μπορούσαν να είναι χρήσιμα θεραπευτικά μέσα. Σε κυτταρικό επίπεδο, η μετάσταση απαιτεί τα κύτταρα να αποκολληθούν από την πρωταρχική τους θέση και να ακολουθήσουν μία μεταναστευτική πορεία δια μέσου του κυκλοφορικού συστήματος. Ως φραγμός σε αυτή τη διαδικασία, τα φυσιολογικά κύτταρα οδηγούνται σε *anoikis* απόπτωση (ανέστια), εάν τυχόν χάσουν την επαφή τους με τα γειτονικά κύτταρα και το εξωκυττάριο υλικό τους (ECM: Extracellular Matrix). Σε αντίθεση, τα καρκινικά κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς υπερπήδησης της ανέστιας, με αποτέλεσμα την επιβίωσή τους, έπειτα από την αποκόλλησή τους από την πρωταρχική τους θέση (Εικόνα 48). Η μετάσταση συμπεριλαμβάνει αρκετά διακριτά στάδια κατά τα οποία τα καρκινικά κύτταρα προωθούνται σε διασπορά από τον αρχικό όγκο, σε δεύτερες μεταστατικές θέσεις διαφορετικών οργάνων.



Εικόνα 48: Στάδια τα οποία συμπεριλαμβάνονται στην μεταστατική διασπορά ενός καρκινικού κυττάρου από την πρωταρχική θέση στην μεταστατική (254).

Τα καρκινικά κύτταρα πρώτα χρειάζονται να αποκτήσουν έναν μεταναστευτικό και διεισδυτικό φαινότυπο, ο οποίος και τους επιτρέπει να αφήσουν τον πρωταρχικό όγκο και να εισβάλουν, δια μέσου της βασικής μεμβράνης, εισερχόμενα μέσα στο κυκλοφορικό ή στο λεμφικό σύστημα. Όταν το καρκινικό κύτταρο εισέλθει σε οποιοδήποτε από αυτά τα συστήματα δεν λαμβάνει πλέον σήματα επιβίωσης από τα γειτονικά κύτταρα και το εξωκυττάριο υλικό. Έτσι, χρειάζεται να αποκτήσει ικανότητες επιβίωσης, υπό την απουσία προσκόλλησης και εξωκυτταρίου υλικού (αυτή η διαδικασία ονομάζεται αντίσταση στην *anoikis* απόπτωση). Η αντίσταση αυτή επιτρέπει στο καρκινικό κύτταρο να εγκαταλείψει την θέση του πρωτογενούς όγκου και να επιβιώσει, υπό την απουσία προσκόλλησης, η οποία βοηθά την ικανότητα των κυττάρων να μεταναστεύσουν σε άλλα όργανα. Στην συνέχεια το καρκινικό κύτταρο προσκολλάται στο τοίχωμα των λεμφικών αγγείων ή αγγείων του κυκλοφορικού συστήματος, δια μέσου του οποίου εισέρχεται σε ένα νέο περιβάλλον. Στην συνέχεια το κύτταρο θα πρέπει να είναι ικανό να επιβιώσει, να πολλαπλασιαστεί και να αναπτύξει μία δευτεροταγή μάζα όγκου (254).

Εδώ και πολλά χρόνια, τα δεδομένα που αφορούν τον ρόλο της *Hsp70* στον καρκίνο και την μετάσταση είναι αντικρουόμενα. Όπως είπαμε προηγουμένως, τα καρκινικά κύτταρα υπερνικούν την ανέστια και επίσης είναι γνωστό ότι η *Hsp70* εμπλέκεται στην αποπτωτική αυτήν διαδικασία. Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο την προσέγγιση αυτού του θέματος, εμπλέκοντας δύο κυτταρικά μονοπάτια, τα οποία διαθέτουν κοινά βήματα κατά την εξέλιξή τους, την ανέστια και την μετάσταση. Έχει ήδη προαναφερθεί ότι η μετάσταση διαθέτει στα αρχικά της στάδια την αποκόλληση του

κυττάρου από τον όγκο, μια διαδικασία από την οποία ξεκινά η *anoikis* απόπτωση, μια φυσιολογική διαδικασία απόπτωσης. Έτσι, με δεδομένη αυτήν την παρατήρηση θεωρήσαμε πως η μελέτη της αποκόλλησης και μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων θα μας έδινε χρήσιμα δεδομένα για την μετάσταση *in vivo*.

Η μετάσταση θεωρείται ως ο βασικός παράγοντας κακοήθειας και είναι συχνή αιτία αποτυχίας της θεραπείας του καρκίνου. Αντιθέτως, η *anoikis* απόπτωση έχει προταθεί ως πιθανό εμπόδιο της μετάστασης (142, 255, 256). Από τις δύο αυτές διαδικασίες, θέλαμε να μελετήσουμε το εναρκτήριο στάδιο της αποκόλλησης των κυττάρων, υποθέτοντας πως αν γνωρίζουμε τον μηχανισμό δράσης, θα μπορούσαμε να ρυθμίσουμε αρνητικά το πρώτο στάδιο της αποκόλλησης των κυττάρων από τον πρωτογενή όγκο *in vivo*.

Παράλληλα, βασιζόμενοι σε μελέτες που αποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70 *kDa* (*Hsp70*) είναι μια καθαρά αντιαποπτωτική πρωτεΐνη, καθώς και πρωτεΐνη επιβίωσης, γεγονός που επιτρέπει στο κύτταρο να επιβιώνει σε ακραίες συνθήκες, θέλαμε να δούμε την εμπλοκή της σε όλη τη διαδικασία της αποκόλλησης του κυττάρου από το κυτταρικό ταπήτιο.

Αρχικά κατασκευάστηκαν τα βιοτεχνολογικά εργαλεία για την επίτευξη των στόχων μας. Για την παρασκευή κυττάρων με μειωμένη έκφραση της *Hsp70* κατασκευάστηκε το πλασμίδιο *pcDNA3-siRNA-Hsp70*, το οποίο περιέχει τμήμα *siRNA* ειδικό για τον κατακερματισμό του ανθρώπινου *Hsp70 mRNA*, σύμφωνα με την τεχνολογία *siRNA* (βλέπε Εικόνα 21Α, Αποτελέσματα).

Έπειτα από πολλές επανειλημμένες προσπάθειες, μιας και όταν αποσιωπούσαμε την *Hsp70* από την καρκινική κυτταρική σειρά *MCF7* τα κύτταρα πέθαιναν, κατασκευάστηκε μια νέα κυτταρική σειρά, η οποία και ελέγχθηκε για την αξιοπιστία της.

Στα πειράματα που ακολούθησαν χρησιμοποιήθηκαν η καρκινική πατρική σειρά *MCF7*, η οποία εκφράζει την πρωτεΐνη *Hsp70* σε υψηλά επίπεδα και η νέα *MCF7-siRNA-Hsp70*, στην οποία αποσιωπάται η *Hsp70* σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% (Εικόνα 24^Α, Αποτελέσματα). Στην νέα κυτταρική σειρά διαπιστώσαμε πως η *Hsp70* διατηρείται σε

ελάχιστα ποσά, ακόμη και έπειτα από συνθήκες θερμικού σοκ (Εικόνα 24B, Αποτελέσματα).

Σε πρώτη φάση, έγιναν ορισμένα πειράματα, για την μελέτη των χαρακτηριστικών της νέας κυτταρικής σειράς. Παρατηρήθηκε ότι η νέα κυτταρική σειρά, με αποσιωπημένη την έκφραση της πρωτεΐνης *Hsp70*, διέφερε από την πατρική καρκινική σειρά, τόσο μορφολογικά όσο και στο επίπεδο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Εικόνα 21, Αποτελέσματα). Τα κύτταρα *MCF7-siRNA-Hsp70*, από τα οποία απουσιάζει η πρωτεΐνη *Hsp70*, παρουσιάζονται πιο επιμήκη και πεπλατυσμένα, σε σχέση με τα πατρικά κύτταρα *MCF7*. Πέραν αυτού, παρατηρήσαμε πως η απουσία της *Hsp70* από τα κύτταρα αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Εικόνα 26, Αποτελέσματα). Θεωρήσαμε ότι οι αλλαγές αυτές των πατρικών *MCF7* κυττάρων οφείλονται στην απουσία της *Hsp70* και πιθανόν τα κύτταρα να μεταπίπτουν σε άλλου τύπου κυττάρων, ο οποίος και διευκολύνει την αποκόλληση και μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων.

Έπειτα από διαδικασίες έκθεσης των κυττάρων σε ακραίες θερμοκρασίες, η νέα κυτταρική σειρά *MCF7-siRNA-Hsp70* παρουσιάστηκε πιο θερμοευαίσθητη (Εικόνα 27, Αποτελέσματα) και πιο αποπτωτική (Εικόνα 29, Αποτελέσματα). Έπειτα από έκθεση των κυττάρων σε θερμοκρασίες υψηλότερες της φυσιολογικής θερμοκρασίας (37°C), τα κύτταρα παρουσιάζονται λιγότερο θερμοανθεκτικά και μη αποτελεσματικά, όσον αφορά την ικανότητά τους να δημιουργούν αποικίες, συγκριτικά με την πατρική καρκινική σειρά (Εικόνα 28, Αποτελέσματα). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με πρότερα αποτελέσματα (76), που προσδίδουν στην *Hsp70* μια λειτουργία που αφορά την επιβίωση και την ικανότητα δημιουργίας αποικιών.

Σε επόμενο στάδιο, μελετήθηκε η διαλεύκανση του ρόλου της *Hsp70* στο μονοπάτι της *apoptosis* απόπτωσης. Όπως προαναφέραμε, η ανέστια (*apoptosis* απόπτωση) ενσωματώνει στο μονοπάτι της το στάδιο της αποκόλλησης των κυττάρων από το υπόστρωμα, ένα στάδιο που θυμίζει αρκετά το πρώτο στάδιο ενός καρκινικού κυττάρου που ξεκινά για μετανάστευση, κατά τη διαδικασία της μετάστασης. Θεωρήθηκε ότι η μελέτη της ανέστιας έμμεσα θα βοηθούσε προς την κατεύθυνση των κυττάρων *MCF7*.

