



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ & ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΓΓΕΛΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΑΙ
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ
ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

ΕΛΕΝΗ ΛΕΝΕΤΗ
Γεωπόνος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2005



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα. Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2.

**ΑΙΤΗΣΗ ΕΚΠΟΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ
ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

**19-11-1997
338^A/16-12-1997**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Άγγελος Ευαγγέλου, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας

ΜΕΛΗ: Βασιλική Καλφακάκου, Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας

Τριαντάφυλλος Αλμπάνης, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΑΝΑΣΥΣΤΑΣΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ **506^A/10-06-2003**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Άγγελος Ευαγγέλου, Καθηγητής Φυσιολογίας

ΜΕΛΗ: Βασιλική Καλφακάκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας

Ευάγγελος Κωλέττας, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας (με έμφαση στη
Μοριακή Φυσιολογία)

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΘΕΜΑΤΟΣ
ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

20-08-1998

11-02-2005

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
Επαμεινώντας Τσιάνος, Καθηγητής Παθολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Άγγελος Ευαγγέλου, Καθηγητής Φυσιολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Επιβλέπων
2. Παναγιώτης Ευθυμιάδης, Καθηγητής, Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
3. Παναγιώτης Καναβάρος, Καθηγητής Ανατομίας και Ιστολογίας - Εμβρυολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος
4. Τριαντάφυλλος Αλμπάνης, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος
5. Βασιλική Καλφακάκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος
6. Κωνσταντίνος Χαραλαμπόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Κλινική – Λειτουργική Φυσιολογία Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος
7. Ευάγγελος Κωλέττας, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στη Μοριακή Φυσιολογία Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Μέλος

ΒΑΘΜΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Άριστα

**Η Γραμματέας
Ευαγγελία Ζαβερδινού - Τσαγγαλά**

*Στην αείμνηστο
Μητέρα μου*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
Συντμήσεις	12
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	13
1 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	16
<i>Ενότητα Α: Φυτικά προϊόντα με οιστρογόνο δράση</i>	16
1.1 Φυτο-οιστρογόνα	16
2.1 Ισοφλαβονοειδή	17
3.1 Βιολογικές δράσεις των ισοφλαβονοειδών	19
4.1 Πηγές ισοφλαβονοειδών	22
5.1 Απορρόφηση και μεταβολισμός των ισοφλαβονοειδών	22
6.1 Κλινικές επιδράσεις των ισοφλαβονοειδών	24
α. Ισοφλαβονοειδή ως αντί-καρκινικοί παράγοντες στις γυναίκες	24
β. Ισοφλαβονοειδή ως αντί-καρκινικοί παράγοντες στους άνδρες	26
7.1 Μελέτες in vitro και σε ζώα	27
<i>Ενότητα Β: Μεταβολίτες οιστρογόνων</i>	30
8.1 Προέλευση και σχηματισμός της 2-μεθοξυοιστραδιόλης	30
9.1 Δράση της 2-μεθοξυοιστραδιόλης	33
10.1 Αντι-μιτωτικοί μηχανισμοί της 2-μεθοξυοιστραδιόλης	34
11.1 Αποπτωτικοί μηχανισμοί της δράσης της 2-μεθοξυοιστραδιόλης	40
12.1 Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (απόπτωση) και αντι-αποπτωτικά γονίδια	42
13.1 Η υπεροικογένεια του Bcl-2 στην απόπτωση	44
14.1 Κλαστρίνη/Απολιποπρωτεΐνη J (ApoJ): Ένα δυνητικά αντι-αποπτωτικό γονίδιο	51
15.1 Ο ρόλος της p21 ^{Waf1/Cip1} στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης	59
2 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	60

ΥΛΙΚΑ	60
ΜΕΘΟΔΟΙ	60
<i>Ενότητα Α: Βακτηριακές τεχνικές</i>	60
1.2 Παρασκευή L-Broth και τρυβλίων με L-άγαρ	60
2.2 Παρασκευή βακτηρίων επιδεκτικών προς μετασχηματισμό	60
3.2 Μετασχηματισμός βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA	64
4.2 Ανάπτυξη υγρών καλλιιεργειών βακτηρίων	64
5.2 Παρασκευή βακτηριακών αποθεμάτων γλυκερόλης	65
6.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρούς όγκους ('Mini prep')	65
7.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλους όγκους ('Maxi prep')	66
<i>Ενότητα Β: Κυτταρική καλλιέργεια</i>	68
8.2 Κυτταρικές σειρές και καλλιέργεια κυττάρων	68
9.2 Ανακαλλιέργεια κυττάρων	71
10.2 Διατήρηση κυττάρων σε υγρό άζωτο (κατάψυξη κυττάρων)	72
11.2 Απόψυξη και ανασύσταση κυττάρων	73
12.2 Επεξεργασία κυττάρων Jurkat με γενιστενίνη (Gen) ή δαΐζείνη (Dz)	74
13.2 Χορήγηση 2-μεθοξυοιστραδιόλης (2-ME) σε κύτταρα Jurkat	74
14.2 Καταμέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο (Neubauer Chamber)	75
15.2 Καμπύλες αύξησης των κυττάρων Jurkat	75
16.2 Ανάλυση των κυττάρων Jurkat με κυτταρομετρία ροής	75
<i>Ενότητα Γ: Απομόνωση και ανάλυση νουκλεϊκών οξέων</i>	76
17.2 Απομόνωση χαμηλού μοριακού βάρους γενωμικού DNA	76
18.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης	77
19.2 Κοπή πλασμιδίων με περιοριστικά ένζυμα	79
<i>Ενότητα Δ: Απομόνωση και ανάλυση πρωτεϊνών</i>	79
20.2. Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων για την ανάλυση πρωτεϊνών	79
21.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	80
22.2 Χρώση της πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου	83
23.2. Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσο-αποτύπωμα κατά Western	83
<i>Ενότητα Ε: Εισαγωγή γονιδίων σε κύτταρα θηλαστικών</i>	84
24.2 Ρετροϊκοί φορείς (Retroviral vectors)	84
25.2. Παραγωγή ρετροϊών με διαμόλυνση DNA	87

