



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

***Ο ρόλος των σηματοδοτικών πορειών του NF-κΒ
στις αποκρίσεις καρκινικών κυττάρων στο
χημειοθεραπευτικό παράγοντα ετοποσίδιο***

Τασιούλα Αλεξία
Πτυχιούχος Βιολογίας ΕΚΠΑ

Επιβλέπων: Ευάγγελος Κωλέτσας
Αναπληρωτής Καθηγητής
Μοριακής Κυτταρικής Βιολογίας
Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας
Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ιωάννινα 2017

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στα πλαίσια του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος «Βιοτεχνολογία», 2014-1016.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Κυτταρικής Βιολογίας κ. Κωλέττα Ευάγγελο, για την εποπτεία του στην παρούσα εργασία, αλλά κυρίως για την άμεση συμβολή του κατά τη διάρκεια της εργασίας, το αμείωτο ενδιαφέρον του, την ενθάρρυνση και τη συνεχή καθοδήγηση του.

Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή Βιολογικής Χημείας κ. Ευστάθιο Φριλίγγο και πρόεδρο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετάσχω στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα.

Ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα μέλη του εργαστηρίου τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Δρ. Γεώργιο Μαρκόπουλο, την υποψήφια διδάκτωρ Ρουπακιά Ευγενία και τον μεταπτυχιακό φοιτητή Κακανιάρη Νίκο για την καθοδήγησή τους καθώς και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερω την οικογένειά μου, που με βοήθησε και με στήριξε σ' αυτήν την προσπάθεια. Τους ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη τους στις δυνατότητες και ικανότητές μου, αλλά και για την αρωγή που μου παρείχαν σε πνεύμα ελευθερίας, προκειμένου να ακολουθήσω τα όνειρά μου.

Περίληψη

Ποικιλία εξωκυττάρων αλλά και ενδοκυττάρων ερεθισμάτων θέτουν συχνά σε κίνδυνο την ακεραιότητα του γενετικού υλικού των κυττάρων, αυξάνοντας την πιθανότητα νεοπλασίας. Οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB και E2F που απορρυθμίζονται στην καρκινογένεση, ρυθμίζουν διαφορετικά και πολλές φορές ανταγωνιστικά, γονίδια-στόχους που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου αλλά και στις αποκρίσεις του κυττάρου σε βλάβες του DNA. Ενώ ο NF-κB γενικά προάγει την κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό, οι E2Fs δρουν τόσο ως θετικοί όσο και ως αρνητικοί ρυθμιστές της κυτταρικής επιβίωσης. Ωστόσο, οι μηχανισμοί που οδηγούν στη συντονισμένη δράση αυτών των δύο οικογενειών μεταγραφικών παραγόντων ως απόκριση σε γενετοξικά ερεθίσματα δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί.

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου των σηματοδοτικών πορειών ενεργοποίησης του NF-κB στην έκφραση γονιδίων που ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και την απόκριση σε βλάβες του DNA, μεταξύ των οποίων και γονιδίων στόχων των E2Fs και miRNAs, ως απόκριση σε γενετοξικά ερεθίσματα σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC). Για το σκοπό αυτό, κατασκευάστηκαν κυτταρικές σειρές με τη χρήση λεντι-ϊικών φορέων που έφεραν shRNA για τις κινάσες ενεργοποίησης του NF-κB, IKKα ή IKKβ, αλλά και RelA/p65.

Αρχικά, καταδείχθηκε ότι ο χημειοθεραπευτικός παράγοντας ετοποσιδίιο (VP16) επήγαγε αμφίκλωνες ρήξεις στο DNA που οδήγησαν στη διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου, και ιδιαίτερα στη συσσώρευση των ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα στη φάση G₂/M του κυτταρικού κύκλου, διαμέσου της μεταβολής της έκφρασης πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μεταξύ των οποίων η CcnD1, η Cdc6, οι E2F1-6, η p53 και οι p21^{Cip1} και p27^{kip1}.

Επίσης καταδείχθηκε ότι το ετοποσιδίιο επαύξησε τη μεταγραφική ενεργότητα της κανονικής πορείας του NF-κB στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα με την ακόλουθη σειρά που εξαρτάται από το βαθμό ενεργοποίησης: H1437 > H1792 > H1299 ≥ A549. Στα κύτταρα A549 και H1299 η ενεργοποίηση του NF-κB ήταν μικρότερη, πιθανά λόγω της ιδιοστατικής έκφρασης/ενεργότητας του NF-κB στα συγκεκριμένα κύτταρα.

Επιπλέον, καταδείξαμε ότι η μειορρύθμιση της κινάσης IKKα επιβράδυνε την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου όλων των καρκινικών σειρών, πιθανά διαμέσου της μεταβολής της έκφρασης γονιδίων-στόχων των μεταγραφικών παραγόντων E2F.

Σε αντίθεση η κανονική σηματοδοτική πορεία IKKβ-RelA/p65 επιβράδυνε την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου όλων των καρκινικών σειρών, πιθανά διαμέσου της μεταβολής της έκφρασης συγκεκριμένων NF-κB ρυθμιζόμενων miRNAs, όπως miR-32 και miR-582-5p. Επιπλέον, η κανονική σηματοδοτική πορεία IKKβ-RelA/p65 ρυθμίζει την έκφραση μιας σειράς miRNAs, και ιδιαίτερα των miR-342-3p και miR-378i κάτω από συνθήκες πρόκλησης βλαβών στο DNA.

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή κατέδειξε την ύπαρξη ενός ρυθμιστικού δικτύου NF-κB-miRNA που εμπλέκεται στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και στις αποκρίσεις σε βλάβες στο DNA ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα.

SUMMARY

Genomic integrity is challenged by DNA damage from both endogenous and environmental sources, raising the possibility for cancer development. The NF- κ B and E2F families of transcription factors that are often subject to deregulation in cancer, differentially control gene expression of target genes that are involved in cell cycle progression and regulation of the DNA damage responses. While NF- κ Bs generally promote cell proliferation and survival, E2Fs can act as either transcriptional activators or suppressors of cell growth; yet the mechanisms allowing for concerted actions of NF- κ Bs and E2Fs in response to genotoxic stimuli in cancer cells remain poorly understood.

Here, we aimed to investigate the role of NF- κ B signaling pathways on the regulation of genes controlling cell cycle progression and DNA damage responses, including E2Fs target genes and miRNAs, in response to genotoxic stimuli in human epithelial lung cancer cells. To this end we constructed stable human lung cancer cell lines bearing shRNAs to either IKK α or IKK β and also RelA/p65.

First, we showed that treatment of non small cell lung cancer (NSCLC) cells with etoposide (VP16) resulted in DNA double strand breaks leading to G₂/M cell cycle phase, of all cancer cells, irrespective of their p53 status. This was due to the changes in the expression of proteins involved in cell cycle progression, including CcnD1, Cdc6, E2F1-6, p53, p21^{Cip1} and p27^{kip1}.

Next, we analyzed the NF- κ B transcriptional activity and showed that all cancer cells treated with VP16 increased the canonical NF- κ B transcriptional activity, to different extent such as H1437 > H1792 > H1299 \geq A549. The activation of NF- κ B in A549 and H1299 was less profound probably because of the constitutive expression/activity of NF- κ B in these cell types.

Finally, we showed that down regulation of IKK α slowed down cell cycle progression of all cancer cell lines. That probably happened because of the expression of transcription factors E2F target genes.

In contrast, the down-regulation of the canonical IKK β -RelA/p65 signaling pathway activity reduced the proliferation of all human lung cancer cell lines, most likely because of the expression of specific NF- κ B-regulated miRNAs, such as miR-32 and miR-582-5p, both of which were shown to inhibit lung cancer cell proliferation and tumor growth. Moreover, the canonical signaling pathway IKK β -RelA/p65 regulates the expression of miRNAs in response to DNA damage, and in particular the expression of miR-342-3p and miR-378i.

Hence, we identified canonical NF- κ B-regulated miRNAs under both normal conditions and under conditions of chemotherapy induced DNA damage, pointing towards, the operation of a NF- κ B-miRNA regulatory network involved in the control of human lung cancer cell proliferation and DNA damage responses in response to chemotherapy.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
	SUMMARY	4
1.	ΕΝΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΗ – ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1.	Πρόλογος	7
1.2.	Καρκίνος του πνεύμονα	8
1.3.	Εισαγωγή στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου	9
1.4.	Ο ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων E2F και NF-κB στον κυτταρικό κύκλο και την καρκινογένεση	13
1.5.	Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου	15
1.6.	Οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων NF-κB (Nuclear Factor-κB)	21
1.7.	Ο ρόλος του NF-κB στην καρκινογένεση	28
1.8.	Μεταγραφικό δίκτυο NF-κB – microRNAs	29
1.9.	Σκοπός της μελέτης	32
2.	ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
	ΥΛΙΚΑ	33
	ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1.	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	
	2.1.1. Παρασκευή L-broth (Luria-Bertani; LB) και τρυβλίων με L-άγαρ (L-agar)	34
	2.1.2. Παρασκευή βακτηρίων επιδεκτικών προς μετασχηματισμό (competent cells)	34
	2.1.3. Μετασχηματισμός βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA	35
	2.1.4. Ανάπτυξη υγρών καλλιέργειών βακτηρίων	35
	2.1.5. Παρασκευή βακτηριακών αποθεμάτων γλυκερόλης	35
	2.1.6. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini prep)	35
	2.1.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μέση κλίμακα (midi prep)	36
2.2.	ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	
	2.2.1. Κυτταρικές σειρές και καλλιέργεια	37
	2.2.2. Ανακαλλιέργεια κυττάρων	38
	2.2.3. Διατήρηση των κυττάρων στο υγρό άζωτο	38
	2.2.4. Χορήγηση ετοποσιδίου (VP16) στα κύτταρα	39
	2.2.5. Προσδιορισμός του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής	39
	2.2.6. Πλασμιδιακοί φορείς και διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων	40
	2.2.7. Ανάλυση με γονίδιο αναφοράς NF-κB λουσιφεράσης	41
	2.2.8. Παραγωγή λεντι-ϊικών σωματιδίων και επιμόλυνση κυττάρων θηλαστικών	41
2.3.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΝΑΛΥΣΗ microRNAs	
	2.3.1. Απομόνωση RNA	42
	2.3.2. Ανάλυση microRNAs	43

	2.4.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	
		2.4.1. Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων για την ανάλυση πρωτεϊνών	43
		2.4.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου	44
		2.4.3. Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσο-αποτύπωμα κατά Western (Western blot)	45
3.	ΕΝΟΤΗΤΑ ΤΡΙΤΗ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		
	3.1	Η χορήγηση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα ετοποσιδίου επάγει τη διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου ανθρωπίνων καρκινικών επιθηλιακών κυτταρικών σειρών	47
	3.2.	Έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στις αποκρίσεις των κυττάρων σε βλάβες στο DNA μετά τη χορήγηση ετοποσιδίου	48
	3.3.	Έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στις αποκρίσεις των κυττάρων στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου μετά τη χορήγηση ετοποσιδίου	50
	3.4.	Ενεργοποίηση του NF-κΒ στις ανθρώπινες καρκινικές επιθηλιακές κυτταρικές σειρές πνεύμονα	52
	3.5.	Μειορρύθμιση των ανοδικών κινασών ενεργοποίησης των σηματοδοτικών πορειών του NF-κΒ στα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα	54
	3.6.	Επιπτώσεις της μειορρύθμισης των ΙΚΚα και ΙΚΚβ στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα	55
	3.7.	Οι επιπτώσεις της μειορρύθμισης της ΙΚΚα ή ΙΚΚβ στην έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών σειρών πνεύμονα	57
	3.8.	Χαρακτηρισμός microRNAs που ρυθμίζονται από την κινάση ΙΚΚβ σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα πριν και μετά τη χορήγηση ετοποσιδίου	59
4.	ΕΝΟΤΗΤΑ ΤΕΤΑΡΤΗ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ		
	4.1.	Η διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου των ανθρωπίνων καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων από το χημειοθεραπευτικό παράγοντα ετοποσιδίιο στη φάση G ₂ /M οφείλεται στη μεταβολή της έκφρασης πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου	62
	4.2.	Μεταγραφική ενεργοποίηση του NF-κΒ στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα ως απόκριση σε βλάβες στο DNA	64
	4.3.	Η μειορρύθμιση των ΙΚΚ επηρεάζει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα	65
	4.4.	Διαφορική έκφραση miRNAs που ρυθμίζονται από την κανονική σηματοδοτική πορεία ΙΚΚβ-NF-κΒ πριν και μετά την επαγωγή βλαβών στο DNA	67
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ		69
	ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ		70

ΕΝΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Πρόλογος

Η καρκινογένεση οφείλεται στη συνάθροιση μεταλλάξεων και επιγενετικών τροποποιήσεων με συνέπεια τη διατάραξη της κυτταρικής φυσιολογίας. Οι σηματοδοτικές πορείες των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και E2F ρυθμίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και την κυτταρική επιβίωση και συχνά απορρυθμίζονται στην καρκινογένεση. Αν και ευδιάκριτες, οι δράσεις των NF-κBs και E2Fs μπορεί να είναι συνεργικές, αλλά και ανταγωνιστικές μεταξύ τους. Οι NF-κBs συνήθως προάγουν τον πολλαπλασιασμό, ενώ οι E2Fs δρουν ως μεταγραφικοί ενεργοποιητές ή καταστολείς. Γονίδια που κωδικοποιούν ρυθμιστές της προόδου του κυτταρικού κύκλου και των αποκρίσεων σε βλάβες στο DNA ρυθμίζονται διαφορετικά από τους NF-κBs και E2Fs, αλλά οι μηχανισμοί που συντονίζουν τις δράσεις τους παραμένουν ελάχιστα κατανοητοί. Η μελέτη στοχεύει να μελετήσει το ρόλο των σηματοδοτικών πορειών του IKK/NF-κB, στην έκφραση γονιδίων-στόχων των E2Fs, ως απόκριση σε μιτογόνα και γενετοξικά ερεθίσματα και τον αντίκτυπό τους στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, στις αποκρίσεις σε βλάβες στο DNA και στην καρκινογένεση επιθηλιακών κυττάρων μη-μικροκυτταρικού (NSCLC) καρκίνου του πνεύμονα.

Ο καρκίνος του πνεύμονα χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα που οφείλεται σε γενετικές μεταλλάξεις και επιγενετικές τροποποιήσεις. Αδενοκαρκινώματα μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα οφείλονται σε επιγενετικές και γενετικές μεταβολές όπως σωματικές ογκογόνες μεταλλάξεις στο *K-Ras* και *EGFR* και στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53*. Οι μεταλλάξεις *K-Ras* οδηγούν στην ενεργοποίηση της IKKβ-εξαρτώμενης πορείας του NF-κB και διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών έχουν επιβεβαιώσει το ρόλο της σηματοδοτικής πορείας IKKβ/NF-κB στην καρκινογένεση (55, 63, 78, 139, 187, 195). Αντίθετα, ο ρόλος της IKKα-εξαρτώμενης πορείας παραμένει αινιγματικός καθώς μπορεί να καταστείλει ή να προάγει την καρκινογένεση (55, 78, 139, 187, 195). Οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB (116) και οι E2F (207)

υπερεκφράζονται στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και αποτελούν ένδειξη δυσμενούς πρόγνωσης για επιβίωση. Ενεργοποιούνται επίσης από ογκογόνες *K-Ras* μεταλλάξεις και εμπλέκονται στις κυτταρικές αποκρίσεις σε βλάβες DNA (22, 103, 128, 148, 156).

Εκτός όμως από τη συνάθροιση μεταλλάξεων ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων, των επιγενετικών τροποποιήσεων που οδηγούν στη μεταβολή της έκφρασης γονιδίων και της φυσιολογικής κυτταρικής ομοιόστασης (86), μελέτες κατέδειξαν ότι τα microRNAs (miRNAs or miRs), τα οποία είναι μικρά, μη κωδικά (noncoding; ncRNAs), ενδογενή RNAs ~22 νουκλεοτιδίων, παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και εμπλέκονται σε όλα τα στάδια της πολυσταδιακής διαδικασίας της καρκινογένεσης (69, 100, 173, 211- 213).

1.2. Καρκίνος του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι το δεύτερο σε συχνότητα νεόπλασμα και στα δύο φύλα (μετά τον καρκίνο του μαστού στις γυναίκες και τον καρκίνο του προστάτη στους άνδρες) και ευθύνεται για τους περισσότερους θανάτους από καρκίνο παγκοσμίως. Το τμήμα του πληθυσμού που είναι πιθανότερο να αναπτύξει καρκίνο του πνεύμονα είναι οι άνθρωποι άνω των 50 ετών που έχουν ιστορικό καπνίσματος. Σε αντίθεση με το ποσοστό θνησιμότητας στους άνδρες, το οποίο άρχισε να μειώνεται πάνω από 20 χρόνια πριν, τα ποσοστά θνησιμότητας στις γυναίκες από καρκίνο των πνευμόνων έχουν αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες και μόλις πρόσφατα άρχισαν να σταθεροποιούνται.

Η πιο κοινή αιτία του καρκίνου του πνεύμονα είναι η μακροχρόνια έκθεση στον καπνό, η οποία προκαλεί το 80-90% των καρκίνων του πνεύμονα. Οι μη καπνιστές αντιστοιχούν στο 10-15% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα, που συχνά αποδίδεται σε ένα συνδυασμό γενετικών παραγόντων, στο αέριο ραδόνιο, στον αμίαντο, την ατμοσφαιρική ρύπανση και το παθητικό κάπνισμα.

Οι καρκίνοι του πνεύμονα ταξινομούνται σύμφωνα με τον ιστολογικό τύπο (133). Η ταξινόμηση αυτή έχει σημαντικές συνέπειες στην κλινική διαχείριση και την πρόγνωση της νόσου. Η συντριπτική πλειοψηφία των καρκίνων του πνεύμονα είναι αδενοκαρκινώματα-κακοήθειες που προκύπτουν από επιθηλιακά κύτταρα. Οι δύο ευρείες κατηγορίες του καρκίνου του πνεύμονα είναι ο μικροκυτταρικός καρκίνος

(Small Cell Lung Carcinoma; SCLC) (~13%) και ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC) (~87%) (139). Οι τρεις κύριες υποκατηγορίες του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC) είναι το αδενοκαρκίνωμα (~70%), το καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων (Squamous cell lung carcinoma; ~20%) και των μεγαλοκυττάρων (Large cell lung carcinoma; ~10%) του πνεύμονα (96). Αυτοί οι καρκίνοι αναπτύσσονται γρήγορα και εξαπλώνονται νωρίς στην πορεία της νόσου. Το αδενοκαρκίνωμα συνδέεται στενά με το κάπνισμα (96).

Παρόμοια με πολλές άλλες μορφές καρκίνου, ο καρκίνος του πνεύμονα οφείλεται στη συσσώρευση γενετικών μεταλλάξεων και επιγενετικών τροποποιήσεων (64). Γενετικές ογκογόνες μεταλλάξεις στο πρωτο-ογκογονίδιο *K-ras* είναι υπεύθυνες για το >30% των αδενοκαρκινωμάτων (11, 89), ενώ μεταλλάξεις του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) ανιχνεύθηκαν στο 15-20% των αδενοκαρκινωμάτων. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53*, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17p, επηρεάζεται στο ~50% των περιπτώσεων μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC). Άλλα γονίδια που συχνά είναι μεταλλαγμένα είναι τα *ALK*, *LKB1*, *BRAF*, *PIK3CA* και *c-MET* (89). Βλάβη στα χρωμοσώματα 3p, 5q, 13q, και 17p είναι ιδιαίτερα συχνή σε μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (51).

Προγνωστικοί παράγοντες στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα περιλαμβάνουν τα χαρακτηριστικά όπως: το μέγεθος του όγκου, τον τύπο κυττάρου (ιστολογία), το βαθμό εξάπλωσης (στάδιο), τις μεταστάσεις σε πολλαπλούς λεμφαδένες και την αγγειακή διείσδυση. Η πρόγνωση είναι συνήθως κακή. Από όλους τους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, το 15% των ασθενών επιβιώνει πέντε χρόνια μετά τη διάγνωση (136).

Η θεραπεία για το μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα εξαρτάται από το συγκεκριμένο τύπο κυττάρων του καρκίνου, την εξάπλωση του αλλά και τη φυσική κατάσταση του ασθενούς. Κοινές θεραπείες περιλαμβάνουν χειρουργική επέμβαση, χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία (96).

1.3. Εισαγωγή στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου

Ο κυτταρικός κύκλος ή κύκλος της κυτταρικής διαίρεσης είναι μια σειρά σταδίων ενός ευκαρυωτικού κυττάρου μεταξύ μιας κυτταρικής διαίρεσης και της επόμενης. Επομένως, είναι η διαδικασία με την οποία ένα γονιμοποιημένο ωάριο αναπτύσσεται

σε έναν ώριμο οργανισμό και η διαδικασία με την οποία αναπαράγονται τα κύτταρα και οι ιστοί.

Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου διακρίνονται στη μεσόφαση κατά την οποία το κύτταρο συνθέτει συνεχώς RNA, παράγει πρωτεΐνες και αυξάνει σε μέγεθος. Η μεσόφαση διαιρείται σε 4 στάδια ή φάσεις: G0 (Gap 0), G1 (Gap 1), S (Synthesis), G2(Gap 2). Η μεσόφαση ακολουθείται από τη μίτωση (διαχωρισμός χρωμοσωμάτων) και την κυττοκίνηση (κυττοκίνησις ή κυτταροκίνησις) (διαίρεση κυτταροπλάσματος). Η μίτωση διακρίνεται σε 4 στάδια: πρόφαση, προ-μετάφαση και μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση. Όταν διαιρείται το κυτταρόπλασμα τότε ολοκληρώνεται και ο κυτταρικός κύκλος και θεωρείται ότι τα δύο θυγατρικά κύτταρα βρίσκονται στη φάση G1.

Η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου ελέγχεται σε όλες τις φάσεις ώστε να διασφαλίζεται η ολοκλήρωση της κάθε φάσης. Στο τέλος της φάσης G1 υπάρχει ένας σημαντικός μηχανισμός ελέγχου (Σημείο ελέγχου της φάσης G1; G1-Checkpoint) που διασφαλίζει τη μετάβαση του κυττάρου στην επόμενη φάση σύνθεσης του DNA. Αν η λειτουργία του κυττάρου είναι φυσιολογική, και τυχόν βλάβες στο DNA έχουν επιδιορθωθεί τότε το κύτταρο εισέρχεται στην επόμενη φάση του κύκλου. Αν όμως ανιχνευθούν ανωμαλίες ή βλάβες στο DNA τότε ο μηχανισμός ελέγχου διακόπτει την πρόοδο του κύκλου στη G1. Αν το κύτταρο λειτουργεί φυσιολογικά και διέλθει από το σημείο περιορισμού ή 'σημείο R', τότε θα πρέπει να συνεχίσει τον κυτταρικό κύκλο και να διαιρεθεί. Παρόμοια, η φάση S διασφαλίζεται από το σημείο ελέγχου της φάσης S (S-phase Checkpoint), ενώ η φάση G2, από το σημείο ελέγχου της φάσης G2 (G2-Checkpoint) που καθορίζει την ικανότητα του κυττάρου να μεταβεί στη φάση M. Στη μιτωτική φάση, υπάρχουν επίσης σημεία ελέγχου όπως το 'σημείο ελέγχου της μετάφασης' (Metaphase Checkpoint) και το 'σημείο ελέγχου της μιτωτικής ατράκτου' (Mitotic spindle checkpoint).(219).

Η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου καθώς επίσης και η ρύθμιση του εξαρτώνται από την έκφραση και την ενεργότητα τριών βασικών οικογενειών πρωτεϊνικών μορίων: των κυκλινών (Cyclins; Ccn), των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (Cyclin-Dependent Kinases; CDKs) και των αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (Cyclin-dependent Kinase Inhibitors; CKIs), καθώς επίσης και από την οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων E2F που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.

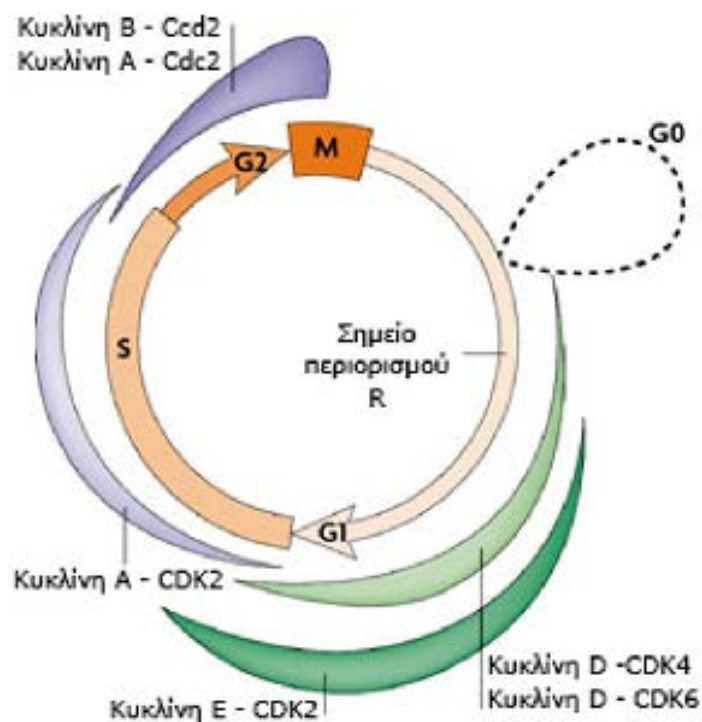
Οι κυκλίνες τύπου D, E, A και B είναι βασικοί ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και απαιτούνται για την ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών CDKs, CDK4 και CDK6. Οι κυκλίνες έχουν ρυθμιστικό ρόλο και σχηματίζουν ετεροδιμερή σύμπλοκα με τις καταλυτικές υπομονάδες CDK4 ή CDK6. Οι κυκλίνες τύπου D (D1, D2 και D3) εκφράζονται κατά την G1 φάση του κυτταρικού κύκλου και ονομάζονται κυκλίνες G1. Κατά το τέλος της φάσης G1 και μετά το σημείο R, εκφράζονται οι κυκλίνες E (E1 και E2) και A, ενώ κατά τη φάση S η κυκλίνη A και κατά τη μιτωτική φάση ή φάση M εκφράζονται οι μιτωτικές κυκλίνες, αρχικά η CcnA και στη συνέχεια η CcnB (95, 140-142, 151, 177, 186).

Μεταξύ των στόχων των CDKs είναι η οικογένεια των πρωτεϊνών της pRb (πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος), η οποία δεσμεύει μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων E2Fs, καταστέλλοντας τη μεταγραφική τους δράση. Οι E2Fs ενεργοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου, όπως των CcnE, CcnA, CDC25A, CDK1, παραγόντων αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA, Cdc6 και Cdt1, και άλλων πρωτεϊνών του προ-εναρκτήριου συμπλόκου της αντιγραφής του DNA, όπως Orc1, MCM2-7, PCNA και DNA πολυμεράση Α. Οι CDKs φωσφορυλιώνουν την pRB, εξασθενούν την αλληλεπίδραση της με τους E2Fs απελευθερώνοντας τους E2Fs που πλέον δεσμεύονται στους υποκινητές γονιδίων-στόχων τους και επάγουν την ενεργοποίησή τους.

Οι CDKs συγκροτούν ενεργά σύμπλοκα με τις κυκλίνες κατά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, όπως CcnD-CDK4/6 κατά τη φάση G1, CcnE-CDK4/6 για τη μετάβαση από τη G1 στη φάση S (G1-S transition), CcnE-CDK2 για την έναρξη της φάσης S, CcnA-CDK1/2 κατά τη φάση S, και CcnA-CDK1 και CcnB-CDK1 για την ολοκλήρωση της φάσης G2 και την είσοδο και ολοκλήρωση της μίτωσης (Εικόνα 1.1.)(23, 95, 140- 142).

Σημαντικό ρόλο στη συγκρότηση των συμπλόκων Ccn-CDK διαδραματίζουν οι αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CKIs). Οι CKIs έχουν διττό ρόλο: Από τη μία δρουν ως αρνητικοί ρυθμιστές της προόδου του κυτταρικού κύκλου καθώς προσδένονται άμεσα στις CDKs αναστέλλοντας την ενζυμική τους ενεργότητα (π.χ., CDK-CKI), και από την άλλη είναι απαραίτητοι για τη δημιουργία ενεργού συμπλόκου μεταξύ Ccn-CDK. Δύο οικογένειες συνθέτουν τους αναστολείς των CDKs, η οικογένεια Cip/Kip και η οικογένεια INK4 (79).

Στην οικογένεια Cip/Kip ανήκουν τα μέλη p21^{Cip1/Waf1}, p27^{Kip1} και p57^{Kip2}. Αρχικά οι αναστολείς Cip/Kip είναι δεσμευμένοι στις CDKs (CDK4, CDK6, CDK2 ή CDK1), αναστέλλοντας τη δράση των CDKs, και επομένως παρεμποδίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Όμως, μιτογόνα ερεθίσματα προάγουν τη συγκρότηση του τριμερούς συμπλόκου CDK-Ccn-Cip/Kip το οποίο παραμένει ανενεργό. Στη συνέχεια, η CDK-ενεργοποιούσα κινάση, CAK, φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη CDK (στο κατάλοιπο Thr172), η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την ανασταλτική πρωτεΐνη Cip/Kip και την αποδεσμεύει από το σύμπλοκο CDK-Ccn, το οποίο πλέον ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνει τα υποστρώματα του. Επομένως, οι ανασταλτικές πρωτεΐνες Cip/Kip έχουν διττό ρόλο καθώς δρουν ως αρνητικοί ρυθμιστές των CDKs, από τη μία και από την άλλη απαιτούνται για την ενεργοποίηση του συμπλόκου CDK-Ccn (24, 50, 185, 193).



Εικόνα 1.1. Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου και τα σύμπλοκα CDKs/κυκλινών που ρυθμίζουν κάθε μία από αυτές. Η φάση G1 του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται από τα σύμπλοκα κυκλίνη D-CDK4/6 και κυκλίνη E-CDK2. Το σύμπλοκο κυκλίνη E-CDK2 συμβάλλει στη μετάβαση στην S φάση του κυτταρικού κύκλου, όπου και αντικαθίσταται από τα σύμπλοκα κυκλίνη A-CDK2. Τέλος, η φάση G2 και η είσοδος στη μίτωση ρυθμίζονται από τις μιτωτικές κυκλίνες τύπου A και B, οι οποίες βρίσκονται σε σύμπλοκο με την CDK1 (Cdc2). Μετά το τέλος της μίτωσης το κύτταρο μπορεί να εισέλθει σε ένα νέο κυτταρικό κύκλο, ή να μεταβεί στη φάση ηρεμίας G0. Στο σχήμα απεικονίζεται επίσης το σημείο περιορισμού R, κατά το οποίο το κύτταρο δεσμεύεται για την ολοκλήρωση του κυτταρικού κύκλου ανεξάρτητα των μιτογόνων ερεθισμάτων. The Arts, Sciences and Medicine: <http://jedismedicine.blogspot.gr/2016/08/cancer-cell-cycle-cdk-inhibitors.html> (243).