Ως ενεργοποιητής της ανέστιας, επιλέχθηκε η ουσία *poly-HEMA*, με την οποία επιστρώνονταν ο πυθμένας του τρυβλίου και δεν επιτρέπονταν στα κύτταρα να

επικαθήσουν και κολλήσουν στο τρυβλίο. Η απαγόρευση της επικόλλησης είχε ως αποτέλεσμα να διεγείρεται η άνευ-οίκου (anoikis) απόπτωση των κυττάρων. Δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο συνθήκες ανέστιας για διαφορετικούς χρόνους, μελετήσαμε σε ποια χρονική στιγμή ξεκινά η ανέστια σε κάθε κυτταρική σειρά. Τα αποτελέσματα έδειξαν, όπως ήταν αναμενόμενο, πως στην κυτταρική σειρά *MCF7-siRNA-Hsp70*, από την οποία απουσιάζει η έκφραση της πρωτεΐνης *Hsp70*, ενεργοποιείται γρηγορότερα η ανέστια (Εικόνες 30, 31, Αποτελέσματα). Επομένως η απουσία της *Hsp70* από την κυτταρική σειρά *MCF7* καθιστά τα κύτταρα περισσότερο αποπτωτικά (Εικόνες 32, 33, Αποτελέσματα).

Στη συνέχεια των πειραμάτων μας, γνωρίζοντας, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, πως η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη *p53* εμπλέκεται στη διαδικασία της *anoikis* απόπτωσης (257), μελετήσαμε τη ρύθμιση και τη μετακίνηση της πρωτεΐνης *p53*, ώστε να δούμε τη δράση της παρουσία ή απουσία της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης *Hsp70*. Θα πρέπει να λάβουμε υπόψη ότι η *p53* μετακινείται μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα και τροποποιείται τόσο στο γονιδιακό επίπεδο (μεταλλαγμένη *p53*), όσο και στο μετα-μεταφραστικό επίπεδο, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Είναι ήδη γνωστό ότι φωσφορυλιώνεται σε πολλά σημεία, τόσο στο αμινοτελικό όσο και το καρβοξυτελικό άκρο (211) και ότι αυτή η τροποποίηση εμπλέκεται με την μετακίνησή της μέσα στα κυτταρικά διαμερίσματα. Σύμφωνα με υπάρχοντα δεδομένα, η φωσφορυλίωση της *p53* στην σερίνη 15, δηλαδή η *phospho-p53(ser15)*, μπορεί να επηρεάσει την εισαγωγή της *p53* στον πυρήνα (213-215) και στην συνέχεια να ενεργοποιηθούν γονίδια που αφορούν την απόπτωση.

Τα αποτελέσματα έδειξαν αρχικά πως η *p53* συσσωρεύεται ελάχιστα σε φυσιολογικές συνθήκες στα καρκινικά κύτταρα *MCF7*, είτε αυτά εκφράζουν την *Hsp70* είτε έχει αποσιωπηθεί (Εικόνα 34, Αποτελέσματα). Έπειτα από στρες των κυττάρων για χρονική διάρκεια από 15 λεπτά έως 8 ώρες (πρόκληση *anoikis* απόπτωσης με poly-Hema), παρατηρείται πως στα *MCF7* κύτταρα (παρουσία της *Hsp70*) δεν φαίνεται να συσσωρεύεται η *p53*, ενώ στα *MCF7-siRNA-Hsp70* (απουσία της *Hsp70*), η *p53* εκφράζεται και συσσωρεύεται (Εικόνα 34, Αποτελέσματα). Όταν ξεκινά έντονο στρες, στην περίπτωση των *MCF7* κυττάρων έπειτα από τις 24 ώρες, ξεκινά η συσσώρευση της πρωτεΐνης *p53* και στη συνέχεια παρατηρείται πως αρχίζει να συσσωρεύεται η

φωσφορυλιωμένη *phospho-p53* (Ser15), η οποία και εμπλέκεται με την *apoptosis* απόπτωση (ανέστια). Σε αντίθεση, στα *MCF7-siRNA-Hsp70* κύτταρα η συσσώρευση της *phospho-p53* (Ser15) αρχίζει πρώιμα και συγκεκριμένα από τις 8 ώρες ανέστιας (Εικόνα 34, Αποτελέσματα). Προσπαθώντας να ερμηνεύσουμε τα αποτελέσματα αυτά, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η παρουσία ή η απουσία της *Hsp70* στις δύο κυτταρικές σειρές είναι το κλειδί για την καθυστέρηση της συσσώρευσης της *phospho-p53*(ser15) και την ενεργοποίηση της ανέστιας. Βασιζόμενοι σε προηγούμενες βιβλιογραφικές μελέτες, γνωρίζουμε πως υπάρχει αλληλεπίδραση των *Hsp70* και *p53* στο κυτταρόπλασμα καρκινικών κυττάρων (258). Η σύνδεση αυτή συσχετίζεται με την ρύθμιση της συσσώρευσης των αγρίου τύπου (μέσω πρωτεοσώματος) και τροποποιημένων μορφών της *p53* (Εικόνα 49).

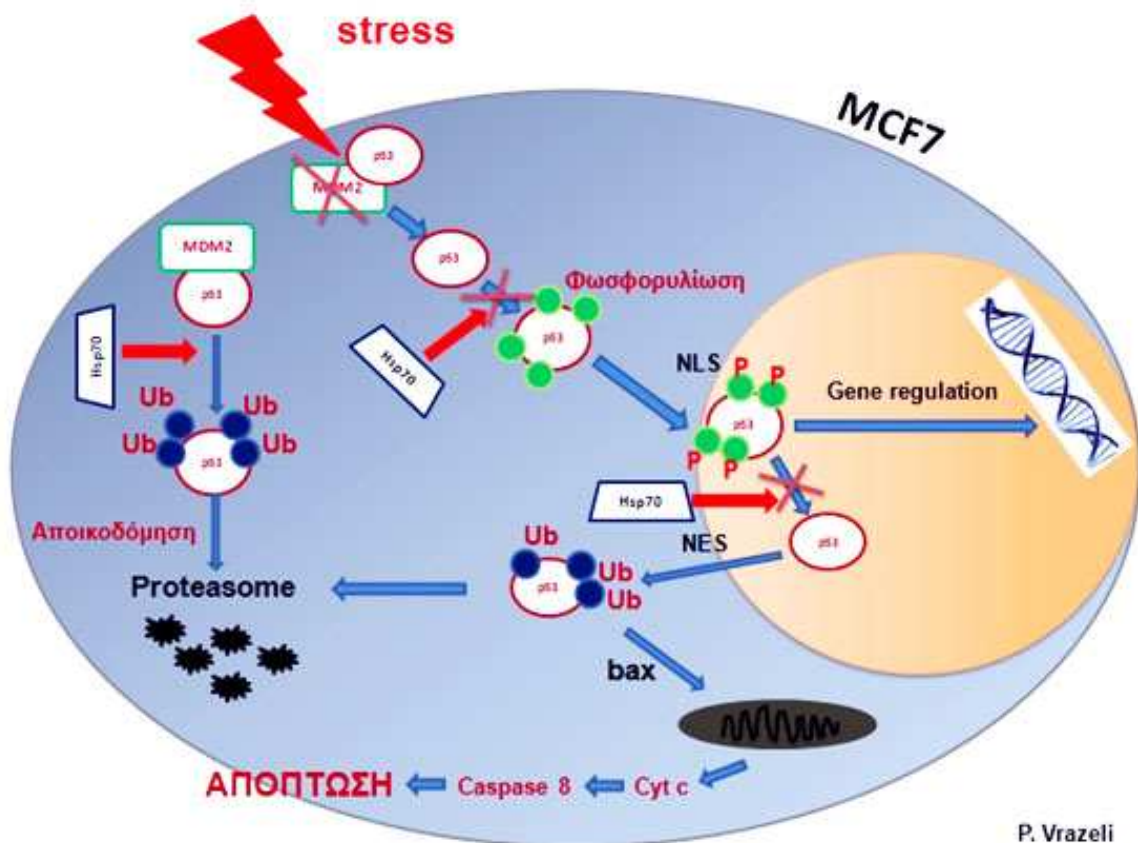
Επομένως, η *Hsp70* εμποδίζοντας την φωσφορυλίωση της *p53* σε *phospho-p53* (Ser15) και τη συσσώρευσή της, εμποδίζει την ενεργοποίηση της ανέστιας, μέσω της *p53*. Επίσης, δεν πρέπει να παραβλέπουμε πως η *MDM2* δεσμεύει την *p53* στο κυτταρόπλασμα, αδρανοποιώντας την λειτουργία της και οδηγώντας την στο αποπτώσωμα προς αποδιάταξη (259). Έτσι, με τον μηχανισμό αυτόν, θα μπορούσαμε να αιτιολογήσουμε την μη παρουσία της *p53* στα εκχυλίσματα της κυτταρικής σειράς *MCF7*, παρουσία της *Hsp70* (Εικόνα 34, Αποτελέσματα). Όταν όμως δεν υπάρχει η *Hsp70*, δηλαδή στα *MCF7-siRNA-Hsp70* κύτταρα, τότε, κάτω από συνθήκες στρες, παρατηρείται ενεργοποίηση (υπό μορφή αύξησης της έκφρασης και συσσώρευσης) της *p53*. Αυτή η παρατήρηση ήταν μη αναμενόμενη, διότι υπό την απουσία της *Hsp70* θα αναμέναμε το πρωτεόσωμα να καταβολίζει μαζικά την *p53*. Αντιθέτως, η απουσία της *Hsp70* φαίνεται να απορυθμίζει όλον τον μηχανισμό ρύθμισης και η *MDM2* να οδηγεί μέρος της πρωτεΐνης για αποδιάταξη και ταυτόχρονα να επιτρέπει την συσσώρευση της υπόλοιπης *p53*. Έπειτα από τις 8 ώρες ανέστιας, η *p53* φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 15, και οδηγεί τα κύτταρα στην απόπτωση (Εικόνα 34, Αποτελέσματα).

Στη συνέχεια των πειραμάτων, μελετήσαμε τον εντοπισμό της *p53* και της *phospho-p53* (Ser15) μέσα στο κύτταρο, κατά τη διάρκεια διαφορετικών χρονικών επώσεων σε συνθήκες ανέστιας. Πραγματοποιήσαμε πειράματα τόσο σε επίπεδο πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων και απεικόνισης της συσσώρευσης των πρωτεϊνών, όσο και σε επίπεδο εντοπισμού των πρωτεϊνών, σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Τα αποτελέσματα

έδειξαν πως σε φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει μηδενική σχεδόν συσσώρευση της πρωτεΐνης *p53* στο κυτταρόπλασμα και στις δύο κυτταρικές σειρές ανεξαρτήτου παρουσίας της *Hsp70* (Εικόνα 35, Αποτελέσματα).