26.2	Επιμόλυνση των κυττάρων Jurkat με τους ρετροϊούς	88
3	ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	90
	<i>Ενότητα Α: Οι επιδράσεις της 2-μεθοξυοιστραδιόλης στην απόπτωση και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Jurkat: Ο ρόλος της Bcl-2</i>	90
1.3	Η 2-μεθοξυοιστραδιόλη επάγει απόπτωση στα κύτταρα Jurkat	90
2.3	Η Bcl-2 αναστέλλει την απόπτωση των κυττάρων Jurkat που επάγεται από τη 2-μεθοξυοιστραδιόλη	94
3.3	Η επίδραση της 2-μεθοξυοιστραδιόλης στην έκφραση των Bcl-2 και Bak	98
4.3	Η Bcl-2 επάγει τη διακοπή της αύξησης των Jurkat στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου μετά τη χορήγηση 2-μεθοξυοιστραδιόλης	100
5.3	Η διακοπή της αύξησης των Jurkat στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου συσχετίζεται με τη μεταβολή της έκφρασης των κυκλινο-εξαρτώμενων αναστολέων των κινασών, p21 ^{Waf1/Cip1/Sid1} και p27 ^{Kip1}	102
	<i>Ενότητα Β: Οι επιδράσεις των φυτο-οιστρογόνων ισοφλαβονοειδών, γενιστενίνης και δαϊζείνης, στον πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση των κυττάρων Jurkat: Ο ρόλος της Bcl-2</i>	104
6.3	Η γενιστενίνη είναι ισχυρότερος επαγωγέας της απόπτωσης των καρκινικών Τ-λεμφοκυττάρων Jurkat από τη δαϊζείνη	104
7.3	Η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 αναστέλλει την απόπτωση των κυττάρων Jurkat που επάγεται από τα ισοφλαβονοειδή, γενιστενίνη και δαϊζείνη	106
4	ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	108
	Μηχανισμός δράσης της 2-μεθοξυοιστραδιόλης σε καρκινικά κύτταρα σε σχέση με την κυτταρική αύξηση και επιβίωση	108
	Οι επιδράσεις των ισοφλαβονοειδών, γενιστενίνης και δαϊζείνης, σε καρκινικά κύτταρα	115
	Μελλοντικές ερευνητικές κατευθύνσεις	118
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ (της διδακτορικής διατριβής στην Ελληνική γλώσσα)	119
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ (της διδακτορικής διατριβής στην Αγγλική γλώσσα)	121
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	123

ΣΧΗΜΑΤΑ

Σελίδα

1	ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	16
1.1	Οι χημικές δομές των ισοφλαβονοειδών	18
2.1	Διάγραμμα ιστικής κατανομής των υποδοχέων οιστρογόνων, ERA και ERβ στον άνδρα και τη γυναίκα	21
3.1	Δομές των μεθυλιωμένων κατεχολικών μεταβολιτών της οιστραδιόλης και σχηματισμός της 2-μεθοξυοιστραδιόλης	31
4.1	Μοντέλο αναπαράστασης των επιδράσεων της 2-μεθοξυοιστραδιόλης στους κυτταρικούς μικροσωληνίσκους και στον HIF-1α σε καρκινικά κύτταρα	37
5.1	Τα μέλη της υπεροικογένειας του Bcl-2	45
6.1	Η δομή της ανθρώπινης κλαστρίνης/απολιποπρωτεΐνης J	54
2	ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	60
1.2	Ρετροϊκοί φορείς έκφρασης της κλαστρίνης/απολιποπρωτεΐνης J (ApoJ) και της Bcl-2	86
3	ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	90
1.3	Δοσο-εξαρτώμενη επαγωγή της απόπτωσης κυττάρων Jurkat από τη 2-ME	91
2.3	Χρονο-εξαρτώμενη επαγωγή της απόπτωσης κυττάρων Jurkat από τη 2-ME	91
3.3	Ανάλυση της 2-ME-επαγόμενης απόπτωσης των κυττάρων Jurkat με κυτταρομετρία ροής	93
4.3	Έκφραση της Bcl-2 στα επιμολυσμένα κύτταρα Jurkat και καμπύλες αύξησης	95
5.3	Ανάλυση της θραυσματοποίησης του DNA των φυσιολογικών και των επιμολυσμένων κυττάρων Jurkat μετά από χορήγηση 2-ME	96
6.3	Έκφραση της PARP σε φυσιολογικά και σε επιμολυσμένα κύτταρα Jurkat μετά από χορήγηση 2-ME	97
7.3	Έκφραση της Bcl-2 και Bak σε φυσιολογικά και σε επιμολυσμένα κύτταρα Jurkat μετά από χορήγηση 2-ME	99
8.3	Ανάλυση της 2-ME-επαγόμενης απόπτωσης των κυττάρων JurkatPuro και JurkatBcl-2 με κυτταρομετρία ροής	101

9.3	Έκφραση της p21 ^{Waf1/Cip1} και p27K ^{ip1} σε κύτταρα Jurkat, JurkatPuro και JurkatBcl-2 μετά από χορήγηση 2-ME	102
10.3	Επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων Jurkat από τη δαϊζείνη (Dz) και τη γενιστενίνη (Gen)	103
11.3	Η Επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων Jurkat από τη δαϊζείνη (Dz) αναστέλλεται από τη Bcl-2	106
12.3	Η επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων Jurkat από τη γενιστενίνη (Gen) αναστέλλεται από τη Bcl-2	107