Η οικογένεια INK4 αποτελείται από πρωτεΐνες μοριακού βάρους 15-20 kDa, τις p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} και p19^{INK4D} οι οποίες διαθέτουν συντηρημένα, επαναλαμβανόμενα μοτίβα αγκυρίνης (ankyrin motifs). Οι αναστολείς της οικογένειας INK4 περιορίζονται στην καταστολή των συμπλόκων CDK4/6-CcnD. Συγκεκριμένα, δεσμεύουν τις CDK4/6 σχηματίζοντας ετεροδιμερή σύμπλοκα CDK-INK4, και παρεμποδίζουν τη συγκρότηση του συμπλόκου CcnD-CDK4/6-CIP/KIP απελευθερώνοντας έτσι την CcnD που δεν έχει καταλυτική δράση καθώς επίσης και την ανασταλτική πρωτεΐνη CIP/KIP. Η έκφραση των INK4 μειορρυθμίζεται (downregulation) από το μεταγραφικό παράγοντα c-myc που επάγεται από μιτογόνα ερεθίσματα (50, 185, 193).

1.4. Ο ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων E2F και NF-κB στον κυτταρικό κύκλο και την καρκινογένεση

Η είσοδος των κυττάρων, που βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας, στον κυτταρικό κύκλο μετά τη διέγερση τους με μιτογόνα ερεθίσματα φαίνεται να εξαρτάται από την E2F-διαμεσολαβούμενη ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων τους. Σε αντίθεση, πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα μπορεί να εισέλθουν σε μια κατάσταση διακοπής της προόδου του κυτταρικού κύκλου με τρόπο που εξαρτάται από την E2F-διαμεσολαβούμενη καταστολή της έκφρασης γονιδίων-στόχων τους ως απόκριση σε διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα. Μια επίπτωση αυτού του μοντέλου εντοπίζεται στο σχεδιασμό αντι-καρκινικών φαρμάκων που στοχεύουν γενικά τους E2F, καθώς μια τέτοια προσέγγιση μπορεί να οδηγήσει στη διέγερση του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων.

Όμως, σε καρκίνους όπου τα καρκινικά κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται εκθετικά αλλά εισέρχονται σε στάδια ηρεμίας, η στόχευση των E2F μπορεί να είναι αποτελεσματική καθώς θα παρεμποδιστεί η επανείσοδος τους στον κυτταρικό κύκλο. Όμως ένα τέτοιο μοντέλο δεν λαμβάνει υπόψη του την ιδέα της συνδυαστικής ρύθμισης της μεταγραφής καθώς στη μεταγραφική ρύθμιση πολλών γονιδίων εμπλέκονται διαφορετικοί μεταγραφικοί παράγοντες (7, 125, 163). Για παράδειγμα, αλληλεπιδράσεις μεταξύ των NFκB-E2F έχουν καταδειχθεί, ο ρόλος καθώς επίσης και ο μηχανισμός των οποίων παραμένει ασαφής (7, 125, 126, 159, 163, 166, 182, 201). Γενικά, η ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων απαιτεί τη συντονισμένη δράση μεταγραφικών παραγόντων, και μελέτες κατέδειξαν ότι η ενεργοποίηση του NF-κB

μπορεί να αμβλύνει ή να καταστείλει την επαγωγή κρίσιμων γονιδίων-στόχων των μεταγραφικών παραγόντων E2F που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (7, 163). Μελέτες έχουν καταδείξει ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες E2F εμπλέκονται επίσης στις αποκρίσεις σε βλάβες DNA διαμέσου p53-εξαρτώμενων και ανεξάρτητων πορειών (84, 169). Όμως οι μηχανισμοί που διέπουν τις συντονισμένες δράσεις αυτών των μεταγραφικών παραγόντων, NF-κB και E2F, στις αποκρίσεις σε βλάβες στο DNA (DDR) δεν έχουν μελετηθεί.

Οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων E2F

Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων E2F εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων που ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, την αντιγραφή και τη σύνθεση του DNA. Υπάρχουν 8 μέλη της οικογένειας E2F που διαιρούνται σε δύο κύριες κατηγορίες με βάση τη λειτουργία τους: τους 'ενεργοποιητές' (activating) E2F (E2F1-3) και τους 'κατασταλτικούς' (repressive) E2F (E2F4-8), η λειτουργία των οποίων εξαρτάται από την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος pRb και των pRb-συναφών πρωτεϊνών (pocket proteins) (41, 54, 168, 206).

Οι E2F1-3 αλληλεπιδρούν κυρίως με την pRb και δρουν ως μεταγραφικοί ενεργοποιητές, και καθώς φέρουν μια αλληλουχία-σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS), εισέρχονται στον πυρήνα σχηματίζοντας πρωτεϊνικά συμπλέγματα με τις ακετυλάσες ιστονών (HATs) p300 και CBP και με τις P/CAF και Tip60. Οι κατασταλτικοί E2F (E2F4 και 5) εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα όταν είναι δεσμευμένοι με τις υποφωσφορυλιωμένες μορφές της pRb και των pRb-συναφών πρωτεϊνών, p107 και p130 και εμπλέκονται στην καταστολή E2F-ελεγχόμενων γονιδίων, στρατολογώντας σύμπλοκα καταστολής της μεταγραφής (transcriptional repressor complexes) που αποτελούνται από τις αποκετυλάσες ιστονών (HDACs), το σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης SWI/SNF και μεθυλομεταφοράσες ιστονών. Επειδή οι κατασταλτικοί E2F φέρουν μια σηματοδοτική αλληλουχία πυρηνικής εξόδου (nuclear export signal), απομακρύνονται από τον πυρήνα όταν δεν είναι δεσμευμένοι στις pRb-συναφείς πρωτεΐνες. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι κατασταλτικοί E2F (E2F1-5) φέρουν περιοχές trans-ενεργοποίησης και μεταγραφικής καταστολής: όταν είναι δεσμευμένοι στις pRb-συναφείς πρωτεΐνες τότε δρουν ως μεταγραφικοί καταστολείς, ενώ όταν αποδεσμεύονται από τις pRb-συναφείς πρωτεΐνες τότε δρουν ως ενεργοποιητές γονιδίων-στόχων τους, αν και οι E2F4 και 5

γενικά καταστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση. Οι E2F1-6 διμερίζονται με μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών DP (DP1-4) και σχηματίζουν ετεροδιμερή που δεσμεύονται στο DNA. Οι E2F6-8 δρουν ως μεταγραφικοί καταστολείς, δεν φέρουν την περιοχή *trans*-ενεργοποίησης και δεν αλληλεπιδρούν με pRb-συναφείς πρωτεΐνες. Όμως οι E2F7 και E2F8 θεωρούνται άτυποι παράγοντες καθώς δεσμεύονται στο DNA χωρίς να σχηματίζουν ετεροδιμερή με τις DPs. Όλοι οι E2F αναγνωρίζουν και δεσμεύονται εξίσου στις κλασσικές συναινετικές αλληλουχίες E2F στους υποκινητές γονιδίων-στόχων τους (10, 29, 41, 49, 54, 65, 67, 118, 144, 172, 206).

Με βάση τη μεταγραφική ικανότητα των E2F και το ρόλο τους σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες, ο ρόλος τους στον πολλαπλασιασμό ακόμη αμφισβητείται: προάγουν ή καταστέλλουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και οφείλεται η δράση τους στην E2F-διαμεσολαβούμενη ενεργοποίηση ή καταστολή γονιδίων-στόχων τους (41, 65, 67, 172).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες E2F ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου. Μεταξύ αυτών των γονιδίων είναι τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις κυκλίνες E και A στη φάση G1, αλλά και γονίδια-στόχους με λειτουργίες στην αντιγραφή του DNA, καθώς και στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου G2 και M (8, 20, 25, 28, 39, 45, 57, 120, 137, 167, 171, 184), όπως: CcnA, Cdc25A, Cdc2 (CDK1), Emi1, ORC1, Cdc6, Cdt1, MCm2-7, και PCNA.

1.5. Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου

Η διατήρηση της ακεραιότητας και της πιστότητας του γονιδιώματος είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για τη φυσιολογική λειτουργία και την επιβίωση όλων των οργανισμών. Η ικανοποίηση αυτών των προϋποθέσεων είναι ιδιαίτερα δύσκολη λόγω της συνεχούς προσβολής του DNA από γενοτοξικούς παράγοντες, της λανθασμένης ενσωμάτωσης νουκλεοτιδίων κατά την αντιγραφή και την αστάθεια του ίδιου του DNA (154).

Η ανικανότητα επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA μπορεί να οδηγήσει σε διακοπή της μεταγραφής, στη μεταλλαξιγένεση και στην κυτταροτοξικότητα. Στον άνθρωπο, βλάβες στο DNA έχουν ενοχοποιηθεί σε διάφορες γενετικά κληρονομήσιμες νόσους. Όλοι οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει

μηχανισμούς με τους οποίους να αντιμετωπίζουν τις πιθανές καταστροφικές επιδράσεις των βλαβών στο DNA. Με την ανίχνευση βλαβών στο DNA ή διακοπών στην αντιγραφή, ενεργοποιούνται οι πορείες των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, και διακόπτουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ώστε να επιδιορθωθούν οι βλάβες και να μην μεταφερθούν στα θυγατρικά κύτταρα. Επιπλέον της ενεργοποίησης των σημείων ελέγχου, οι βλάβες στο DNA οδηγούν στην επαγωγή μεταγραφικών προγραμμάτων, πορειών επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA και όταν το επίπεδο των βλαβών είναι υψηλό, στην επαγωγή της κυτταρικής απόπτωσης. Όλες αυτές οι πορείες είναι καλά ενορχηστρωμένες έτσι ώστε το DNA να διατηρείται, να αντιγράφεται και να κατανέμεται μέσα σ' ένα κύτταρο με ακρίβεια και πιστότητα. Όμως, μιτωτικά κύτταρα δεν μπορούν να επιδιορθώσουν αποτελεσματικά τις αμφίκλωνες ρήξεις στο DNA (Double Strand Breaks; DSBs) και σε συνδυασμό με ανεπάρκεια των πορειών των σημείων ελέγχου και ανωμαλίες στο σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου οδηγούνται σε θάνατο, γνωστό ως 'μιτωτική καταστροφή' (44, 83, 87, 101, 135, 154, 170, 188).

Οι πορείες των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου είναι ένα δίκτυο μεταγωγής σήματος ως απόκριση σε βλάβες στο DNA και ανωμαλίες στον κυτταρικό κύκλο που ελέγχει την πρόοδο του κύκλου από τη μια φάση στην άλλη διασφαλίζοντας την ολοκλήρωση της μιας πριν την έναρξη της επόμενης φάσης. Αυτό το δίκτυο των πορειών ελέγχεται από τις κινάσες ATM-Chk2 και ATR-Chk1 που ενεργοποιούνται και επάγουν την προσωρινή διακοπή της προόδου του κύκλου στις φάσεις G1, S ή G2, ακόμη τη μόνιμη διακοπή είτε στη φάση G1 ή G2 πριν την είσοδο των κυττάρων στη φάση S ή τη μίτωση, αντίστοιχα. Επίσης υπάρχουν σημεία ελέγχου της μιτωτικής ατράκτου (44, 83, 87, 101, 132, 135, 154, 170, 188).

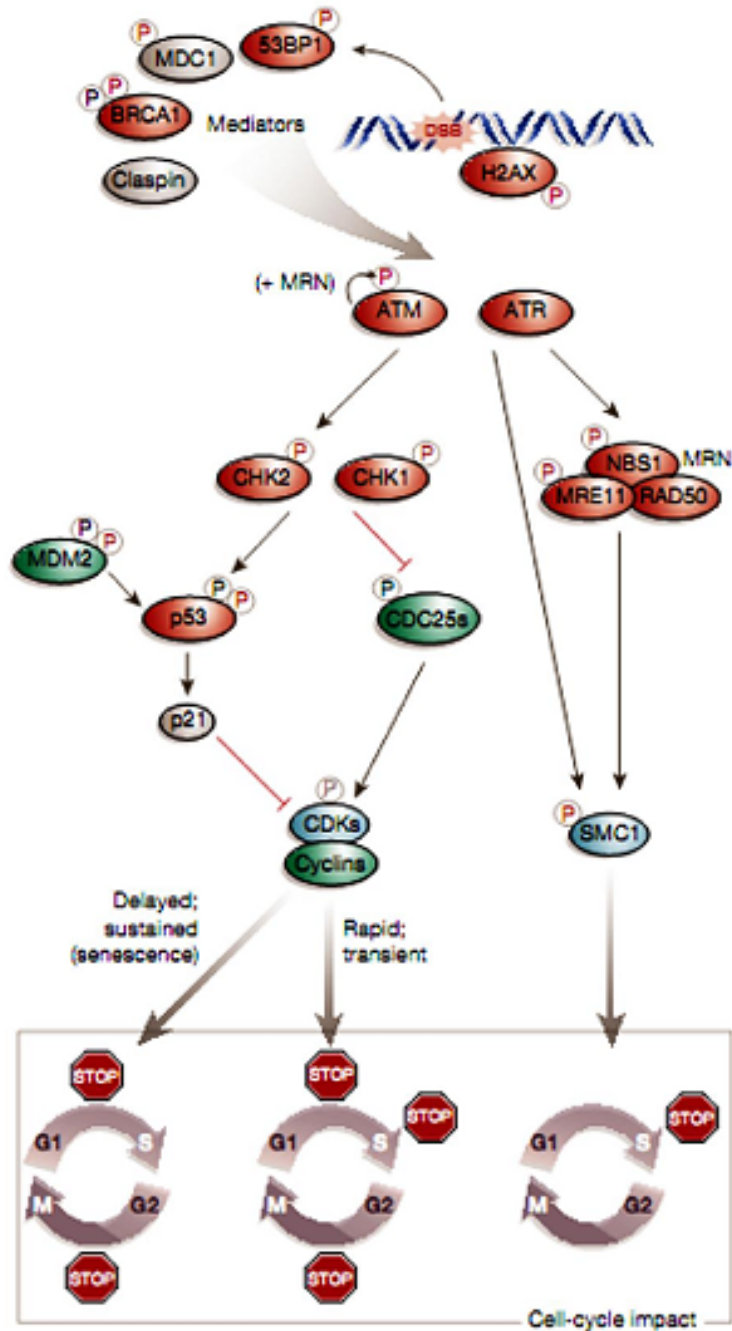
Σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου κατά τη φάση G1 και G1-S: Η πορεία του σημείου ελέγχου της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου παρεμποδίζει την αντιγραφή του κατεστραμμένου DNA και είναι σήμερα η πιο κατανοητή πορεία. Η επικρατής πορεία του σημείου ελέγχου της φάσης G1 ως απόκριση σε βλάβες στο DNA είναι η πορεία μεταγωγής σήματος: ATM(ATR)/Chk2(Chk1) - p53/HDM2-p21, η οποία δύναται να επάγει, ακόμη και τη μόνιμη, διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 (Εικόνα 1.2.) (44, 83, 87, 101, 115, 132, 135, 154, 170, 188).

Μολονότι η έκφραση των ATM και Chk2 είναι σχετικά σταθερή κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, οι συγκεντρώσεις των ATR και Chk1 είναι χαμηλές στην

πρώιμη προς τη μέση G1, και οι ενεργότητες αυξάνονται σημαντικά μόνο κοντά στο σημείο μετάβασης G1-S. Οι ATM/ATR φωσφορυλιώνουν άμεσα τον μεταγραφικό παράγοντα p53 στην αμινοτελική περιοχή του υπεύθυνη για την ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων του *in trans* και ιδιαίτερα στη Ser15. Η Thr18 και Ser20 στην ίδια περιοχή, στοχεύονται από τις κινάσες Chk1/Chk2 που φωσφορυλιώνουν αυτά τα κατάλοιπα. Ενώ η φωσφορυλίωση στη θέση Ser20 είναι σημαντική για τη σταθερότητα της p53, η φωσφορυλίωση στη θέση Ser15 είναι κρίσιμη για την επαύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας της p53. Το κατάλοιπο Ser15 της p53 μπορεί να φωσφορυλιωθεί άμεσα από την ATM ή την ATR ως απόκριση στην ιονίζουσα ακτινοβολία (IR), στην υπεριώδη ακτινοβολία (UV) και σε διακοπές στη διχάλα αντιγραφής. Ο ρόλος της ATR στη φωσφορυλίωση της p53 στη Ser20 δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, αλλά μελέτες *in vitro* απέδειξαν ότι η p53 φωσφορυλιώνεται στη θέση Ser20 από την ATR-εξαρτώμενη κινάση Chk1. Επιπλέον, η λιγάση της ουβικιτίνης HDM2 η οποία φυσιολογικά δεσμεύει την p53 διασφαλίζοντας τη γρήγορη αποδόμηση της p53, στοχεύεται από τις ATM/ATR και τις Chk2/Chk1, μετά την πρόκληση βλαβών στο DNA. Ειδικότερα, η ATM φωσφορυλιώνει άμεσα τον αρνητικό ρυθμιστή της p53, HDM2, στη Ser395, έτσι ώστε η HDM2 να μην δύναται να μεταφέρει την p53 έξω από τον πυρήνα του κυττάρου. Αυτές οι τροποποιήσεις της p53 και Mdm2 συμβάλλουν στη σταθεροποίηση και τη συσσώρευση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53, καθώς επίσης και στην αύξηση της μεταγραφικής της ενεργότητας. Ο μεταγραφικός στόχος-κλειδί της p53 είναι ο αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CKI) p21^{CIP1/WAF1} (επίσης και η GADD45a), που καταστέλλει τη δράση του συμπλόκου της CcnE-CDK2 που προάγει τη μετάβαση G1-S προκαλώντας έτσι τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1. Αυτή η διακοπή του κύκλου δεν οδηγεί μόνο στην ανικανότητα έναρξης της σύνθεσης του DNA, αλλά διατηρεί επίσης ενεργή την πορεία των pRB/E2F, που καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, με αποτέλεσμα να προκαλείται μια συνεχής διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 και να παρεμποδίζεται η μετάβαση του κυττάρου στη φάση S. Επομένως το σημείο ελέγχου της φάσης G1 στοχεύει δύο σημαντικές πορείες που ελέγχονται από τις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες p53 και pRb. Αυτές οι δύο πορείες είναι αναμφισβήτητα οι συχνότερες πορείες που απορυθμίζονται στον ανθρώπινο καρκίνο.

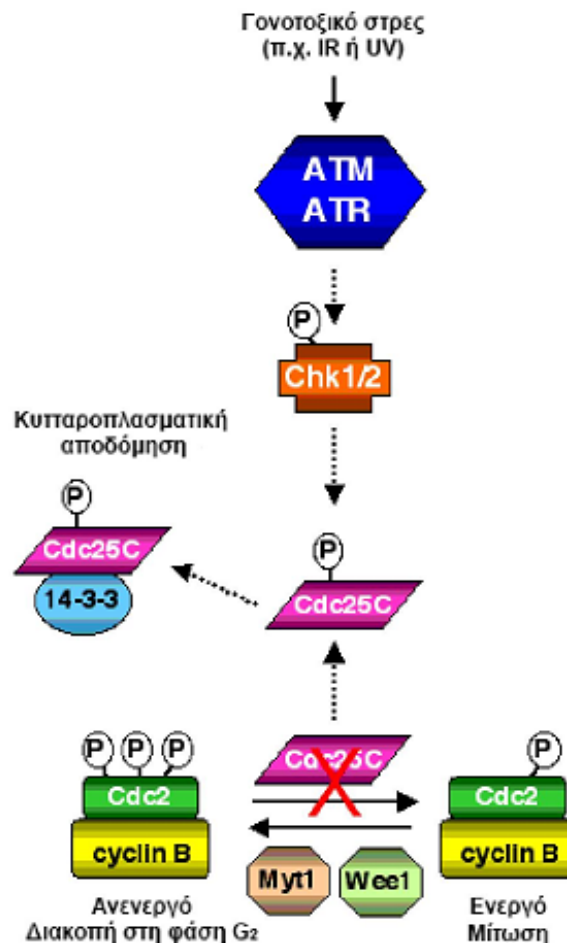
Στην όψιμη φάση G1, ως απόκριση στο ενεργό E2F-εξαρτώμενο μεταγραφικό σύμπλοκο προαγωγής της φάσης S, η έκφραση της ATR και Chk1 αυξάνονται. Οι

CcnE και A, και ο ενεργοποιητής των CcnE(A)/CDK2 - η φωσφατάση CDC25A - επάγονται επίσης κατά την όψιμη φάση. Ο κλάδος ATR/Chk1 (αλλά όχι ATM/Chk2), διαμέσου της ιδιοστατικής φωσφορυλίωσης της CDC25A σε διάφορα κατάλοιπα σερίνης, διατηρεί την έκφραση της CDC25A κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Όμως, ως απόκριση σε γενοτοξικούς παράγοντες, αυτός ο φυσιολογικός μηχανισμός επαυξάνεται διαμέσου της αύξησης της ενεργότητας των Chk1 και Chk2, που οδηγεί στη μειορύθμιση της CDC25A και κατ' ακολουθία στην καταστολή της δράσης των συμπλόκων της CcnE(A)/CDK2. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η πορεία Chk1/Chk2–CDC25A δρα γρήγορα και ανεξάρτητα από την p53, προκαλώντας την επιβράδυνση της μετάβασης από τη φάση G1 στη φάση S (G1-S) μόνο για μερικές ώρες, εκτός αν ενεργοποιηθεί η πορεία της p53 που οδηγεί σε μια παρατεταμένη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 (44, 83, 87, 101, 132, 135, 154, 170, 188).



Εικόνα 1.2. Σχηματική απεικόνιση των σηματοδοτικών πορειών ελέγχου του κυτταρικού που επάγονται ως απόκριση σε βλάβες στο DNA κατά τις φάσεις **G1** και **G1-S**. Ως απόκριση σε βλάβες στο DNA όπως σε αμφίκλωνες ρήξεις στο DNA (Double Strand Breaks; DSBs), οι κινάσες ελέγχου ATM και ATR φωσφορυλιώνουν (P) μια σειρά υποστρώματα, είτε άμεσα (κόκκινο P) είτε έμμεσα διαμέσου των κινασών μεταγωγής σήματος Chk1 και Chk2 (μαύρο P). Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη BRCA1 συμβάλλει στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και στην επιδιόρθωση του DNA, ενώ η p53 ελέγχει τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, στον κυτταρικό θάνατο και στην επιδιόρθωση του DNA (111).

Σημείο ελέγχου της φάσης G2: Οι πορείες απόκρισης σε βλάβες του DNA στη φάση G2 του κυτταρικού κύκλου έχουν κοινό στόχο την αναστολή της δράσης της CDK1. Επίδραση γενετοξικού στρες στο κύτταρο οδηγεί στην ενεργοποίηση των κινασών ATM και ATR οι οποίες φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις Chk2 και Chk1 αντίστοιχα. Οι ενεργές Chk2 και Chk1, αντίστοιχα φωσφορυλιώνουν με τη σειρά τους τη Cdc25C στο κατάλοιπο σερίνη 216, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας θέσης δέσμευσης για τις πρωτεΐνες 14-3-3. Η Cdc25C μετατοπίζεται έξω από τον πυρήνα και συγκρατείται στο κυτταρόπλασμα από τις πρωτεΐνες 14-3-3. Αυτό οδηγεί στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 λόγω της απώλειας της ικανότητας της Cdc25C να ενεργοποιήσει τα σύμπλοκα των κυκλινών B1-CDK1(Cdc2) (Εικόνα 1.3.).



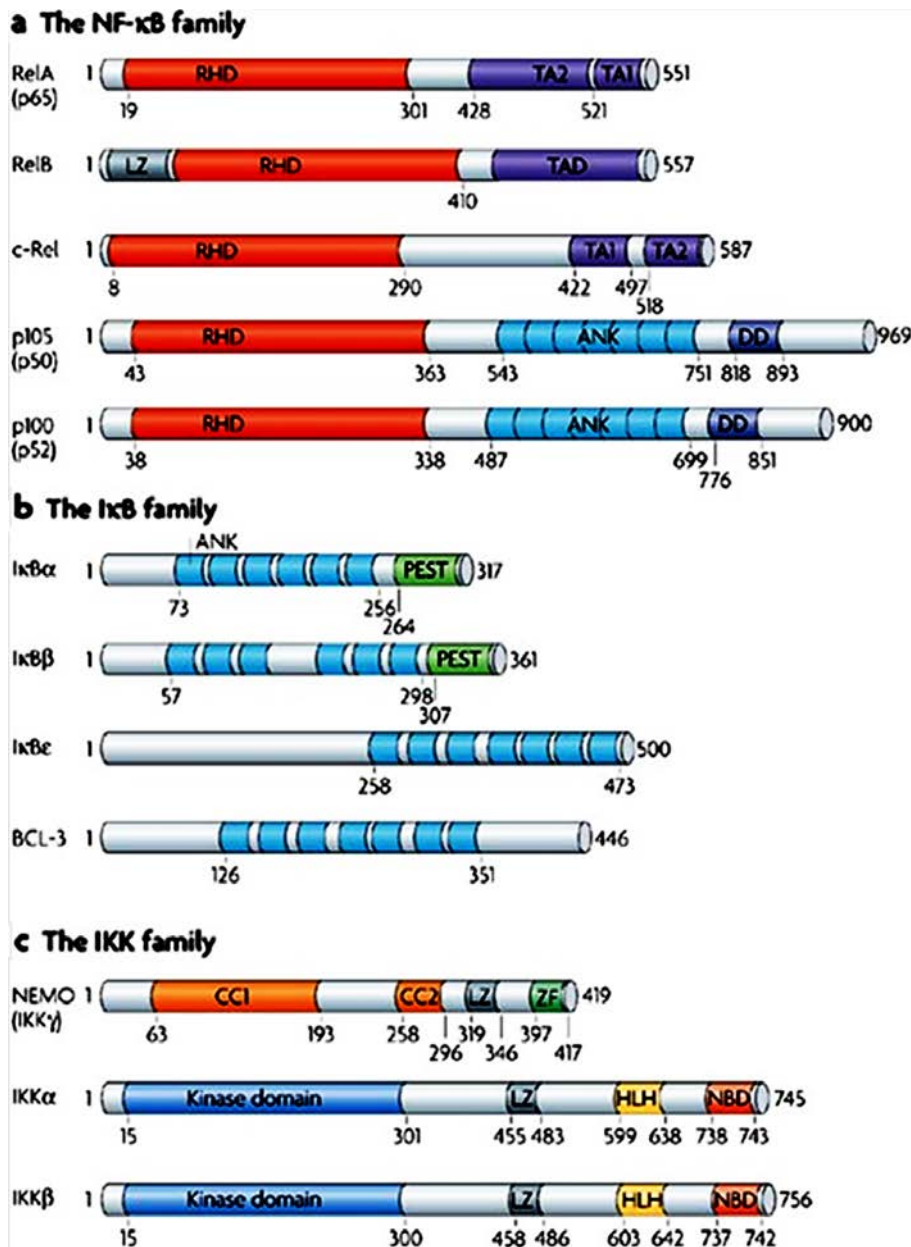
Εικόνα 1.3. Σχηματική απεικόνιση της σηματοδοτικής πορείας ελέγχου του κυτταρικού κύκλου κατά τη φάση G2. Ως απόκριση σε γενετοξικό στρες όπως ιονίζουσα ακτινοβολία (IR) ή υπεριώδη ακτινοβολία (UV), ενεργοποιείται η πορεία μεταγωγής σήματος των ATM/ATR. Η ATM φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη Chk2, ενώ η ATR τη Chk1. Οι ενεργές Chk1 και Chk2 φωσφορυλιώνουν τη Cdc25C στη Ser216, δημιουργώντας μια θέση δέσμευσης για τις πρωτεΐνες 14-3-3. Η Cdc25C μετατοπίζεται έξω από τον πυρήνα και συγκρατείται στο κυτταρόπλασμα από τις πρωτεΐνες 14-3-3. The mammalian cell cycle: www.eurekah.com (244).

Μελέτες κατέδειξαν ότι είναι απαραίτητη και η συμμετοχή των πρωτεϊνών p53 και p21^{Cip1/Waf1} για τη διατήρηση της διακοπής του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 έπειτα από βλάβες του γενετικού υλικού, καθώς καρκινικά κύτταρα στα οποία απουσιάζουν οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες ολοκληρώνουν τη φάση G2 και εισέρχονται στη μίτωση. Ο μηχανισμός δράσης της p53 οδηγεί στην αναστολή της ενεργότητας αλλά και της έκφρασης της CDK1 και της κυκλίνης B1. Η εξαρτώμενη από την p53 συσσώρευση της p21^{Cip1/Waf1} οδηγεί στην καταστολή της ενεργότητας του συμπλόκου CDK1-κυκλίνη B1 και ταυτόχρονα η p53 ασκεί αρνητική μεταγραφική ρύθμιση στα γονίδια της CDK1 και της κυκλίνης B1. Αντίθετα, η p53 ρυθμίζει θετικά την έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3, απώλεια των οποίων οδηγεί σε πρόωμη είσοδο του κυττάρου στη φάση M (44, 83, 87, 101, 132, 135, 154, 170, 188).

1.6. Οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων NF-κB (Nuclear Factor-κB)

Η οικογένεια των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων Nuclear Factor-κB (NF-κB) διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στις αποκρίσεις της έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας (Εικόνα 1.4). Επιπλέον, οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της απόκρισης του κυττάρου σε στρεσογόνα ερεθίσματα ενώ συμμετέχουν και σε πορείες που αφορούν τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση αλλά και τη διαφοροποίηση του κυττάρου (21, 73- 75, 164, 165, 189). Αρκετές μελέτες απέδειξαν ότι διαφορετικές υπομονάδες του NF-κB μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση των γονιδίων του κυτταρικού κύκλου, συμπεριλαμβανομένων των κυκλινών A1, B1 και D1, Cdk2 και CDK6, p21^{WAF1}, E2F3 και c- myc, μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με τους υποκινητές τους ή μέσω ενός άγνωστου έως τώρα μηχανισμού.

Στα θηλαστικά, η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB αποτελείται από πέντε μέλη: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF-κB1) και p52/p100 (NF-κB2). Όλα αυτά τα μέλη της οικογένειας Rel σχηματίζουν όμο- και έτερο-διμερή σύμπλοκα, τα οποία προσδένονται στις αλληλουχίες κB του γονιδιώματος και ασκούν θετική ή αρνητική ρύθμιση στη μεταγραφική ενεργότητα ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων. Οι αλληλουχίες κB εμφανίζονται με τη συντηρημένη αλληλουχία GGGRNNYYCC (N= οποιαδήποτε βάση, R= πουρίνη, Y= πυριμιδίνη), στους προαγωγείς και ενισχυτές των γονιδίων στόχων του NF-κB (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4. (Α) Οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων NF- κ B. Την οικογένεια NF- κ B αποτελούν τα μέλη RelA (p65), RelB, Rel (c-Rel) και τα μέλη p52 και p50, τα οποία προέρχονται από τα πρόδρομα μόρια p100 και p105 αντίστοιχα. Όλα τα μέλη της οικογένειας διαθέτουν επικράτεια RHD, στην οποία περιέχεται και η επικράτεια πυρηνικού εντοπισμού, η οποία είναι απαραίτητη για το διμερισμό των μορίων και την πρόσδεση στο DNA. Μόνο τα μέλη Rel (RelA, RelB, c-Rel), διαθέτουν επικράτεια ενεργοποίησης, TAD. **(Β) Οικογένεια κινασών I κ B.** Η οικογένεια αποτελείται από τα μέλη I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B ζ , BCL-3 και I κ BNS. Σε αυτή την ομάδα ανήκουν και τα πρόδρομα μόρια p105 και p100, καθώς όπως και όλα τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας διαθέτουν χαρακτηριστικές επαναλήψεις αγκυρίνης και αναστέλλουν την ενεργοποίηση των διμερών NF- κ B. **(Γ) Σύμπλοκο των IKK.** Το μεγάλο μοριακού βάρους σύμπλοκο αποτελείται από τις καταλυτικές υπομονάδες IKK α και IKK β και τη ρυθμιστική υπομονάδα NEMO (IKK γ). ANK; επαναλήψεις αγκυρίνης, CC; δομή σπειραμένου σπειράματος, DD; επικράτεια θανάτου, GRR; περιοχή πλούσια σε γλυκίνη, HLH; δομή έλικα-βρόγχου-έλικας, LZ; δομή φερμουάρ λευκίνης, NBD; επικράτεια πρόσδεσης με την υπομονάδα NEMO, PEST; περιοχή πλούσια σε Pro, Glu, Ser και Thr, RHD; ομόλογη επικράτεια Rel, TAD; επικράτεια ενεργοποίησης, ZF; δομή δακτύλου ψευδαργύρου (Perkins *et al.*, 2007) (164).