Έπειτα από ήπιο στρες, στα κύτταρα *MCF7*, στα οποία εκφράζεται η *Hsp70* παρατηρούμε πως δεν υπάρχει συσσώρευση της πρωτεΐνης *p53*, ούτε στο κυτταρόπλασμα, ούτε στον πυρήνα. Η *p53* ξεκινά να ανιχνεύεται μόνο στο κυτταρόπλασμα, έπειτα από 24 ώρες ανέστιας των κυττάρων. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες στρες και το ίδιο χρονικό διάστημα ένα μέρος του *p53* πληθυσμού αρχίζει να τροποποιείται και να συσσωρεύεται σε *phospho-p53* (Ser15), μόνο όμως στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον, κάτω από τις ίδιες συνθήκες στρες, στα *MCF7-siRNA-Hsp70* κύτταρα, στα οποία δεν εκφράζεται η *Hsp70*, παρατηρούμε την συσσώρευση της *p53* (4-6 ώρες στρες), αλλά και της *phospho-p53* (Ser15) (24-72 ώρες στρες) στο κυτταρόπλασμα. Ταυτόχρονα όμως παρατηρούμε την *p53* να μεταφέρεται μαζικά και να συσσωρεύεται στους πυρήνες (8-72 ώρες στρες) και τους πυρηνίσκους (24-72 ώρες στρες). Όμως, κάτω από αυτές τις συνθήκες, η *phospho-p53* (Ser15) συσσωρεύεται μετά από τουλάχιστον 48 ώρες στρες με *poly-Hema* (Εικόνα 35, Αποτελέσματα). Αντίστοιχα αποτελέσματα λάβαμε και με ανοσοφθορισμό και την χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας (Εικόνα 36, Αποτελέσματα).

Λαμβάνοντας υπόψη όλες τις παρατηρήσεις και την υπάρχουσα βιβλιογραφία, μπορούμε να υποθέσουμε ότι εφόσον δεν υπάρχει η *Hsp70*, η *p53* δρα ελεύθερα και εισέρχεται στον πυρήνα και στους πυρηνίσκους σε ακραίες συνθήκες στρες –ανέστιας. Έπειτα από τις 8 ώρες ανέστιας, παρατηρούμε την παρουσία της *p53* στον πυρήνα. Ήδη από τις 8 ώρες ανέστιας, η *p53* φωσφορυλιώνεται στο κυτταρόπλασμα και εισέρχεται στον πυρήνα, για την επιδιόρθωση βλαβών του *DNA* (Εικόνα 35, Αποτελέσματα). Εάν δεν επιτευχθεί η επιδιόρθωση των βλαβών του *DNA*, τότε η *phospho-p53* (Ser15) ενεργοποιεί γονίδια που προωθούν την απόπτωση. Υπό αυτή την λογική, μπορούμε να προτείνουμε ένα πιθανό μοντέλο δράσης της *p53*, αλλά και την εμπλοκή της *Hsp70* (Εικόνα 49) , όπως αυτή προκύπτει από τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας.



P. Vrazeli

Εικόνα 49: Πιθανό μοντέλο δράσης της p53 στο ανοίκισ αποπτωτικό μονοπάτι (ανέστια) και η εμπλοκή της Hsp70 σε αυτό.

Ένα από τα χαρακτηριστικά της νέας κυτταρικής σειράς, στη οποία απουσίαζε η έκφραση της πρωτεΐνης Hsp70 είναι πως τα κύτταρα αφενός μεν πολλαπλασιάζονταν πιο γρήγορα σε σύγκριση με την πατρική κυτταρική σειρά, αφετέρου δε διέθεταν έναν διαφορετικό φαινότυπο. Τα κύτταρα ήταν πιο επιμήκη και πεπλατυσμένα, γεγονός που οδήγησε τις σκέψεις μας για πιθανή μετάπτωση των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (EMT). Για την διαλεύκανση αυτού του ερωτήματος, αξιολογήσαμε πειράματα που είχαν ήδη διεξαχθεί, όπως κυτταρικού πολλαπλασιασμού και προσθέσαμε πειράματα που αφορούσαν την μεταναστευτικότητα των κυττάρων. Όλα αυτά ενισχύθηκαν με επιβεβαιωτικούς μάρτυρες που υποδείκνυαν και αποδείκνυαν την ύπαρξη του φαινομένου της επιθηλιακής προς μεσεγχυματική μετάβασης.

Για την μελέτη της μεταναστευτικότητας των κυττάρων πραγματοποιήσαμε πειράματα επούλωσης τραύματος, μια διαδικασία η οποία μας αποδεικνύει την ικανότητα των κυττάρων να μεταναστεύουν. Αποδείχθηκε ότι τα κύτταρα με αποσιώπηση της

έκφρασης της *Hsp70* είναι πιο μεταναστευτικά, σε σχέση με την πατρική κυτταρική σειρά (Εικόνες 38, 39, Αποτελέσματα).

Η παραπάνω παρατήρηση μας οδήγησε στην σκέψη εάν η απουσία της *Hsp70* δρα συνεργιστικά ή μη, παρουσία χημειοθεραπευτικών, στο θέμα της μεταναστευτικότητας των καρκινικών κυττάρων. Αρχικά, μελετήσαμε την αντοχή των κυτταρικών σειρών *MCF7* και *MCF7-siRNA-Hsp70*, έπειτα από χορήγηση σε αυτά των χημειοθεραπευτικών δοξορουβικίνη ή σισπλατίνη. Χορηγήσαμε διαφορετικές συγκεντρώσεις των χημειοθεραπευτικών ουσιών ξεχωριστά κάθε φορά και μελετήσαμε την ικανότητα επιβίωσης της εκάστου κυτταρικής σειράς. Καταλήξαμε στο συμπέρασμα, πως η απουσία της *Hsp70* καθιστά τα κύτταρα πιο ευαίσθητα, έπειτα από την έκθεσή τους στις χημειοθεραπευτικές ουσίες δοξορουβικίνη και σισπλατίνη (Εικόνα 40, Πίνακας 2, Αποτελέσματα).

Επιπλέον, πραγματοποιήσαμε πειράματα επούλωσης τραύματος, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως για την μελέτη της μεταναστευτικότητας των κυττάρων, με την ταυτόχρονη χορήγηση σε αυτά χημειοθεραπευτικών ουσιών όπως η δοξορουβικίνη ή η σισπλατίνη σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Μελετώντας τα αποτελέσματα και συγκρίνοντάς τα με εκείνα στα οποία δεν χορηγήθηκε καμία ουσία (control), καταλήξαμε στο συμπέρασμα πως έπειτα από την χορήγηση των χημειοθεραπευτικών δοξορουβικίνης ή σισπλατίνης η κυτταρική σειρά *MCF7-siRNA-Hsp70*, από την οποία απουσιάζει η *Hsp70*, παρουσιάζει μεγαλύτερο ποσοστό μεταναστευτικότητας των κυττάρων, σε σχέση με την κυτταρική σειρά *MCF7*, αλλά και σε σχέση με την κυτταρική σειρά *MCF7-siRNA-Hsp70*, στα οποία όμως δεν έχει χορηγηθεί κάποια χημειοθεραπευτική ουσία (Εικόνες 41-44, Αποτελέσματα). Όσο μεγαλύτερη συγκέντρωση χημειοθεραπευτικών ουσιών χορηγούσαμε στις κυτταρικές σειρές, απουσία την *Hsp70*, τόσο πιο μεταναστευτικά γινόταν τα κύτταρα. Επιπλέον, σημαντικό είναι να υπογραμμίσουμε πως η δοξορουβικίνη ήταν περισσότερο τοξική από τη σισπλατίνη. Επομένως, σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούμε να τονίσουμε τη σημαντικότητα της έκφρασης της πρωτεΐνης *Hsp70* στις κυτταρικές σειρές. Μια πρωτεΐνη που η παρουσία της, αφενός μεν είναι αντιαποπτωτική, αφετέρου δε, μειώνει την μεταναστευτική δραστηριότητα, έπειτα από χορήγηση ή όχι χημειοθεραπευτικών ουσιών.

Χορηγώντας ταυτόχρονα και τις δύο χημειοθεραπευτικές ουσίες δοξορουβικίνη και σισπλατίνη, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις στα ίδια κύτταρα, παρατηρήθηκε ότι δρουν συνεργιστικά (Εικόνα 45, Αποτελέσματα). Επιπλέον, η ταυτόχρονη παρουσία και των δύο χημειοθεραπευτικών αυξάνει περαιτέρω την απόπτωση των κυττάρων, όταν απουσιάζει η *Hsp70*. Από τα παραπάνω αποτελέσματα, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι η χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων δοξορουβικίνης στα θεραπευτικά μίγματα ασθενών, που προκαλεί παρενέργειες, όπως καρδιακή ανεπάρκεια (260), θα μπορούσαν να μειωθούν εάν στα μίγματα χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα και αναστολείς της *Hsp70*.

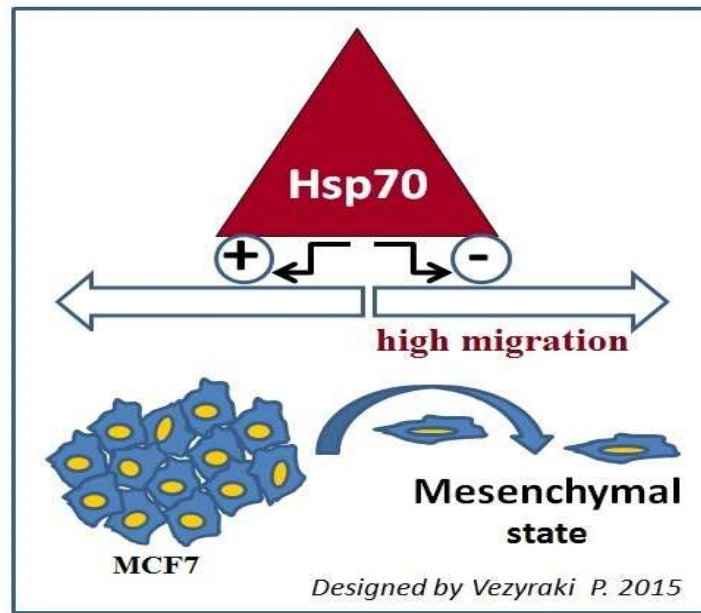
Όπως προαναφέραμε, η απουσία της *Hsp70* προκαλεί αλλαγή φαινοτύπου των καρκινικών κυττάρων και ότι τα κύτταρα αποκτούν έντονη μεταστατικότητα. Αυτό μας οδήγησε στην μελέτη του φαινομένου *EMT* (επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση) και την εμπλοκή της *Hsp70* στην εν λόγω διαδικασία.