Συντμήσεις

ApoJ: κλαστρίνη / απολιποπρωτεΐνη J

Cdk: (cyclin-dependent kinase), *κυκλινο*-εξαρτώμενη κινάση

COMT: *κατεχολο*-Ο-μεθυλομεταφοράση

DMEM: Dulbecco's modified Eagles medium

DMSO: διμέθυλο-σουλφοξείδιο

Dz: (Dizein) Δαϊζείνη

E₂: Οιστραδιόλη

ER: (EstroGen Receptors), οιστρογονικοί υποδοχείς

FCS: (Foetal Calf Serum), ορός εμβρύου βοός

Gen: (Genistein) Γενιστενίνη

h: (hour), ώρα

JNK: c-jun αμινοτελική κινάση

2-ME: 2-μεθοξυοιστραδιόλη

min: (minutes), λεπτά

Puro: φωσφομεταφοράση της πουρομυκίνης ή γονίδιο της πουρομυκίνης

PARP: πολύ ADP-ριβόσυλ-*πολυμεράση*

PBS: phosphate buffered saline

RPMI-1640:

wt: αγρίου-τύπου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή με τίτλο: *‘Μελέτη της επίδρασης φυτικών προϊόντων και μεταβολιτών οιστρογόνων στη φυσιολογία καρκινικών κυττάρων’*, πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα Κυτταρικής και Μοριακής Φυσιολογίας του Εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Η επιτυχής χημειοθεραπεία απαιτεί έναν ικανοποιητικό θεραπευτικό δείκτη που να αντανakλά τις επιδράσεις της θεραπείας στα κύτταρα-στόχους αλλά και την έλλειψη κλινικά σημαντικών παρενεργειών στον ασθενή. Στον καρκίνο, ο στόχος της χημειοθεραπείας είναι η επιλεκτική εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων. Ο μηχανισμός υπεύθυνος για τη φόνευση των καρκινικών κυττάρων είναι φανερό ότι *θα καθορίζει και την αποτελεσματικότητα της συγκεκριμένης χημειοθεραπείας*. Σε θεραπεύσιμες κακοήθειες με χημειοθεραπευτικά όπως είναι οι λευχαιμίες αλλά και άλλοι τύποι καρκίνων, η απόπτωση είναι ο κύριος, αν όχι ο μοναδικός, μηχανισμός που εμπλέκεται στη θεραπεία του καρκίνου. Όμως υπάρχει και μια ομάδα λευχαιμιών που είναι ανθεκτικές στα κλασσικά χημειοθεραπευτικά. Τα χημειοθεραπευτικά έχουν σημαντικές παρενέργειες στο ασθενή λόγω της τοξικότητάς τους.

Η 2-ME είναι ένας μη-τοξικός φυσιολογικός μεταβολίτης των ενδογενών οιστρογόνων κυρίως της 17β-οιστραδιόλης που απαντάται στο ανθρώπινο αίμα και στα ούρα. Σε αντίθεση με τα περισσότερα οιστρογόνα, η 2-ME έχει αντι-μιτωτική, αποπτωτική και αντι-αγγειογενετική δράση σε καρκινικά αλλά όχι σε φυσιολογικά κύτταρα και αυτές οι επιδράσεις της σε συνάρτηση με την απουσία τοξικότητας την καθιστούν έναν πολύ υποσχόμενο και αποτελεσματικό αντινεοπλασματικό παράγοντα. Η δυνατότητα της ως χημειοθεραπευτικός παράγοντας έχει αναφερθεί *in vitro* σε διάφορες καρκινικές σειρές αλλά και *in vivo* τόσο σε ζωικά μοντέλα καρκίνου του μαστού, του πνεύμονα και του παγκρέατος, όσο και σε κλινικές δοκιμές σε μεταστατικούς καρκίνους μαστού και προστάτη χωρίς σημαντικές παρενέργειες. Παρ’ όλες τις *in vitro* και *in vivo* μελέτες και τις επιδράσεις της στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, οι ακριβείς μηχανισμοί δράσης της 2-ME δεν έχουν αποσαφηνιστεί. Καθίσταται επομένως προφανές ότι η ανάπτυξη χημειοθεραπευτικών φαρμάκων 2-μεθοξυοιστραδιόλης θα πρέπει να συνοδεύεται και

από την κατανόηση των μηχανισμών δράσης της ώστε να δύναται να χρησιμοποιηθεί σε συνάρτηση και με άλλα χημειοθεραπευτικά για τη θεραπεία διαφόρων τύπων και μορφών καρκίνου. Η κατανόηση της ενεργοποίησης της πορείας μεταγωγής σήματος από τη 2-ME που οδηγεί στη μεταβολή της έκφρασης/σταθερότητας πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης θα συμβάλλει στην αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης της. Η δράση των ισοφλαβονοειδών όπως γενιστενίνη και δαϊζείνη, έχουν μελετηθεί σε ποικίλες και διαφορετικές ανθρώπινες καρκινικές σειρές αλλά όχι σε λευχαιμικές. Μια πρωτεΐνη που αποτελεί στόχο των περισσότερων χημειοθεραπευτικών αλλά και ισοφλαβονοειδών με οιστρογόνο δράση είναι η τοποϊσομεράση-II, ενώ πρωτεΐνες που αυξάνουν την κυτταρική επιβίωση καρκινικών λεμφοκυττάρων αλλά και άλλων αιματολογικών κακοηθειών είναι το Bcl-2.

Ο μηχανισμός δράσης της 2-μεθοξυοιστραδιόλης και των ισοφλαβονοειδών, γενιστενίνης και δαϊζείνης καθώς επίσης και ο ρόλος της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, αποτέλεσαν το κεντρικό σημείο της παρούσας διδακτορικής διατριβής. IV,

Ο σχεδιασμός, η πραγματοποίηση και η ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα ήταν αδύνατη χωρίς την αμέριστη βοήθεια ορισμένων εκλεκτών ακαδημαϊκών διδασκάλων από το Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. «;

Για την πολύτιμη βοήθειά τους, ευχαριστώ ιδιαίτερα τους κ. Άγγελο Ευαγγέλου, Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων ο οποίος ως επιβλέπων στάθηκε από την αρχή μέχρι το τέλος δάσκαλος και συμπαραστάτης προσφέροντας την πολύτιμη εμπειρία και τις γνώσεις του δίνοντας πάντα τις ενδεδειγμένες λύσεις στα προβλήματα που παρουσιάστηκαν. Τον κ. Ευάγγελο Κωλέττα, Επίκουρο καθηγητή Φυσιολογίας (με έμφαση στη Μοριακή Φυσιολογία) της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την αμέριστη και αδελφική συμπαράσταση, την καθοδήγηση στον πειραματικό σχεδιασμό και την ανάλυση των ερευνητικών αποτελεσμάτων, την επιστημονική και ηθική ενίσχυση που με βοήθησαν στην κατανόηση εννοιών απαραίτητων για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Επίσης για τον εμπλουτισμό των γνώσεων μου στις μοριακές τεχνικές με την πολύτιμη εμπειρία του. Την κ. Βίκυ Καλφακάκου Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων η οποία στάθηκε δίπλα μου συνεχώς με την χαρακτηριστική ζεστασιά που τη διακρίνει και για την