Κοινό δομικό στοιχείο των μελών της οικογένειας αποτελεί η συντηρημένη επικράτεια μήκους περίπου 300 αμινοξέων, RHD (Rel Homology Domain), η οποία βρίσκεται στο αμινο-τελικό άκρο και ευθύνεται για την ικανότητα πρόσδεσής τους στο DNA, το διμερισμό τους με άλλα μόρια NF-κB, αλλά και την αλληλεπίδρασή τους με τις πρωτεΐνες IκB. Οι υπομονάδες RelA (p65), RelB και c-Rel διαθέτουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο μια επικράτεια ενεργοποίησης της μεταγραφής, TAD (Transactivation Domain), διαμέσου της οποίας πραγματοποιείται αλληλεπίδρασή τους με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (Εικόνα 1.4).

Αντίθετα, οι υπομονάδες p50 και p52 που προκύπτουν από την επεξεργασία των μεγαλύτερων πρόδρομων μορίων p105 και p100 αντίστοιχα, δε διαθέτουν TADs, αλλά διατηρούν την ικανότητα επαγωγής της μεταγραφής μέσω σχηματισμού συμπλόκων με πρωτεΐνες που διαθέτουν περιοχή TAD. Αντίθετα, ομοδιμερή σύμπλοκα p50 ή p52 διαφεύγουν της αρνητικής ρύθμισης των IκB και σε πολλές περιπτώσεις εμφανίζονται ιδιοστατικά στον πυρήνα του κυττάρου, όπου καταστέλλουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση ανταγωνιζόμενα με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες για την πρόσδεση στις αλληλουχίες κB (73, 75, 165).

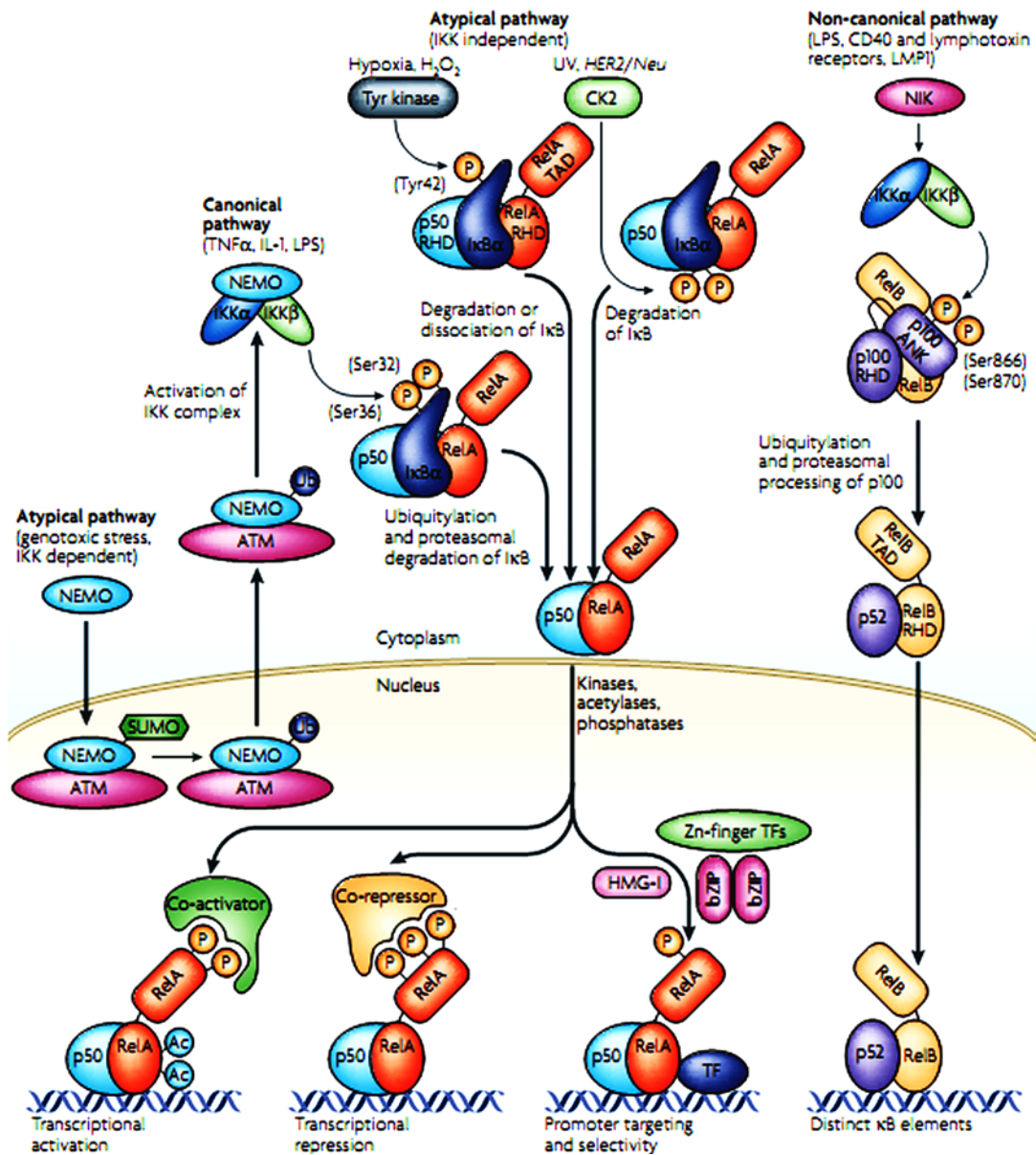
Οικογένεια πρωτεϊνών IκB: Η οικογένεια αναστολέων του NF-κB (IκB) περιλαμβάνει τα μέλη IκBα, IκBβ, IκBε, IκBζ, IκBη, BCL-3 και IκBNS. Δομικό χαρακτηριστικό τους είναι οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες αγκυρίνης στο καρβοξυ-τελικό τους άκρο και ο ρόλος τους είναι η αναστολή της ενεργοποίησης των διμερών NF-κB. Οι πρόδρομες ενώσεις p100 και p105, της οικογένειας Rel/NF-κB, επίσης θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως πρωτεΐνες IκB, δεδομένου ότι περιέχουν το χαρακτηριστικό μοτίβο αγκυρίνης στη δομή τους και συγκρατούν τα σύμπλοκα του NF-κB στο κυτταρόπλασμα (73, 75, 92, 107) (Εικόνα 1.4).

Καταλυτικές υπομονάδες IKK των σηματοδοτικών πορειών του NF-κB: Το σύμπλοκο IKK, αποτελείται από τις καταλυτικές υπομονάδες IKKα και IKKβ και την ρυθμιστική υπομονάδα NEMO (IKKγ). Οι υπομονάδες IKKα και IKKβ ανήκουν στην οικογένεια κινασών σερίνης/θρεονίνης και μεταξύ άλλων διαθέτουν μια καρβοξυ-τελική επικράτεια πρόσδεσης με την καταλυτική υπομονάδα NEMO (NEMO binding domain; NBD). Η υπομονάδα NEMO διαφέρει δομικά και είναι υπεύθυνη για τη μεταβίβαση των σημάτων από τις ανοδικές κινάσες. Η συγκρότηση του συμπλόκου απαιτείται για την ενεργοποίηση της δράσης κινάσης και συνηθέστερα αποτελείται

από ένα ετερο-διμερές ΙΚΚα και ΙΚΚβ και δύο υπομονάδες της NEMO. Στόχους του συμπλόκου αποτελούν οι ανασταλτικές πρωτεΐνες ΙκBs, τις οποίες φωσφορυλιώνει σε κατάλοιπα σερίνης και τις οδηγεί σε αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα 26S. Ως αποτέλεσμα, τα ελεύθερα διμερή του NF-κΒ μετατοπίζονται στον πυρήνα, όπου προσδένονται στις χαρακτηριστικές αλληλουχίες κΒ του γονιδιώματος και συμβάλουν στη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων στόχων τους. Οι κινάσες ΙΚΚα και ΙΚΚβ εκτός από τη δράση τους ως υπομονάδες του συμπλόκου ΙΚΚ, μπορούν να φωσφορυλιώσουν υποστρώματα ανεξάρτητα από τις πορείες ενεργοποίησης του NF-κΒ, όπως επίσης και να εισέλθουν στον πυρήνα όπου ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων (40, 43, 76, 131, 160, 190) (Εικόνα 1.4).

Σηματοδοτικές πορείες ενεργοποίησης μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ: Τα ετεροδιμερή του NF-κΒ φυσιολογικά παραμένουν ανενεργά στο κυτταρόπλασμα, συνδεδεμένα ισχυρά με τους αναστολείς ΙκΒ, ώστε να καλύπτονται οι αλληλουχίες που ευνοούν την πυρηνική τους εντόπιση. Υπάρχουν τρεις κεντρικές πορείες ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ οι οποίες πυροδοτούνται ως απόκριση σε ποικιλία εξωκυτταρικών και ενδοκυτταρικών ερεθισμάτων. Οι δύο σημαντικότερες πορείες απ' αυτές αναφέρονται ως *κανονική* (ή κλασική) πορεία ενεργοποίησης και ως *μη κανονική* (ή εναλλακτική) πορεία, και τέλος η *άτυπη* πορεία ενεργοποίησης (Εικόνα 1.4.) (73, 75, 157, 164, 165) (Εικόνα 1.5).

Κανονική πορεία ενεργοποίησης: Η κανονική πορεία επάγεται ως απόκριση σε κυτοκίνες όπως ο TNF-α και η IL-1 καθώς και σε σήματα που μεταβιβάζονται μέσω υποδοχέων Toll (Toll-like receptors; TLRs). Απουσία ερεθίσματος τα ετεροδιμερή του NF-κΒ, RelA(p65)-p50, εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα δεσμευμένα με την κατασταλτική πρωτεΐνη ΙκΒα. Παρουσία κάποιου εξωτερικού ή στρεσογόνου ερεθίσματος, η υπομονάδα ΙΚΚβ φωσφορυλιώνεται στις σερίνες 177/181 και ενεργοποιείται με αποτέλεσμα να φωσφορυλιώνει την ΙκΒα στις Ser32/36. Στη συνέχεια, η ΙκΒα ουβικιτινιώνεται στα κατάλοιπα λυσίνης 19 και 21 και αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα αφήνοντας ελεύθερο το ετεροδιμερές σύμπλοκο RelA/p65-p50 να μετατοπισθεί στον πυρήνα και να επάγει ή να καταστείλει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του (Εικόνα 1.5.) (157, 164, 165).



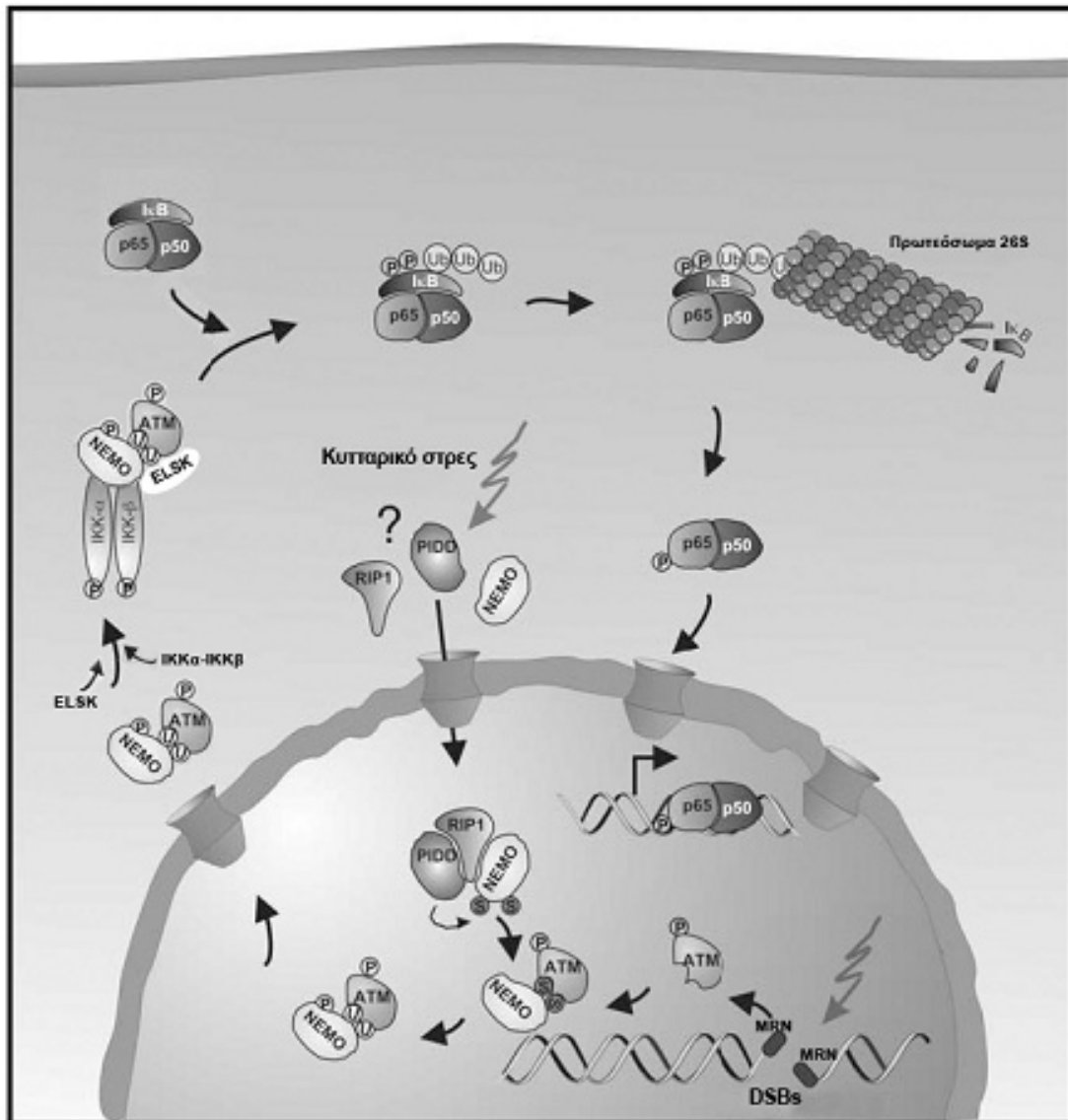
Εικόνα 1.5. Πορείες ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB.

Ερεθίσματα όπως ο TNFα και η IL-1, επάγουν την *κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB*. Η πορεία χαρακτηρίζεται από την ταχεία φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης IκBα, κυρίως από την κινάση IKKβ, η οποία ακολούθως αποδομείται από το πρωτεόσωμα 26S με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των διμερών NF-κB. Συνηθέστερα, διμερή RelA-p50 εισέρχονται στον πυρήνα, όπου σε συνεργασία με επιπλέον μεταγραφικούς παράγοντες ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων. Η IKK-εξαρτώμενη πορεία ενεργοποίησης μπορεί να επαχθεί και από την επίδραση γενετοξικού στρες. Κύριο ρόλο διαδραματίζει η υπομονάδα NEMO, η οποία εισέρχεται στον πυρήνα όπου σουμοϋλιώνεται και ακολούθως ουβικιτινιώνεται με έναν ATM εξαρτώμενο τρόπο. Η NEMO εξέρχεται από τον πυρήνα σε σύμπλοκο με την ATM όπου και πραγματοποιείται η ενεργοποίηση της IKKβ. IKK ανεξάρτητες, άτυπες πορείες έχουν επίσης περιγραφεί, κατά τις οποίες η ενεργοποίηση του NF-κB ρυθμίζεται από την κινάση CK2, αλλά και κινάσες τυροσίνης. Στη *μη κανονική πορεία ενεργοποίησης* κεντρικό ρόλο διαδραματίζει η IKKα, που φωσφορυλιώνεται από την κινάση NIK. Η IKKα προάγει την επεξεργασία της υπομονάδας p100 από την οποία προκύπτει η p52. Τα σύμπλοκα RelB-p52 μετατοπίζονται στον πυρήνα, όπου προσδένονται σε διακριτά στοιχεία κB. Ub; ουβικιτίνωση, P; φωσφορυλίωση, TAD; Επικράτεια ενεργοποίησης, RHD; ομόλογη επικράτεια Rel, bZIP; μεταγραφικός παράγοντας με δομή φερμουάρ λευκίνης, HMG-I; Οικογένεια πρωτεϊνών υψηλής κινητικότητας (164).

Μη κανονική ή εναλλακτική πορεία ενεργοποίησης: Η πορεία αυτή επάγεται από ένα μικρό αριθμό ερεθισμάτων όπως η λεμφοτοξίνη β (LTβ) και ο παράγοντας ενεργοποίησης των Β-λεμφοκυττάρων, και διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ωρίμανση των Β-κυττάρων και το σχηματισμό των λεμφοειδών ιστών. Αποτελεί μια δεύτερη πορεία μεταγραφικής ρύθμισης μέσω του NF-κΒ, κατά την οποία ομοδιμερή της υπομονάδας ΙΚΚα ενεργοποιούνται με φωσφορυλίωση στις σερίνες 176/180 από την κινάση NIK (NF-κΒ Inducing Kinase), η οποία ανταποκρίνεται σε κάποιο ερέθισμα. Η ενεργοποίηση της κινάσης ΙΚΚα, οδηγεί στη φωσφορυλίωση του καρβοξυ-τελικού άκρου της p100 υπομονάδας με συνέπεια την πρωτεολυτική του επεξεργασία και την παραγωγή της ώριμης υπομονάδας p52, η οποία σχηματίζει σύμπλοκο με την πρωτεΐνη RelB μεταφέρεται στον πυρήνα όπου το διμερές θα ρυθμίσει θετικά ή αρνητικά τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων (Εικόνα 1.5.) (60, 73, 75, 165, 183, 196).

Άτυπη πορεία ενεργοποίησης: Τέλος, η άτυπη πορεία ενεργοποίησης επάγεται ως απόκριση σε μια ποικιλία ερεθισμάτων και μπορεί να είναι είτε εξαρτώμενη είτε ανεξάρτητη από το σύμπλοκο ΙΚΚ. Κοινός στόχος και των δύο είναι η ενεργοποίηση του διμερούς p50-p65(RelA) και η μετατόπισή του στον πυρήνα. Η ανεξάρτητη του συμπλόκου ΙΚΚ πορεία ενεργοποιείται σε συνθήκες υποξίας, σε διέγερση με υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) καθώς και υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) ή έκφρασης του ογκογονιδίου *HER2/Neu* και έχει σαν αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο τυροσίνη 42 και αποδόμηση ή αποδέσμευση της ΙκΒα από το σύμπλοκο NF-κΒ. Αντίθετα, η ΙΚΚ εξαρτώμενη πορεία, ενεργοποιείται υπό την επίδραση γενετοξικού στρες και χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και προσομοιάζει την κανονική πορεία ενεργοποίησης (Εικόνα 1.5.) (164, 165).

Η ενεργοποίηση του NF-κΒ ως απόκριση του κυττάρου σε βλάβες του DNA: Το κύτταρο έχει αναπτύξει πολύπλοκες σηματοδοτικές πορείες απόκρισης σε βλάβες του DNA (DNA damage response; DDR) που ρυθμίζονται από πρωτεΐνες οι οποίες θα ανιχνεύσουν τη γενετική βλάβη και θα προάγουν είτε μια προ-βιοτική απόκριση (σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, πορείες επιδιόρθωσης του DNA και μεταγραφικής ρύθμισης), είτε μια προ-αποπτωτική πορεία (44).



Εικόνα 1.6. Σχηματική απεικόνιση της IKK-εξαρτώμενης πορείας ενεργοποίησης του NF-κΒ έπειτα από επίδραση γενotoξικού στρες. Η δράση δύο παράλληλων πορειών οδηγεί στην ενεργοποίηση του NF-κΒ έπειτα από την πρόκληση αμφίκλωνων ρήξεων στο DNA. Ένα στρεσογόνο ερέθισμα προάγει την πυρηνική εισαγωγή των πρωτεϊνών PIDD και RIP1, οι οποίες σχηματίζουν σύμπλοκο με τη NEMO και προάγουν τη σουμοϋλίωσή της. Παράλληλα, οι αμφίκλωνες ρήξεις του DNA ενεργοποιούν την κινάση ATM, η οποία αναγνωρίζει τη σουμοϋλιωμένη NEMO και τη φωσφορυλιώνει. Ακολούθως η NEMO (σε σύμπλοκο με την ATM) αποσουμοϋλιώνεται και στη συνέχεια μονοουβικιτινώνεται, γεγονός που αποτελεί το σήμα πυρηνικής εξόδου του συμπλόκου. Στο κυτταρόπλασμα, το διμερές NEMO-ATM προσδένεται με τις κινάσες IKKα και IKKβ, αλλά και την πρωτεΐνη ELSK (πλούσια σε γλουταμινικό οξύ, λευκίνη, λυσίνη και σερίνη). Ο σχηματισμός του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου προάγει την αποδόμηση της IκΒα και την επακόλουθη απελευθέρωση των διμερών NF-κΒ, τα οποία εισέρχονται στον πυρήνα για τη ρύθμιση των γονιδίων στόχων (106).

Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στις κυτταρικές αποκρίσεις στις βλάβες του DNA, διαδραματίζει και ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ, ο οποίος προάγει τη μεταγραφή αντι-αποπτωτικών γονιδίων αλλά και την ενεργοποίηση πορειών επιδιόρθωσης του DNA (82, 106, 145, 148, 152, 221, 223). Με εξαίρεση την υπεριώδη ακτινοβολία (UV), γενοτοξικοί παράγοντες που προκαλούν αμφίκλωνες ρήξεις στο DNA (DSBs), όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία (IR) και οι αναστολείς των τοποϊσομερασών (καμπποθεκίνη, CPT και ετοποσίδιο), οδηγούν στην ενεργοποίηση του NF-κΒ διαμέσου μιας πορείας εξαρτώμενης από την κινάση ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), μια πρωτεϊνική κινάση η οποία αποτελεί κεντρικό ρυθμιστή των σηματοδοτικών πορειών ελέγχου του κυτταρικού κύκλου στα θηλαστικά, και μιας παράλληλης πορείας η οποία απαιτεί την ενεργοποίηση της PIDD (p53-inducible death domain-containing protein), μιας πρωτεΐνης η οποία περιέχει μια περιοχή θανάτου που επάγεται από την p53 (102, 103) (Εικόνα 1.6).

Η υπομονάδα NEMO εισέρχεται στον πυρήνα διαμέσου της PIDD, ενώ παράλληλα η ATM ενεργοποιείται ως απόκριση σε κάποιο γενοτοξικό ερέθισμα. Το σημείο σύγκλισης των δύο πορειών αποτελεί η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης NEMO από την ATM και η δημιουργία του συμπλόκου NEMO-ATM γεγονός που αποτελεί και το σήμα «πυρήνας στο κυτταρόπλασμα». Στο κυτταρόπλασμα το σύμπλοκο δεσμεύεται στις κινάσες IKKα και IKKβ και οδηγεί στην απελευθέρωση του διμερούς p65-p50, ομοίως με την κανονική πορεία ενεργοποίησης, προάγοντας τη μεταγραφή γονιδίων που συμβάλλουν στην κυτταρική επιβίωση (Εικόνα 1.6.) (102, 145, 148).

1.7. Ο ρόλος του NF-κΒ στην καρκινογένεση

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ ελέγχει την έκφραση περισσότερων από 400 γονιδίων που εμπλέκονται σε μια πληθώρα λειτουργιών, όπως η έκφραση ανοσοϋποδοχέων, χημειοκινών, κυτοκινών, μορίων κυτταρικής προσκόλλησης. Επιπλέον, στοχεύει γονίδια, τα προϊόντα των οποίων συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, τη μετάσταση, τη φλεγμονή και την αναστολή της απόπτωσης (2, 15, 108- 110, 165).

Δεδομένου ότι ο NF-κΒ συμμετέχει σε πορείες που προάγουν τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλουν την απόπτωση των κυττάρων, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι έχει συσχετιστεί με την καρκινογένεση. Υπάρχουν αρκετές μελέτες που καταδεικνύουν τη σχέση του NF-κΒ με την εμφάνιση ή εξέλιξη του

καρκίνου. Ιδιοστατική ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB μπορεί να παρατηρηθεί σε αρκετές μορφές επιθηλιακού καρκίνου και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του πνεύμονα (18, 42, 105, 150, 175, 202). Μελέτες με διαγονιδιακά ποντίκια κατέδειξαν το σημαντικό ρόλο του NF-κB σε μια σειρά φυσιολογικών διαδικασιών (72, 161). Διαγονιδιακά μοντέλα καρκινογένεσης του πνεύμονα ποντικών κατέδειξαν ότι η κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αδενοκαρκινωμάτων μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (210, 220). Επιπλέον, η καταστολή της ενεργοποίησης της κανονικής πορείας του NF-κB μείωσε την αύξηση και τη μετάσταση των όγκων και αύξησε την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (17, 147, 194, 227). Αντίθετα, ελάχιστες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε σχέση με το ρόλο της μη κανονικής πορείας του NF-κB στον καρκίνο του πνεύμονα (227).

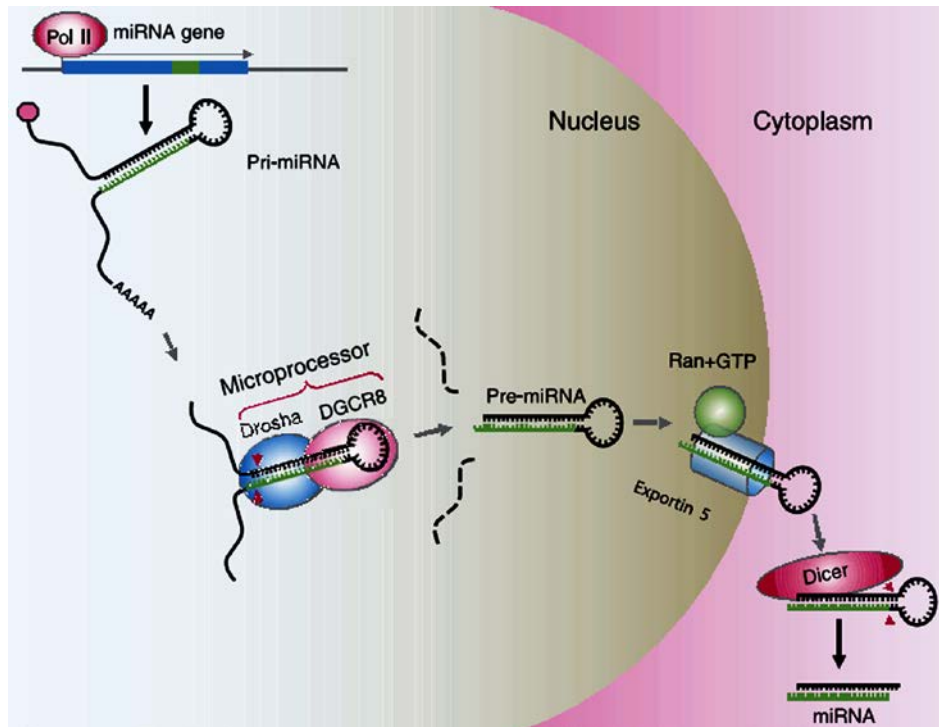
1.8. Μεταγραφικό δίκτυο NF-κB - microRNAs

Η καρκινογένεση οφείλεται στη συνάθροιση μεταλλάξεων που οδηγούν στην ενεργοποίηση ογκογονιδίων και στην απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, καθώς επίσης και σε επιγενετικές τροποποιήσεις που οδηγούν στη μεταβολή της έκφρασης γονιδίων και της φυσιολογικής κυτταρικής ομοιόστασης (86). Μελέτες έχουν καταδείξει ότι τα microRNAs (miRNAs or miRs) παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και εμπλέκονται σε όλα τα στάδια της πολυσταδιακής διαδικασίας της καρκινογένεσης (69, 100, 173, 211- 213).

Τα MicroRNAs (miRNAs) αποτελούν μια κατηγορία μικρών, μη κωδικοποιών (noncoding; ncRNAs), ενδογενών RNAs ~22 νουκλεοτιδίων. Τα miRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II η οποία παράγει τα πρωτογενή μεταγραφήματα, pri-miRNA, τα οποία στη συνέχεια υφίστανται επεξεργασία από το σύμπλοκο του μικροεπεξεργαστή (microprocessor complex) που αποτελείται από τις RNAάσες III, Drosha και Dicer, οι οποίες παράγουν το πρόδρομο μόριο miRNA (precursor miRNA ή pre-miRNA), το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται μετά από περαιτέρω επεξεργασία σε ώριμο μόριο miRNA (Εικόνα 1.7).

Τα miRNAs ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο δρώντας ως αρνητικοί ρυθμιστές της μετάφρασης ή/και της σταθερότητας του mRNA, κυρίως με τη δέσμευση τους σε συμπληρωματικές βάσεις της 3' μη μεταφραζόμενη

περιοχής, 3' UTR (3' UnTranslated Region) του mRNA στόχους τους, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της μετάφρασης τους ή την αποικοδόμησή τους (6, 16, 77, 81, 127).



Εικόνα 1.7. Μοντέλο βιογένεσης των miRNAs. Μεγάλα πρωτογενή μεταγραφώματα (pri-miRNAs) τα οποία περιέχουν 1 έως και αρκετά μόρια miRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II, φέρουν την 5' καλύπτρα και είναι πολυαδενυλιωμένα. Το σύμπλοκο του μικροεπεξεργαστή το οποίο αποτελείται από την πρωτεΐνη Drosha, μια RNA III ενδονουκλεάση, και την πρωτεΐνη DGCR8, η οποία δεσμεύεται σε δίκλωνο μόριο RNA (double-stranded RNA binding protein) αναγνωρίζει τη χαρακτηριστική δευτεροταγή δομή βρόγχου (ή φουρκέτας) του pri-miRNA (hairpin secondary structure of pri-miRNA), και κόβει το μόριο στη βάση του βρόγχου απελευθερώνοντας ένα μόριο pre-miRNA περίπου 60-70 νουκλεοτιδίων. Αυτό το ενδιάμεσο μόριο pre-miRNA εξέρχεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα με τη βοήθεια του μηχανισμού της εξπορτίνης 5/Ran-GTP, όπου η πρωτεΐνη Dicer, μια δεύτερη RNA III ενδονουκλεάση, απελευθερώνει από το μόριο pri-miRNA ένα ώριμο μόριο miRNA μεγέθους ~22-νουκλεοτιδίων. Η απορρύθμιση της διαδικασίας της βιογένεσης των miRNA συνεισφέρει σημαντικά στην καρκινογένεση (77).

Τα miRNAs εμπλέκονται στη ρύθμιση μιας σειράς σημαντικών βιολογικών διαδικασιών, όπως στη ρύθμιση πορειών μεταγωγής σήματος, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, της διαφοροποίησης και της ανάπτυξης (5, 6, 62, 99, 146, 205).