Είναι γνωστό ότι η επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση (*EMT*) αντιπροσωπεύει την αλλαγή του φαινοτύπου των επιθηλιακών κυττάρων προς κύτταρα μεσεγχυματικού τύπου. Η *in vivo* μετάβαση των επιθηλιακών σε μεσεγχυματικά κύτταρα συμβαίνει κατά την εμβρυογένεση και σε καταστάσεις φλεγμονής και επούλωσης των ιστών. Η μετάβαση αυτή χαρακτηρίζεται από απώλεια των διακυτταρικών συνδέσεων και από απόκτηση μεταναστευτικών και διεισδυτικών ιδιοτήτων. Το χαρακτηριστικό αυτό χρησιμοποιείται από κακοήθεις όγκους επιθηλιακών κυττάρων για την εξάπλωσή τους (244-246). Κατά τη διαδικασία της *EMT*, λαμβάνουν μέρος αρκετά μόρια. Για παράδειγμα, οι καδερίνες μεσολαβούν στην προσκόλληση μεταξύ δύο κυττάρων και παίζουν σημαντικό ρόλο στην φυσιολογική ανάπτυξη ενός ιστού. Πιο συγκεκριμένα, η E-καδερίνη θεωρείται ενεργός καταστολέας της εισβολής και της ανάπτυξης πολλών καρκινικών κυττάρων (247-249). Μελέτες έχουν δείξει, πως τα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα έχουν αυξημένα ποσά N-καδερίνης και απώλεια της E-καδερίνης. Αυτή η αλλαγή στην έκφραση των καδερινών ονομάζεται «διακόπτης καδερίνης» (“cadherin switch”). Η μειορρύθμιση της E-καδερίνης είναι ένα από τα χαρακτηριστικά της *EMT* διαδικασίας. Η πρωτεΐνη *Slug* (*SNAI2*) είναι ένας ευρέως εκφραζόμενος μεταγραφικός καταστολέας και μέλος της οικογένειας *Snail* (250). Ομοίως, με την πρωτεΐνη *Snail*, η *Slug* συνδέεται στον υποκινητή της E-καδερίνης, μια περιοχή που καταστέλλει τη μεταγραφή της (251). Η σύνδεση της *Slug* στον υποκινητή των ιντεγκρινών καταστέλλει την έκφραση των ιντεγκρινών και ως αποτέλεσμα οδηγεί σε μειωμένη κυτταρική προσκόλληση (252).

Τέλος, η βιμεντίνη είναι ένας καθαρά μεσεγγυματικός δείκτης και έχει αποδειχθεί πως η έκφρασή της στα επιθηλιακά κύτταρα αυξάνει τη μεταστατική τους ικανότητα (261, 262).

Στην διεθνή βιβλιογραφία, όλες οι παραπάνω πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται ως δείκτες του επιθηλιακού ή μεσεγγυματικού φαινοτύπου στις κυτταρικές σειρές. Πιο συγκεκριμένα, με τη χρήση του κιτ “*Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Antibody Sampler Kit #9782*” της εταιρείας *Cell Signalling* και έπειτα από πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά western, ανοσοφθορισμού και έκθεση σε συνεστιακό μικροσκόπιο, συμπεράναμε πως η νέα κυτταρική σειρά, *MCF7-siRNA-Hsp70*, απουσία της έκφρασης της *Hsp70*, εκφράζει μεσεγγυματικούς δείκτες, όπως τη βιμεντίνη (Εικόνες 46, 47^A, Αποτελέσματα) και N-καδερίνη (Εικόνες 46, Αποτελέσματα) και μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο *Slug* (Εικόνες 46, 47^I, Αποτελέσματα). Η έκφρασή τους επάγει αλλαγές στο σχήμα, στην προσκόλληση, στην κινητικότητα και τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων (261). Σε αντίθεση με τη νέα κυτταρική σειρά, η πατρική καρκινική σειρά *MCF7* η οποία με τη σειρά της εκφράζει την *Hsp70*, εκφράζει και επιθηλιακούς δείκτες, όπως η E-καδερίνη (Εικόνες 46, 47^B, Αποτελέσματα).

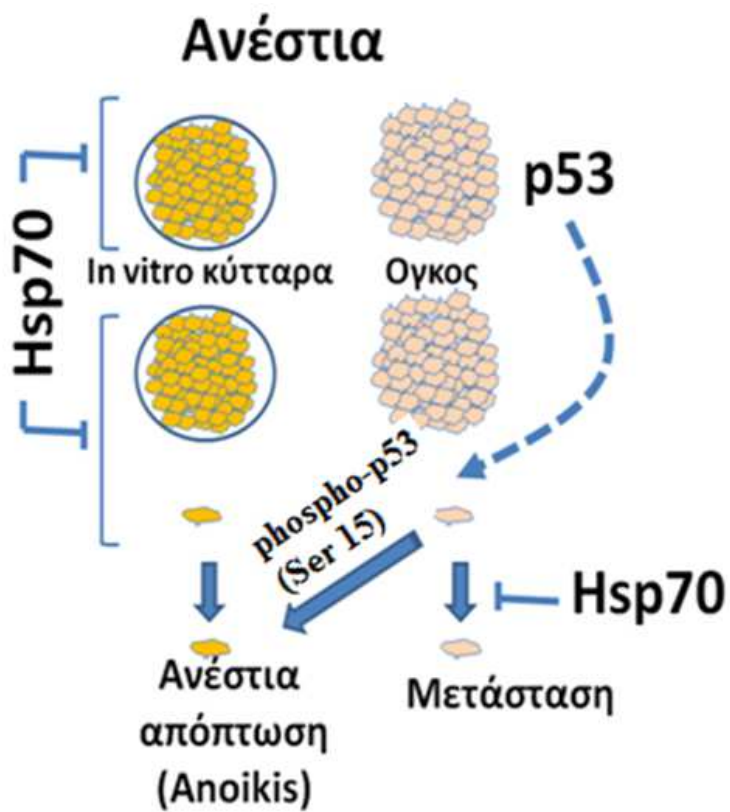
Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαίωσαν τους αρχικούς ισχυρισμούς μας για την ύπαρξη του φαινομένου *EMT* (επιθηλιακής προς μεσεγγυματική μετάβαση των κυττάρων) στα κύτταρα, *MCF7-siRNA-Hsp70*, τα οποία αποσιωπούν την έκφραση της *Hsp70* σε υψηλό ποσοστό. Έτσι, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη *Hsp70*, η οποία εκφράζεται σε υψηλά ποσά στις καρκινικές κυτταρικές σειρές, αφενός μεν επιτρέπει στα κύτταρα να επιβιώνουν σε αντίξοες συνθήκες, αφετέρου δε να παραμένουν στην εστία τους μειώνοντας την ικανότητα προς μετανάστευση. Όταν όμως απουσιάζει από τα κύτταρα, τότε εκείνα μετατρέπονται σε μεσεγγυματικά, τα οποία θεωρούνται ότι διαθέτουν μεγαλύτερη ικανότητα μεταναστευτικότητας. Ένα πιθανό μοντέλο δράσης της *Hsp70* στην καρκινική σειρά *MCF7*, όπως προέκυψε από τη μελέτη μας, φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 50).



Εικόνα 50: Πιθανός τρόπος δράσης της *Hsp70* κατά την μετάπτωση των καρκινικών MCF7 κυττάρων σε μεσεγχυματικά κύτταρα (EMT).

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα αποτελέσματα, μπορούμε να υποθέσουμε ένα μηχανισμό δράσης της *Hsp70*, μέσα από την αλληλεπίδραση της *Hsp70* με την *p53* (αδημοσίευτα αποτελέσματα) και άλλων μορίων. Φαίνεται ότι η *Hsp70* δρα σε δυο - τρία σημεία (Εικόνα 51), μειώνοντας έτσι την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων προς απόπτωση ή μετανάστευση:

1. Στην συγκρότηση του δικτύου συνένωσης των κυττάρων μέσω των μορίων προσκόλλησης (π.χ Καδερίνη)
2. Στην ενδοκυτταρική μετακίνηση της *p53*
3. Στην μετα-μεταφραστική τροποποίηση της *p53* σε *phospho-p53*(ser15).



Εικόνα 51: Πιθανό μοντέλο δράσης της Hsp70 στην phospho-p53(ser15) εξαρτώμενη ανέστια ή μετάσταση.

6. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ *Hsp70* (**HSPA1A**: heat shock πρωτεΐνη οικογένειας A (*Hsp70*) μέλος 1A) είναι η καλύτερα μελετημένη πρωτεΐνη στην οικογένεια A των *Hsp70s*. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη επιβίωσης και πρωτεΐνη αντι-αποπτωτική, που σχετίζεται με πολλές ασθένειες στον άνθρωπο. Μεταξύ αυτών, ο καρκίνος, τα καρκινικά κύτταρα του οποίου συνήθως την εκφράζουν σε υψηλές ποσότητες. Η παρούσα μελέτη εστιάζεται στην δράση και τη σύνδεση της *Hsp70*, τόσο με την απόπτωση, η οποία οφείλεται στην απουσία προσκόλλησης (*anoikis*) και ταυτόχρονα συνιστά μέρος της διαδικασίας της μετάστασης, όσο και με την σύνδεσή της με την προώθηση της μετάστασης. Έπειτα από πολλές προσπάθειες, επιτεύχθηκε σχεδόν η παντελής αποσιώπηση της *Hsp70*, στην καρκινική κυτταρική σειρά *MCF7*. Αρχικά, μετρήθηκαν τα ποσοστά επιβίωσής των κυττάρων αυτών, υπό αυξανόμενο θερμικό σοκ. Παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα, από τα οποία απουσίαζε η *Hsp70*, ήταν πιο θερμοευαίσθητα, και με χαμηλή ικανότητα δημιουργίας αποικιών και πιο αποπτωτικά. Στη συνέχεια, η εμπλοκή των χημειοθεραπευτικών ουσιών δοξορουβικίνης και σισπλατίνης έδειξε πως η δοξορουβικίνη είναι πιο τοξική από την σισπλατίνη στα *MCF7* κύτταρα. Επίσης, δρουν συνεργιστικά όταν η έκφραση της *Hsp70* απουσιάζει από την κυτταρική σειρά *MCF7*.