ηθική και επιστημονική υποστήριξη της. Θεωρώ υποχρέωση να ευχαριστήσω ακόμη τους μεταπτυχιακούς φοιτητές, ιδιαίτερα τους κ. Ευάγγελο Κονταργύρη, υποψήφιο διδάκτορα στο Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας και την κ. Βιολέττα Τσαβδάρη, πτυχιούχο του ΠΣΕ 'Βιοχημεία' του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη βοήθεια τους, κυρίως στο πρακτικό μέρος, καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής μου, καθώς επίσης και τον κ. Ακη Δούλια, υποψήφιο διδάκτορα στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη βοήθεια του με την κυτταρομετρία ροής. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και όλα τα άλλα μέλη της Μονάδας Κυτταρικής και Μοριακής Φυσιολογίας του Εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων ογίας για την συνεργασία τους και την βοήθεια τους.

Τέλος εκφράζω επίσης τις ευχαριστίες μου στους καθηγητές για την τιμή που μου έκαναν να δεχθούν να συμμετάσχουν ως μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΕΝΟΤΗΤΑ Α: Φυτικά προϊόντα με οιστρογόνο δράση

1.1. Φυτο-οιστρογόνα

Πολλά και ουσιαστικά στοιχεία δείχνουν ότι διατροφές πλούσιες σε φυτικά τροφικά συστατικά μπορούν να εξηγήσουν την επιδημιολογική διαφορά πολλών ορμόνο-εξαρτώμενων ασθενειών που είναι μια σημαντική αιτία θνησιμότητας και νοσηρότητας στους δυτικούς πληθυσμούς. Όλο και περισσότερο γίνεται αντιληπτό και κατανοητό ότι τα φυτά περιέχουν πολλές φυτοπροστατευτικές ενώσεις. Οι λιγνίνες και τα ισοφλαβονοειδή αντιπροσωπεύουν δύο από τις κύριες κατηγορίες φυτο-οιστρογόνων τρέχοντος ενδιαφέροντος για την κλινική διατροφή. Αν και απαντώνται παντού στο φυτικό βασίλειο, αυτά τα βιοενεργά μη-θρεπτικά συστατικά βρίσκονται σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις σε λιναρόσπορους και τη σόγια και έχουν βρεθεί να εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα ορμονικών και μη-ορμονικών ενεργιοτήτων που συντελούν σε εύλογους μηχανισμούς για τα πιθανά οφέλη υγείας των διατροφών πλούσιων σε φυτο-οιστρογόνα. Τα αποτελέσματα από *in vitro* μελέτες και μελέτες σε ζώα παρέχουν τα πειστικά στοιχεία για τη δυνατότητα των φυτο-οιστρογόνων να επηρεάζουν ορμόνο-εξαρτώμενες καταστάσεις. Αν και η κλινική εφαρμογή των διατροφών πλούσιων σε αυτούς τους μίμους οιστρογόνου είναι στα σπάργανα, τα στοιχεία από τις προκαταρκτικές μελέτες δείχνουν τα ευεργετικά αποτελέσματα τους στην υγεία. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν το εκθετικά αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα φυτο-οιστρογόνα από μια προοπτική κλινικής διατροφής.

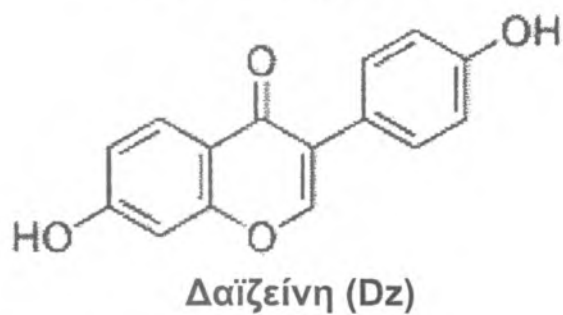
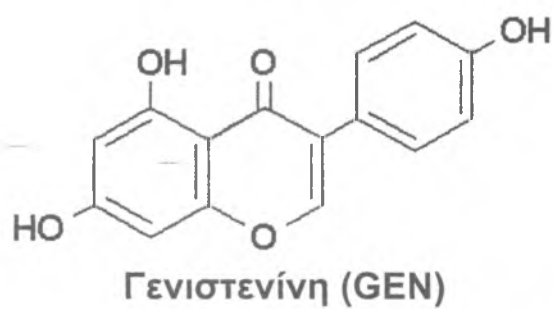
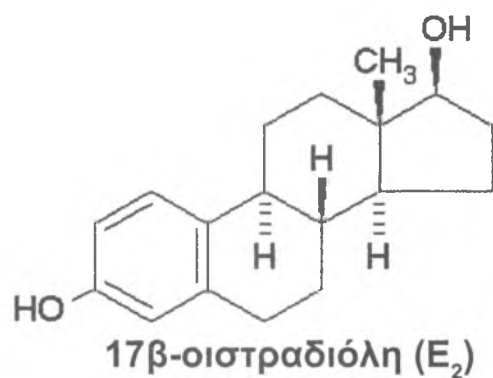
Τα φυτο-οιστρογόνα είναι μη-στεροειδείς ενώσεις που απαντούνται σε διάφορα διατροφικά φυτικά προϊόντα (Setchell and Cassidy, 1999). Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν λοιπόν η πρόσληψη τροφών πλούσιων σε φυτο-οιστρογόνα παρέχουν

προστασία από συγκεκριμένους ορμονο-εξαρτώμενους καρκίνους όπως ο καρκίνος του μαστού και του προστάτη (Setchell and Cassidy, 1999). Μολονότι οι βιολογικές δράσεις των φυτο-οιστρογόνων έχουν αποδειχθεί στον άνθρωπο και σε ζώα, ο μηχανισμός δράσης τους παραμένει εν πολλοίς άγνωστος.