Μελέτες κατέδειξαν ότι τα miRNAs παίζουν σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση καθώς ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και τις κυτταρικές

αποκρίσεις σε παράγοντες στρες δρώντας ως ογκογονίδια (oncomirs) ή ογκοκατασταλτικά γονίδια (tumor suppressors miRs) (32, 33, 47, 52, 61, 62, 69, 85, 100, 122, 153, 155, 173, 192, 211- 213).

Επειδή τα miRNAs καταστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση, υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους τα miRNAs ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επηρεάζουν την πολυσταδιακή διαδικασία της καρκινογένεσης. Η υπερέκφραση, η γονιδιακή ενίσχυση, ή η επιγενετική αποσιώπηση ενός ογκογόνου miRNA (oncomiR) το οποίο στοχεύει ένα ή περισσότερα ογκοκατασταλτικά γονίδια μπορεί να καταστείλει τη λειτουργία μιας αντι-ογκογόνου πορείας. Σε αντίθεση, η απάλειψη, οι μεταλλάξεις ή η επιγενετική αποσιώπηση ενός ογκοκατασταλτικού miRNA (tumor suppressive miRNA) το οποίο φυσιολογικά καταστέλλει την έκφραση ενός ή περισσότερων ογκογονιδίων μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση ενός ή περισσότερων ογκογονιδίων και μιας ογκογόνου πορείας (12, 13, 62, 99, 211, 212, 216).

Με βάση το ρόλο των miRNAs ως ογκογονίδια ή ως ογκοκατασταλτικά γονίδια κατά την καρκινογένεση, πολυάριθμες μελέτες εστιάζονται στο χειρισμό των miRNAs ως μια πιθανή θεραπευτική στρατηγική κατά του καρκίνου (12, 62, 112, 129, 211).

Όμως, τα miRNAs φαίνεται ότι δε λειτουργούν μεμονωμένα αλλά αποτελούν μέρος πολύπλοκων και αλληλεπιδρώντων ρυθμιστικών δικτύων μεταγραφικών παραγόντων - miRNAs για να επιτευχθεί διαφορική γονιδιακή έκφραση και ρύθμιση μιας σειράς βιολογικών διαδικασιών, όπως η ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης και της καρκινογένεσης (9, 30, 80, 94, 143).

Τέτοια πολύπλοκα, αλληλεπιδρώντα ρυθμιστικά δίκτυα μεταγραφικών παραγόντων - miRNA είναι τα ρυθμιστικά δίκτυα p53-miRNA (90, 91, 122, 124, 229), E2F-miRNA (31, 114, 197, 203) και NFκB-miRNA (26, 98, 138, 209, 239, 240).

Είναι επομένως φανερό ότι η ισορροπία μεταξύ ογκογόνων και ογκοκατασταλτικών miRNAs τα οποία δρουν μέσα σε ένα αλληλεπιδρώντων με άλλα ρυθμιστικό δίκτυο μεταγραφικού παράγοντα - miRNA θα καθορίσει τις αποκρίσεις των κυττάρων, και την εξάλαξη των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά κύτταρα διαμέσου της πολυσταδιακής διαδικασίας της καρκινογένεσης.

1.9. Σκοπός της μελέτης

Οι σηματοδοτικές πορείες ενεργοποίησης των NF-κB και E2F διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και συχνά φαίνεται να δρουν ανταγωνιστικά. Ενώ ο NF-κB γενικά προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση, οι E2Fs δρουν τόσο ως ενεργοποιητές όσο και ως αναστολείς της κυτταρικής ανάπτυξης. Γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και ρυθμίζουν την πορεία του κυτταρικού κύκλου (E2F1, κυκλίνης D1, Cdc6, p21, p27), αλλά και την απόκριση του κυτάρου σε βλάβες του DNA (ATM) ρυθμίζονται διαφορετικά από τις δύο οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων, όμως οι μηχανισμοί που επιτρέπουν τη συντονισμένη δράση των NF-κBs και E2Fs ως απόκριση σε γενετοξικά ερεθίσματα δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου του NF-κB στη ρύθμιση γονιδίων στόχων των E2F που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και η διερεύνηση νέων μηχανισμών με τους οποίους ο NF-κB ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τις κυτταρικές αποκρίσεις σε βλάβες στο DNA.

Συγκεκριμένα, στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν να διερευνηθούν:

1. Οι επιδράσεις των σηματοδοτικών πορειών του NF-κB στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην έκφραση γονιδίων-στόχων των E2Fs.
2. Η επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα ετοποσιδίου (VP16) στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.
3. Η επίδραση του VP16 στις αποκρίσεις σε βλάβες στο DNA.
4. NF-κB ρυθμιζόμενα microRNAs που πιθανά εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στις κυτταρικές αποκρίσεις σε βλάβες στο DNA.

ΕΝΟΤΗΤΑ ΔΕΥΤΕΡΗ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ

Στον ακόλουθο πίνακα παρατίθενται μερικά από τα πιο σημαντικά αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης (Πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1: ΥΛΙΚΑ	
ΥΛΙΚΑ	ΕΤΑΙΡΙΑ
DMEM	Hyclone, Thermo Scientific
RPMI-1640	Hyclone, Thermo Scientific
Ορός εμβρύου μόσχου (FCS)	Gibco, Life Technologies, UK
Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη	Biosera
L-γλουταμίνη (200 mM)	Biosera
Θρυψίνη – EDTA	Lonza
Πουρομυκίνη	SantaCruz Biotechnology
Θρυπτόνη (Bacto-tryptone)	LAB M
Εκχύλισμα ζύμης (Bacto-yeast extract)	LAB M
Άγαρ	LAB M
Διμεθυλο-σουλφοξειδίο (DMSO)	AppliChem
Ετοποσίδιο (VP16)	Pch Pharmachemie
Δοξυκυκλίνη	Sigma Aldrich Co
Ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodine)	SantaCruz Biotechnology
Πρότυπος μάρτυρας πρωτεϊνών	Thermo Scientific
Kit απομόνωσης πλασμιδιακού DNA	Macherey-Nagel GmbH & Co.
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, USA
Μεμβράνες Νιτροκυτταρίνης	Whatman GmdH, Germany
	OPTITRAN BA-S 85 Reinforced NC
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific, USA
ECL kit	Bio-Rad
Αντισώματα	SantaCruz Biotechnology, USA
Διάφορα εργαστηριακά στερεά χημικά	Riedel, Germany
Διάφορα εργαστηριακά υγρά χημικά	Fisher Scientific
Πλαστικά υλικά κυτταροκαλλιέργειας	CellTek
Πλαστικοί σωλήνες (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson
Μικροσωλήνες	Eppendorff

ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.1.1. Παρασκευή L-broth (Luria-Bertani; LB) και τρυβλίων με L-άγαρ (L-agar)

Η παρασκευή των τρυβλίων L-άγαρ έγινε παράλληλα με την παρασκευή διαλύματος L- Broth. 10 g θρυπτόνης (Bacteriological thryptone), 5 g εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract powder) και 10 g χλωριούχου νατρίου (LAB M), διαλύθηκαν με ανάδευση σε 1 l δισ απεσταγμένου νερού και το διάλυμα μεταβιβάστηκε σε 2 φιάλες των 500 ml. Στη μια φιάλη προστέθηκαν 7.5 g άγαρ και αφού έγινε αποστείρωση σε αυτόκαυστο, η φιάλη αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για να κατέβει η θερμοκρασία στους 55°C, προστέθηκε αμπικυλλίνη (100 µg/ml), το υλικό μοιράστηκε σε 20 τρυβλία και αφέθηκε να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα τρυβλία αποθηκεύτηκαν στους 4°C για περαιτέρω χρήση (176).

100 mg/ml Αμπικυλλίνης: Σκόνη αμπικυλλίνης διαλύθηκε σε κατάλληλη ποσότητα αποστειρωμένου ddH₂O, φιλτραρίστηκε μέσω ενός αποστειρωμένου μικροφίλτρου 0.2 µm και διατηρήθηκε στους -20°C σε μικρές ποσότητες (aliquots).

2.1.2. Παρασκευή βακτηρίων επιδεκτικών προς μετασχηματισμό (competent cells)

Η δημιουργία επιδεκτικών προς μετασχηματισμό βακτηρίων, απαιτεί την κατεργασία τους με παράγοντες που σχηματίζουν πόρους στο κυτταρικό τους τοίχωμα, επιτρέποντας την εισαγωγή με παθητική διάχυση, εξωγενώς προστιθέμενου DNA. Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή επιδεκτικών βακτηρίων ικανών προς μετασχηματισμό με πλασμίδια (competent cells) ήταν το στέλεχος *E. Coli* TOP10F.

Αρχικά, μη επιδεκτικά βακτήρια τοποθετήθηκαν σε 4 ml L-Broth και επωάστηκαν σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C ολονύκτια ώστε να αναπτυχθούν. Την επόμενη ημέρα, 0.2 ml της ολονύχτιας υγρής βακτηριακής καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 20 ml L-broth (αραίωση 1/100) σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη 25 cm², όπου επωάστηκαν για 2-3 ώρες στους 37°C, μέχρι η OD₆₀₀ να φτάσει 0.5. Έπειτα, η καλλιέργεια μοιράστηκε σε 2 σωλήνες των 15ml και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά σε 3000Xg στους 4°C. Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 4 ml διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂) και

φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 3000Xg στους 4°C. Το ίζημα επανεωρήθηκε με άλλα 4 ml CaCl₂ και επωάστηκε για 30 λεπτά στον πάγο. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 7 λεπτά στις 2500 στροφές και τους 4°C. Το ίζημα επανεωρήθηκε σε 1,5 ml CaCl₂ και δείγματα των 100 μl βακτηρίων τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένους σωλήνες errendorff και αποθηκεύτηκαν στους -80°C για μελλοντική χρήση (176).

Διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂): 60 mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη, 10 mM PIPES pH 7.0.

2.1.3. Μετασχηματισμός βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA

100 μl ικανών βακτηριακών στελεχών E. Coli TOP10 αναμίχθηκαν με ~50 ng πλασμιδιακού DNA σε σωλήνες errendorff και επωάστηκαν στον πάγο για 10 λεπτά έτσι ώστε να γίνει η εισαγωγή του πλασμιδίου στα βακτηριακά κύτταρα. Στη συνέχεια τα βακτήρια επιστρώθηκαν σε τρυβλία L-άγαρ που περιείχαν 100 μg/ml αμπικικιλίνη με τη βοήθεια μιας γυάλινου ράβδου. Τα τρυβλία αφέθηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να απορροφηθεί το εμβολίασμα και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 30°C ολονύκτια, προς σχηματισμό ανθεκτικών στην αμπικικιλίνη αποικιών βακτηρίων (176).

2.1.4. Ανάπτυξη υγρών καλλιιεργειών βακτηρίων

Για απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρούς όγκους (mini prep) ήταν απαραίτητη η ανάπτυξη υγρών καλλιιεργειών βακτηρίων. 4 ml L-Broth με 100 μg/ml αμπικικιλίνης εμβολιάστηκαν με αποικίες ή αποθέματα γλυκερόλης βακτηρίων, με τη χρήση κρικοφόρου στειλεού και επωάστηκαν σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα (orbital shaker) στους 37°C για όλη τη νύχτα (>16 ώρες).

2.1.5. Παρασκευή βακτηριακών αποθεμάτων γλυκερόλης

Τα αποθέματα βακτηρίων παρασκευάστηκαν αναμιγνύοντας 800 μl αναπτυγμένης υγρής καλλιιεργείας βακτηρίων και 200 μl γλυκερόλης (10% τελική συγκέντρωση γλυκερόλης), και διατηρήθηκαν στους -80°C για περαιτέρω χρήση (176).

2.1.6. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini prep)

1.5 ml υγρής καλλιιεργείας βακτηρίων, προερχόμενες από αποικίες (§ 2.1.4.), τοποθετήθηκαν σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα errendorff και φυγοκεντρήθηκαν

στις 6500 στροφές για 2 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια, το βακτηριακό ίζημα εναιωρήθηκε με δίνη (vortexing) σε 70 μl ρυθμιστικού διαλύματος STET και 25 μl λυσοζύμης (10 mg/ml). Μετά από 5 λεπτά επώασης σε θερμοκρασία δωματίου, τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 100°C για 45 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στις 13000 στροφές (176).

Το υπερκείμενο συλλέχθηκε προσεκτικά και μεταφέρθηκε σε καθαρό σωλήνα erpendorff, όπου προστέθηκαν 100 μl ισοπροπανόλης. Το πλασμιδιακό DNA αφέθηκε να κατακρημνιστεί για 5 λεπτά στους -70°C και συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση για 7 λεπτά στις 13000 στροφές. Το ίζημα επανεναιωρήθηκε σε περίπου 25 μl διαλύματος 1X TE και αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

Ρυθμιστικό διάλυμα STET: 8% σουκρόζη, 5% Triton X-100, 50 mM EDTA pH8.0, 50 mM Tris-HCl pH8.0

1xTE pH 8.0: 10 mM Tris pH8.0, 1 mM EDTA pH8.0

2.1.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μέση κλίμακα (midi prep)

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA έγινε με τη χρήση Nucleobond kit Xtra Midi EF/Maxi EF, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Εν συντομία, οι καλλιέργειες των βακτηρίων που αναπτύχθηκαν σε 150-200 ml L-Broth με 100 μg/ml αμπικιλίνης, φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά, στις 4500 στροφές στους 4°C. Το βακτηριακό ίζημα υπέστη αλκαλική λύση και έπειτα εισήχθη σε ειδική στήλη Nucleobond tip-100 που κατακρατά το πλασμιδιακό DNA. Στη συνέχεια, οι στήλες εκπλύθηκαν με ρυθμιστικά διαλύματα έκπλυσης (wash buffer) και απομάκρυνσης των ενδονουκλεασών και το πλασμιδιακό DNA εκχυλίστηκε σε 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης (elution buffer).

Το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίσθηκε με 3.5 ml ισοπροπανόλης με φυγοκέντρηση 8000Xg για 40 λεπτά στους 4°C. Ακολούθησε έκπλυση του με 1 ml 70% αιθανόλη, φυγοκέντρηση στις 13000Xg για 10 λεπτά και το ίζημα αφέθηκε να ξηρανθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Το πλασμιδιακό DNA εναιωρήθηκε σε 100-200 μl 1X TE pH8.0 και αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση. Η ποσότητα του απομονωμένου DNA υπολογίστηκε φωτομετρικά, με μέτρηση στα 260 nm και με βάση τον τύπο: Οπτική πυκνότητα (O.D.) =1 αντιστοιχεί σε 50 μg DNA.

2.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

2.2.1. Κυτταρικές σειρές και καλλιέργεια

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη αναφέρονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 2.2):

Κύτταρα	Περιγραφή κυττάρων	Γονότυπος (Μεταλλάξεις γονιδίων)			
		<i>K-Ras</i>	<i>p16</i>	<i>ARF</i>	<i>p53</i>
A549	Καρκινικά κύτταρα πνεύμονα 58 ετών	<i>K-Ras^{G12S}</i>	-/- (del)	-/- (del)	Wt
H1299	Καρκινικά κύτταρα πνεύμονα 43 ετών	wt	wt	wt	Null
H1437	Καρκινικά κύτταρα πνεύμονα 60 ετών	wt	mut	mut	<i>p53^{R267P}</i>
H1792	Καρκινικά κύτταρα πνεύμονα 50 ετών	<i>K-Ras^{G12C}</i>	wt	wt	Mut
HEK293T	Ανθρώπινα κύτταρα από νεφρό εμβρύου, Χρησιμεύει ως κυτταρική σειρά πακεταρίσματος ρετροϊών				

Συγκεκριμένα:

- A549: Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα. Προέρχονται από κυψελιδικό αδеноκαρκίνωμα πνεύμονα, και απομονώθηκαν από Καυκάσιο άντρα 58 ετών, που έπασχε από μεταστατικό καρκίνο του πνεύμονα. Φέρουν αγρίου τύπου γονίδιο της *p53* και μεταλλάξεις στα γονίδια *K-Ras*, *p16^{INK4A}* και *p14^{ARF}*.
- H1299: Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα. Προέρχονται από λεμφαδένα και εμφανίζουν μορφολογία επιθηλιακών κυττάρων, και απομονώθηκαν από Καυκάσιο άνδρα 43 ετών που έπασχε από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Φέρουν αγρίου τύπου γονίδια *K-Ras*, *p16^{INK4A}* και *p14^{ARF}*, ενώ δεν υπάρχει το γονίδιο *p53*.
- H1437: Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα που απομονώθηκαν από Καυκάσιο άντρα 60 ετών, που έπασχε από αδеноκαρκίνωμα πνεύμονα. Φέρουν αγρίου τύπου γονίδιο *K-Ras* και μεταλλάξεις στα γονίδια *p16^{INK4A}*, *p14^{ARF}* και *p53*.
- H1792: Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα που απομονώθηκαν από Καυκάσιο άντρα 50 ετών, που έπασχε από αδеноκαρκίνωμα πνεύμονα. Φέρουν αγρίου τύπου γονίδια *p16^{INK4A}* και *p14^{ARF}* και μεταλλάξεις στα γονίδια *K-Ras* και *p53*.

- HEK293T: Ανθρώπινα κύτταρα από νεφρό εμβρύου, και εκφράζουν ιδιοστατικά το μεγάλο T αντιγόνο του ιού του SV40 [Simian virus 40 (SV40) large T antigen].

Οι κυτταρικές σειρές A549, H1299 και HEK293T, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) (Hyclone) και οι σειρές H1437 και H1792 σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 (Hyclone). Τα θρεπτικά υλικά εμπλουτίστηκαν με 10% εμβρυϊκό ορό μόσχου (Foetal Calf Serum) (Life Technologies , Biochrom), 100 IU/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη και 1.4 mM L-γλουταμίνη. Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5%CO₂ (66).

2.2.2. Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Η ανακαλλιέργεια κυττάρων έγινε: 1) Για να διατηρηθούν τα καλλιεργούμενα κύτταρα ζωντανά, και 2) Για να προετοιμαστούν τα καλλιεργούμενα κύτταρα για έκθεση σε παράγοντες, κατά τη διάρκεια των διαφόρων πειραμάτων. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων διεξάγονταν στην εστία κυτταροκαλλιέργειας κάθετης νοηματικής ροής (Tissue culture hood).

Τρυβλία διαμέτρου 100 mm, με κύτταρα σε πλήρες ταπήτιο (confluent) εκπλύθηκαν δύο φορές με 10 ml PBS και ύστερα προστέθηκε 1 ml διάλυμα θρυψίνης-EDTA [Lonza]. Τα κύτταρα αφέθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5%CO₂ για περίπου 2-5 λεπτά, ώστε να αποκολληθούν από το τρυβλίο. Μετά προστέθηκε ο κατάλληλος όγκος θρεπτικού υλικού στα τρυβλία, ώστε να γίνουν οι επιθυμητές αραιώσεις, συνήθως σε αναλογίες 1:2, 1:4, 1:8 ή 1:16 και συμπληρώθηκε θρεπτικό υλικό μέχρι τα 10 ml. Τέλος, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5%CO₂, ώστε να αναπτυχθούν τα κύτταρα εκ νέου.

Ρυθμιστικό διάλυμα φυσιολογικού ορού - φωσφορικού άλατος (Phosphate Buffered Saline; PBS): Για 10X PBS διαλύθηκαν με ανάδευση σε 1l απεσταγμένου νερού 80g NaCl, 2g KCl, 18,055g ενυδατωμένου Na₂HPO₄ και 2,4 g KH₂PO₄ σε pH 7.4. Το PBS αποστειρώθηκε στο αυτόκαυστο. Για 1X PBS 50ml από το 10X PBS διαλύθηκαν σε 500 ml απεσταγμένου νερού και το PBS αποστειρώθηκε στο αυτόκαυστο.

2.2.3. Διατήρηση των κυττάρων στο υγρό άζωτο

Η μακροχρόνια συντήρηση των κυτταρικών σειρών είναι δυνατή με την αποθήκευσή τους σε υγρό άζωτο (-192°C) σε υλικό που αποτελείται από 90% FCS και 10% διμεθυλο-σουλφοξειδίο (DMSO) (66).

Για τη διατήρηση και τη βαθιά κατάψυξη των κυττάρων, επιλέχθηκαν τρυβλία με κύτταρα σε ημι-πλήρες ταπήτιο (semi-confluent) και αποκολλήθηκαν με θρυψίνη - EDTA (§2.2.2.). Στη συνέχεια προστέθηκαν 9 ml PBS και τα εναιωρήματα των κυττάρων μεταβιβάστηκαν σε αποστειρωμένους σωλήνες Falcon των 15 ml. Έγινε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 1500 στροφές και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 2 ml ορού (FCS) που περιείχε 10% διμέθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO), μεταφέρθηκε σε 2 ειδικές αμπούλες (cryovials) των 2 ml (1 ml εναιωρήματος ανά Falcon). Οι αμπούλες τοποθετήθηκαν σε ισοθερμικό δοχείο που περιείχε ισοπροπανόλη και μεταφέρθηκαν στους -80°C για όλη τη νύχτα ώστε να παγώσουν σταδιακά ($1^{\circ}\text{C}/\text{λεπτό}$). Την επόμενη ημέρα μεταφέρθηκαν στο υγρό άζωτο για μακροπρόθεσμη διατήρηση.

Για την ανασύστασή τους, οι αμπούλες από το υγρό άζωτο τοποθετήθηκαν για περίπου 1-2 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 37°C ώστε να ξεπαγώσουν τα κύτταρα και το περιεχόμενο μεταβιβάστηκε σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας διαμέτρου 100 mm όπου προστέθηκαν 9 ml πλήρους θρεπτικού υλικού. Τα κύτταρα ανακινήθηκαν ελαφρά και τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C , 5% CO_2 .

2.2.4. Χορήγηση ετοποσιδίου (VP16) στα κύτταρα

Αρχικά πραγματοποιήθηκε σπορά των κυττάρων σε τρυβλία διαμέτρου 100mm με πλήρες θρεπτικό υλικό. Έπειτα από 24 ώρες έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού και χορήγηση των επιθυμητών συγκεντρώσεων ετοποσιδίου (0 - 5 μM). Τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω πειράματα μετά το πέρας 24 ωρών από τη χορήγηση του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου. Το ετοποσίδιο είναι κατάλληλο για ενδοφλέβια χρήση με αρχική συγκέντρωση 34 mM. Η χορήγησή του στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε έπειτα από κατάλληλες αραιώσεις με DMSO.

2.2.5. Προσδιορισμός του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής

Κύτταρα από τρυβλία διαμέτρου 60 mm συλλέχθηκαν με θρυψινοποίηση (0.5 ml θρυψίνης), και προστέθηκαν 0.5ml PBS ανά τρυβλίο. Στη συνέχεια, το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρθηκε σε ειδικά σωληνάρια, τα οποία φυγοκεντρήθηκαν για 3 λεπτά στα 6000Xg. Ακολούθως, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 0.5 ml διαλύματος χρώσης ιωδιούχου προπιδίου (PI), μετρήθηκαν σε μηχανήμα BD – FACSCALIBUR αναλύθηκαν με τη χρήση του προγράμματος cellquest.

Διάλυμα χρώσης ιωδιούχου προπιδίου (propidium iodide; PI): 0.1% Triton X-100, 0.1% κιτρικό νάτριο, 50 ng/ml ιωδιούχο προπίδιο (Santa Cruz, sc-3541)

2.2.6. Πλασμιδιακοί φορείς και διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων

Πλασμίδια

PS-p65^{KD}: Ευκαρυωτικός πλασμιδιακός φορέας έκφρασης που φέρει shRNA για αποσιώπηση της υπομονάδας RelA/p65 του NF-κB, και το γονίδιο της φωσφομεταφοράσης της πουρομυκίνης ως μάρτυρα επιλογής διαμολυσμένων κυττάρων στο αντιβιοτικό πουρομυκίνη.

pS-pSuper: Ευκαρυωτικός πλασμιδιακός φορέας έκφρασης όπως ανωτέρω, όπου απουσιάζει το shRNA, και χρησιμοποιείται ως φορέας ελέγχου.

Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA με τη χρήση λιπιδίων

Η μέθοδος της διαμόλυνσης με λιπίδια χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πλασμιδιακών κατασκευών σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκε το λιπίδιο polyethilenimine (PEI). Το αντιδραστήριο αυτό σχηματίζει θετικά φορτισμένες συμπαγείς δομές με το πλασμιδιακό DNA, που προσδένονται στους αρνητικά φορτισμένους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η μεταφορά ακέραιου DNA διαμέσου της μεμβράνης.

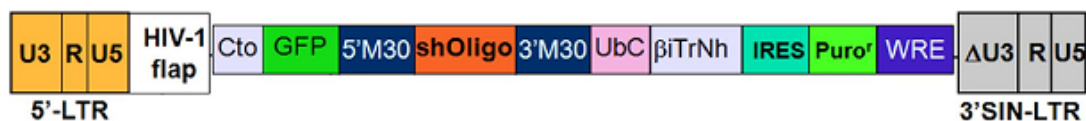
Το PEI διαλύθηκε σε ddH₂O σε συγκέντρωση 2 mg/ml και αποθηκεύθηκε σε βαθιά κατάψυξη (-80 °C) μέχρι τη χρήση του. Για τη διαμόλυνση ενός τρυβλίου ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα διαμέτρου 60 mm αναμείχθηκαν 4 μg πλασμιδίου με 10 μg PEI σε 80 μl θρεπτικού υλικού DMEM (απουσία ορού και αντιβιοτικών). Το διάλυμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 λεπτά και προστέθηκε σε κύτταρα ~70% πληρότητας που είχαν εκπλυθεί δύο φορές με DMEM απουσία ορού και αντιβιοτικών. Την επομένη ημέρα έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού και σε επιπλέον 24 ώρες ξεκίνησε η επιλογή των διαμολυσμένων κυττάρων σε 2 μg/ml πουρομυκίνης για δύο εβδομάδες, και σε 10 μg/ml πουρομυκίνης για μια επιπλέον εβδομάδα προκειμένου να κατασκευαστούν ανθρώπινες καρκινικές σειρές πνεύμονα, A549 και H1299 με μειορρυθμισμένη την έκφραση της RelA/p65 (κύτταρα p65^{KD}).

2.2.7. Ανάλυση με γονίδιο αναφοράς NF-κB λουσιφεράσης

Για την ανάλυση με γονίδιο αναφοράς NF-κB λουσιφεράσης έγινε σπορά κυττάρων σε πολυτρυβλία 24ρων θέσεων. Τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με 0.3 μg εξαρτώμενου πλασμιδίου αναφοράς firefly λουσιφεράσης 5κB και με 0.2 μg πλασμιδίου pRLTK (πλασμίδιο που εκφράζει το γονίδιο της renilla λουσιφεράσης και βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή της κινάσης της θυμιδίνης). 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση χορηγήθηκαν στα κύτταρα οι επιθυμητές συγκεντρώσεις ετοποσιδίου. Μετά από 24 ώρες αναλύθηκε η δραστηριότητα της λουσιφεράσης με τη χρήση του kit Dual-Luciferase Reporter Assay System και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Promega Co).

2.2.8. Παραγωγή λεντι-ϊικών σωματιδίων και επιμόλυνση κυττάρων θηλαστικών

Ένας λεντι-ϊικός φορέας έκφρασης, χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή σταθερών κυτταρικών σειρών A549, H1299, H1437 και H1792 που μειορρυθμίζουν τις κινάσες IKKα ή IKKβ (Εικόνα 2.1.). Ο φορέας έφερε ένα shRNA καθώς και το γονίδιο που κωδικοποιεί για μια πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, GFP (Green Fluorescent Protein), υπό τον έλεγχο του υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού CMV (Cto), ο οποίος επάγεται από τη δράση τετρακυκλίνης. Το sh-ολιγονουκλεοτίδιο είχε ως στόχο τη λουσιφεράση (control), είτε τις κινάσες ενεργοποίησης του NF-κB IKKα ή IKKβ. Για την επιλογή των κυττάρων, ο φορέας έφερε και το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην πουρομυκίνη (Puro).



Εικόνα 2.1. Σχηματική αναπαράσταση του λεντι-ϊικού φορέα έκφρασης για τη μειορρύθμιση της IKKα ή IKKβ. Ο φορέας φέρει τον υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού, CMV (Cto), ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση μιας πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP και ενός sh-ολιγονουκλεοτιδίου το οποίο στοχεύει τη λουσιφεράση (control), την IKKα ή την IKKβ. Επίσης, φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη.

Για την παραγωγή λεντι-ϊικών σωματιδίων χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HEK293T, η οποία διαμολύνθηκε με τους επιθυμητούς λεντι-ϊικούς φορείς με τη χρήση λιπιδίων PEI. 4.5 μg του επιθυμητού πλασμιδίου, 2.2 μg του πλασμιδίου VSV-

G (κωδικοποιεί για τις G γλυκοπρωτεΐνες του ιού VSV) και 3.3 μl του πλασμιδίου pBR8.91 (κωδικοποιεί για τις κύριες δομικές πρωτεΐνες του ιοσωματίου) αναμείχθηκαν με 125 μl θρεπτικού υλικού (χωρίς προσθήκη ορού) και 15 μl λιπιδίου, για κάθε διαμόλυνση, και αφέθηκαν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Σε καλλιεργούμενα κύτταρα HEK293T πραγματοποιήθηκε μία πλύση με PBS και ακολούθησε προσθήκη 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού στο οποίο προστέθηκε στάγδην το διάλυμα των πλασμιδίων. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο 37°C, 5% CO₂.

Έπειτα από 24 ώρες στα κύτταρα HEK293T πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού υλικού και έπειτα από άλλες 24 ώρες η συλλογή των ιικών σωματίων. Το θρεπτικό υλικό συλλέχθηκε, φυγοκεντρήθηκε στις 1500 στροφές για 3 λεπτά και φιλτραρίστηκε μέσω ενός αποστειρωμένου μικροφίλτρου 0.45 μm. Στη συνέχεια προστέθηκε πολυβρίνη (8μl ανά 10ml ιού) και το διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για την επιμόλυνση καλλιεργούμενων κυττάρων A549, H1299, H1437 και H1792.

Η επιλογή των επιμολυσμένων κυττάρων έγινε με χορήγηση πουρομυκίνης σε συγκέντρωση 1μg/ml για 8 ημέρες. Το θρεπτικό υλικό με το αντιβιοτικό επιλογής ανανεώνονταν κάθε 2 - 3 ημέρες καθ' όλη τη διάρκεια της επιλογής των επιμολυσμένων κυττάρων. Πριν την απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από τα κύτταρα, χορηγήθηκε 1 μg/ml δοξυκυκλίνης (Dox) για 24 ώρες.

2.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΝΑΛΥΣΗ microRNAs

2.3.1. Απομόνωση RNA

Η απομόνωση ολικού RNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του miRNeasy Mini Kit (QIAGEN, 217004), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Εν συντομία, τα κύτταρα συλλέχθηκαν ($\leq 1 \times 10^7$) και φυγοκεντρήθηκαν στις 6500rpm για 1,5 min. Στο ίζημα προστέθηκαν 700μl QIAzol, και ακολούθησε πολύ καλή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5'. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 140 μl χλωροφόρμιο και τα δείγματα επώαστηκαν ξανά σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3'. Ακολούθως, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 12000 xg στους 4°C για 15 λεπτά και συλλέχθηκε, σε νέο δοχείο, η άνω υδάτινη φάση. Έπειτα προστέθηκε 100% αιθανόλη σε ποσότητα ίση με 1,5 φορά τον όγκο του διαλύματος και τα δείγματα εισήχθησαν στις ειδικές στήλες που κατακρατούν το RNA. Στη συνέχεια, οι στήλες εκπλύθηκαν με ρυθμιστικά διαλύματα έκπλυσης (wash

buffer) και το RNA εκχυλίστηκε σε 30 μl νερού απαλλαγμένο από RNάσες. Η ποιότητα του RNA ελέγχθηκε σε gel αγαρόζης και η ποσότητά του μετρήθηκε με nanodrop.