Η μελέτη της *anoikis* απόπτωσης, με ενεργοποιητή την ουσία *poly-HEMA*, ουσία η οποία εμποδίζει την προσκόλληση των κυττάρων στο ταπήτιο των τρυβλίων, οδήγησε στην απόδειξη περί εμπλοκής της *phospho-p53* (Ser15) στην απόπτωση λόγω *anoikis*. Σημαντικό βήμα στην εξέλιξη της έρευνας ήταν η παρατήρηση ότι τα ίδια κύτταρα (*MCF7-siRNA-Hsp70*), από τα οποία απουσίαζε η *Hsp70*, παρουσίαζαν γρηγορότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού, αλλά και μεγαλύτερη μεταναστευτική δραστηριότητα. Μορφολογικά, έπειτα από την αποσιώπηση της πρωτεΐνης *Hsp70*, τα κύτταρα παρουσιάζονταν πιο επιμήκη και πεπλατυσμένα. Βασιζόμενοι σε επιθηλιακούς και μεσεγχυματικούς δείκτες (E-καδερίνης, Slug, βιμεντίνη, N-καδερίνη) και σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά *western* και ανοσοφθορισμού σε συνεστιακό μικροσκόπιο, μελετήθηκε αυτή η φαινοτυπική αλλαγή. Αποδείχθηκε ότι η απουσία της έκφρασης της πρωτεΐνης *Hsp70*, από την κυτταρική σειρά *MCF7*, ωθεί τα κύτταρα να μεταπίπτουν από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά (φαινόμενο επιθηλιακής προς μεσεγχυματικής μετάπτωσης - *EMT*). Η μετάπτωση αυτή ωθεί τα καρκινικά κύτταρα σε αυξημένη ικανότητα

μετανάστευσης (migration). Αν τα αποτελέσματα αυτά τα αναγάγουμε σε *in vivo* συνθήκες, τότε θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η απουσία της *Hsp70* πρωτεΐνης προάγει την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Αντίθετα, η παρουσία της *Hsp70* συγκρατεί τα καρκινικά κύτταρα στον αρχικό όγκο. Σύμφωνα με το προτεινόμενο μοντέλο η *p53* φωσφορυλιώνεται, κατά την διάρκεια της αποκόλλησης των κυττάρων, σε *phospho-p53* (Ser 15), η οποία ωθεί τα κύτταρα, που αποκολλούνται προς μετάσταση, στον θάνατο. Ταυτόχρονα, η *Hsp70* εμποδίζει την μέσω *p53* προαγωγή της μετάστασης. Έτσι οι δύο πρωτεΐνες, δηλαδή οι *phospho-p53* και *Hsp70*, δρουν αντι-μεταναστευτικά ή αντι-μεταστατικά και η εμπλοκή τους στα δύο μονοπάτια, *anoikis* και *metastasis*, θα παίζει σημαντικό ρόλο τουλάχιστον στην θεραπεία του καρκίνου του μαστού.

SUMMARY

The heat shock protein Hsp70 (**HSPA1A**: heat shock protein family A (Hsp70) member 1A) is the most thoroughly studied and analyzed protein in the A-family of the Hsp70s. Hsp70 is a survival and anti-apoptotic protein, related to a huge number of human diseases. Specifically, in cancer tumor cells, Hsp70 is expressed in high concentrations. The current study is focused on the action and the connection of Hsp70, both to the apoptosis, which is induced by the absence of cell adhesion (anoikis) and simultaneously plays a key role in the metastasis procedure and to its connection with the promotion of metastasis. The almost complete silencing of Hsp70 was eventually achieved, at the MCF7 cancer cell line. Initially, the survival ratio of these cancer cells was measured under constantly increasing heat shock. It was observed that the cells, that Hsp70 was absent, were more thermo sensitive, and additionally had a lower colony creation capability and a higher apoptotic possibility. Onwards, the involution of the chemotherapeutic drugs doxorubicin and cisplatin proved that doxorubicin is more toxic than cisplatin, regarding the MCF7 cells. Also, doxorubicin and cisplatin can act cooperatively when the expression of Hsp70 is absent from the MCF7 cell line.

Studying anoikis apoptosis, utilizing the poly-HEMA solution, which is a substance that prohibits the adhesion of the cell at the culture plate, has led to the proof of the involvement of phospho-p53 (Serine 15) to the anoikis apoptosis. An important step, towards the progress of our investigation, was the observation that in the very same cells (MCF7-siRNA-Hsp70), from which Hsp70 was absent, displayed a much faster proliferation rate, along with greater migration capability. Morphologically, following the silencing of Hsp70 protein, the cells appear to be more lengthy and flattened. Based on the epithelial and mesenchymal markers (E-cadherin, Slug, Vimentin, N-cadherin), western blotting experiments and immunofluorescence in a confocal microscope, this morphological change was studied. It was proved that the absence of the Hsp70 protein expression, from the MCF7 cell line, is forcing the cells to transit from epithelial to mesenchymal (epithelial to mesenchymal transition – EMT). This transition is forcing the tumor cells to a state of higher migration capability (migration). If these results are reduced at in vivo conditions, then it can be easily assumed that the absence of Hsp70 protein is promoting the migration of tumor cancer cells. In the contrary, the presence of Hsp70 maintains the cancer cells attached to the initial tumor. According to the proposed model,

p53 is phosphorylated, during the process of the cells' detachment, to phospho-p53 (Serine 15), which forces the tumor cells that are detached for metastasis, to their death. Simultaneously, Hsp70 is preventing the promotion of metastasis, through-p53. So, these two proteins, phospho-p53 and Hsp70, act as an anti-migratory or anti-metastatic factor and their involvement in both pathways, anoikis and metastasis, will play an important role at the cure of the breast cancer, at least.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abravaya K, Myers MP, Murphy SP, Morimoto RI. The human heat shock protein hsp70 interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression. *Genes Dev.* 1992;6(7):1153-64.
2. Maio AD. Heat shock proteins. Facts, thoughts, and dreams. *Shock.* 1999(11):1-12.
3. Feder ME HG. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiology.* 1999(61):243-82.
4. Fu H, SRR, Masters S. C. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40:617-47.
5. Arrigo AP. [Heat shock proteins as molecular chaperones]. *Med Sci (Paris).* 2005;21(6-7):619-25.
6. Welch WJ, Kang HS, Beckmann RP, Mizzen LA. Response of mammalian cells to metabolic stress; changes in cell physiology and structure/function of stress proteins. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1991;167:31-55.
7. Papp E, Nardai G, Soti C, Csermely P. Molecular chaperones, stress proteins and redox homeostasis. *Biofactors.* 2003;17(1-4):249-57.
8. Sedger L, Ruby J. Heat shock response to vaccinia virus infection. *J Virol.* 1994;68(7):4685-9.
9. Ritossa FM. A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia.* 1962;18:571-3.
10. Ashburner M, Bonner JJ. The induction of gene activity in *drosophila* by heat shock. *Cell.* 1979;17(2):241-54.
11. Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol.* 1974;84(3):389-98.
12. Lindquist S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem.* 1986;55:1151-91.
13. Matz JM, Blake MJ, Tatelman HM, Lavoie KP, Holbrook NJ. Characterization and regulation of cold-induced heat shock protein expression in mouse brown adipose tissue. *Am J Physiol.* 1995;269(1 Pt 2):R38-47.
14. Cao Y, Ohwatari N, Matsumoto T, Kosaka M, Ohtsuru A, Yamashita S. TGF-beta1 mediates 70-kDa heat shock protein induction due to ultraviolet irradiation in human skin fibroblasts. *Pflugers Arch.* 1999;438(3):239-44.
15. Laplante AF, Moulin V, Auger FA, Landry J, Li H, Morrow G, et al. Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing. *J Histochem Cytochem.* 1998;46(11):1291-301.
16. Wu C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annual review of cell and developmental biology.* 1995;11:441-69.
17. Neupert W. Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem.* 1997;66:863-917.
18. Nollen EA, Morimoto RI. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 14):2809-16.
19. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science.* 2002;295(5561):1852-8.
20. Katschinski DM. On heat and cells and proteins. *News Physiol Sci.* 2004;19:11-5.
21. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature.* 1996;381(6583):571-9.
22. Csermely P, Miyata Y, Soti C, Yahara I. Binding affinity of proteins to hsp90 correlates with both hydrophobicity and positive charges. A surface plasmon resonance study. *Life Sci.* 1997;61(4):411-8.
23. Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohaszka Z, Nardai G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 1998;79(2):129-68.

24. Voisine C, Pedersen JS, Morimoto RI. Chaperone networks: tipping the balance in protein folding diseases. *Neurobiol Dis.* 2010;40(1):12-20.
25. Ellis RJ, van der Vies SM. Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem.* 1991;60:321-47.
26. Laskey RA, Honda BM, Mills AD, Finch JT. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature.* 1978;275(5679):416-20.
27. Ellis J. Proteins as molecular chaperones. *Nature.* 1987;328(6129):378-9.
28. Flynn GC, Pohl J, Flocco MT, Rothman JE. Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature.* 1991;353(6346):726-30.
29. Landry SJ, Jordan R, McMacken R, Gierasch LM. Different conformations for the same polypeptide bound to chaperones DnaK and GroEL. *Nature.* 1992;355(6359):455-7.
30. Szabo A, Langer T, Schroder H, Flanagan J, Bukau B, Hartl FU. The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the Escherichia coli Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(22):10345-9.
31. Buchberger A, Schroder H, Hesterkamp T, Schonfeld HJ, Bukau B. Substrate shuttling between the DnaK and GroEL systems indicates a chaperone network promoting protein folding. *J Mol Biol.* 1996;261(3):328-33.
32. Hubbard TJ, Sander C. The role of heat-shock and chaperone proteins in protein folding: possible molecular mechanisms. *Protein Eng.* 1991;4(7):711-7.
33. Zahn R, Spitzfaden C, Ottiger M, Wuthrich K, Pluckthun A. Destabilization of the complete protein secondary structure on binding to the chaperone GroEL. *Nature.* 1994;368(6468):261-5.
34. Goloubinoff P, Mogk A, Zvi AP, Tomoyasu T, Bukau B. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(24):13732-7.
35. Kandjian E.W. TH. Simian virus 40 and polyomavirus induce synthesis of heat shock proteins in mammalian cells. *MolCell Biol.* 1983;3:1-8.
36. Walter S, Buchner J. Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2002;41(7):1098-113.
37. Goetz MP, Toft DO, Ames MM, Erlichman C. The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Ann Oncol.* 2003;14(8):1169-76.
38. Lindquist S, DebBurman SK, Glover JR, Kowal AS, Liu JJ, Schirmer EC, et al. Amyloid fibres of Sup35 support a prion-like mechanism of inheritance in yeast. *Biochem Soc Trans.* 1998;26(3):486-90.
39. Gupta RS, Aitken K, Falah M, Singh B. Cloning of Giardia lamblia heat shock protein HSP70 homologs: implications regarding origin of eukaryotic cells and of endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(8):2895-9.
40. Hunt C, Morimoto RI. Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(19):6455-9.
41. Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J Mol Evol.* 1994;38(1):1-17.
42. Pelham HR. Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *EMBO J.* 1984;3(13):3095-100.
43. Li GC, Li LG, Liu YK, Mak JY, Chen LL, Lee WM. Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-kDa heat shock protein-encoding gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(5):1681-5.
44. Angelidis C.E. NC, Lazaridis I., Kontoyannis D., Kollias G. and Pagoulatos G.N. Overexpression of hsp70 in transgenic mice results in increased cell thermotolerance. *Transgenics.* 1996;2:111-7.