2.1. Ισοφλαβονοειδή

Τα ισοφλαβονοειδή είναι φυσικές, φυτικές χημικές ουσίες που ανήκουν στην κατηγορία των "φυτο-οιστρογόνων". Θεωρούνται σήμερα ότι προσφέρουν την πιθανή εναλλακτική θεραπεία για μια σειρά ορμόνο-εξαρτώμενων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης, των καρδιαγγειακών ασθενειών και της οστεοπόρωσης. Τα πρόσφατα επιδημιολογικά και τα πειραματικά στοιχεία από τις *in vivo* μελέτες που έχουν ανασκοπηθεί πρόσφατα (Messina et al., 1994; Cassidy 1996; Knight and Eden 1996; Anderson and Gamet 1997; Murkies et al., 1998; Setchell 1995 και 1998) είναι ιδιαίτερα υποδηλωτικά των ευεργετικών αποτελεσμάτων των ισοφλαβονοειδών στην ανθρώπινη υγεία, αλλά τα κλινικά στοιχεία ενθαρρυντικά για τέτοια αποτελέσματα είναι είτε μη διαθέσιμα, είτε αναμένουν το σχέδιο και την εκτέλεση των κατάλληλων κλινικών μελετών μεγάλης κλίμακας. Εντούτοις, τα στοιχεία από τις περιορισμένες μικρές πειραματικές μελέτες είναι ελπιδοφόρα, και αυτό έχει κεντρίσει το τρέχον ενδιαφέρον για αυτήν την περιοχή.

Μεταξύ των σημαντικότερων ισοφλαβονοειδών φυτο-οιστρογόνων είναι η γενιστενίνη (Genistein; Gen) και η δαϊζείνη (Daidzein; dz) (Σχήμα 1.1).



Σχήμα 1.1. Οι χημικές δομές ισοφλαβονοειδών. Σύγκριση των χημικών δομών των ισοφλαβονοειδών γενιστενίνης (Genistein; GEN) και δαϊζείνης (Daidzein; Dz) με τη χημική δομή της 17β-οιστραδιόλης (E₂).