2.3.2. Ανάλυση microRNAs

Η ανάλυση της διαφορικής έκφρασης των microRNA πραγματοποιήθηκε με την τεχνολογία Nanostring nCounter της ομώνυμης εταιρίας (71). Στα δείγματα πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις υβριδισμού με τη χρήση του nCounterPrepStation και ακολούθως η ανίχνευση των ιχνηθετών έγινε με τη χρήση του ψηφιακού αναλυτή nCounter (nCounter digital analyzer). Η έκφραση των microRNA (n=800) αναλύθηκε με τη χρήση του λογισμικού nSolver software, v1.1 (Nanostring Technologies Inc, Seattle, WA, USA). Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε ως προς όλα τα miRNA με συντελεστή διακύμανσης μικρότερο του 50%.

2.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

2.4.1. Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων για την ανάλυση πρωτεϊνών

Η απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων έγιναν σύμφωνα με προηγούμενες μεθόδους που έχουν περιγραφεί (119).

Περιληπτικά, τρυβλία διαμέτρου 100mm εκπλύθηκαν αρχικά δύο φορές με 5ml ψυχρής PBS-1mM EDTA pH8.0 και στη συνέχεια προστέθηκε 1.0 ml ψυχρής PBS-1mM EDTA pH8.0 και τα κύτταρα συλλέχθηκαν με ειδικό σιλικονούχο υλικό (rubber policeman) σε σωλήνα erpendorff. Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στις 6500 στροφές για 1.5 λεπτό στο ψυχρό θάλαμο (cold room) και το υπερκείμενο αφαιρέθηκε. Κατόπιν προστέθηκαν 40-60 μl διαλύματος RIPA, το ίζημα επαναιωρήθηκε με δίνη (vortex) και το μίγμα παρέμεινε στον πάγο για 20 λεπτά. Ακολούθησε ανάδευση με δίνη (vortex) για περίπου 1 λεπτό και φυγοκέντρωση στις 13000 στροφές για 20 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό, αποστειρωμένο σωλήνα erpendorff και μικρή ποσότητα των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη χρήση του Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Τέλος, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C για περαιτέρω χρήση.

Διάλυμα RIPA: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1% NP-40, 0,5% Triton X-100, 1 mM EDTA pH8.0 και 0.5% δεοξυχολικό άλας του νατρίου (Sodium Deoxycholate) το οποίο περιείχε 1mM Dithiothreitol (DTT) και αναστολείς πρωτεασών - 1 μg/ml

απροτινίνη, 1 µg/ml πεψιστατίνη, 1 µg/ml λευπεψίνη (leupeptin), 1 mM PMSF και 1 mM ορθοβαναδικό άλας του νατρίου (Na₃VO₄).

2.4.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Με την ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε σύστημα κάθετων γυάλινων πλακών (176, 119). Η πηκτή αποτελείται από δύο μέρη: Από την πηκτή επιστοίβαξης με μεγάλο μέγεθος πόρων και την πηκτή διαχωρισμού με μικρότερο μέγεθος πόρων. Τα πρωτεϊνικά μόρια διαπερνούν γρήγορα την πρώτη συσσωρεύονται σε μια λεπτή στιβάδα και εισέρχονται ταυτόχρονα στη δεύτερη πηκτή όπου και γίνεται ο διαχωρισμός. Η αναλογία όγκων πηκτής διαχωρισμού : πηκτή επιστοίβαξης είναι ~5:1.

Πίνακας 2.3 Πηκτές SDS-Πολυακρυλαμιδίου ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών		
Όγκοι πηκτής επιστοίβαξης (για δύο πηκτές: 6 ml)		
Διάλυμα	Όγκος (ml)	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο ddH ₂ O	4.1	
30% μίγμα ακρυλαμιδίου	1.0	5% w/v
1.0 M Tris pH6.8	0.75	0.125 M
10% SDS	0.06	0.1%
10% υπερθειϊκό αμμώνιο	0.06	0.1%
TEMED	0.006	
Τελικός όγκος (ml)	6	(Για 2 πηκτές)
Όγκοι πηκτής διαχωρισμού 10% (για δύο πηκτές: 15 ml)		
Διάλυμα	Όγκος (ml)	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο ddH ₂ O	5.9	
30% μίγμα ακρυλαμιδίου	5.0	10% w/v
1.5 M Tris pH8.7	3.8	0.375 M
10% SDS	0.15	0.1%
10% υπερθειϊκό αμμώνιο	0.15	0.1%
TEMED	0.006	
Τελικός όγκος (ml)	15	(Για 2 πηκτές)

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-PAGE, που πραγματοποιήθηκε σε μικρή διπλή συσκευή Mini-Protean (Bio-Rad Labs, USA), παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν 10% πηκτές SDS-PAGE (Πίνακας 2.3) (176, 119).

Το μίγμα αφέθηκε να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου για 20-30 λεπτά. Στα πρωτεϊνικά δείγματα (40-60 μg πρωτεΐνης) προστέθηκαν 4 μl 4X διαλύματος φόρτωσης πρωτεϊνών και αφού θερμάνθηκαν για 10 λεπτά στους 100°C, φορτώθηκαν στην πηκτή. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 100 V σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης για ~3 ώρες. Ως δείκτης του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ένα πρότυπο έγχρωμο μίγμα πρωτεϊνών (RageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific).

4X διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών: 250mM Tris-Cl pH6.8, 40% γλυκερόλη, 8% SDS, 2.8 M β-μερκαπτοαιθανόλη, 0.2% κυανού της βρωμοφαινόλης
Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1X Tris-γλυκίνη/SDS): 25 mM Tris, 250 mM γλυκίνη, 0.1% SDS

2.4.3. Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσο-αποτύπωμα κατά Western (Western blot)

Μετά την ηλεκτροφόρηση σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα Tris-γλυκίνης που περιείχε SDS, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών για όλη τη νύχτα (>16 ώρες) στους 4°C και τάση 35V σύμφωνα με προηγούμενες μεθόδους που έχουν περιγραφεί (176).

Μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών, οι μεμβράνες επωάστηκαν για 3 ώρες σε 5% άπαχο γάλα σκόνη ελεύθερο λιπιδίων διαλυμένο σε PBS (5% blocking solution). Στην συνέχεια οι μεμβράνες επωάστηκαν με το πρώτο αντίσωμα σε 3.5% blocking solution ολονύκτια στους 4°C υπό ανάδευση. Οι μεμβράνες εκπλύθηκαν 3 φορές από 10 λεπτά με PBS και εκτέθηκαν στο δεύτερο αντίσωμα σε 3.5% blocking solution για 1.5 - 2 ώρες, στους 4°C, υπό ανάδευση. Οι μεμβράνες εκπλύθηκαν 3 φορές από 10 λεπτά με PBS και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν σε σκοτεινό θάλαμο χρησιμοποιώντας το ECL kit (Bio-Rad) ή/και το SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) Η έκθεση των μεμβρανών πραγματοποιήθηκε στο Molecular Imager® Chemi Doc™ XRS της εταιρίας Bio-Rad.

1X Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών (Transfer blotting buffer): 0.0025 M Tris, 0.192 M γλυκίνη, 20% μεθανόλη

Τα πρωτογενή αντισώματα με τα οποία επωάστηκαν οι μεμβράνες ήταν της εταιρίας SantaCruz Biotechnology, USA, ενώ τα δευτερογενή της εταιρίας Jackson Immuno Research. Η β-actin ήταν της εταιρίας Sigma και τα p-ATM και p- Chk2 της εταιρίας Cell Signaling.

- Πρωτογενή αντισώματα

- *Μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού*: CcnD1 (sc-20044), Cdc6 (sc-9964), IKKα (sc-87606), IKKβ (sc-8014), E2F1 (sc-251), E2F2 (sc-9967 X), p53 (sc-126), p21 (sc-817), β-actin (A5441-.2ML), ATM (sc-23921)
- *Μονοκλωνικά αντισώματα κουνελιού*: p-ATM (5883)
- *Πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού*: IKKα (sc-7218), p27 (sc-528), E2F3 (sc-878X), E2F4(sc-866X), E2F6 (sc-22823X), Chk2 (sc-9064), p- Chk2, p- p53 (sc-18079-R)
- *Πολυκλωνικά αντισώματα αιγός*: IKKβ (sc-7330)

- Δευτερογενή αντισώματα

Goat anti-mouse IgG (HRP)
Goat anti-rabbit IgG (HRP)
Bovine anti-goat IgG (HRP)

ΕΝΟΤΗΤΑ ΤΡΙΤΗ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

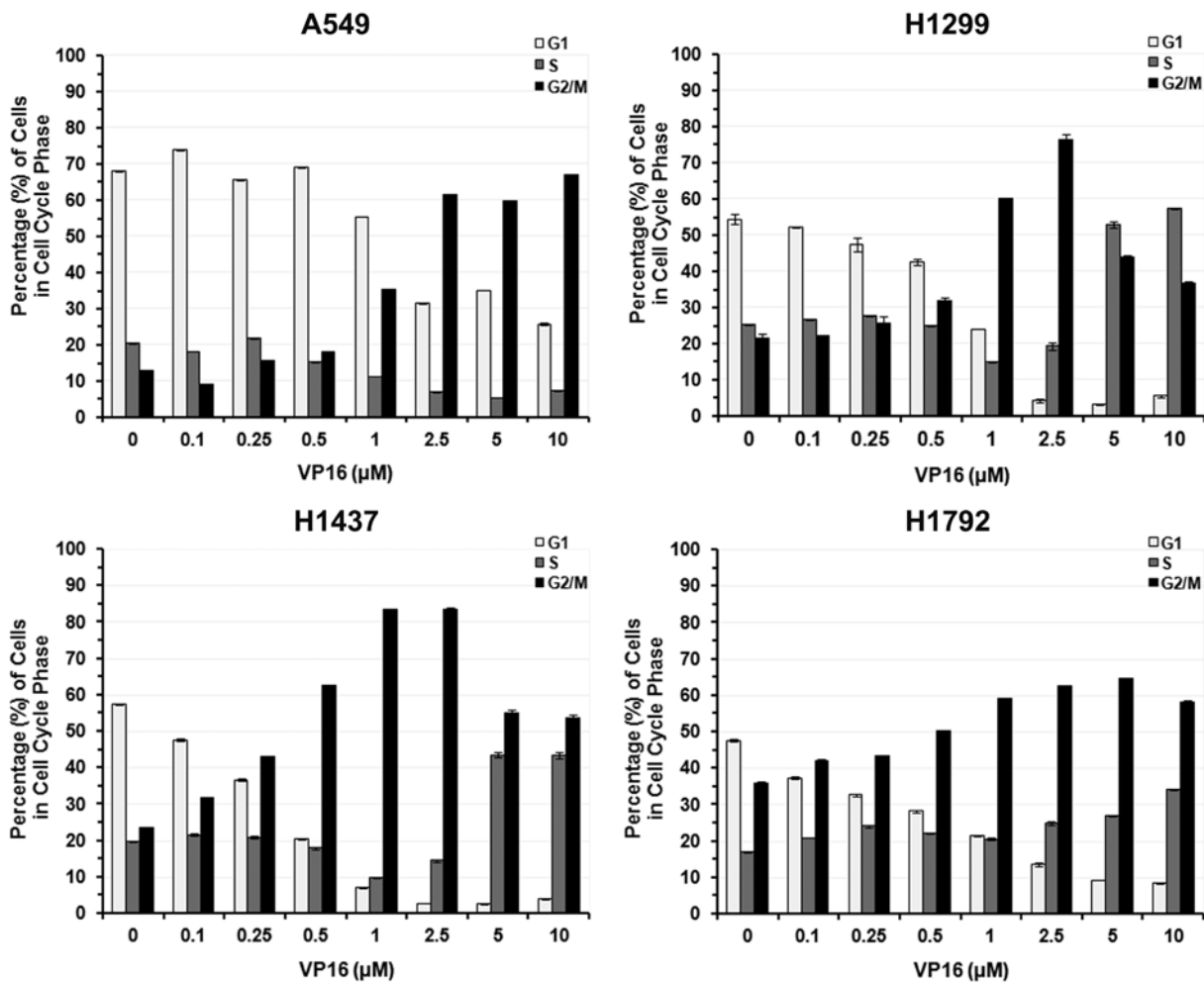
3.1. Η χορήγηση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα ετοποσιδίου επάγει τη διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου ανθρωπίνων καρκινικών επιθηλιακών κυτταρικών σειρών

Χημειοθεραπευτικοί παράγοντες ενεργοποιούν πορείες απόκρισης σε βλάβες στο DNA [DNA damage checkpoint responses (DDR)], οι οποίες οδηγούν είτε στη διακοπή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είτε στην απόπτωση, δύο κυτταρικές αποκρίσεις που εξαρτώνται από τη συγκέντρωση, την ισχύ και τη διάρκεια του ερεθίσματος (44, 101).

Στις ανθρώπινες καρκινικές επιθηλιακές κυτταρικές σειρές A549, H1299, H1437 και H1792 χορηγήθηκε ετοποσιδίο (VP16), και αναλύθηκε ο κυτταρικός κύκλος τους με κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 3.1.).

Η χορήγηση 0 - 10 μM VP16 για 24 ώρες επήγαγε τη διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου όλων των καρκινικών κυτταρικών σειρών, ανεξάρτητα από την κατάσταση της p53, στη φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου, χωρίς ενδείξεις απόπτωσης (Εικόνα 3.1.). Ειδικότερα, ενώ τα κύτταρα A549 με αγρίου τύπου (wt) p53 εμφάνισαν διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, οι p53-ελλειματικές κυτταρικές σειρές H1299, H1437 και H1792 εμφάνισαν επιπλέον διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση S στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 5 και 10 μM ετοποσιδίου. Όμως, όλες ανεξαρτήτως οι κυτταρικές σειρές εμφάνισαν διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M στις συγκεντρώσεις των 1 και 2,5 μM ετοποσιδίου.

Τίθεται επομένως το ερώτημα αν η επαγωγή της διακοπής του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων στη φάση G2/M από το ετοποσιδίο συσχετίζεται με την ενεργοποίηση της πορείας σε βλάβες στο DNA και με μεταβολές στην έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.



Εικόνα 3.1. Επίδραση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα ετοποσιδίου (VP16) στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου κυττάρων των ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549, H1299, H1437 και H1792. Η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων μελετήθηκε με κυτταρομετρία ροής, και η εικόνα απεικονίζει την κατανομή των ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549, H1299, H1437 και H1792 στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου μετά τη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων (0 - 10 μM) ετοποσιδίου (VP16) για 24 ώρες.

3.2. Έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στις αποκρίσεις των κυττάρων σε βλάβες στο DNA μετά τη χορήγηση ετοποσιδίου

Για τη μελέτη της επίδρασης του ετοποσιδίου στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων, αναλύθηκε η ενεργοποίηση της πορείας σε βλάβες του DNA.

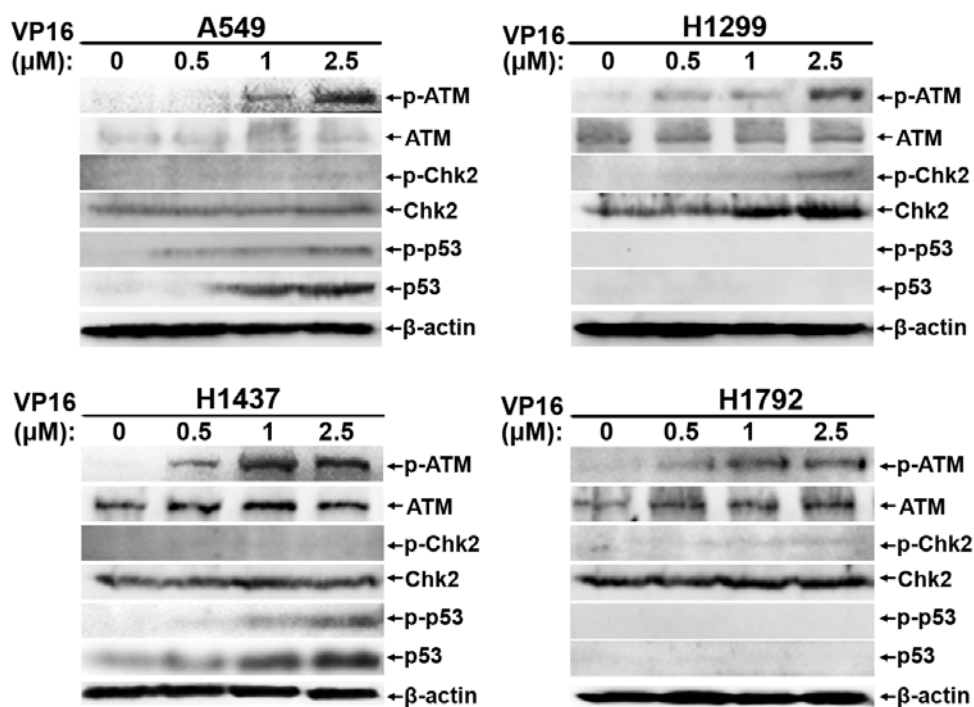
Σε καρκινικά κύτταρα A549, H1299, H1437 και H1792, χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις ετοποσιδίου (0.5 - 2,5 μM) και μετά από 24 ώρες απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά western, για την έκφραση της φωσφορυλιωμένης (ενεργής) μορφής της κινάσης ATM (ATM

S1981), ενδεικτικής της ενεργοποίησης της πορείας σε βλάβες του DNA, καθώς επίσης και για την έκφραση των πρωτεϊνών ATM, p-Chk2 (T68), Chk2, p-p53 (S15), p53 και της β-ακτίνης ως μάρτυρας (Εικόνα 3.2).

Η επίδραση του ετοποσιδίου επήγαγε την έκφραση της φωσφορυλιωμένης μορφής της κινάσης ATM (p-ATM S1981) με έναν δοσοεξαρτώμενο τρόπο, σε όλες τις κυτταρικές σειρές.

Τα επίπεδα της έκφρασης των ATM, p-Chk2 και Chk2 εμφανίζονται σταθερά σε όλες τις κυτταρικές σειρές, με εξαίρεση τα H1299 που η έκφραση των p-Chk2 και Chk2 φαίνεται να επάγεται από το ετοποσίδιο με έναν δοσοεξαρτώμενο τρόπο.

Η χορήγηση ετοποσιδίου στα A549 (wt-p53) και H1437 που έφεραν μια μεταλλαγμένη μορφή της p53 (p53^{267Pro}) επήγαγε τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών p-p53 και p53, σε αντίθεση με τα κύτταρα H1299 και H1792 όπου δεν παρατηρήθηκε καθόλου έκφραση των πρωτεϊνών, καθώς τα μεν H1299 είναι ελλειματικά σε p53 (p53-null), ενώ τα H1792 φέρουν μια μετάλλαξη που επηρεάζει το μάτισμα του mRNA (splice donor site mutation c.672+1G>A), που πιθανά παράγει μια ασταθή πρωτεΐνη.



Εικόνα 3.2. Η επίδραση του ετοποσιδίου μεταβάλλει τα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την απόκριση του κυττάρου σε βλάβες του DNA. Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, από τα καρκινικά κύτταρα A549, H1299, H1437 και H1792 στα οποία είχαν χορηγηθεί αυξανόμενες δόσεις ετοποσιδίου (0 – 2,5 μM) για 24 ώρες, αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά western για την έκφραση ATM, p-Chk2, Chk2, p-p53, p53 και της β-ακτίνης ως μάρτυρα αναφοράς.

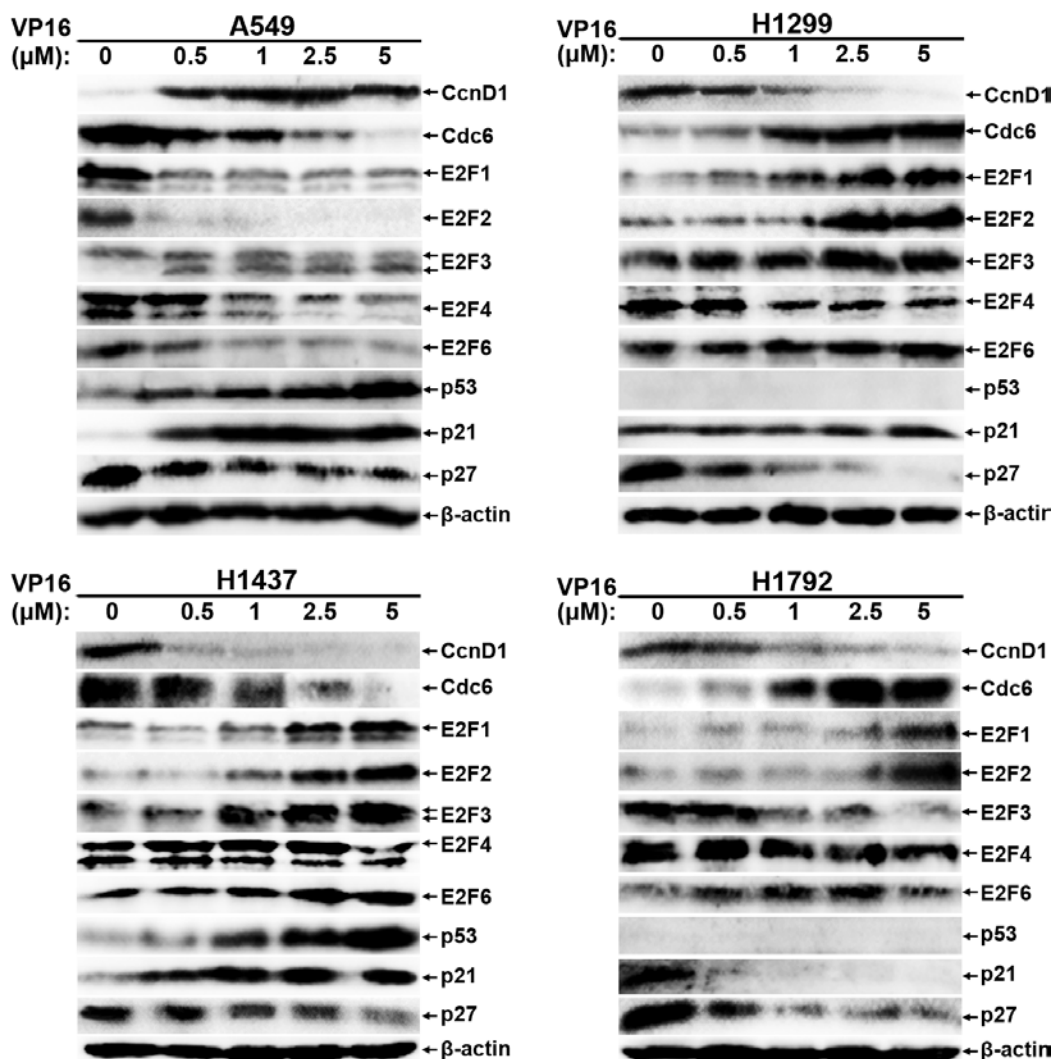
3.3. Έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στις αποκρίσεις των κυττάρων στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου μετά τη χορήγηση ετοποσιδίου

Για την περαιτέρω μελέτη της επίδρασης του ετοποσιδίου στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων, αναλύθηκε η έκφραση διαφόρων πρωτεϊνών που διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου.

Σε καρκινικά κύτταρα A549, H1299, H1437 και H1792, χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις ετοποσιδίου (0.5 - 5 μ M) και μετά από 24 ώρες απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά western, για την έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου, όπως της κυκλίνης D1 (CcnD1), Cdc6, E2F1, E2F2, E2F3, E2F4, E2F6, p53, p21 και p27, και της β-ακτίνης ως μάρτυρας (Εικόνα 3.3.).

Τα επίπεδα της έκφρασης της CcnD1 εμφανίστηκαν αυξημένα έπειτα από τη χορήγηση του ετοποσιδίου στα κύτταρα A549 που φέρουν την αγρίου τύπου μορφή της p53 (wt-p53), ενώ στις p53-ελλειματικές κυτταρικές σειρές H1299, H1437 και H1792 η έκφραση της μειώθηκε κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Σε αντίθεση, η χορήγηση ετοποσιδίου μειορρύθμισε την έκφραση της Cdc6 στα A549 (wt-p53), κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο, και σε μικρότερο βαθμό στα κύτταρα H1437 που έφεραν μια μεταλλαγμένη μορφή της p53 (p53^{267Pro}) και μόνον στις υψηλές συγκεντρώσεις, ενώ επήγαγε την έκφραση της Cdc6 στις p53-ελλειματικές κυτταρικές σειρές H1299 και H1792 κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο.

Επειδή η Cdc6 είναι μεταγραφικός στόχος των μεταγραφικών παραγόντων E2F, διερευνήθηκε η έκφραση των ενεργοποιητών και καταστολέων E2Fs, E2F1-3 και E2F4, E2F6 αντίστοιχα. Στα κύτταρα A549, η χορήγηση του ετοποσιδίου οδήγησε στη μειορρύθμιση των E2F1 και E2F2, σε αντίθεση με τον παράγοντα E2F3 τα επίπεδα του οποίου παρέμειναν σταθερά. Στις p53-ελλειματικές κυτταρικές σειρές H1299 και H1792 οδήγησε στην αυξορρύθμιση (upregulation) των μεταγραφικών παραγόντων E2F1 και E2F2 κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο ενώ, ο μεταγραφικός παράγοντας E2F3, αυξορρυθμίστηκε και μειορρυθμίστηκε αντίστοιχα. Η έκφραση των E2F1-3 στα κύτταρα H1437 επάχθηκε στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 2,5 και 5 μ M ετοποσιδίου. Η χορήγηση του ετοποσιδίου μειορρύθμισε επίσης τα επίπεδα έκφρασης των E2F4 και E2F6 στα κύτταρα A549, ενώ δε φαίνεται να υπάρχει καμία σημαντική μεταβολή στην έκφραση αυτών των δύο E2Fs στα H1299 και H1792. Στα κύτταρα H1437 ο E2F4 φαίνεται αμετάβλητος, ενώ ο E2F6 αυξορρυθμίζεται.



Εικόνα 3.3. Η επίδραση του ετοποσιδίου μεταβάλλει τα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, από τα καρκινικά κύτταρα A549, H1299, H1437 και H1792 στα οποία είχαν χορηγηθεί αυξανόμενες δόσεις ετοποσιδίου (0 - 5 μ M) για 24 ώρες, αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά western για την έκφραση κυκλίνης D1 (CcnD1), Cdc6, E2F1, E2F2, E2F3, E2F4, E2F6, p53, p21 και p27, και της β -ακτίνης ως μάρτυρα αναφοράς.

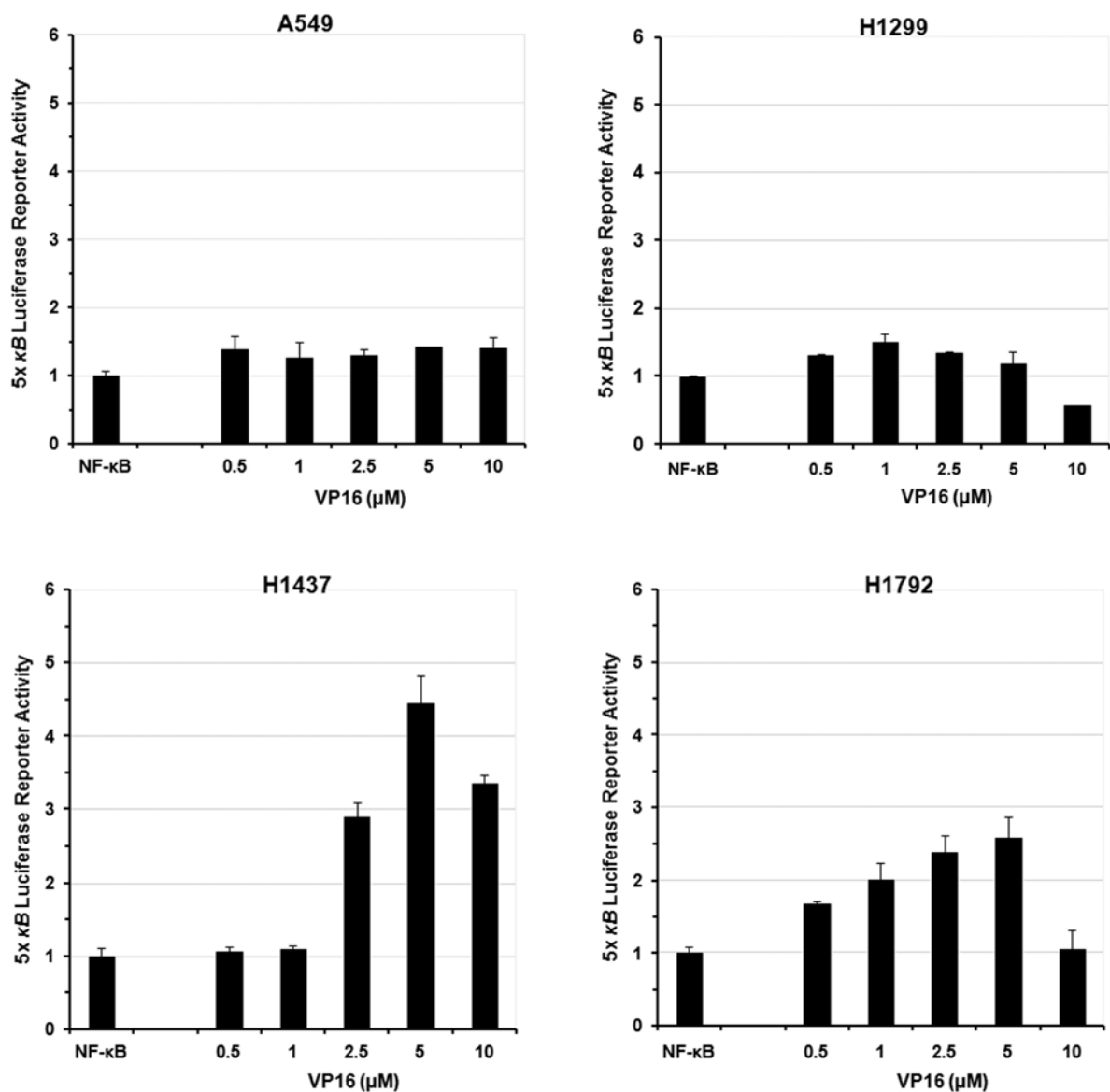
Σε σχέση με τον άξονα p53-p21, η χορήγηση ετοποσιδίου στα A549 (wt-p53) και H1437 που έφεραν μια μεταλλαγμένη μορφή της p53 (p53^{267Pro}) επήγαγε τα επίπεδα έκφρασης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 και ιδιαίτερα στις συγκεντρώσεις 2,5 και 5 μ M, σε αντίθεση με τα κύτταρα H1299 και H1792 όπου δεν παρατηρήθηκε καθόλου έκφραση της πρωτεΐνης, καθώς τα μεν H1299 είναι ελλειμματικά σε p53 (p53-null), ενώ τα H1792 φέρουν μια μετάλλαξη που επηρεάζει το μάτισμα του mRNA (splice donor site mutation c.672+1G>A), που πιθανά παράγει μια ασταθή

πρωτεΐνη. Στην πρωτεΐνη p21^{Cip1/Waf1} που προάγει την καταστολή του κυτταρικού κύκλου και αποτελεί μεταγραφικό στόχο της p53, η χορήγηση ετοποσιδίου επήγαγε την έκφραση της στα κύτταρα A549, H1299 και H1437 με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, ανεξάρτητα από την κατάσταση της p53, καταδεικνύοντας ότι η έκφραση της p21 μπορεί να επαχθεί με μηχανισμούς εξαρτώμενους ή ανεξάρτητους από την p53. Σε αντίθεση, η έκφραση της p21 στα κύτταρα H1792 εμφάνισε ένα διαφορετικό πρότυπο και ανιχνεύθηκε μια δοσοεξαρτώμενη μείωση των επιπέδων έκφρασης της p21 υπό την επίδραση αυξανόμενων δόσεων ετοποσιδίου. Τέλος, το ετοποσιδίο μειορρύθμισε τα επίπεδα της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p27^{Kip1} στα κύτταρα A549 και H1437 και εντονότερα στα H1299 και H1792 με δοσοεξαρτώμενο τρόπο.