45. Tang H, Liu Y, Madabusi L, Gilmour DS. Promoter-proximal pausing on the hsp70 promoter in *Drosophila melanogaster* depends on the upstream regulator. *Mol Cell Biol.* 2000;20(7):2569-80.
46. Wu CH, Madabusi L, Nishioka H, Emanuel P, Sypes M, Arkhipova I, et al. Analysis of core promoter sequences located downstream from the TATA element in the hsp70 promoter from *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol.* 2001;21(5):1593-602.
47. Werner-Washburne M, Craig EA. Expression of members of the *Saccharomyces cerevisiae* hsp70 multigene family. *Genome.* 1989;31(2):684-9.
48. Werner-Washburne M, Stone DE, Craig EA. Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1987;7(7):2568-77.
49. Tavaría M, Gabriele T, Kola I, Anderson RL. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones.* 1996;1(1):23-8.
50. Hartl FU, Martin J, Neupert W. Protein folding in the cell: the role of molecular chaperones Hsp70 and Hsp60. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1992;21:293-322.
51. Bukau B, Weissman J, Horwich A. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell.* 2006;125(3):443-51.
52. Chappell TG, Konforti BB, Schmid SL, Rothman JE. The ATPase core of a clathrin uncoating protein. *J Biol Chem.* 1987;262(2):746-51.
53. Daugaard M, Kirkegaard-Sorensen T, Ostensfeld MS, Aaboe M, Hoyer-Hansen M, Orntoft TF, et al. Lens epithelium-derived growth factor is an Hsp70-2 regulated guardian of lysosomal stability in human cancer. *Cancer Res.* 2007;67(6):2559-67.
54. Munro S, Pelham HR. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell.* 1987;48(5):899-907.
55. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet.* 1988;22:631-77.
56. Hightower LE. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell.* 1991;66(2):191-7.
57. Milner CM, Campbell RD. Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics.* 1990;32(4):242-51.
58. Anckar J, Sistonen L. Heat shock factor 1 as a coordinator of stress and developmental pathways. *Adv Exp Med Biol.* 2007;594:78-88.
59. Milarski KL, Morimoto RI. Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(24):9517-21.
60. Greene JM, Larin Z, Taylor IC, Prentice H, Gwinn KA, Kingston RE. Multiple basal elements of a human hsp70 promoter function differently in human and rodent cell lines. *Mol Cell Biol.* 1987;7(10):3646-55.
61. Jaattela M. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med.* 1999;31(4):261-71.
62. Freedman RB, Hirst TR, Tuite MF. Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem Sci.* 1994;19(8):331-6.
63. Cyr DM, Langer T, Douglas MG. DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem Sci.* 1994;19(4):176-81.
64. Minami Y, Hohfeld J, Ohtsuka K, Hartl FU. Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40. *J Biol Chem.* 1996;271(32):19617-24.
65. Bozidis P, Lazaridis I, Pagoulatos GN, Angelidis CE. MydJ2 as a potent partner of hsc70 in mammalian cells. *Eur J Biochem.* 2002;269(5):1553-60.
66. Benaroudj N, Triniolles F, Ladjimi MM. Effect of nucleotides, peptides, and unfolded proteins on the self-association of the molecular chaperone HSC70. *J Biol Chem.* 1996;271(31):18471-6.
67. Angelidis CE, Lazaridis I, Pagoulatos GN. Aggregation of hsp70 and hsc70 in vivo is distinct and temperature-dependent and their chaperone function is directly related to non-aggregated forms. *Eur J Biochem.* 1999;259(1-2):505-12.

68. Jaattela M, Wissing D. Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of self-protection. *J Exp Med.* 1993;177(1):231-6.
69. Mestril R, Chi SH, Sayen MR, O'Reilly K, Dillmann WH. Expression of inducible stress protein 70 in rat heart myogenic cells confers protection against simulated ischemia-induced injury. *J Clin Invest.* 1994;93(2):759-67.
70. Marber MS, Mestril R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, Dillmann WH. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest.* 1995;95(4):1446-56.
71. Wissing D, Jaattela M. HSP27 and HSP70 increase the survival of WEHI-S cells exposed to hyperthermia. *Int J Hyperthermia.* 1996;12(1):125-38.
72. Bellmann K, Jaattela M, Wissing D, Burkart V, Kolb H. Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Lett.* 1996;391(1-2):185-8.
73. Amin V, Cumming DV, Latchman DS. Over-expression of heat shock protein 70 protects neuronal cells against both thermal and ischaemic stress but with different efficiencies. *Neurosci Lett.* 1996;206(1):45-8.
74. Chong KY, Lai CC, Lille S, Chang C, Su CY. Stable overexpression of the constitutive form of heat shock protein 70 confers oxidative protection. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30(3):599-608.
75. Kwak HJ, Jun CD, Pae HO, Yoo JC, Park YC, Choi BM, et al. The role of inducible 70-kDa heat shock protein in cell cycle control, differentiation, and apoptotic cell death of the human myeloid leukemic HL-60 cells. *Cell Immunol.* 1998;187(1):1-12.
76. Angelidis CE, Lazaridis I, Pagoulatos GN. Constitutive expression of heat-shock protein 70 in mammalian cells confers thermoresistance. *Eur J Biochem.* 1991;199(1):35-9.
77. Samali A, Cotter TG. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp Cell Res.* 1996;223(1):163-70.
78. Plumier JC, Krueger AM, Currie RW, Kontoyiannis D, Kollias G, Pagoulatos GN. Transgenic mice expressing the human inducible Hsp70 have hippocampal neurons resistant to ischemic injury. *Cell Stress Chaperones.* 1997;2(3):162-7.
79. Plumier JC, Ross BM, Currie RW, Angelidis CE, Kazlaris H, Kollias G, et al. Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *J Clin Invest.* 1995;95(4):1854-60.
80. Nollen EA, Brunsting JF, Roelofsen H, Weber LA, Kampinga HH. In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol Cell Biol.* 1999;19(3):2069-79.
81. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, et al. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2000;20(19):7146-59.
82. Hut HM, Kampinga HH, Sibon OC. Hsp70 protects mitotic cells against heat-induced centrosome damage and division abnormalities. *Mol Biol Cell.* 2005;16(8):3776-85.
83. Hwang JH, Ryu JK, Yoon YB, Lee KH, Park YS, Kim JW, et al. Spontaneous activation of pancreas trypsinogen in heat shock protein 70.1 knock-out mice. *Pancreas.* 2005;31(4):332-6.
84. Buzzard KA, Giaccia AJ, Killender M, Anderson RL. Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1998;273(27):17147-53.
85. Jaattela M, Wissing D, Bauer PA, Li GC. Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *The EMBO journal.* 1992;11(10):3507-12.
86. Williams RS, Thomas JA, Fina M, German Z, Benjamin IJ. Human heat shock protein 70 (hsp70) protects murine cells from injury during metabolic stress. *J Clin Invest.* 1993;92(1):503-8.
87. Karlseder J, Wissing D, Holzer G, Orel L, Sliutz G, Auer H, et al. HSP70 overexpression mediates the escape of a doxorubicin-induced G2 cell cycle arrest. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;220(1):153-9.

88. Simon MM, Reikerstorfer A, Schwarz A, Krone C, Luger TA, Jaattela M, et al. Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *J Clin Invest.* 1995;95(3):926-33.
89. Nylandsted J, Brand K, Jaattela M. Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;926:122-5.
90. Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J, Jaattela M. Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev.* 2005;19(5):570-82.
91. Nylandsted J, Jaattela M. [Heat shock protein 70: an important survival factor for cancer cells]. *Ugeskr Laeger.* 2004;166(37):3184-6.
92. Gyrd-Hansen M, Nylandsted J, Jaattela M. Heat shock protein 70 promotes cancer cell viability by safeguarding lysosomal integrity. *Cell Cycle.* 2004;3(12):1484-5.
93. Bivik C, Rosdahl I, Ollinger K. Hsp70 protects against UVB induced apoptosis by preventing release of cathepsins and cytochrome c in human melanocytes. *Carcinogenesis.* 2007;28(3):537-44.
94. Mambula SS, Calderwood SK. Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes. *J Immunol.* 2006;177(11):7849-57.
95. Doulias PT, Kotoglou P, Tenopoulou M, Keramisanou D, Tzavaras T, Brunk U, et al. Involvement of heat shock protein-70 in the mechanism of hydrogen peroxide-induced DNA damage: the role of lysosomes and iron. *Free Radic Biol Med.* 2007;42(4):567-77.
96. Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(8):589-98.
97. Kroemer G, Jaattela M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(11):886-97.
98. Welch WJ, Feramisco JR. Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat-shocked mammalian cells. *J Biol Chem.* 1984;259(7):4501-13.
99. Rubbi CP, Milner J. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO J.* 2003;22(22):6068-77.
100. Nollen EA, Salomons FA, Brunsting JF, van der Want JJ, Sibon OC, Kampinga HH. Dynamic changes in the localization of thermally unfolded nuclear proteins associated with chaperone-dependent protection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(21):12038-43.
101. Kotoglou P, Kalaitzakis A, Vezyraki P, Tzavaras T, Michalis LK, Dantzer F, et al. Hsp70 translocates to the nuclei and nucleoli, binds to XRCC1 and PARP-1, and protects HeLa cells from single-strand DNA breaks. *Cell Stress Chaperones.* 2009;14(4):391-406.
102. Bonnycastle LL, Yu CE, Hunt CR, Trask BJ, Clancy KP, Weber JL, et al. Cloning, sequencing, and mapping of the human chromosome 14 heat shock protein gene (HSPA2). *Genomics.* 1994;23(1):85-93.
103. Son WY, Han CT, Hwang SH, Lee JH, Kim S, Kim YC. Repression of hspA2 messenger RNA in human testes with abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril.* 2000;73(6):1138-44.
104. Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Poorman-Allen P, Mori C, Blizard DR, et al. HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development.* 1997;124(22):4595-603.
105. Hendershot LM, Valentine VA, Lee AS, Morris SW, Shapiro DN. Localization of the gene encoding human BiP/GRP78, the endoplasmic reticulum cognate of the HSP70 family, to chromosome 9q34. *Genomics.* 1994;20(2):281-4.
106. Gething MJ. Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol.* 1999;10(5):465-72.
107. Leung TK, Hall C, Rajendran M, Spurr NK, Lim L. The human heat-shock genes HSPA6 and HSPA7 are both expressed and localize to chromosome 1. *Genomics.* 1992;12(1):74-9.