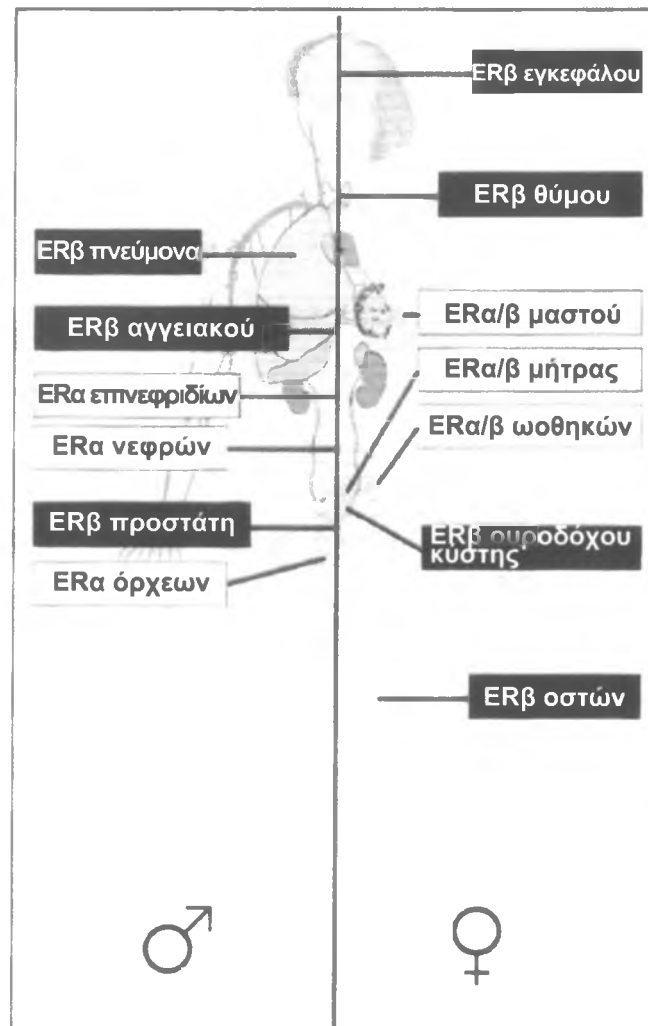
3.1. Βιολογικές δράσεις ισοφλαβονοειδών

Η χημική δομή των ισοφλαβονοειδών είναι παρόμοια με αυτή των οιστρογόνων των θηλαστικών (Setchell and Adlercreutz 1988). Ο φαινολικός δακτύλιος είναι το βασικό δομικό στοιχείο των περισσότερων ενώσεων που προσδένουν στους οιστρογονικούς υποδοχείς (Leclerq and Heuson 1979). Όταν οι δομές του ισοφλαβονοειδούς μεταβολίτη, εκουόλης (equol) και της οιστραδιόλης συγκρίνονται, τότε φαίνεται καθαρά η μεγάλη δομική και χημική συγγένεια και ουσιαστικά η απόσταση μεταξύ των ομάδων υδροξυλίου σε κάθε άκρο και των δύο μορίων είναι ουσιαστικά ίδια. Με βάση τη δομή και μόνον, δεν είναι παράξενο ότι τα ισοφλαβονοειδή προσδένουν στους οιστρογονικούς υποδοχείς (ER), εντούτοις δρουν περισσότερο ως μερικοί αγωνιστές και ανταγωνιστές των οιστρογόνων, μια έννοια που είναι δύσκολο να κατανοηθεί πλήρως, αλλά που συνεχίζει να συναρπάζει τους βιοχημικούς στεροειδών ορμονών και τους ενδοκρινολόγους (Jordan 1990; Mendelson 1996). Το θέμα περιπλέκεται περαιτέρω, καθώς τα οιστρογόνα εμφανίζουν μη-κλασσικές δράσεις ευδιάκριτες από τις κλασσικές δράσεις τους στο DNA, και ιδιαίτερα στη μεταγραφή (Brann et al., 1995), που περιλαμβάνουν επιδράσεις στις πλασματικές μεμβράνες και στις κυτταρικές πορείες μεταγωγής σήματος (Kim et al., 1998). Τι αυτό υπονοεί από μια κλινική προοπτική είναι ότι σε ορισμένες συγκεντρώσεις, που μπορούν να εξαρτηθούν από πολλούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων του αριθμού των οιστρογονικών υποδοχέων, την κατάληψη των οιστρογονικών υποδοχέων και τη δέσμευση τους καθώς επίσης και την ανταγωνιστική συγκέντρωση του οιστρογόνου, μπορούν να δρουν όχι ως μίμοι οιστρογόνου διεγείροντας την έναρξη των επιδράσεων των οιστρογόνων, αλλά ανταγωνιστές παρεμποδίζοντας τη δράση των οιστρογόνων. Αυτές οι δράσεις είναι επίσης και ιστο-ειδικές. Αυτό το φαινόμενο είναι ένα καλά-γνωστό χαρακτηριστικό της δράσης των στεροειδών, που έχει διεγείρει το ενδιαφέρον των φαρμακολόγων στην αναζήτηση νέων μορίων με εκλεκτική οιστρογονική δράση. Το πρόσφατα εγκεκριμένο φάρμακο, ραλοξιφένη (raloxifene), ένας εκλεκτικός ρυθμιστής των υποδοχέων οιστρογόνου είναι ένα παράδειγμα (Dodge et al., 1997).

Οι σχέσεις δομής - δράσης μπορούν να παρέχουν τις ενδείξεις για τη μοριακή ^{aκq} βάση αυτού του φαινομένου διέγερσης - ανταγωνισμού (Brzozowski et al., 1997), και η απουσία μιας λιπόφιλης περιοχής στα φυτο-οιστρογόνα μπορεί να επηρεάσει τη δέσμευση τους στους ER (Cunningham et al., 1997). Διαφορές στην ικανότητα των

η απουσία μιας λιπόφιλης περιοχής στα φυτο-οιστρογόνα μπορεί να επηρεάσει τη δέσμευση τους στους ER (Cunningham et al., 1997). Διαφορές στην ικανότητα των ισοφλαβονοειδών να δεσμεύονται στους ER, να επάγουν οιστρογόνο-εξαρτώμενα τελικά προϊόντα και να διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό πολλών οιστρογόνο-εξαρτώμενων ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών μαστού μπορούν να βοηθήσουν να εξηγηθεί αυτή η διαφορά στη βιολογική δράση των ισοφλαβονοειδών. Εντούτοις, η πρόβλεψη των αποτελεσμάτων των ισοφλαβονοειδών *in vivo* είναι δυσκολότερη επειδή ο τρόπος χορήγησης, η διαδρομή, η χημική μορφή του φυτο-οιστρογόνου, ο μεταβολισμός, η βιοδιαθεσιμότητα, η ημιζωή, ο χρόνος και το επίπεδο έκθεσης, η εγγενής οιστρογονική κατάσταση και οι μη-ορμονικές δευτερογενείς δράσεις των ισοφλαβονοειδών θα πρέπει επίσης να συνυπολογιστούν στο σχεδιασμό των κλινικών μελετών για τις επιδράσεις τους.

Η πρόσφατη ανακάλυψη ενός δεύτερου υποδοχέα οιστρογόνου περιπλέκει περαιτέρω την κατανόηση του μηχανισμού δράσης των ισοφλαβονοειδών (Kuiper et al., 1998). Η κλωνοποίηση ενός νέου μέλους της οικογένειας των πυρηνικών οιστρογονικών υποδοχέων, που ονομάστηκε ERβ (Kuiper et al., 1996) για να διαχωριστεί από τον "κλασσικό" υπότυπο ERα δείχνει ότι αυτοί οι δύο οιστρογονικοί υποδοχείς μπορεί να παίζουν διαφορετικούς ρόλους στη γονιδιακή ρύθμιση (Paech et al., 1997). Είναι κατανοητό ότι θα υπάρξουν επιπλέον υποδοχείς οιστρογόνων στο μέλλον, δεδομένου ότι υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός υποδοχέων γνωστοί ως 'ορφανοί' υποδοχείς (Willy and Mangelsdorf 1998) που έχουν αναγνωριστεί και αναμένεται ο χαρακτηρισμός προσδετών και της λειτουργίας τους. Η ιστική κατανομή (Σχήμα 2.1) και οι σχετικές δεσμευτικές συγγένειες των προσδετών του ERβ και του ERα διαφέρουν, και αυτό το εύρημα μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση της εκλεκτικής δράσης των οιστρογόνων σε διαφορετικούς ιστούς. Είναι συναρπαστικό ότι ο ERβ βρίσκεται στον εγκέφαλο, στα οστά, στην ουροδόχο κύστη και στους αγγειακούς επιθηλιακούς ιστούς (Kuiper et al., 1997; Paech et al., 1997), ιστοί που αποκρίνονται στην κλασσική θεραπεία αντικατάστασης ορμονών (HRT). Επιπλέον, η σχετική μοριακή συγγένεια δέσμευσης των διαφορετικών οιστρογονικών ενώσεων αποκαλύπτει ότι τα φυτο-οιστρογόνα και μερικά περιβαλλοντικά ξено-οιστρογόνα έχουν σημαντικά υψηλότερες τις συγγένειες για τον ERβ από ότι για τον ERα (Kuiper et al., 1997), δείχνοντας ότι αυτός ο νέος οιστρογονικός υποδοχέας μπορεί να είναι σημαντικός στη δράση των μη-στεροειδών οιστρογόνων.



Σχήμα 2.1. Διάγραμμα ιστικής κατανομής των υποδοχέων οιστρογόνων, ERα και ERβ στον άνδρα και τη γυναίκα.