3.4. Ενεργοποίηση του NF-κΒ στις ανθρώπινες καρκινικές επιθηλιακές κυτταρικές σειρές πνεύμονα

Ενώ οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες ενεργοποιούν την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 (44, 178, 179, 214), ορισμένα χημειοθεραπευτικά φάρμακα ενεργοποιούν ενώ άλλα καταστέλλουν τις σηματοδοτικές πορείες του NF-κΒ, ένα φαινόμενο που εξαρτάται και από τον κυτταρικό τύπο που χρησιμοποιείται (34- 37, 103, 178, 179, 221- 223).

Επομένως, αναλύθηκε η μεταγραφική ενεργότητα του NF-κΒ που ενεργοποιείται από την κανονική πορεία χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς τη λουσιφεράση κάτω από τον μεταγραφικό έλεγχο ενός υποκινητή που περιείχε 5XκΒ ρυθμιστικά στοιχεία. Τα καρκινικά κύτταρα διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο p5XκΒ-λουσιφεράση (p5XκΒ-Luc), και στη συνέχεια χορηγήθηκαν αυξανόμενες δόσεις 0 - 10 μΜ ετοποσιδίου για 24 ώρες. Μετά το τέλος της επώασης αναλύθηκε η έκφραση της λουσιφεράσης ώστε να εκτιμηθεί η ενεργοποίηση της κανονικής πορείας του NF-κΒ (Εικόνα 3.4.).



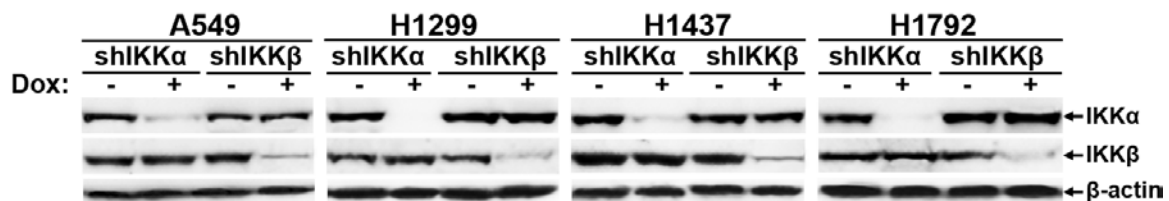
Εικόνα 3.4. Μεταγραφική ενεργοποίηση της κανονικής πορείας του NF-κΒ στα κύτταρα A549, H1299, H1437 και H1792. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς 5ΧκΒ-Λουσιφεράση και στη συνέχεια επώαστηκαν με αυξανόμενες δόσεις ετοποσιδίου (0 - 10 μΜ) για 24 ώρες. Μετά την επώαση, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αναλύθηκε η έκφραση της λουσιφεράσης με λουμινόμετρο.

Η χορήγηση ετοποσιδίου στα κύτταρα A549 και H1299 οδήγησε σε μια μικρή επαγωγή της μεταγραφικής ενεργότητας του NF-κΒ (αύξηση κατά 1,3 στα A549 και 1,5 και 1,4 στα H1299 στις συγκεντρώσεις 1 και 2,5 μΜ ετοποσιδίου, αντίστοιχα), ενώ στα κύτταρα H1437 και H1792 οδήγησε σε μεγαλύτερη επαγωγή της μεταγραφικής ενεργότητας του NF-κΒ (αύξηση κατά 3 και 4.5 στα H1437 και κατά 2.4 και 2.6 στα

H1792 στις συγκεντρώσεις 2,5 και 5 μM ετοποσιδίου) (Εικόνα 3.4.). Επομένως η ενεργοποίηση της κανονικής πορείας του NF- κB από το ετοποσίδιο εξαρτάται από είδος του καρκινικού κυττάρου του πνεύμονα, και υποθέτουμε ότι εξαρτάται από το φάσμα των μεταλλάξεων που φέρει ένα μεταλλαγμένο κύτταρο μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα.

3.5. Μειορρύθμιση των ανοδικών κινασών ενεργοποίησης των σηματοδοτικών πορειών του NF- κB στα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα

Οι καρκινικές κυτταρικές σειρές A549, H1299, H1437 και H1792 επιμολύνθηκαν με λεντιικούς φορείς που έφεραν shRNA-ολιγονουκλεοτίδια για την αποσιώπηση της έκφρασης των ανοδικών κινασών ενεργοποίησης του NF- κB , της IKK α ή της IKK β , που επάγονται έπειτα από τη χορήγηση δοξουκυκλίνης (Dox). Μετά την επιμόλυνση και την επιλογή των κυττάρων σε πουρομυκίνη για την κατασκευή σταθερών κυτταρικών πληθυσμών, απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα τα οποία αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά western για την έκφραση των κινασών IKK α και IKK β (Εικόνα 3.5.).



Εικόνα 3.5. Μειορρύθμιση των κινασών IKK α και IKK β στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα. Τα κύτταρα A549, H1299, H1437 και H1792 επιμολύνθηκαν με λεντιικούς φορείς που έφεραν shRNA-ολιγονουκλεοτίδια για την αποσιώπηση της έκφρασης της IKK α (shIKK α) ή της IKK β (shIKK β) και στη συνέχεια επιλέχθηκαν σε πουρομυκίνη. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία (+) ή απουσία (-) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ δοξουκυκλίνης (Dox). Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά western για την έκφραση της IKK α ή IKK β . Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η β -ακτίνη.

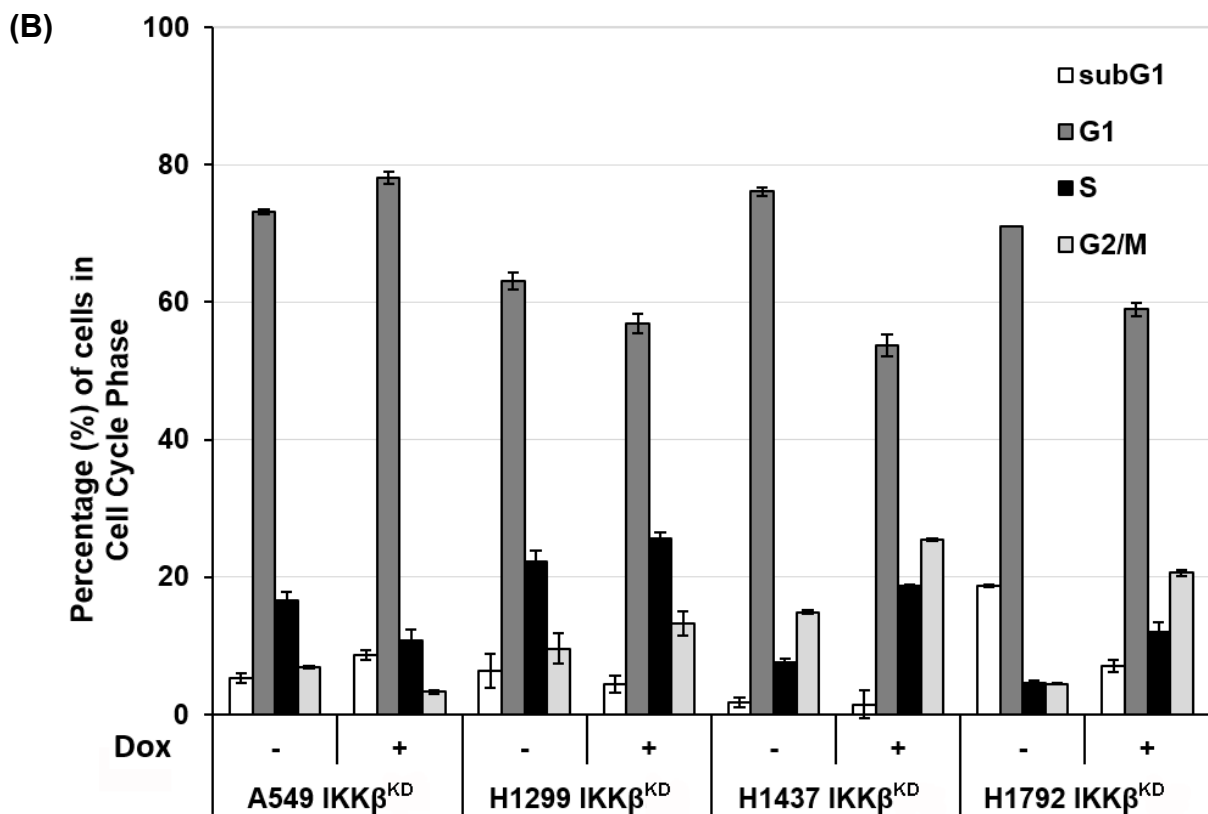
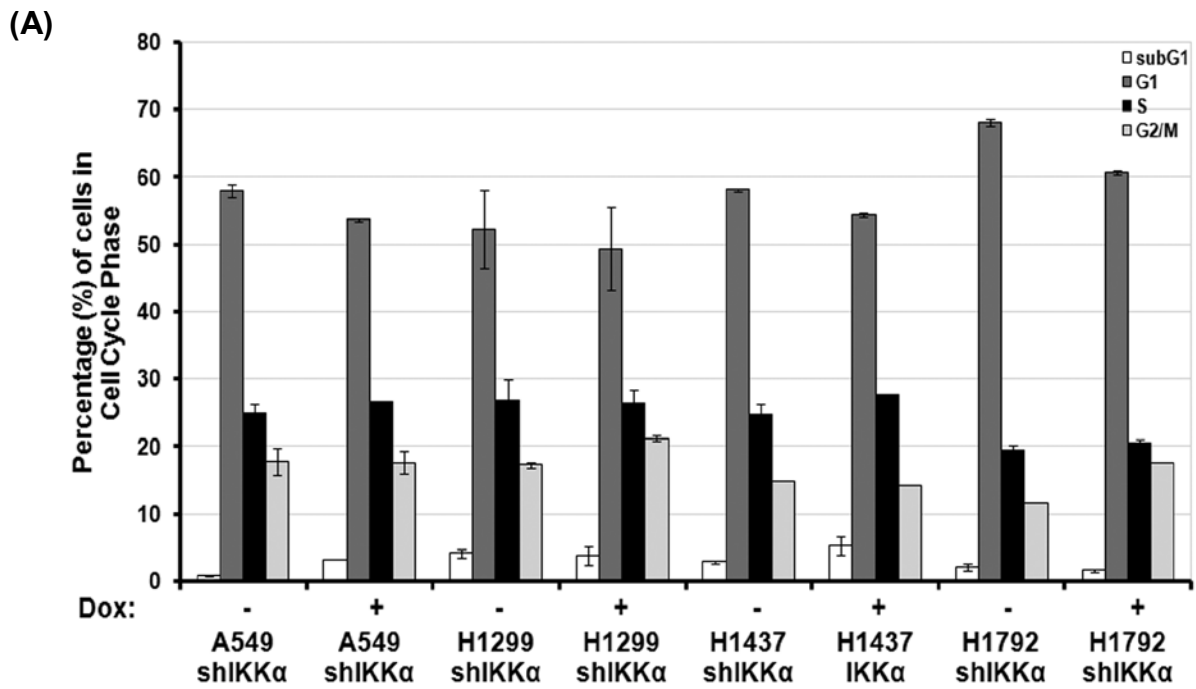
Η ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα κατά western κατέδειξε την αποτελεσματική και επαγωγίμη (Dox-επαγόμενη) μειορρύθμιση των επιπέδων έκφρασης τόσο της IKK α , όσο και της IKK β σε όλες τις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές του πνεύμονα.

3.6. Επιπτώσεις της μειορρύθμισης των ΙΚΚα και ΙΚΚβ στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα

Στη συνέχεια μελετήθηκαν οι επιπτώσεις της μειορρύθμισης της ΙΚΚα ή ΙΚΚβ στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου όλων των ανθρωπίνων καρκινικών σειρών πνεύμονα με κυτταρομετρία ροής, μετά από 24 ώρες (Εικόνα 3.6).

Η μειορρύθμιση της ΙΚΚα επιβράδυνε την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου όλων των ανθρωπίνων καρκινικών σειρών κατά 5-10% μειώνοντας κυρίως τον αριθμό των κυττάρων στη φάση G1 και τη συσσώρευση τους στη φάση S ή G2 (Εικόνα 3.6A).

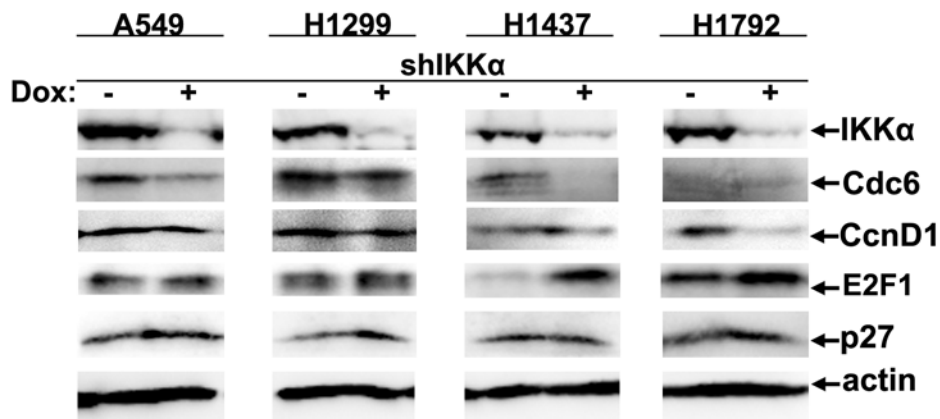
Η μειορρύθμιση της ΙΚΚβ είχε σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση των κυττάρων A549, που έφεραν αγρίου-τύπου p53, στη φάση G₁ του κυτταρικού κύκλου με ένδειξη απόπτωσης. Στις άλλες, p53-ελλειματικές κυτταρικές σειρές, H1299, H1437 και H1792, η μειορρύθμιση της ΙΚΚβ επιβράδυνε την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου τους κατά ~10% μειώνοντας κυρίως τον αριθμό των κυττάρων στη φάση G1 και τη συσσώρευση τους στη φάση S ή G2 (Εικόνα 3.6B).



Εικόνα 3.6. Επιπτώσεις της μειορύθμισης των IKKα (A) και IKKβ (B) στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα. Η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων A549 (αγρίου τύπου p53), H1299 (p53-null), H1437 (μεταλλαγμένη p53) και H1792 (μεταλλαγμένη p53) που έφεραν σι-ολιγονουκλεοτίδια ενάντια στην IKKα (IKKα^{KD}) ή στην IKKβ (IKKβ^{KD}) μελετήθηκε με κυτταρομετρία ροής, μετά από 24 ώρες. Η εικόνα απεικονίζει την κατανομή των IKK-τροποποιημένων ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου μετά από 24 ώρες καλλιέργειας.

3.7. Οι επιπτώσεις της μειορρύθμισης της IKKα ή IKKβ στην έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών σειρών πνεύμονα

Στη συνέχεια μελετήθηκαν οι επιπτώσεις της μειορρύθμισης της IKKα ή IKKβ στην έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών σειρών πνεύμονα, A549, H1299, H1437 και H1792, με ανοσοαποτύπωμα κατά western, όπως της Cdc6, CcnD1, E2F1, p27 και p53 (Εικόνες 3.7 και 3.8).



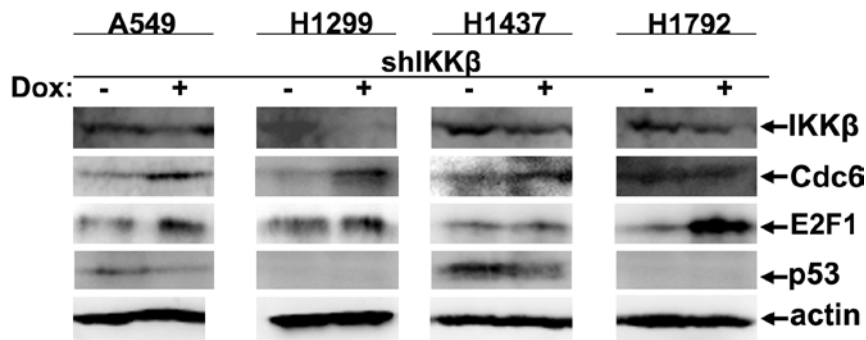
Εικόνα 3.7. Επίδραση της μειορρύθμισης της κινάσης IKKα στην έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα. Ολικά εκχυλίσματα που έφεραν sh- ολιγονουκλεοτίδιο ενάντια στην IKKα (IKKα^{KD}) παρουσία/απουσία 2 μg/ml δοξυκυκλίνης αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά western για την έκφραση των IKKα, Cdc6, CcnD1, E2F1, p27 και της β-ακτίνης ως μάρτυρα αναφοράς.

Η μειορρύθμιση της IKKα κινάσης οδήγησε στη μειορρύθμιση της Cdc6 στις κυτταρικές σειρές A549 και H1437, ενώ στις κυτταρικές σειρές H1299 και H1792 τα επίπεδα έκφρασης της Cdc6 δε φάνηκαν να μεταβάλλονται.

Στις κυτταρικές σειρές A549 και H1299 η έκφραση της CcnD1 παρέμεινε αμετάβλητη μετά από τη μειορρύθμιση της IKKα, ενώ στις σειρές H1437 και H1792 μειορρυθμίστηκε σημαντικά.

Επίσης, η αποσιώπηση της IKKα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του επιπέδου έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 στα H1437 και H1792, ενώ στα A549 και H1299 η έκφρασή του δε σημείωσε αλλαγή.

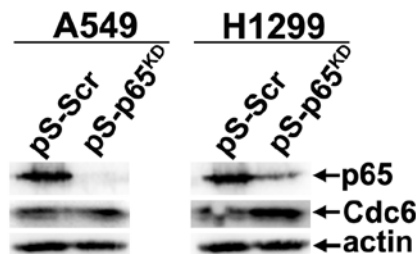
Τέλος, η έκφραση της p27 αυξήθηκε σε όλες τις κυτταρικές σειρές μετά την μειορρύθμιση της IKKα, με εξαίρεση μόνο την H1437 όπου δεν έδειξε μεταβολή.



Εικόνα 3.8. Επίδραση της μειορρύθμισης της κινάσης IKKβ στην έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα. Ολικά εκχυλίσματα που έφεραν sh- ολιγονουκλεοτίδιο ενάντια στην IKKβ (IKKβ^{KD}) παρουσία/απουσία 2 μg/ml δοξυκυκλίνης αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά western για την έκφραση των IKKβ, Cdc6, E2F1, p53 και της β-ακτίνης ως μάρτυρα αναφοράς.

Ακολούθως, η μειορρύθμιση της IKKβ οδήγησε σε αυξορρύθμιση της Cdc6 στις κυτταρικές σειρές A549, H1299 και H1437 ενώ στην H1792 τα επίπεδα έκφρασης παρέμειναν αμετάβλητα. Επίσης ο E2F1 διατήρησε σταθερή έκφραση στα H1437, ενώ αυξορρυθμίστηκε στις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές.

Τέλος, η αποσιώπηση της IKKβ μειορρύθμισε την p53 στα A549 (wt-p53), και στα κύτταρα H1437 που έφεραν μια μεταλλαγμένη μορφή της p53 (p53^{267Pro}).



Εικόνα 3.9. Επίδραση της μειορρύθμισης της RelA/p65 στην έκφραση της Cdc6 στα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα. Ολικά εκχυλίσματα κυττάρων A549 και H1299 που έφεραν τυχαίο (scramble) sh- ολιγονουκλεοτίδιο ή ενάντια στην RelA/p65 αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά western για την έκφραση των RelA/p65, Cdc6, και της β-ακτίνης ως μάρτυρα αναφοράς.

Επίσης, μειορρυθμίζοντας την έκφραση της p65 στα A549 και H1299 παρατηρούμε ότι μειορρύθμιση της p65 οδηγεί στην αυξορρύθμιση της έκφρασης της Cdc6 (Εικόνα 3.9), ομοίως με τη μειορρύθμιση της IKKβ στα ίδια κύτταρα. Άρα συμπεραίνουμε ότι η κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB οδηγεί στην επαγωγή της έκφραση της Cdc6.

3.8. Χαρακτηρισμός microRNAs που ρυθμίζονται από την κινάση IKKβ σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα πριν και μετά τη χορήγηση ετοποσιδίου

Τα microRNAs (miRNAs ή miRs) είναι μικρά μόρια RNA περίπου 22 νουκλεοτίδια τα οποία μολονότι δεν κωδικοποιούν ένα προϊόν, ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση γονιδίων δρώντας σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο κατά τη μετάφραση ενός mRNA ή επηρεάζοντας τη σταθερότητα του μορίου mRNA (81, 127, 155).

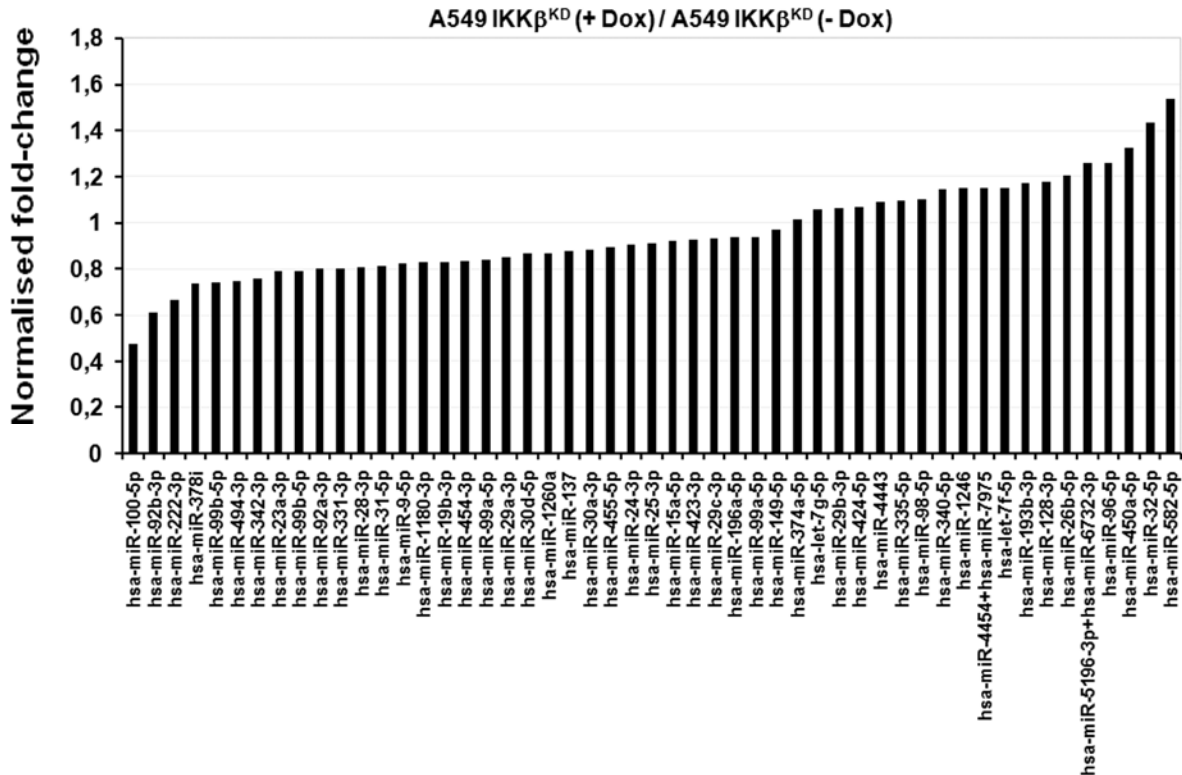
Τα miRNAs παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στην καρκινογένεση και στη μετάσταση, καθώς δρουν ως ογκογονίδια ή ως ογκοκατασταλτικά γονίδια (68, 134, 198, 211, 213).

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός με τον οποίο η IKKβ μειώνει το ρυθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, απομονώθηκε RNA από τα κύτταρα A549 IKKβ παρουσία/απουσία 2 μg/ml δοξουκυκλίνης, και αναλύθηκε με την τεχνολογία nanostring για την έκφραση microRNAs (miRNAs ή miRs). Η συγκεκριμένη τεχνολογία έχει τη δυνατότητα ανάλυσης 800 miRNAs.

Η ανάλυση κατέδειξε ότι 51 miRNAs εκφράζονταν σε υψηλότερα επίπεδα σε κύτταρα A549 IKKβ^{KD}, σε σύγκριση με τα κύτταρα αγρίου-τύπου A549 IKKβ (Εικόνα 3.10).

Μεταξύ των 51 miRNAs που εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα στα κύτταρα A549 IKKβ^{KD}, σε σύγκριση με τα κύτταρα αγρίου-τύπου A549 IKKβ ήταν τα miR-32-5p και miR-582-5p (Εικόνα 3.10).

Να σημειωθεί ότι η έκφραση των miR-32-5p και miR-582-5p θα πρέπει να επιβεβαιωθεί με RT-PCR, αν και η εταιρία εγγυάται ότι η τεχνολογία Nanostring nCounter δεν χρειάζεται την επιβεβαίωση της διαφορικής έκφρασης των miRNAs με RT-PCR, τόσο στα κύτταρα A549 IKKβ^{KD}, αλλά και στα άλλα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα στα οποία έχει μειορρυθμιστεί η IKKβ.

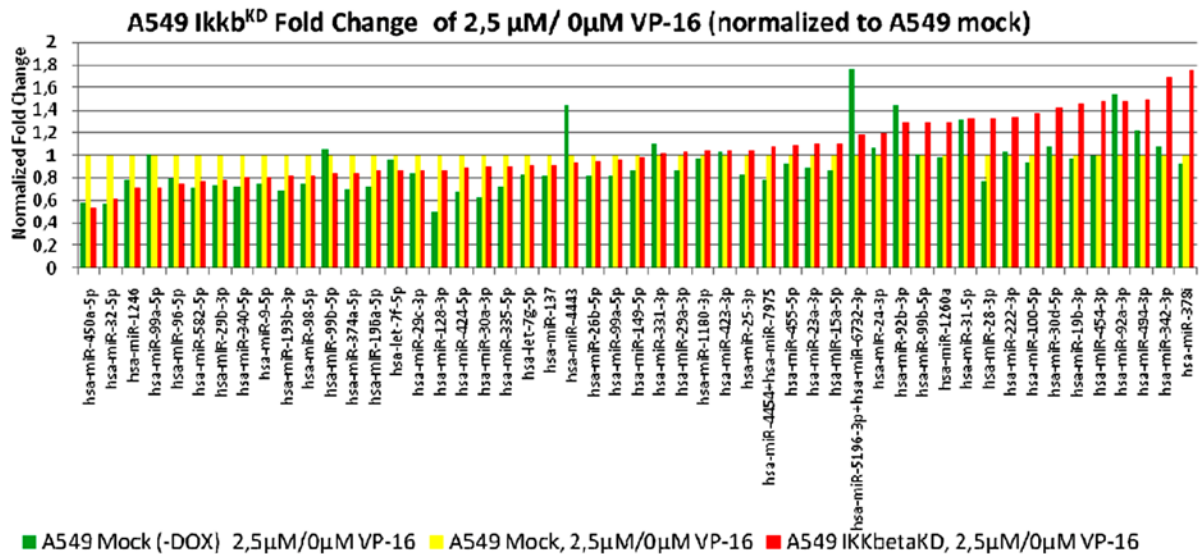


Εικόνα 3.10. Διαφορική έκφραση miRNAs σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα A549 IKKβ^{KD} σε σύγκριση με τα κύτταρα αγρίου-τύπου A549 IKKβ. Ολικό RNA (συμπεριλαμβανομένων των miRNAs) απομονώθηκε από κύτταρα A549 IKKβ παρουσία/απουσία 2 μg/ml δοξουκυκλίνης, και αναλύθηκε με την τεχνολογία nanostring για την έκφραση miRNAs.

Όμως όπως είδαμε παραπάνω, η χορήγηση ετοπιοσιδίου επάγει αμφίκλωνες ρήξεις στο DNA και ενεργοποιεί τις πορείες απόκρισης σε βλάβες στο DNA (Εικόνα 3.2) και την ενεργοποίηση της κανονικής πορείας IKKβ-NFκB (Εικόνα 3.4) στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα (H1437 > H1792 > H1299 > A549).

Μελετήθηκε με την τεχνολογία Nanostring, η διαφορική έκφραση miRNA στα κύτταρα A549 IKKβ^{KD}, σε σύγκριση με τα κύτταρα αγρίου-τύπου A549 IKKβ μετά από χορήγηση ετοπιοσιδίου (Εικόνα 3.11).

Μεταξύ των miRNAs που εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα στα κύτταρα A549 IKKβ^{KD} σε σύγκριση με τα κύτταρα αγρίου-τύπου A549 IKKβ μετά τη χορήγηση ετοπιοσιδίου ήταν τα miR-342-3p και miR-378i (Εικόνα 3.11).



Εικόνα 3.11. Διαφορική έκφραση miRNAs σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα A549 IKK β ^{KD} σε σύγκριση με τα κύτταρα αγρίου-τύπου A549 IKK β μετά τη χορήγηση ετοποσιδίου. Ολικό RNA (συμπεριλαμβανομένων των miRNAs) απομονώθηκε από κύτταρα A549 IKK β παρουσία/απουσία 2 μ g/ml δοξουκυκλίνης στα οποία χορηγήθηκαν 2,5 μ M ετοποσιδίου (VP16) για 24 ώρες, και αναλύθηκε με την τεχνολογία nanostring για την έκφραση miRNAs.

Η έκφραση των miR-342-3p και miR-378i θα πρέπει να επιβεβαιωθεί με RT-PCR, αν και η εταιρία εγγυάται ότι η τεχνολογία Nanostring nCounter δεν χρειάζεται την επιβεβαίωση της διαφορικής έκφρασης των miRNAs με RT-PCR, τόσο στα κύτταρα A549 IKK β ^{KD}, αλλά και στα άλλα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα στα οποία έχει μειορρυθμιστεί η IKK β , μετά τη χορήγηση ετοποσιδίου.