108. Parsian AJ, Sheren JE, Tao TY, Goswami PC, Malyapa R, Van Rheeden R, et al. The human Hsp70B gene at the HSPA7 locus of chromosome 1 is transcribed but non-functional. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1494(1-2):201-5.
109. Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, et al. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(16):6062-7.
110. Dworniczak B, Mirault ME. Structure and expression of a human gene coding for a 71 kd heat shock 'cognate' protein. *Nucleic Acids Res*. 1987;15(13):5181-97.
111. Florin L, Becker KA, Sapp C, Lambert C, Sirma H, Muller M, et al. Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires Hsc70. *J Virol*. 2004;78(11):5546-53.
112. Matsui H, Asou H, Inaba T. Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by heat-shock cognate protein 70. *Mol Cell*. 2007;25(1):99-112.
113. Domanico SZ, DeNagel DC, Dahlseid JN, Green JM, Pierce SK. Cloning of the gene encoding peptide-binding protein 74 shows that it is a new member of the heat shock protein 70 family. *Mol Cell Biol*. 1993;13(6):3598-610.
114. Bhattacharyya T, Karnezis AN, Murphy SP, Hoang T, Freeman BC, Phillips B, et al. Cloning and subcellular localization of human mitochondrial hsp70. *J Biol Chem*. 1995;270(4):1705-10.
115. Deocaris CC, Kaul SC, Wadhwa R. On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60. *Cell Stress Chaperones*. 2006;11(2):116-28.
116. Craig EA, Kramer J, Shilling J, Werner-Washburne M, Holmes S, Kusic-Smithers J, et al. SSC1, an essential member of the yeast HSP70 multigene family, encodes a mitochondrial protein. *Mol Cell Biol*. 1989;9(7):3000-8.
117. Garrido C, Fromentin A, Bonnotte B, Favre N, Moutet M, Arrigo AP, et al. Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones. *Cancer Res*. 1998;58(23):5495-9.
118. Akalin A, Elmore LW, Forsythe HL, Amaker BA, McCollum ED, Nelson PS, et al. A novel mechanism for chaperone-mediated telomerase regulation during prostate cancer progression. *Cancer Res*. 2001;61(12):4791-6.
119. Beere HM, Green DR. Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol*. 2001;11(1):6-10.
120. Wei YQ, Zhao X, Kariya Y, Teshigawara K, Uchida A. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat-shock protein (HSP) 70 expression in tumor cells. *Cancer Immunol Immunother*. 1995;40(2):73-8.
121. Caporale LH. Chance favors the prepared genome. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;870:1-21.
122. Brozovic A, Simaga S, Osmak M. Induction of heat shock protein 70 in drug-resistant cells by anticancer drugs and hyperthermia. *Neoplasma*. 2001;48(2):99-103.
123. Nylandsted J, Rohde M, Brand K, Bastholm L, Elling F, Jaattela M. Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(14):7871-6.
124. Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, Fehrenbacher N, Lademann U, Hoyer-Hansen M, et al. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J Exp Med*. 2004;200(4):425-35.
125. Creagh EM, Sheehan D, Cotter TG. Heat shock proteins--modulators of apoptosis in tumour cells. *Leukemia*. 2000;14(7):1161-73.
126. Takayama S, Reed JC, Homma S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene*. 2003;22(56):9041-7.
127. Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol*. 2000;2(8):476-83.
128. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*. 2007;87(1):99-163.

129. Gabai VL, Mabuchi K, Mosser DD, Sherman MY. Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2002;22(10):3415-24.
130. Yaglom JA, Gabai VL, Sherman MY. High levels of heat shock protein Hsp72 in cancer cells suppress default senescence pathways. *Cancer Res.* 2007;67(5):2373-81.
131. Braig M, Schmitt CA. Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. *Cancer Res.* 2006;66(6):2881-4.
132. Trost TM, Lausch EU, Fees SA, Schmitt S, Enklaar T, Reutzel D, et al. Premature senescence is a primary fail-safe mechanism of ERBB2-driven tumorigenesis in breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 2005;65(3):840-9.
133. Prendergast GC. Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene.* 1999;18(19):2967-87.
134. Perez-Sala D, Rebollo A. Novel aspects of Ras proteins biology: regulation and implications. *Cell Death Differ.* 1999;6(8):722-8.
135. Eischen CM, Weber JD, Roussel MF, Sherr CJ, Cleveland JL. Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev.* 1999;13(20):2658-69.
136. Frisch SM. E1a induces the expression of epithelial characteristics. *J Cell Biol.* 1994;127(4):1085-96.
137. Meredith JE, Jr., Fazeli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell.* 1993;4(9):953-61.
138. Grossmann J. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis.* 2002;7(3):247-60.
139. Gniadecki R, Jemec GB, Thomsen BM, Hansen M. Relationship between keratinocyte adhesion and death: anoikis in acantholytic diseases. *Arch Dermatol Res.* 1998;290(10):528-32.
140. Behrens J, Frixen U, Schipper J, Weidner M, Birchmeier W. Cell adhesion in invasion and metastasis. *Semin Cell Biol.* 1992;3(3):169-78.
141. Gilmore AP. Anoikis. *Cell Death Differ.* 2005;12 Suppl 2:1473-7.
142. Frisch SM, Ruoslahti E. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9(5):701-6.
143. Alahari SK, Reddig PJ, Juliano RL. Biological aspects of signal transduction by cell adhesion receptors. *Int Rev Cytol.* 2002;220:145-84.
144. Aoudjit F, Vuori K. Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene.* 2001;20(36):4995-5004.
145. Kim YN, Koo KH, Sung JY, Yun UJ, Kim H. Anoikis resistance: an essential prerequisite for tumor metastasis. *Int J Cell Biol.* 2012;2012:306879.
146. P Friedl KW. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer.* 2003.
147. J. J Bravo-cordero LH, J Condeelis. Directed cell invasion and migration during metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 2011.
148. Hernández-Caballero M. Molecular Mechanisms of Metastasis: Epithelial-Mesenchymal Transition, Anoikis and Loss Adhesion. "Carcinogenesis", book edited by Kathryn Tonissen, ISBN 978-953-51-0945-7. 1013.
149. Rorth P. Whence directionality: guidance mechanisms in solitary and collective cell migration. *Dev Cell.* 2011;20(1):9-18.
150. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 2003;302(5651):1704-9.
151. Yoshida K, Soldati T. Dissection of amoeboid movement into two mechanically distinct modes. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 18):3833-44.
152. Abraham VC, Krishnamurthi V, Taylor DL, Lanni F. The actin-based nanomachine at the leading edge of migrating cells. *Biophys J.* 1999;77(3):1721-32.
153. Dunn GA, Zicha D. Dynamics of fibroblast spreading. *J Cell Sci.* 1995;108 (Pt 3):1239-49.

154. Panteleakou Z, Lembessis P, Sourla A, Pissimissis N, Polyzos A, Deliveliotis C, et al. Detection of circulating tumor cells in prostate cancer patients: methodological pitfalls and clinical relevance. *Mol Med*. 2009;15(3-4):101-14.
155. Sakamoto S, McCann RO, Dhir R, Kyprianou N. Talin1 promotes tumor invasion and metastasis via focal adhesion signaling and anoikis resistance. *Cancer Res*. 2010;70(5):1885-95.
156. Halder G, Johnson RL. Hippo signaling: growth control and beyond. *Development*. 2011;138(1):9-22.
157. Tan W, Zhang W, Strasner A, Grivennikov S, Cheng JQ, Hoffman RM, et al. Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature*. 2011;470(7335):548-53.
158. DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, Vasquez L, Tawfik D, Kolhatkar N, et al. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell*. 2009;16(2):91-102.
159. Zhao B, Li L, Wang L, Wang CY, Yu J, Guan KL. Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev*. 2012;26(1):54-68.
160. Lamar JM, Stern P, Liu H, Schindler JW, Jiang ZG, Hynes RO. The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(37):E2441-50.
161. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*. 2005;12 Suppl 2:1463-7.
162. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30:87.
163. Kumar R, Vadlamudi RK, Adam L. Apoptosis in mammary gland and cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2000;7(4):257-69.
164. Giannoni E, Buricchi F, Grimaldi G, Parri M, Cialdai F, Taddei ML, et al. Redox regulation of anoikis: reactive oxygen species as essential mediators of cell survival. *Cell Death Differ*. 2008;15(5):867-78.
165. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*. 1995;154(1):8-20.
166. Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1417-9.
167. Willis BC, Borok Z. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293(3):L525-34.
168. Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 2005;166(5):1321-32.
169. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420-8.
170. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1776-84.
171. Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1438-49.
172. Zavadil J, Haley J, Kalluri R, Muthuswamy SK, Thompson E. Epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*. 2008;68(23):9574-7.
173. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704-15.