4.1. Πηγές ισοφλαβονοειδών

Τα ισοφλαβονοειδή που θεωρούνται σημαντικά για την ανθρώπινη υγεία βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα όσπρια (Setchell et al., 1998). Η σόγια, ιδιαίτερα, παρέχει την αφθονότερη πηγή ισοφλαβονοειδών, και επομένως τα περισσότερα τρόφιμα σόγιας παρέχουν μια σημαντική διατροφική πηγή αυτών των βιοενεργών μη-θρεπτικών μορίων (Murphy 1982; Coward et al., 1993; Reinli and Block 1996).

Τα ισοφλαβονοειδή απαντούνται στα φυτά κυρίως ως γλυκοσίδια (ή γλυκοζίτες) και είναι συνεπώς ιδιαίτερα πολικές (υδατοδιαλυτές) ενώσεις (Walz 1931). Οι περιεκτικές αναλύσεις του ισοφλαβονοειδικού περιεχομένου πολλών τροφίμων σόγιας γενικά δείχνουν ότι τα περισσότερα περιέχουν 0,1 - 3,0 mg/g ολικών ισοφλαβονοειδών (Murphy 1982; Coward et al., 1993). Τα προϊόντα σόγιας που προέρχονται από σπόρους αποτελούν μια από τις πιο συγκεντρωμένες (> 20 mg/g) πηγές ισοφλαβονοειδών. Πολλά εμπορικά διαθέσιμα συμπληρώματα σόγιας, τα περισσότερα από τα οποία προέρχονται από συγκεντρωμένα εκχυλίσματα σόγιας είναι πλέον διαθέσιμα αντικαθιστώντας την ανάγκη διατροφικών ισοφλαβονοειδών. Τα κλινικά αποτελέσματα των συμπληρωμάτων ισοφλαβονοειδών πρέπει να αξιολογηθούν πλήρως καθώς υπάρχουν προφανή ερωτήματα σχετικά με τα ενδεχομένως δυσμενή αποτελέσματα που θα μπορούσαν να προκύψουν από με αυτές τις βιοενεργές ενώσεις (Setchell et al., 1998).

Αν και ένα μεγάλο μέρος των τροφίμων περιέχει προϊόντα σόγιας, αυτά είναι κυρίως σογιέλαια και λεκιθίνη σόγιας. Αυτά τα προϊόντα σόγιας δεν περιέχουν ισοφλαβονοειδή, και η μέση ημερήσια κατανάλωση ισοφλαβονοειδών από δυτικούς πληθυσμούς είναι τυπικά αμελητέα (< 1 mg/d). Αντίθετα, στην Κίνα και την Ιαπωνία που η διατροφή βασίζεται στη σόγια, η μέση ημερήσια κατανάλωση ισοφλαβονοειδών είναι υψηλή της τάξης των 20 - 50 mg/d (Nagata et al., 1998).

5.1. Απορρόφηση και μεταβολισμός ισοφλαβονοειδών

Η χημική μορφή με την οποία απαντούνται τα ισοφλαβονοειδή είναι σημαντική επειδή μπορεί να επηρεάσει τη βιολογική δράση, τη βιοδιαθεσιμότητα, και επομένως τα φυσιολογικά αποτελέσματα αυτών των διατροφικών συστατικών. Έχει δειχθεί εδώ και δύο δεκαετίες περίπου ότι η εντερική μικροχλωρίδα διαδραματίζει ένα βασικό ρόλο στο μεταβολισμό και τη βιοδιαθεσιμότητα και των λιγνίνων και των

ισοφλαβονοειδών (Setchell and Adlercreutz, 1998; Setchell and Cassidy, 1999). Μετά από την κατάποση, τα ισοφλαβονοειδή της σόγια υδρολύονται από τις εντερικές γλυκοσιδάσες (γλυκοζιτάσες), που απελευθερώνουν τις αγλυκόνες, δαϊζείνη (daidzein), γενιστενίνη (Genistein) και γλυκικεΐνη (glycitein). Αυτοί οι μεταβολίτες μπορούν να απορροφηθούν ή να μεταβολιστούν περαιτέρω σε πολλούς *συγκεκριμένους* μεταβολίτες όπως, εκουόλη και *p-αιθυλο-φαινόλη*. Η έκταση αυτού του μεταβολισμού εμφανίζεται να είναι ιδιαίτερα μεταβλητή μεταξύ ατόμων και επηρεάζεται από άλλα συστατικά της διατροφής. Το υψηλό περιβάλλον υδατανθράκων, που προκαλεί αυξανόμενη εντερική ζύμωση, οδηγεί σε πιο εκτενή βιομετασχηματισμό των φυτο-οιστρογόνων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό της εκουόλης, ένας μεταβολίτης της δαϊζείνης (daidzein) στα θηλαστικά. Αυτή η μεταβολική πορεία μπορεί να είναι κλινικά σχετική με την αποτελεσματικότητα των ισοφλαβονοειδών της σόγιας επειδή η οιστρογονική δράση της εκουόλης είναι μιας τάξης μεγαλύτερη από αυτή της πρόδρομου ενώσεως της δαϊζείνης (daidzein) (Setchell et al., 1998; Setchell and Cassidy, 1999).

Ο χρόνος ημιζωής της δαϊζείνης (daidzein) και της γενιστενίνης (Genistein) στο πλάσμα έχει καθορισθεί σε 7,9 ώρες στους ενήλικες, με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις 6 - 8 ώρες μετά τη χορήγηση (Setchell 1998). Συνεπώς, μια διατροφή πλούσια σε προϊόντα σόγιας θα οδηγήσει τελικά σε υψηλές συγκεντρώσεις δαϊζείνης (daidzein) και γενιστενίνης (Genistein) στο πλάσμα. Η γνώση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των ισοφλαβονοειδών των τροφίμων σόγιας (ή των συμπληρωμάτων) είναι σημαντική στη διαμόρφωση πρωτοκόλλων σχετικών με τη μακροπρόθεσμη αποτελεσματικότητα των ισοφλαβονοειδών σε κλινικές μελέτες (Safe 1995).