ΕΝΟΤΗΤΑ ΤΕΤΑΡΤΗ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Η διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου των ανθρωπίνων καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων από το χημειοθεραπευτικό παράγοντα ετοποσιδίιο στη φάση G₂/M οφείλεται στη μεταβολή της έκφρασης πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου

Το ετοποσιδίιο (VP16) είναι ένα ημισυνθετικό παράγωγο της ποδοφυλοτοξίνης το οποίο προκαλεί μονόκλωνες (SSBs) και ιδιαίτερα αμφίκλωνες ρήξεις (DSBs) στο DNA καθώς στοχεύει την DNA τοποϊσομεράση II (Topo-II) και σταθεροποιεί τις αμφίκλωνες ρήξεις (DSBs) στο DNA . Το ετοποσιδίιο καταστέλλει τη σύνθεση του DNA σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο με την topo-II και το DNA το οποίο επάγει τη διακοπή της αντιγραφής του DNA και τις αμφίκλωνες ρήξεις (DSBs) στο DNA, παρεμποδίζοντας την επιδιόρθωση του DNA από την topo-II. Το ετοποσιδίιο επάγει επίσης την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου. Ως αποτέλεσμα αυτής της δράσης, το ετοποσιδίιο χρησιμοποιείται ως αντινεοπλασματικός χημειοθεραπευτικός παράγοντας για τη θεραπεία διαφορετικών τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του πνεύμονα (149).

Η χορήγηση ετοποσιδίου στις διαφορετικές ανθρώπινες καρκινικές σειρές ενεργοποίησε τις πορείες σε βλάβες στο DNA (44, 87), όπως τεκμηριώνεται από την επαγωγή της έκφρασης της φωσφορυλιωμένης μορφής της ATM στη Ser1981 και της φωσφο-Chk2 (T68) ως απόκριση των κυττάρων που εκτίθενται σε γενotoξικούς παράγοντες (10). Ομοίως, τα επίπεδα έκφρασης της φωσφο-p53 Ser15 αλλά και τα ολικά επίπεδα της p53 αυξορρυθμίστηκαν σε κύτταρα που έκφραζαν p53 όπως στα A549 και στα H1437 (Εικόνα 3.2). Η αυξορρύθμιση της φωσφορυλιωμένης μορφής της p53 στη Ser15 στις κυτταρικές σειρές A549 και H1437 (Εικόνα 3.2) καταδεικνύει επίσης την ενεργοποίηση των πορειών απόκρισης σε βλάβες στο DNA, καθώς το κατάλοιπο Ser15 μπορεί να φωσφορυλιωθεί άμεσα από την ATM ως απόκριση σε αυτές. Η φωσφορυλίωση στη θέση Ser15 είναι κρίσιμη για την επαύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας της p53 όπως διαπιστώνεται και από την αντίστοιχη αυξορρύθμισή της (Εικόνα 3.2). Σημειώνεται ότι στις άλλες δύο κυτταρικές σειρές, H1299 και H1792, δεν ανιχνεύονται p-p53 και p53 καθώς είναι ελλειμματικά σε p53

(p53-null) και με μετάλλαξη που επηρεάζει το μάτισμα του mRNA και παράγει ασταθή πρωτεΐνη αντίστοιχα.

Η ενεργοποίηση της πορείας απόκρισης σε βλάβες στο DNA, ATM-Chk2 από το ετοποσίδιο, οδήγησε στη διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου στη φάση G₂/M ανεξάρτητα από την κατάσταση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 (35, 49, 107) (Εικόνα 3.1). Αυτό το αποτέλεσμα τεκμηριώνεται από τις μεταβολές στην έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.

Η συσσώρευση των ανθρωπίνων καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα στη φάση G₂/M του κυτταρικού κύκλου (241) οφειλόταν στη μεταβολή της έκφρασης πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου στη φάση G₁ και G₁/S (140- 142, 186). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών που αποτελούν μεταγραφικούς στόχους των μεταγραφικών παραγόντων E2F και οι οποίες εμπλέκονται στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου, όπως επίσης και της p53 και p21^{Cip1/Waf1} καθώς είναι οι τελεστές του άξονα ATM-p53-p21 (Εικόνα 3.3).

Συγκεκριμένα, το ετοποσίδιο επήγαγε την έκφραση της CcnD1 (130, 241) και μειορρύθμισε την έκφραση της Cdc6 (59, 106, 162, 234, 235) και των E2F1, E2F2, E2F4 και E2F6 στα κύτταρα A549 που έφεραν αγρίου τύπου p53 και δε φάνηκε να επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης του E2F3. Επιπλέον, το ετοποσίδιο επήγαγε την έκφραση της p53 και του μεταγραφικού στόχου της p21 (130, 241).

Σε αντίθεση, το ετοποσίδιο οδήγησε στη μειορρύθμιση της CcnD1 και στην αυξορρύθμιση των E2F1 και E2F2 (56, 215) στα p53-ανεπαρκή κύτταρα H1292, H1437 και H1792. Το Cdc6 αυξορρυθμίστηκε στα H1299 και H1792, ενώ μειορρυθμίστηκε στα H1437. Το πρότυπο έκφρασης της p21^{Waf1} είναι πιο πολύπλοκο καθώς η έκφρασή της είναι p53-εξαρτώμενη και p53-ανεξάρτητη (1, 70, 224), αλλά και έχει πολλαπλούς ρόλους (38). Ο E2F3 αυξορρυθμίστηκε στα H1299 και H1437, ενώ μειορρυθμίστηκε στα H1792. Αντίθετα, οι E2F4 και E2F6 δεν παρουσίασαν σημαντική μεταβολή στην έκφρασή τους στα p53-ανεπαρκή κύτταρα H1292, H1437 και H1792 με εξαίρεση το E2F6 στα H1437 που αυξορρυθμίστηκε. Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p27^{Kip1} μειορρυθμίστηκαν σε όλες τις καρκινικές σειρές μετά τη χορήγηση ετοποσιδίου.

Τα επίπεδα έκφρασης της CcnD1 ρυθμίζονται τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, και ο υποκινητής του γονιδίου φέρει διάφορα ρυθμιστικά στοιχεία όπως AP1 (Fos/Jun), CRE (CREB), NF-κB που επάγουν την έκφραση του

και ρυθμιστικά στοιχεία όπως E2F και Myc που καταστέλλουν την έκφραση του γονιδίου της CcnD1 (113). Ομοίως, η έκφραση της Cdc6 ρυθμίζεται σε πολλαπλά επίπεδα (25, 27). Το γονίδιο Cdc6 αποτελεί μεταγραφικό στόχο των E2Fs (88, 158, 231), αλλά τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της Cdc6 ρυθμίζονται αρνητικά από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 (58, 59).

Σε σχέση με τους μεταγραφικούς παράγοντες E2Fs, έχει καταδειχθεί ότι η έκφραση τους ως απόκριση σε βλάβες στο DNA που επάγονται από το ετοποσίδιο οφείλεται στην επαγωγή της έκφρασης δύο άλλων μελών της οικογένειας E2Fs, E2F7 και E2F8 (236). Για παράδειγμα η επαγωγή των E2F7/E2F8 οδηγεί στην καταστολή της έκφρασης του E2F1 (162). Επιπλέον, η έκφραση των μεταγραφικών στόχων των E2Fs ρυθμίζεται από τις πορείες μεταγωγής σήματος του NF-κB (7, 163), και είναι πιθανόν η ρύθμιση γονιδίων- στόχων των E2F, όπως CcnD1, Cdc6, p21 και p27, να εξαρτώνται και από την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών πορειών του NF-κB σε συνθήκες στρες.

4.2. Μεταγραφική ενεργοποίηση του NF-κB στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα ως απόκριση σε βλάβες στο DNA

Ορισμένα χημειοθεραπευτικά φάρμακα ενεργοποιούν, ενώ άλλα καταστέλλουν τις σηματοδοτικές πορείες του NF-κB, ένα φαινόμενο που εξαρτάται και από τον κυτταρικό τύπο, αλλά και το χημειοθεραπευτικό παράγοντα που χρησιμοποιείται (34 - 37, 103, 178, 179, 221- 223).

Το ετοποσίδιο ενεργοποιεί τις σηματοδοτικές πορείες του NF-κB σε ανθρώπινα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα, και ιδιαίτερα την κανονική πορεία ενεργοποίησης IKKβ-p65/p50 (34, 37, 104, 191, 199, 224) που εξαρτάται από την ενεργοποίηση της ATM (93, 174, 221, 223). Τα αποτελέσματα μας κατέδειξαν ότι το ετοποσίδιο ενεργοποίησε την κανονική πορεία του NF-κB με την ακόλουθη σειρά που εξαρτάται από το βαθμό ενεργοποίησης: H1437 > H1792 > H1299 ≥ A549 (Εικόνα 3.4).

Πρόσφατες μελέτες κατέδειξαν ότι ο NF-κB είναι ιδιοστατικά ενεργοποιημένος στα κύτταρα H1299 και σε μικρότερο βαθμό στα A549, που οφείλεται στο γεγονός ότι όλες οι υπομονάδες των ετεροδιμερών p50-p65/RelA και p52/RelB είναι δεσμευμένες στο DNA των H1299, ενώ μόνον η υπομονάδα p52 είναι δεσμευμένη στα κύτταρα A549 (175). Επομένως, αυτό αποτελεί ένα σημαντικό λόγο που το ετοποσίδιο δεν

ενεργοποίησε την κανονική πορεία του NF-κΒ στα κύτταρα A549 και H1299, καθώς η ιδιοστατική ενεργοποίηση του NF-κΒ (175), δεν επιτρέπει την ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων του NF-κΒ, αφού τα ετεροδιμερή δεν είναι ελεύθερα και επίσης ο δεσμευμένος NF-κΒ στους υποκινητές γονιδίων-στόχων του ενεργά καταστέλλει αυτά τα γονίδια (34- 37).

Η διαφορά στη μεταγραφική ενεργοποίηση του NF-κΒ μεταξύ των κυττάρων H1437 και H1792, πιθανά να οφείλεται ότι στα κύτταρα H1437 η μεταλλαγμένη μορφή της p53 επαυξάνει τη μεταγραφική ενεργότητα του NF-κΒ (46, 217).

Συμπερασματικά, το ετοποσίδιο επαύξησε τη μεταγραφική ενεργότητα του NF-κΒ στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα (H1437 > H1792 > H1299 ≥ A549).

4.3. Η μειορρύθμιση των ΙΚΚ επηρεάζει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα

Προκειμένου να μελετηθούν οι επιδράσεις των ΙΚΚ στην έκφραση γονιδίων-στόχων των E2F, που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, κατασκευάστηκαν κυτταρικές σειρές οι οποίες εμφάνισαν μειορρύθμιση στην έκφραση των ΙΚΚα ή ΙΚΚβ, και στη συνέχεια αναλύθηκαν οι επιδράσεις τους στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και στην έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατέδειξαν την αποτελεσματική και επαγωγίμη (Dox-επαγόμενη) μειορρύθμιση των επιπέδων έκφρασης τόσο της ΙΚΚα, όσο και της ΙΚΚβ σε όλες τις καρκινικές κυτταρικές σειρές (Εικόνα 3.5).

Η μειορρύθμιση της ΙΚΚα επιβράδυνε την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου όλων των ανθρώπινων καρκινικών σειρών κατά 5-10% μειώνοντας κυρίως τον αριθμό των κυττάρων στη φάση G1 και τη συσσώρευση τους στη φάση S ή G2 (Εικόνα 3.6A).

Η μειορρύθμιση της ΙΚΚβ είχε σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση των κυττάρων A549, που έφεραν αγρίου-τύπου p53, στη φάση G₁ του κυτταρικού κύκλου με ένδειξη απόπτωσης. Στις άλλες, p53-ελλειμματικές κυτταρικές σειρές, H1299, H1437 και H1792, η μειορρύθμιση της ΙΚΚβ επιβράδυνε την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου τους κατά ~10% μειώνοντας κυρίως τον αριθμό των κυττάρων στη φάση G1 και τη συσσώρευση τους στη φάση S ή G2 (Εικόνα 3.6B).

Οι μεταβολές στην έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, λόγω της μειορρύθμισης των ΙΚΚα ή ΙΚΚβ, πιθανά να είναι

πολλαπλές λόγω του ανταγωνισμού των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB με τους E2Fs (7, 19, 126, 163, 166, 178, 182, 201), ή την p53 (3, 97, 181, 204, 225, 230).

Στην προκειμένη περίπτωση, μελετήθηκε αρχικά η έκφραση της *Cdc6*, ενός παράγοντα αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA, που ρυθμίζεται θετικά από τους μεταγραφικούς παράγοντες E2Fs και αρνητικά από την p53. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι στα κύτταρα A549, η μειορρύθμιση της IKKα έχει σαν αποτέλεσμα τη μειορρύθμιση της έκφρασης της *Cdc6* και την ταυτόχρονη μη μεταβολή στην έκφραση του E2F1, ενώ η μειορρύθμιση της IKKβ έχει σαν αποτέλεσμα την αυξορρύθμιση της έκφρασης της *Cdc6* με την ταυτόχρονη αυξορρύθμιση του E2F1 και τη μειορρύθμιση της p53. Στα κύτταρα H1299 η μειορρύθμιση της IKKα έχει σαν αποτέλεσμα μη μεταβολή στην έκφραση της *Cdc6* και του E2F1, ενώ η μειορρύθμιση της IKKβ αυξορρυθμίζει την έκφραση της *Cdc6* με την ταυτόχρονη αυξορρύθμιση του E2F1. Ακολούθως, στα κύτταρα H1437, η μειορρύθμιση της IKKα έχει σαν αποτέλεσμα τη μειορρύθμιση της *Cdc6* και την αυξορρύθμιση του E2F1, ενώ η μειορρύθμιση της IKKβ οδήγησε στην αυξορρύθμιση της *Cdc6*, μη μεταβολή στην έκφραση του E2F1 και μειορρύθμιση της p53. Τέλος, στα κύτταρα H1792 η μειορρύθμιση της IKKα και IKKβ έχει σαν αποτέλεσμα μη μεταβολή στην έκφραση της *Cdc6* και αυξορρύθμιση του E2F1. (Εικόνα 3.7- Εικόνα 3.8).

Στα A549 και H1299 η έκφραση της *CcnD1* δε φαίνεται να αλλάζει, ενώ στα H1437 και H1792 μειορρυθμίζεται μετά από μειορρύθμιση της IKKα (Εικόνα 3.7). Η IKKα ενεργοποιεί τα γονίδια που αποκρίνονται σε οιστρογόνα, όπως την κυκλίνη D1 (*CcnD1*) και το *c-myc*, τα οποία διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και επίσης η IKKα δρα συνεργικά με τον οιστρογονικό υποδοχέα-α (ERα) και διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων μαστού, ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων-στόχων των μεταγραφικών παραγόντων E2F, όπως *CcnE*, *PCNA*, *Cdc25A* και *CcnD1*, η οποία επίσης ρυθμίζεται και από την IKKβ (40, 76, 159, 164). Επιπλέον, η δράση της *CcnD1* εξαρτάται και από τον υποκυτταρικό εντοπισμό της, και έχει καταδειχθεί ότι η μη-κανονική πορεία μεταγωγής σήματος του NF-κB IKKα-p52 εμπλέκεται στη ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης και στον υποκυτταρικό εντοπισμό της *CcnD1* (4, 116, 117, 218). Η IKKα επάγει επίσης τη μεταγραφή της λιγάσης της ουβικιτίνης *skp2* ενεργοποιώντας το ετεροδιμερές RelB/p52 που οδηγεί στη μειορρύθμιση της έκφρασης της p27^{Kip1} και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου κατά τη φάση G₁ (180), κάτι που αποδεικνύεται και στα αποτελέσματα αφού

μειορρύθμιση της IKKα οδηγεί σε αυξορρύθμιση της p27 και άρα αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 3.7).

Επίσης, μειορρυθμίζοντας την έκφραση της p65 στα A549 και H1299 παρατηρούμε ότι οδηγεί στην αυξορρύθμιση της έκφρασης της Cdc6 (Εικόνα 3.9), ομοίως με τη μειορρύθμιση της IKKβ στα ίδια κύτταρα. Άρα συμπεραίνουμε ότι η κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κΒ οδηγεί στην επαγωγή της έκφραση της Cdc6.

Η ρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου από τις καταλυτικές κινάσες του NF-κΒ, IKKα και IKKβ είναι πολυεπίπεδη, τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Οι IKKα και IKKβ ρυθμίζουν την έκφραση και τη σταθερότητα της p53 (19, 121, 204, 225, 230, 232, 233), αλλά και συνολικά την έκφραση γονιδίων-στόχων των μεταγραφικών παραγόντων E2F (7, 19, 40, 76, 159, 163, 164, 180, 181) και επομένως την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και τις αποκρίσεις σε βλάβες στο DNA.

4.4. Διαφορική έκφραση miRNAs που ρυθμίζονται από την κανονική σηματοδοτική πορεία IKKβ-NF-κΒ πριν και μετά την επαγωγή βλαβών στο DNA

Τα miRNAs παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση μιας σειράς σημαντικών βιολογικών διαδικασιών, όπως στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στις αποκρίσεις σε βλάβες στο DNA, στην απόπτωση και στην καρκινογένεση, διαμέσου πολύπλοκων και αλληλεπιδρώντων ρυθμιστικών δικτύων μεταγραφικών παραγόντων - miRNA (47, 52, 53, 122, 153, 155, 192).

Το ρυθμιστικό δίκτυο NFκΒ-miRNA εμπλέκεται στη ρύθμιση μιας σειράς βιολογικών διαδικασιών, μεταξύ των οποίων ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, οι προ-φλεγμονώδεις αποκρίσεις, και η καρκινογένεση (26, 98, 138, 209, 239, 240).

Στην παρούσα διατριβή ταυτοποιήσαμε νέα miRNAs που ρυθμίζονται από την κανονική σηματοδοτική πορεία IKKβ-NF-κΒ. Μεταξύ των 51 διαφορεικά εκφραζόμενων miRNAs, τα miR-32-5p και miR-582-5p εκφράζονταν σε υψηλότερα επίπεδα στα κύτταρα A549 IKKβ^{KD} σε σύγκριση με τα κύτταρα αγρίου τύπου A549 IKKβ (Εικόνα 3.10). Επομένως, η κανονική σηματοδοτική πορεία IKKβ-NF-κΒ δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης miR-32-5p και miR-582-5p. Αυτό το εύρημα είναι

σημαντικό καθώς τα miR-32-5p και miR-582-5p παρεμποδίζουν την ανάπτυξη αδενοκαρκινωμάτων του πνεύμονα (NSCLC), για την πρόοδο των οποίων απαιτείται η ενεργότητα της κανονικής σηματοδοτικής πορείας του IKKβ-NF-κB (17, 147, 194, 226).

Η μειορρύθμιση του miR-32 συσχετίζεται με την πρόοδο του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (14). Το miR-32 καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάπτωση (EMT) και τη μετάσταση στοχεύοντας το μεταγραφικό παράγοντα *Twist1* σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (123). Το miR-32 στοχεύει επίσης μια σειρά γονιδίων όπως *TSC1*, *SLC45A3*, *KAT2B* (ακετυλομεταφοράση της λυσίνης; *Lys acetyltransferase 2B*), *Mdm2* και *TRAF3*.

Ομοίως, το miR-582 καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό διαφορετικών καρκινικών κυττάρων (208, 237, 238).

Σε αντίθεση κάτω από συνθήκες που επάγουν αμφίκλωνες ρήξεις στο DNA όπως στην περίπτωση χορήγησης συγκεκριμένων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, η τεχνολογία *nanostrip* ταυτοποίησε ένα διαφορετικό προφίλ έκφρασης miRNA (Εικόνα 3.11). Μεταξύ των miRNA που εκφράζονταν σε υψηλότερα επίπεδα στα κύτταρα A549 IKKβ^{KD} σε σύγκριση με τα κύτταρα αγρίου τύπου A549 IKKβ μετά τη χορήγηση ετοποσιδίου (VP16) ήταν τα miR-342-3p και miR-378i (Εικόνα 3.11).

Ιδιαίτερα, το miR-342 λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό miRNA (228) και μειορρυθμίζεται σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (48). Επιπλέον, το miR-342-3p ρυθμίζει την έκφραση του MYC διαμέσου της άμεσης καταστολής του E2F1 σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα (200).

Είναι επομένως φανερό ότι οι επιδράσεις της IKKβ στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στις κυτταρικές αποκρίσεις σε βλάβες στο DNA, πιθανά να οφείλονται στη μεταβολή της έκφρασης NF-κB ρυθμιζόμενων miRNAs, όπως miR-32 και miR-582-5p, και miR-342-3p και miR-378i, αντίστοιχα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Ο χημειοθεραπευτικός παράγοντας ετοποσίδιο (VP16) επάγει τη συσσώρευση ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα στη φάση G₂/M του κυτταρικού κύκλου, ανεξάρτητα από την κατάσταση της p53.
- Το ετοποσίδιο επάγει τη διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου στη φάση G₂/M, διαμέσου της μεταβολής της έκφρασης πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μεταξύ των οποίων, CcnD1, Cdc6, E2F1, E2F2, E2F3, E2F4, E2F6, p53, p21^{Cip1} και p27^{kip1}.
- Το ετοποσίδιο επαύξησε τη μεταγραφική ενεργότητα του NF-κB στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα με την ακόλουθη σειρά που εξαρτάται από το βαθμό ενεργοποίησης: H1437 > H1792 > H1299 ≥ A549. Στα κύτταρα A549 και H1299 η ενεργοποίηση του NF-κB ήταν μικρότερη, πιθανά λόγω της ιδιοστατικής έκφρασης/ενεργότητας του NF-κB στα συγκεκριμένα κύτταρα ή της πυρηνικής μετατόπισης της ανασταλτικής πρωτεΐνης του NF-κB, IκBα (δεν απεικονίζονται τα αποτελέσματα; 242).
- Η μειορρύθμιση της IKKα επιβράδυνε την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου όλων των καρκινικών σειρών πιθανά διαμέσου της ρύθμισης γονιδίων-στόχων των μεταγραφικών παραγόντων E2F.
- Η μειορρύθμιση της κανονικής σηματοδοτικής πορείας IKKβ-RelA/p65 επιβράδυνε την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου όλων των καρκινικών σειρών, πιθανά διαμέσου της μεταβολής της έκφρασης συγκεκριμένων NF-κB ρυθμιζόμενων miRNAs, όπως miR-32 και miR-582-5p.
- Η μειορρύθμιση της IKKβ είχε σαν αποτέλεσμα τη διαφορική έκφραση NF-κB ρυθμιζόμενων miRNAs ως απόκριση σε βλάβες στο DNA που επάγονται από το ετοποσίδιο, όπως miR-342-3p και miR-378i.

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή κατέδειξε την ύπαρξη ενός ρυθμιστικού δικτύου NF-κB-miRNA που εμπλέκεται στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και στις αποκρίσεις σε βλάβες στο DNA ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα.

ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

- Στα ΙΚΚ-τροποποιημένα κύτταρα θα χορηγηθεί ετοποσιδίιο και θα αναλυθεί η έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στις σηματοδοτικές πορείες του NF-κΒ.
- Στα ΙΚΚ-τροποποιημένα κύτταρα θα χορηγηθεί ετοποσιδίιο και θα αναλυθεί η έκφραση γονιδίων-στόχων των μεταγραφικών παραγόντων E2F, όπως *CcnD1*, *Cdc6*, *E2F1*, *p21* και *p27* σε επίπεδο mRNA με RT-PCR και σε επίπεδο πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωμα.
- Επειδή οι υποκινητές των γονιδίων *CcnD1*, *Cdc6*, *E2F1*, *p21* και *p27* έχουν θέσεις δέσμευσης για τον NF-κΒ και τους E2Fs, θα πραγματοποιηθεί ανοσοκαθίζηση της χρωματίνης προκειμένου να διερευνηθεί πως οι ΙΚΚα και ΙΚΚβ μεταβάλλουν τη δέσμευση των ενεργοποιητών E2Fs (E2F1-E2F3) και κατασταλτικών E2Fs (E2F4-E2F6) στους υποκινητές των παραπάνω γονιδίων παρουσία και απουσία του ετοποσιδίου.
- Θα μελετηθούν οι επιδράσεις του miR-32 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό *in vitro* και *in vivo* σε ξενομοσχεύματα, είτε υπερεκφράζοντας ή μειορρυθμίζοντας την έκφραση του σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα, και σε φυσιολογικές ινοβλάστες πνεύμονα.
- Θα μελετηθούν οι επιδράσεις του miR-342 στις αποκρίσεις σε βλάβες στο DNA ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα, και φυσιολογικών ινοβλαστών πνεύμονα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abbas T, Dutta A (2009) p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Rev Cancer* **9**:400-414
2. Aggarwal BB, Sung B (2011) NF-κB in cancer: a matter of life and death. *Cancer Discov* **1**:469-471
3. Ak P, Levine AJ (2010) p53 and NF-κB: different strategies for responding to stress lead to a functional antagonism. *FASEB J.* **24**:3643-3652
4. Albanese C, Wu K, D'Amico M, Jarrett C, Joyce D, Hughes J, Hult J, Sakamaki T, Fu M, Ben-Ze'ev A, Bromberg JF, Lamberti C, Verma U, Gaynor RB, Byers SW, Pestell RG (2003) IKKα regulates mitogenic signaling through transcriptional induction of cyclin D1 via Tcf. *Mol Biol Cell* **14**:585-599
5. Ambros V (2004) The functions of animal micrnas. *Nature* **431**:350-35
6. Ameres SL, Zamore PD (2013) Diversifying micrna sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**:475-488
7. Araki K, Kawauchi K, Tanaka N (2008) IKK/NF-κB signaling pathway inhibits cell-cycle progression by a novel Rb-independent suppression system for E2F transcription factors. *Oncogene* **27**:5696-5705
8. Arias EE, Walter JC (2007) Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes Dev* **21**:497-518
9. Arora S, Rana R, Chhabra A, Jaiswal A, Rani V (2013) MiRNA-transcription factor interactions: A combinatorial regulation of gene expression. *Mol Genet Genomics* **288**:77-87
10. Attwooll C, Lazzarini Denchi E, Helin K (2004) The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J* **23**:4709-4716
11. Aviel-Ronen, S; Blackhall FH, Shepherd FA, Tsao MS (2006). K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review. *Clin Lung Cancer* **8**(1):30-38.
12. Babashah S, Soleimani M (2011) The oncogenic and tumour suppressive roles of micrnas in cancer and apoptosis. *Eur J Cancer* **47**:1127-1137
13. Baer C, Claus R, Plass C (2013) Genome-wide epigenetic regulation of mirnas in cancer. *Cancer Res* **73**:473-477
14. Bai *et al* (2015) Expression of miR-32 in human non-small cell lung cancer and its correlation with tumor progression and patient survival. *Int J Clin Exp Pathol* **8**:824-9
15. Baldwin AS. (2001) Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-κB. *J Clin Invest.* **107**:241-6.
16. Bartel DP (2004) Micrnas: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**:281-297
17. Basseres DS, Ebbs A, Levantini E, Baldwin AS (2010) Requirement of the NF-κB subunit p65/RelA for K-Ras-induced lung tumorigenesis. *Cancer Res* **70**:3537-3546
18. Batra S, Balamayooran G, Sahoo MK (2011) NF-κB: a key regulator in health and disease of lungs. *Arch Immunol. et therapiae experimentalis* **59**:335-351
19. Batsi C, Markopoulou S, Vartholomatos G, Georgiou I, Kanavaros P, Gorgoulis VG, Marcu KB, Kolettas E (2009) Chronic NF-κB activation delays RasV12-induced premature senescence of human fibroblasts by suppressing the DNA damage checkpoint response. *Mech. Ageing Development* **130**:409-419
20. Bell SP, Dutta A (2002) DNA replication in eukaryotic cells. *Annual Rev Biochem* **71**:333-374

21. Ben-Neriah Y, Karin M (2011) Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nature Immunol* **12**:715-723
22. Berkovich E, Ginsberg D. (2003). ATM is a target for positive regulation by E2F-1. *Oncogene* **22**:161-167.
23. Bertoli C, Skotheim JM, de Bruin RA (2013) Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Rev Mol Cell Biol* **14**:518-528
24. Blain SW (2008) Switching cyclin D-Cdk4 kinase activity on and off. *Cell Cycle* **7**:892-898
25. Blow JJ, Gillespie PJ (2008) Replication licensing and cancer - a fatal entanglement? *Nature Rev Cancer* **8**:799-806
26. Boldin MP, Baltimore D (2012) MicroRNAs, new effectors and regulators of NF- κ B. *Immunol Rev* **246**:205-220
27. Borlado LR, Mendez J (2008) CDC6: from DNA replication to cell cycle checkpoints and oncogenesis. *Carcinogenesis* **29**:237-243
28. Botchan M (2007) Cell biology: a switch for S phase. *Nature* **445**:272-274
29. Bracken AP, et al. (2004) E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem Sci.* **29**:409-17.
30. Bracken CP, Scott HS, Goodall GJ (2016) A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer. *Nat Rev Genet* **17**:719-732
31. Brosh R, Shalgi R, Liran A, Landan G, Korotayev K, Nguyen GH, Enerly E, Johnsen H, Buganim Y, Solomon H (2008) P53-repressed miRNAs are involved with E2F in a feed-forward loop promoting proliferation. *Mol Systems Biol* **4**:229
32. Bueno MJ, Malumbres M (2011) MicroRNAs and the cell cycle. *Biochim Biophys Acta* **1812**:592-601
33. Calin GA, Croce CM (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* **2006**;6:857-866
34. Campbell KJ, O'Shea JM, Perkins ND (2006a) Differential regulation of NF- κ B activation and function by topoisomerase II inhibitors. *BMC cancer* **6**:101
35. Campbell KJ, Perkins ND (2004) Reprogramming RelA. *Cell Cycle* **3**: 869-872
36. Campbell KJ, Rocha S, Perkins ND (2004) Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA(p65) NF- κ B. *Mol Cell* **13**:853-865
37. Campbell KJ, Witty JM, Rocha S, Perkins ND (2006b) Cisplatin mimics ARF tumor suppressor regulation of RelA (p65) NF- κ B transactivation. *Cancer Res* **66**:929-935
38. Cazzalini O, Scovassi AI, Savio M, Stivala LA, Prospero E (2010) Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21^{CDKN1A} in the DNA damage response. *Mutation res* **704**:12-20
39. Chagin VO, Stear JH, Cardoso MC (2010) Organization of DNA replication. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**:a000737
40. Chariot A (2009) The NF- κ B-independent functions of IKK subunits in immunity and cancer. *Trends Cell Biol* **19**:404-413
41. Chen HZ, Tsai SY, Leone G (2009) Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nature Rev Cancer* **9**:785-797
42. Chen W, Li Z, Bai L, Lin Y (2011) NF- κ B in lung cancer, a carcinogenesis mediator and a prevention and therapy target. *Front Biosci* **16**:1172-1185
43. Chen ZJ (2012) Ubiquitination in signaling to and activation of IKK. *Immunological Rev* **246**:95-106
44. Ciccio A, Elledge SJ (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* **40**:179-204

45. Collier HA (2007) What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. *Nature Rev Mol Cell Biol* **8**:667-670
46. Cooks T, Pateras IS, Tarcic O, Solomon H, Schetter AJ, Wilder S, Lozano G, Pikarsky E, Forsheo T, Rosenfeld N, Harpaz N, Itzkowitz S, Harris CC, Rotter V, Gorgoulis VG, Oren M (2013) Mutant p53 prolongs NF- κ B activation and promotes chronic inflammation and inflammation-associated colorectal cancer. *Cancer Cell* **23**:634-646
47. Croce CM (2009) Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* **10**:704-714
48. Dacik et al (2010) miRNA expression profiling of lung adenocarcinomas: correlation with mutational status. *Mod Pathol* **23**:1577-82
49. DeGregori J and Johnson DG. (2006) Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr Mol Med.* **6**:739-48.
50. Denicourt C, Dowdy SF (2004) Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors. *Genes Dev* **18**:851-855
51. Devereux, TR; Taylor JA, Barrett JC (1996). Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors. *Chest* **109** (Suppl 3): 14S-19S.
52. Di Fagagna FdA (2014) A direct role for small noncoding RNAs in DNA damage response. *Trends Cell Biol* **24**:171-178
53. Di Leva G, Croce CM (2013) MiRNA profiling of cancer. *Curr Opin Genet Dev* **23**:3-11
54. Dimova DK and Dyson NJ. (2005) The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* **24**:2810-26.
55. Ding L., Getz G, Wheeler DA, et al. (2008). Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* **455**:1069-1075.
56. Dong YB, Yang HL, Elliott MJ, McMasters KM (2002) Adenovirus-mediated E2F-1 gene transfer sensitizes melanoma cells to apoptosis induced by topoisomerase II inhibitors. *Cancer Res* **62**:1776-1783
57. Du W, Pogoriler J (2006) Retinoblastoma family genes. *Oncogene* **25**:5190-5200
58. Duursma A, Agami R (2005a) p53-Dependent regulation of Cdc6 protein stability controls cellular proliferation. *Mol Cell Biol* **25**:6937-6947
59. Duursma AM, Agami R (2005b) CDK-dependent stabilization of Cdc6: linking growth and stress signals to activation of DNA replication. *Cell Cycle* **4**:1725-1728
60. Espinosa L, Bigas A, Mulero MC (2011) Alternative nuclear functions for NF-kappaB family members. *Am J Cancer Res* **1**:446-459
61. Esquela-Kerscher A, Slack FJ (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**:259-269
62. Esteller M (2011) Noncoding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* **12**:861-874
63. Farago AF, Snyder EL, Jacks T. (2012). *Cell* **149**:246-246 e241.
64. Fong KM; Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD (2003). Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax* **58**(10):892-900.
65. Freedman JA, Chang JT, Jakoi L, Nevins JR (2009) A combinatorial mechanism for determining the specificity of E2F activation and repression. *Oncogene* **28**:2873-2881

66. Freshney RI and Freshney MG. (2002). Culture of Epithelial Cells, Second Edition, Wiley-Liss & Sons, Inc., NY, USA.
67. Frolov MV, Dyson NJ (2004) Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J Cell Science* **117**:2173-2181
68. Garofalo M, Croce CM: Role of micrnas in maintaining cancer stem cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2015;**81**:53-61
69. Gartel AL, Kandel ES (2008) MiRNAs: Little known mediators of oncogenesis. *Semin Cancer Biol* **18**:103-110
70. Gartel AL, Radhakrishnan SK (2005) Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res* **65**:3980-3985
71. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, *et al* (2008) Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol* **26**(3):317-325
72. Gerondakis S, Grumont R, Gugasyan R, Wong L, Isomura I, Ho W, Banerjee A (2006) Unravelling the complexities of the NF- κ B signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene* **25**:6781-6799
73. Ghosh G, Wang VY, Huang DB, Fusco A (2012) NF- κ B regulation: lessons from structures. *Immunological Rev* **246**:36-58
74. Ghosh S, Hayden MS (2008) New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nat Rev Immunol* **8**:837-848
75. Ghosh S, Hayden MS (2012) Celebrating 25 years of NF- κ B research. *Immunological Rev* **246**:5-13
76. Gloire G, Dejardin E, Piette J (2006) Extending the nuclear roles of I κ B kinase subunits. *Biochem Pharmacol* **72**:1081-1089
77. Gregory RI, Shiekhattar R (2005) MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res* **65**:3509-3512
78. Greulich H. (2010) The genomics of lung adenocarcinoma: opportunities for targeted therapies. *Genes Cancer* **1**:1200-1210.
79. Guardavaccaro D, Pagano M (2006) Stabilizers and destabilizers controlling cell cycle oscillators. *Mol Cell* **22**:1-4
80. Gurtan AM, Sharp PA (2013) The role of miRNAs in regulating gene expression networks. *J Mol Biol* **425**:3582-3600
81. Ha M, Kim VN (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**:509-524
82. Habraken Y, Piette J (2006) NF- κ B activation by double-strand breaks. *Biochem Pharmacol* **72**:1132-1141
83. Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J (2008) An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* **319**:1352-1355
84. Hallstrom TC, Nevins JR (2009) Balancing the decision of cell proliferation and cell fate. *Cell Cycle* **8**: 532-535
85. Hammond SM (2007) MicroRNAs as tumor suppressors. *Nat Genet* **39**:582-583
86. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**:646-674
87. Harper JW, Elledge SJ (2007) The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* **28**:739-745
88. Hateboer G, Wobst A, Petersen BO, Le Cam L, Vigo E, Sardet C, Helin K (1998) Cell cycle-regulated expression of mammalian CDC6 is dependent on E2F. *Mol Cell Biol* **18**:6679-6697
89. Herbst, RS; Heymach JV, Lippman SM (2008) Lung cancer. *New England J Med* **359**(13):1367-1380.