174. Kabashima A, Higuchi H, Takaishi H, Matsuzaki Y, Suzuki S, Izumiya M, et al. Side population of pancreatic cancer cells predominates in TGF-beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and invasion. *Int J Cancer*. 2009;124(12):2771-9.
175. Roxburgh SA, Murphy M, Pollock CA, Brazil DP. Recapitulation of embryological programmes in renal fibrosis--the importance of epithelial cell plasticity and developmental genes. *Nephron Physiol*. 2006;103(3):p139-48.
176. Cates JM, Byrd RH, Fohn LE, Tatsas AD, Washington MK, Black CC. Epithelial-mesenchymal transition markers in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas*. 2009;38(1):e1-6.
177. Roxanis I. Occurrence and significance of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Journal of clinical pathology*. 2013;66(6):517-21.
178. Hajra KM, Fearon ER. Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002;34(3):255-68.
179. Derycke LD, Bracke ME. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol*. 2004;48(5-6):463-76.
180. Islam S, Kim JB, Trendel J, Wheelock MJ, Johnson KR. Vimentin expression in human squamous carcinoma cells: relationship with phenotypic changes and cadherin-based cell adhesion. *J Cell Biochem*. 2000;78(1):141-50.
181. Singh S, Sadacharan S, Su S, Belldegrun A, Persad S, Singh G. Overexpression of vimentin: role in the invasive phenotype in an androgen-independent model of prostate cancer. *Cancer Res*. 2003;63(9):2306-11.
182. Wei J, Xu G, Wu M, Zhang Y, Li Q, Liu P, et al. Overexpression of vimentin contributes to prostate cancer invasion and metastasis via src regulation. *Anticancer Res*. 2008;28(1A):327-34.
183. Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays*. 2001;23(10):912-23.
184. Sun Y, Song GD, Sun N, Chen JQ, Yang SS. Slug overexpression induces stemness and promotes hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis. *Oncol Lett*. 2014;7(6):1936-40.
185. Yang J, Zhu T, Liu X, Zhang L, Yang Y, Zhang J, et al. Heat shock protein 70 protects rat peritoneal mesothelial cells from advanced glycation end-products-induced epithelial-to-mesenchymal transition through mitogenactivated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases and transforming growth factor-beta/Smad pathways. *Mol Med Rep*. 2015;11(6):4473-81.
186. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992;358(6381):15-6.
187. Yee KS, Vousden KH. Complicating the complexity of p53. *Carcinogenesis*. 2005;26(8):1317-22.
188. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(5):402-12.
189. Green DR, Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*. 2009;458(7242):1127-30.
190. Vogelstein B LD, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000;408(6810):307-10.
191. Zilfou JT, Lowe SW. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(5):a001883.
192. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, et al. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*. 1993;362(6423):849-52.
193. Lowe SW, Ruley HE. Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev*. 1993;7(4):535-45.
194. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*. 2003;22(56):9030-40.
195. Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Kuwana T, Newmeyer DD, Green DR. PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science*. 2005;309(5741):1732-5.
196. Lane D. Awakening angels. *Nature*. 1998;394(6694):616-7.

197. Hupp TR. Regulation of p53 protein function through alterations in protein-folding pathways. *Cell Mol Life Sci.* 1999;55(1):88-95.
198. Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol.* 1999;187(1):112-26.
199. Appella E, Anderson CW. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem.* 2001;268(10):2764-72.
200. Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res.* 2000;77:81-137.
201. Zilfou JT, Hoffman WH, Sank M, George DL, Murphy M. The corepressor mSin3a interacts with the proline-rich domain of p53 and protects p53 from proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol.* 2001;21(12):3974-85.
202. Murphy ME. The thousand doors that lead to death: p53-dependent repression and apoptosis. *Cancer Biol Ther.* 2003;2(4):381-2.
203. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell.* 1992;69(7):1237-45.
204. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature.* 1997;387(6630):296-9.
205. Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature.* 1997;387(6630):299-303.
206. Roth J, Dobbelstein M, Freedman DA, Shenk T, Levine AJ. Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *EMBO J.* 1998;17(2):554-64.
207. Tao W, Levine AJ. Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(6):3077-80.
208. Lu W, Pochampally R, Chen L, Traidej M, Wang Y, Chen J. Nuclear exclusion of p53 in a subset of tumors requires MDM2 function. *Oncogene.* 2000;19(2):232-40.
209. Stommel JM, Marchenko ND, Jimenez GS, Moll UM, Hope TJ, Wahl GM. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J.* 1999;18(6):1660-72.
210. Engel K, Kotlyarov A, Gaestel M. Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation. *EMBO J.* 1998;17(12):3363-71.
211. Jayaraman L, Prives C. Covalent and noncovalent modifiers of the p53 protein. *Cell Mol Life Sci.* 1999;55(1):76-87.
212. Takahashi K, Suzuki K. Association of insulin-like growth-factor-I-induced DNA synthesis with phosphorylation and nuclear exclusion of p53 in human breast cancer MCF-7 cells. *Int J Cancer.* 1993;55(3):453-8.
213. Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science.* 1998;281(5383):1674-7.
214. Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, et al. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science.* 1998;281(5383):1677-9.
215. Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 1997;91(3):325-34.
216. Knippschild U, Oren M, Deppert W. Abrogation of wild-type p53 mediated growth-inhibition by nuclear exclusion. *Oncogene.* 1996;12(8):1755-65.
217. Moll UM, Ostermeyer AG, Haladay R, Winkfield B, Frazier M, Zambetti G. Cytoplasmic sequestration of wild-type p53 protein impairs the G1 checkpoint after DNA damage. *Mol Cell Biol.* 1996;16(3):1126-37.
218. Ryan JJ, Prochownik E, Gottlieb CA, Apel IJ, Merino R, Nunez G, et al. c-myc and bcl-2 modulate p53 function by altering p53 subcellular trafficking during the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(13):5878-82.

219. Moll UM, Riou G, Levine AJ. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(15):7262-6.
220. Moll UM, LaQuaglia M, Benard J, Riou G. Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(10):4407-11.
221. Bosari S, Viale G, Roncalli M, Graziani D, Borsani G, Lee AK, et al. p53 gene mutations, p53 protein accumulation and compartmentalization in colorectal adenocarcinoma. *Am J Pathol.* 1995;147(3):790-8.
222. Gorlich D, Mattaj IW. Nucleocytoplasmic transport. *Science.* 1996;271(5255):1513-8.
223. Weis K. Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus. *Trends Biochem Sci.* 1998;23(5):185-9.
224. Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell.* 1997;90(6):1051-60.
225. Kudo N, Khochbin S, Nishi K, Kitano K, Yanagida M, Yoshida M, et al. Molecular cloning and cell cycle-dependent expression of mammalian CRM1, a protein involved in nuclear export of proteins. *J Biol Chem.* 1997;272(47):29742-51.
226. Stade K, Ford CS, Guthrie C, Weis K. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell.* 1997;90(6):1041-50.
227. Shaulsky G, Goldfinger N, Ben-Ze'ev A, Rotter V. Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol.* 1990;10(12):6565-77.
228. Dang CV, Lee WM. Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myc, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins. *J Biol Chem.* 1989;264(30):18019-23.
229. Liang SH, Clarke MF. The nuclear import of p53 is determined by the presence of a basic domain and its relative position to the nuclear localization signal. *Oncogene.* 1999;18(12):2163-6.
230. Liang SH, Hong D, Clarke MF. Cooperation of a single lysine mutation and a C-terminal domain in the cytoplasmic sequestration of the p53 protein. *J Biol Chem.* 1998;273(31):19817-21.
231. Kudo N, Wolff B, Sekimoto T, Schreiner EP, Yoneda Y, Yanagida M, et al. Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res.* 1998;242(2):540-7.
232. Marine JC. p53 stabilization: the importance of nuclear import. *Cell Death Differ.* 2010;17(2):191-2.
233. Scherl A, Coute Y, Deon C, Calle A, Kindbeiter K, Sanchez JC, et al. Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol Biol Cell.* 2002;13(11):4100-9.
234. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
235. Pahl HL, Burn TC, Tenen DG. Optimization of transient transfection into human myeloid cell lines using a luciferase reporter gene. *Exp Hematol.* 1991;19(10):1038-41.
236. Kobayashi T, Takematsu H, Yamaji T, Hiramoto S, Kozutsumi Y. Disturbance of sphingolipid biosynthesis abrogates the signaling of Mss4, phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, in yeast. *J Biol Chem.* 2005;280(18):18087-94.
237. Givan AL. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol.* 2004;263:1-32.
238. Dressel R, Johnson JP, Gunther E. Heterogeneous patterns of constitutive and heat shock induced expression of HLA-linked HSP70-1 and HSP70-2 heat shock genes in human melanoma cell lines. *Melanoma Res.* 1998;8(6):482-92.
239. Tan C, Tasaka H, Yu KP, Murphy ML, Karnofsky DA. Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer.* 1967;20(3):333-53.

240. Momparler RL, Siegel S, Avila F, Lee T, Karon M. Effect of tRNA from 5-azacytidine-treated hamster fibrosarcoma cells on protein synthesis in vitro in a cell-free system. *Biochem Pharmacol.* 1976;25(4):389-92.
241. Ito K, Nakazato T, Yamato K, Miyakawa Y, Yamada T, Hozumi N, et al. Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: implication of phosphorylation of p53 at Ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer Res.* 2004;64(3):1071-8.
242. She QB, Bode AM, Ma WY, Chen NY, Dong Z. Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer Res.* 2001;61(4):1604-10.
243. O'Brate A, Giannakakou P. The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code? *Drug Resist Updat.* 2003;6(6):313-22.
244. Aigner K DB, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M, Mikulits W, Brabletz T, Strand D, Obrist P, Sommergruber W, Schweifer N, Wernitznig A, Beug H, Foisner R, Eger A. The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene.* 2007(26):6979-88.
245. Peinado H OD, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.* 2007 (6):415-28.
246. Moreno-Bueno G, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene.* 2008;27(55):6958-69.
247. Wheelock MJ, Johnson KR. Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003;19:207-35.
248. Christofori G. Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression. *EMBO J.* 2003;22(10):2318-23.
249. Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K. Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1014:155-63.
250. Inukai T, Inoue A, Kurosawa H, Goi K, Shinjyo T, Ozawa K, et al. SLUG, a ces-1-related zinc finger transcription factor gene with antiapoptotic activity, is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein. *Mol Cell.* 1999;4(3):343-52.
251. Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 3):499-511.
252. Turner FE, Broad S, Khanim FL, Jeanes A, Talma S, Hughes S, et al. Slug regulates integrin expression and cell proliferation in human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem.* 2006;281(30):21321-31.
253. Ruoslahti E. Cell adhesion and tumor metastasis. *Princess Takamatsu Symp.* 1994;24:99-105.
254. Simpson CD, Anyiwe K, Schimmer AD. Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Lett.* 2008;272(2):177-85.
255. Frisch SM, Screaton RA. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13(5):555-62.
256. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
257. Ghosh A, Chen TC, Kapila YL. Anoikis triggers Mdm2-dependent p53 degradation. *Mol Cell Biochem.* 2010;343(1-2):201-9.
258. Cui CW, Yang SJ, Liu YP, Liu YF. [Interaction between p53 and HSP70 in human hepatocellular carcinoma tissues]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2003;19(2):195-6.
259. Moll UM, Petrenko O. The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res.* 2003;1(14):1001-8.
260. Naka KK, Vezyraki P, Kalaitzakis A, Zerikiotis S, Michalis L, Angelidis C. Hsp70 regulates the doxorubicin-mediated heart failure in Hsp70-transgenic mice. *Cell Stress Chaperones.* 2014;19(6):853-64.

261. Mendez MG, Kojima S, Goldman RD. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2010;24(6):1838-51.
262. Hu L, Lau SH, Tzang CH, Wen JM, Wang W, Xie D, et al. Association of Vimentin overexpression and hepatocellular carcinoma metastasis. *Oncogene*. 2004;23(1):298-302.