90. Hermeking H (2012) MicroRNAs in the p53 network: Micromanagement of tumour suppression. *Nat Rev Cancer* **12**:613-626
91. Hermeking H (2007) P53 enters the microRNA world. *Cancer Cell* **12**:414-418
92. Hinz M, Arslan SC, Scheidereit C (2012) It takes two to tango: IκappaBs, the multifunctional partners of NF-κappaB. *Immunological Rev* **246**:59-76
93. Hinz M, Stilmann M, Arslan SC, Khanna KK, Dittmar G, Scheidereit C (2010) A cytoplasmic ATM-TRAF6-clAP1 module links nuclear DNA damage signaling to ubiquitin-mediated NF-κappaB activation. *Mol Cell* **40**:63-74
94. Hobert O (2008) Gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Science* **319**:1785-1786
95. Hochegger H, Takeda S, Hunt T (2008) Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nature reviews Mol Cell Biol* **9**:910-916
96. Horn, L; Pao W, Johnson DH (2012) «89». *Harrison's Principles of Internal Medicine* (18th έκδοση). McGraw-Hill.
97. Huang WC, Ju TK, Hung MC, Chen CC (2007) Phosphorylation of CBP by IKKalpha promotes cell growth by switching the binding preference of CBP from p53 to NF-κB. *Mol Cell* **26**:75-87
98. Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K (2009) An epigenetic switch involving NF-κB, lin28, let-7 microRNA, and IL-6 links inflammation to cell transformation. *Cell* **139**:693-706
99. Inui M, Martello G, Piccolo S (2010) MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**:252-263
100. Iorio MV, Croce CM (2012) MicroRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis* **33**:1126-1133
101. Jackson SP, Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**:1071-1078
102. Janssens S, Tinel A, Lippens S, Tschopp J (2005) PIDD mediates NF-κB activation in response to DNA damage. *Cell* **123**:1079-1092
103. Janssens S, Tschopp J (2006) Signals from within: the DNA-damage-induced NF-κB response. *Cell Death Differ* **13**:773-784
104. Jin HS, Lee DH, Kim DH, Chung JH, Lee SJ, Lee TH (2009) clAP1, clAP2, and XIAP act cooperatively via nonredundant pathways to regulate genotoxic stress-induced nuclear factor-κappaB activation. *Cancer Res* **69**:1782-1791
105. Jin X, Wang Z, Qiu L, Zhang D, Guo Z, Gao Z, Deng C, Wang F, Wang S, Guo C (2008) Potential biomarkers involving IKK/RelA signal in early stage non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* **99**:582-589
106. Kan Q, Jinno S, Kobayashi K, Yamamoto H, Okayama H (2008) Cdc6 determines utilization of p21^{WAF1/CIP1}-dependent damage checkpoint in S phase cells. *Journal Biol Chrm* **283**:17864-17872
107. Kanarek N, Ben-Neriah Y (2012) Regulation of NF-κB by ubiquitination and degradation of the IκappaBs. *Immunological Rev* **246**:77-94
108. Karin M (2006) NF-κB in cancer development and progression. *Nature* **441**:431-436
109. Karin M, Greten FR (2005) NF-κB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* **5**:749-759
110. Karin M, Yamamoto Y, Wang QM (2004) The IKK NF-κB system: a treasure trove for drug development. *Nature Rev Drug Discov* **3**:17-26
111. Kastan MB and Bartek J (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*. **432**:316-23.

112. Kim D, Sung YM, Park J, Kim S, Kim J, Ha H, Bae JY, Baek D (2016) General rules for functional microRNA targeting. *Nat Genet* **48**:1517-1526
113. Klein EA, Assoian RK (2008) Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *J Cell Sci* **121**:3853-3857
114. Knoll S, Furst K, Kowtharapu B, Schmitz U, Marquardt S, Wolkenhauer O, Martin H, Putzer BM (2014) E2F1 induces mir-224/452 expression to drive emt through TXNIP downregulation. *EMBO Rep* **15**:1315-1329
115. Koundrioukoff S, Polo S, Almouzni G (2004) Interplay between chromatin and cell cycle checkpoints in the context of ATR/ATM-dependent checkpoints. *DNA Repair (Amst)* **3**:969-978
116. Kwak YT, Li R, Becerra CR, Tripathy D, Frenkel EP, Verma UN (2005) I κ B kinase alpha regulates subcellular distribution and turnover of cyclin D1 by phosphorylation. *J Biol Chem* **280**:33945-33952
117. Kwak YT, Radaideh SM, Ding L, Li R, Frenkel E, Story MD, Girard L, Minna J, Verma UN (2011) Cells lacking IKK α show nuclear cyclin D1 overexpression and a neoplastic phenotype: role of IKK α as a tumor suppressor. *Molecular cancer research : Mol Cancer Res* **9**:341-349
118. Lammens T, Li J, Leone G, De Veylder L (2009) Atypical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family. *Trends Cell Biol* **19**:111-118
119. Lane D and Harlow E. (1988). Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
120. Lau E, Tsuji T, Guo L, Lu SH, Jiang W (2007) The role of pre-replicative complex (pre-RC) components in oncogenesis. *FASEB J* **21**:3786-3794
121. Lau R, Niu MY, Pratt MA (2012) cIAP2 represses IKK α /beta-mediated activation of MDM2 to prevent p53 degradation. *Cell Cycle* **11**: 4009-4019
122. Leung AK, Sharp PA (2010) MicroRNA functions in stress responses. *Mol Cell* **40**:205-215
123. Li & Wu (2016) miR-32 inhibits proliferation, epithelial-mesenchymal transition, and metastasis by targeting TWIST1 in non-small-cell lung cancer cells. *Oncotargets Ther* **9**:1489-98
124. Li XL, Jones MF, Subramanian M, Lal A (2014) Mutant p53 exerts oncogenic effects through micrnas and their target gene networks. *FEBS Lett* **588**:2610-2615
125. Lim CA, Yao F, Wong JJ, George J, Xu H, Chiu KP, Sung WK, Lipovich L, Vega VB, Chen J, Shahab A, Zhao XD, Hibberd M, Wei CL, Lim B, Ng HH, Ruan Y, Chin KC (2007) Genome-wide mapping of RELA(p65) binding identifies E2F1 as a transcriptional activator recruited by NF- κ B upon TLR4 activation. *Mol Cell* **27**:622-635
126. Lin CY, Liang YC, Yung BY (2006) Nucleophosmin/B23 regulates transcriptional activation of E2F1 via modulating the promoter binding of NF- κ B, E2F1 and pRB. *Cell Signal* **18**: 2041-2048
127. Lin S, Gregory RI: MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015;**15**:321-333
128. Lin WC, Lin FT, Nevins JR. (2001) Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev* **15**:1833-1844.
129. Ling H, Fabbri M, Calin GA (2013) Micrnas and other noncoding rnas as targets for anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov* **12**:847-865
130. Litwiniec A, Gackowska L, Helmin-Basa A, Zuryn A, Grzanka A (2013) Low-dose etoposide-treatment induces endoreplication and cell death accompanied

- by cytoskeletal alterations in A549 cells: Does the response involve senescence? The possible role of vimentin. *Cancer Cell Int* **13**: 9
131. Liu F, Xia Y, Parker AS, Verma IM (2012) IKK biology. *Immunological Rev* **246**:239-253
 132. Lopez-Contreras AJ, Fernandez-Capetillo O (2010) The ATR barrier to replication-born DNA damage. *DNA Repair (Amst)* **9**:1249-1255
 133. Lu, C; Onn A, Vaporciyan AA et al. (2010). 78: Cancer of the Lung. *Holland-Frei Cancer Medicine* (8th έκδοση). People's Medical Publishing House.
 134. Lui PY, Jin DY, Stevenson NJ (2015) Microrna: Master controllers of intracellular signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* **72**:3531-3542
 135. Lukas J, Lukas C, Bartek J (2011) More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nature Cell Biol* **13**:1161-1169
 136. Lung Carcinoma: Tumors of the Lungs. Merck Manual Professional Edition, Online edition.
 137. Ma HT, Poon RY (2011) How protein kinases co-ordinate mitosis in animal cells. *Biochem J* **435**:17-31
 138. Ma X, Becker Buscaglia LE, Baker JR, Li Y (2011) MicroRNAs in NF-κB signaling. *J Mol Cell Biol*; **3**:159-166
 139. Maitra, A; Kumar V (2007). *Robbins Basic Pathology* (8th έκδοση). Saunders Elsevier, pp528-529
 140. Malumbres M (2011) Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiol Rev* **91**:973-1007
 141. Malumbres M, Barbacid M (2005) Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* **30**:630-641
 142. Malumbres M, Barbacid M (2007) Cell cycle kinases in cancer. *Current Opin Genet Dev* **17**:60-65
 143. Martinez NJ, Walhout AJ (2009) The interplay between transcription factors and microRNAs in genome-scale regulatory networks. *Bioessays* **31**:435-445
 144. McClellan KA, Slack RS (2007) Specific in vivo roles for E2Fs in differentiation and development. *Cell Cycle* **6**:2917-2927
 145. McCool KW, Miyamoto S (2012) DNA damage-dependent NF-κB activation: NEMO turns nuclear signaling inside out. *Immunological Rev* **246**:311-326
 146. Mendell JT (2005) MicroRNAs: Critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. *Cell Cycle* **4**:1179-1184
 147. Meylan E, Dooley AL, Feldser DM, Shen L, Turk E, Ouyang C, Jacks T (2009) Requirement for NF-κB signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma. *Nature* **462**:104-107
 148. Miyamoto S (2011) Nuclear initiated NF-κB signaling: NEMO and ATM take center stage. *Cell Res* **21**:116-130
 149. Montecucco A, Biamonti G (2007) Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Lett* **252**:9-18
 150. Mukhopadhyay T, Roth JA, Maxwell SA (1995) Altered expression of the p50 subunit of the NF-κB transcription factor complex in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene* **11**:999-1003
 151. Murray AW (2004) Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* **116**: 221-234
 152. Naugler WE, Karin M (2008) NF-κB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Current Opin Genet Dev* **18**:19-26
 153. Negrini M, Nicoloso MS, Calin GA (2009) MicroRNAs and cancer - new paradigms in molecular oncology. *Curr Opin Cell Biol* **21**:470-479

154. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD (2010) Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature Rev Mol Cell Biol* **11**:220-228
155. Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, Rossi S, Calin GA: Micrnas--the micro steering wheel of tumour metastases. *Nat Rev Cancer* 2009;**9**:293-302
156. Norris JL, Baldwin AS, Jr. (1999) Oncogenic Ras enhances NF-kappaB transcriptional activity through Raf-dependent and Raf-independent mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Biol Chem* **274**:13841-13846.
157. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S (2011) Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nature Immunol* **12**:695-708
158. Ohtani K, Tsujimoto A, Ikeda M, Nakamura M (1998) Regulation of cell growth-dependent expression of mammalian CDC6 gene by the cell cycle transcription factor E2F. *Oncogene* **17**:1777-1785
159. Park KJ, Krishnan V, O'Malley BW, Yamamoto Y, Gaynor RB (2005) Formation of an IKKalpha-dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation. *Mol Cell* **18**: 71-82
160. Pasparakis M (2012) Role of NF- κ B in epithelial biology. *Immunol Rev* **246**:346-358
161. Pasparakis M, Luedde T, Schmidt-Supprian M (2006) Dissection of the NF- κ B signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell Death Differ* **13**: 861-872
162. Pelizon C, d'Adda di Fagagna F, Farrace L, Laskey RA (2002) Human replication protein Cdc6 is selectively cleaved by caspase 3 during apoptosis. *EMBO Rep* **3**:780-784
163. Penzo M, Massa PE, Olivotto E, Bianchi F, Borzi RM, Hanidu A, Li X, Li J, Marcu KB (2009) Sustained NF-kappaB activation produces a short-term cell proliferation block in conjunction with repressing effectors of cell cycle progression controlled by E2F or FoxM1. *J Cell Physiol* **218**:215-227
164. Perkins ND (2007) Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**:49-62
165. Perkins ND (2012) The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer. *Nature Rev Cancer* **12**:121-132
166. Phillips AC, Ernst MK, Bates S, Rice NR, Vousden KH (1999) E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. *Mol Cell* **4**:771-781
167. Pines J (2006) Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time. *Trends Cell Biol* **16**: 55-63
168. Polager S and Ginsberg D (2008) E2F - at the crossroads of life and death. *Trends Cell Biol.* **18**:528-35.
169. Polager S, Ginsberg D (2009) p53 and E2f: partners in life and death. *Nature reviews Cancer* **9**: 738-748
170. Polo SE, Jackson SP (2011) Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev* **25**:409-433
171. Remus D, Diffley JF (2009) Eukaryotic DNA replication control: lock and load, then fire. *Current Opin Cell Biol* **21**:771-777
172. Rowland BD, Bernards R (2006) Re-evaluating cell-cycle regulation by E2Fs. *Cell* **127**:871-874
173. Ruan K, Fang X, Ouyang G (2009) Micrnas: Novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett* **285**:116-126
174. Sabatel H, Di Valentin E, Gloire G, Dequiedt F, Piette J, Habraken Y (2012) Phosphorylation of p65(RelA) on Ser(547) by ATM represses NF- κ B-dependent transcription of specific genes after genotoxic stress. *PloS One* **7**:e38246

175. Saitoh Y, Martinez Bruyn VJ, Uota S, Hasegawa A, Yamamoto N, Imoto I, Inazawa J, Yamaoka S (2010) Overexpression of NF- κ B inducing kinase underlies constitutive NF-kappaB activation in lung cancer cells. *Lung cancer* **70**:263-270
176. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA
177. Sanchez I, Dynlacht BD (2005) New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Sem Cell Dev Biol* **16**:311-321
178. Schneider G, Henrich A, Greiner G, Wolf V, Lovas A, Wieczorek M, Wagner T, Reichardt S, von Werder A, Schmid RM, Weih F, Heinzl T, Saur D, Kramer OH (2010) Cross talk between stimulated NF- κ B and the tumor suppressor p53. *Oncogene* **29**:2795-2806
179. Schneider G, Kramer OH (2011) NF κ B/p53 crosstalk-a promising new therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* **1815**:90-103
180. Schneider G, Saur D, Siveke JT, Fritsch R, Greten FR, Schmid RM (2006) IKK α controls p52/RelB at the *skp2* gene promoter to regulate G1- to S-phase progression. *EMBO J* **25**:3801-3812
181. Sfikas A, Batsi C, Tselikou E, Vartholomatos G, Monokrousos N, Pappas P, Christoforidis S, Tzavaras T, Kanavaros P, Gorgoulis VG, Marcu KB, Kolettas E (2012) The canonical NF- κ B pathway differentially protects normal and human tumor cells from ROS-induced DNA damage. *Cell Signal* **24**: 2007-2023
182. Shaw J, Yurkova N, Zhang T, Gang H, Aguilar F, Weidman D, Scramstad C, Weisman H, Kirshenbaum LA (2008) Antagonism of E2F-1 regulated Brip3 transcription by NF- κ B is essential for basal cell survival. *Proc Nat Acad Sci USA* **105** 20734-20739
183. Shen RR, Hahn WC (2011) Emerging roles for the non-canonical IKKs in cancer. *Oncogene* **30**:631-641
184. Sherr CJ (2000) The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* **60**:3689-3695
185. Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**:1501-1512
186. Sherr CJ, Roberts JM (2004) Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **18**:2699-2711
187. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. (2016). *CA Cancer J Clin* **66**:7-30.
188. Sirbu BM, Cortez D (2013) DNA damage response: three levels of DNA repair regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**:a012724
189. Smale ST (2012) Dimer-specific regulatory mechanisms within the NF- κ B family of transcription factors. *Immunol Rev* **246**:193-204
190. Solt LA and May MJ. (2008) The I κ B kinase complex: master regulator of NF- κ B signaling. *Immunol Res* **42**:3-18.
191. Spalding AC, Jotte RM, Scheinman RI, Geraci MW, Clarke P, Tyler KL, Johnson GL (2002) TRAIL and inhibitors of apoptosis are opposing determinants for NF- κ B-dependent, genotoxin-induced apoptosis of cancer cells. *Oncogene* **21**: 260-271
192. Spizzo R, Nicoloso MS, Croce CM, Calin GA (2009) Snapshot: MicroRNAs in cancer. *Cell* **137**:586-586 e581
193. Starostina NG, Kipreos ET (2012) Multiple degradation pathways regulate versatile CIP/KIP CDK inhibitors. *Trends iCell Biol* **22**:33-41
194. Stathopoulos GT, Sherrill TP, Cheng DS, Scoggins RM, Han W, Polosukhin VV, Connelly L, Yull FE, Fingleton B, Blackwell TS (2007) Epithelial NF- κ B

- activation promotes urethane-induced lung carcinogenesis. *Proc Nat Acad Sci USA* **104**:18514-18519
195. Sun S, Schiller JH, Spinola M, Minna JD. (2007). *J Clin Invest* **117**:2740-2750.
 196. Sun SC (2012) The noncanonical NF- κ B pathway. *Immunol Rev* **246**:125-140
 197. Suzuki HI, Huang L, Luo J, Cai Q, Pan Q, Zeng H, Guo Z, Dong W, Huang J, Lin T (2011) MicroRNA-125b suppresses the development of bladder cancer by targeting E2F3. *Int J Cancer*,**128**:1758-1769
 198. Suzuki HI, Katsura A, Matsuyama H, Miyazono K: MicroRNA regulons in tumor microenvironment. *Oncogene* 2015;**34**:3085-3094
 199. Tabata M, Tabata R, Grabowski DR, Bukowski RM, Ganapathi MK, Ganapathi R (2001) Roles of NF- κ B and 26 S proteasome in apoptotic cell death induced by topoisomerase I and II poisons in human nonsmall cell lung carcinoma. *J Biol Chem* **276**: 029-8036
 200. Tai MC, Kajino T, Nakatochi M, Arima C, Shimada Y, Suzuki M, Miyoshi H, Yatabe Y, Yanagisawa K, Tahahashi T (2015) miR-342-3p regulates MYC transcriptional activity via direct repression of E2F1 in human lung cancer. *Carcinogenesis* **36**:1464-73
 201. Tanaka H, Matsumura I, Ezoe S, Satoh Y, Sakamaki T, Albanese C, Machii T, Pestell RG, Kanakura Y (2002) E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF- κ B activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination. *Mol Cell* **9**: 1017-1029
 202. Tang X, Liu D, Shishodia S, Ozburn N, Behrens C, Lee JJ, Hong WK, Aggarwal BB, Wistuba, II (2006) NF- κ B is frequently expressed in lung cancer and preneoplastic lesions. *Cancer* **107**:2637-2646
 203. Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H (2007) Tumor-suppressive mir-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Nat Acad Sci USA* **104**:15472-15477
 204. Tergaonkar V, Pando M, Vafa O, Wahl G, Verma I (2002) p53 stabilization is decreased upon NF κ B activation: a role for NF κ B in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell* **1**:493-503
 205. Tiscornia G, Izpisua Belmonte JC (2010) MicroRNAs in embryonic stem cell function and fate. *Genes Dev* **24**:2732-2741
 206. Trimarchi JM, Lees JA (2002) Sibling rivalry in the E2F family. *Nature Rev Mol Cell Biol* **3**:11-20
 207. Tsantoulis PK, Gorgoulis VG (2005) Involvement of E2F transcription factor family in cancer. *Eur J Cancer* **41**:2403-2414.
 208. Uchino K, Taketsita F, Takahashi RU, *et al* (2013) Therapeutic effects of microRNA-582-5p and -3p on the inhibition of bladder cancer progression. *Mol Ther* **21**:610-9
 209. Zhang X, Zhang Y, Yang J, Li S, Chen J (2015) Upregulation of miR-582-5p inhibits cell proliferation, cell cycle progression and invasion by targeting Rab27a in human colorectal carcinoma. *Cancer Gene Ther* **22**:475-80
 210. Uribealago I, Ballare C, Di Croce L: Polycomb regulates NF- κ B signaling in cancer through miRNA. *Cancer Cell* **21**:5-7
 211. Van Waes C (2011) Targeting NF- κ B in mouse models of lung adenocarcinoma. *Cancer Discov* **1**: 200-202
 212. Ventura A, Jacks T (2009) MicroRNAs and cancer: Short rnas go a long way. *Cell* **136**:586-591

213. Voorhoeve PM (2010) MicroRNAs: Oncogenes, tumor suppressors or master regulators of cancer heterogeneity? *Biochim Biophys Acta* **1805**:72-86
214. Voorhoeve PM, Agami R: Classifying microRNAs in cancer: The good, the bad and the ugly. *Biochim Biophys Acta* 2007;**1775**:274-282
215. Vousden KH, Lane DP (2007) p53 in health and disease. *Nature Rev Mol Cell Biol* **8**:275-283
216. Wei Y, Liu D, Ge Y, Zhou F, Xu J, Chen H, Gu J, Jiang J (2008) Identification of E1AF as a target gene of E2F1-induced apoptosis in response to DNA damage. *J Biochem* **144**:539-546
217. Weinhold N, Jacobsen A, Schultz N, Sander C, Lee W (2014) Genome-wide analysis of noncoding regulatory mutations in cancer. *Nat Genet* **46**:1160-1165
218. Weisz L, Damalas A, Lontos M, Karakaidos P, Fontemaggi G, Maor-Aloni R, Kalis M, Levrero M, Strano S, Gorgoulis VG, Rotter V, Blandino G, Oren M (2007) Mutant p53 enhances NF- κ B activation by tumor necrosis factor alpha in cancer cells. *Cancer Res* **67** 2396-2401
219. Westerheide SD, Mayo MW, Anest V, Hanson JL, Baldwin AS, Jr. (2001) The putative oncoprotein Bcl-3 induces cyclin D1 to stimulate G₁ transition. *Mol Cell Biol* **21**: 8428-8436
220. Williams GH, Stoeber K (2012) The cell cycle and cancer. *J Pathol* **226**:352-364
221. Wong KK, Jacks T, Dranoff G (2010) NF- κ B fans the flames of lung carcinogenesis. *Cancer Prev Res* **3**:403-405
222. Wu ZH, Miyamoto S (2007) Many faces of NF- κ B signaling induced by genotoxic stress. *J Mol Med* **85**:1187-1202
223. Wu ZH, Miyamoto S (2008) Induction of a pro-apoptotic ATM-NF- κ B pathway and its repression by ATR in response to replication stress. *EMBO J* **27**:1963-1973
224. Wu ZH, Shi Y, Tibbetts RS, Miyamoto S (2006) Molecular linkage between the kinase ATM and NF- κ B signaling in response to genotoxic stimuli. *Science* **311**: 1141-1146
225. Wuerzberger-Davis SM, Chang PY, Berchtold C, Miyamoto S (2005) Enhanced G2-M arrest by NF- κ B-dependent p21^{waf1/cip1} induction. *Mol Cancer Res* **3**:345-353
226. Xia Y, Padre RC, De Mendoza TH, Bottero V, Tergaonkar VB, Verma IM (2009) Phosphorylation of p53 by IkappaB kinase 2 promotes its degradation by beta-TrCP. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:2629-2634
227. Xia Y, Yeddula N, Leblanc M, Ke E, Zhang Y, Oldfield E, Shaw RJ, Verma IM (2012) Reduced cell proliferation by IKK2 depletion in a mouse lung cancer model. *Nat Cell Biol* **14**:257-65
228. Xiao Z, Jiang Q, Willette-Brown J, Xi S, Zhu F, Burkett S, Back T, Song NY, Datla M, Sun Z, Goldszmid R, Lin F, Cohoon T, Pike K, Wu X, Schrumph DS, Wong KK, Young HA, Trinchieri G, Wiltrot RH, Hu Y (2013) The pivotal role of IKK α in the development of spontaneous lung squamous cell carcinomas. *Cancer Cell* **23**:527-540
229. Xie X, Liu H, Wang M, Ding F, Xiao H, Hu R, Mei J (2015) miR-342-3p targets RAP2B to suppress proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells. *Tumor Biol* **36**:5031-8
230. Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K (2009) Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* **460**:529-533

231. Yamaguchi T, Miki Y, Yoshida K (2007) Protein kinase C delta activates I κ B-kinase- α to induce the p53 tumor suppressor in response to oxidative stress. *Cell Signal* **19**:2088-2097
232. Yan Z, DeGregori J, Shohet R, Leone G, Stillman B, Nevins JR, Williams RS (1998) Cdc6 is regulated by E2F and is essential for DNA replication in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:3603-3608
233. Yang J, Splittgerber R, Yull FE, Kantrow S, Ayers GD, Karin M, Richmond A (2010a) Conditional ablation of I κ kb inhibits melanoma tumor development in mice. *J Clin Inv* **120**:2563-2574
234. Yang PM, Huang WC, Lin YC, Huang WY, Wu HA, Chen WL, Chang YF, Chou CW, Tzeng CC, Chen YL, Chen CC (2010b) Loss of IKK β activity increases p53 stability and p21 expression leading to cell cycle arrest and apoptosis. *J Cell Mol Med* **14**:687-698
235. Yim H, Hwang IS, Choi JS, Chun KH, Jin YH, Ham YM, Lee KY, Lee SK (2006) Cleavage of Cdc6 by caspase-3 promotes ATM/ATR kinase-mediated apoptosis of HeLa cells. *J Cell Biol* **174**:77-88
236. Yim H, Jin YH, Park BD, Choi HJ, Lee SK (2003) Caspase-3-mediated cleavage of Cdc6 induces nuclear localization of p49-truncated Cdc6 and apoptosis. *Mol Biol Cell* **14**:4250-4259
237. Zalmas LP, Zhao X, Graham AL, Fisher R, Reilly C, Coutts AS, La Thangue NB (2008) DNA-damage response control of E2F7 and E2F8. *EMBO Rep* **9**:252-259
238. Zhang Y, Huang W, Ran Y, Xiong Y, Zhong Z, Fan X, Wang Z, Ye Q (2015) miR-582-5p inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma by targeting CDK1 and AKT3. *Tumor Biol* **36**:8309-16
239. Zhou R, Hu G, Gong AY, Chen XM (2010) Binding of NF- κ B p65 subunit to the promoter elements is involved in LPS-induced transactivation of mirna genes in human biliary epithelial cells. *Nucleic Acids Res* **38**:3222-3232
240. Zhou R, O'Hara SP, Chen XM (2011) MicroRNA regulation of innate immune responses in epithelial cells. *Cell Mol Immunol* **8**:371-379
241. Zhu H, Smith C, Ansah C, Gooderham NJ (2005) Responses of genes involved in cell cycle control to diverse DNA damaging chemicals in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Cancer cell international* **5**: 28
242. Ρουπακιά Ευγενία (2014). *Διερεύνηση του ρόλου των σηματοδοτικών πορειών του NF- κ B στην ρύθμιση γονιδίων-στόχων των μεταγραφικών παραγόντων E2Fs σε καρκινικά κύτταρα*. Μεταπτυχιακή Διατριβή ΠΜΣ Βιοτεχνολογία, Παν/μιο Ιωαννίνων
243. The Arts, Sciences and Medicine: <http://jedismedicine.blogspot.gr/2016/08/cancer-cell-cycle-cdk-inhibitors.html>
244. The mammalian cell cycle: www.eurekah.com