Σε ενήλικες που καταναλώνουν μέτριες ποσότητες τροφίμων σόγιας που περιέχουν ~50 mg/d ολικών ισοφλαβονοειδών, οι συγκεντρώσεις δαϊζείνης (daidzein), γενιστενίνης (Genistein) και εκουόλης (equol) στο πλάσμα φθάνουν τα 50-800 ng/ml. Αυτές οι τιμές είναι παρόμοιες με τις συγκεντρώσεις ισοφλαβονοειδών στο πλάσμα των Ιαπώνων που καταναλώνουν την παραδοσιακή διατροφή τους (Setchell et al., 1998; Setchell and Cassidy, 1999). Συνολικά, όταν καταναλώνονται τρόφιμα σόγιας σε τακτικά χρονικά διαστήματα, τα επίπεδα ισοφλαβονοειδών στο πλάσμα υπερβαίνουν κατά πολύ τις φυσιολογικές συγκεντρώσεις οιστραδιόλης στο πλάσμα, που στους άνδρες και στις γυναίκες κυμαίνονται γενικά μεταξύ 40 και 80 pg/ml. Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν στην υπόθεση ότι με τέτοιες διαφορές των ισοφλαβονοειδών και των οιστρογόνων στο πλάσμα, τα φυτο-οιστρογόνα θα

oto

μπορούσαν να επιφέρουν ορμονικές επιδράσεις (Setchell et al., 1998; Setchell and Cassidy, 1999). Αυτό δεν ήταν απρόσμενο καθώς υπάρχουν καλά καθιερωμένες μελέτες ορμονικών επιδράσεων, συνήθως επιβλαβείς, σε διάφορα ζωικά μοντέλα ως αποτέλεσμα της κατανάλωσης φυτο-οιστρογόνων (Setchell and Cassidy, 1999).

6.1. Κλινικές επιδράσεις των ισοφλαβονοειδών

Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για να χαρακτηρισθούν οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες των ισοφλαβονοειδών. Η βέλτιστη δόση των ισοφλαβονοειδών που απαιτείται για να έχει κλινικά αποτελέσματα στις περισσότερες ορμονο-εξαρτώμενες καταστάσεις θα πρέπει να διερευνηθεί. Τα αποτελέσματα από προηγούμενες μελέτες σε υγιείς γυναίκες προ-εμμηνόπαυσης δείχνουν ότι 50 mg/d αγλυκονών επαρκούν για να επιφέρουν σημαντικά ενδοκρινικές επιδράσεις, ενώ η μισή δόση από αυτή εμφανίζεται βιολογικά ανενεργός. Η δόση και η διάρκεια της χορήγησης θα είναι πιθανώς οι σημαντικότεροι παράγοντες που θα επηρεάζουν την κλινική και βιολογική έκβαση μιας διατροφής πλούσιας σε φυτο-οιστρογόνα (Setchell and Cassidy, 1999).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε ισοφλαβονοειδή όπως η γενιστενίνη, μπορεί να έχει προστατευτικές ιδιότητες στην εμφάνιση καρκίνου του μαστού και του προστάτη στον άνθρωπο (Setchell and Cassidy, 1999) αλλά και σε ζώα (Messina et al., 1994). Επίσης έχει δειχθεί ότι η γενιστενίνη έχει χημειοθεραπευτική αξία στην θεραπεία λευχαιμιών όταν η θεραπεία συνδυάζεται με αντισώματα ειδικά για τον τύπο της λευχαιμίας (Uckhun et al., 1995).

6.1α. Ισοφλαβονοειδή ως αντί-καρκινικοί παράγοντες στις γυναίκες

Ελεγχόμενες μελέτες σε γυναίκες προ-εμμηνόπαυσης παρέχουν τα άμεσα στοιχεία που δείχνουν ότι οι διατροφές πλούσιες σε φυτο-οιστρογόνα μπορούν να επιφέρουν οιστρογονικές επιδράσεις (Setchell and Cassidy, 1999).

Η περίοδος του εμμηνορροϊκού κύκλου, όπως τα επιδημιολογικά στοιχεία παρουσιάζουν, είναι ένας από τους παράγοντες κινδύνου για τον καρκίνο του μαστού, αλλά οι λόγοι για αυτήν την σχέση είναι ασαφείς. Το μέσο μήκος του εμμηνορροϊκού κύκλου στις δυτικές χώρες, όπου ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού είναι υψηλός, είναι 28-29 ημέρες, ενώ το μέσο μήκος του εμμηνορροϊκού

κύκλου στις Γιαπωνέζες είναι 32 ημέρες, για τις οποίες ο κίνδυνος για εμφάνιση καρκίνου του μαστού είναι τέσσερις με πέντε φορές μικρότερος. Στις Ασιάτισσες οι συγκεντρώσεις οιστρογόνων στο πλάσμα είναι 20-30% χαμηλότερες από εκείνες στις δυτικές γυναίκες (Key and Pike 1988; Shimizu et al., 1990), και η συνδυασμένη επίδραση του μεγαλύτερου εμμηνορροϊκού κύκλου με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις οιστρογόνου μεταφράζεται σε μια γενικά μικρότερη έκθεση στα οιστρογόνα κατά τη διάρκεια ζωής. Αν αυτός μπορεί να είναι ένας παράγοντας που εξηγεί το χαμηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού στις ασιάτισσες είναι μόνο θεωρητικός. Κρίσιμες μελέτες στις επιδράσεις των φυτο-οιστρογόνων στα επίπεδα και το μεταβολισμό των οιστρογόνων θα πρέπει να διεξαχθούν σε γυναίκες *προ*-εμμηνόπαυσης, αλλά το γεγονός ότι τα διατροφικά ισοφλαβονοειδή μπορούν να διαμορφώσουν την ενδοκρινική κατάσταση και να επηρεάσουν τον εμμηνορροϊκό κύκλο είναι ευνοϊκά όσον αφορά την πιθανή πρόληψη εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Με αυτό το σκεπτικό, είναι ενδιαφέρον το ότι το συνηθισμένο αντί-οιστρογόνο χημειοθεραπευτικό, ταμοξιφένη, η οποία έχει όμοιες επιδράσεις στον εμμηνορροϊκό κύκλο, χρησιμοποιείται ως φαρμακολογικός παράγοντας αντιμετώπισης του καρκίνου του μαστού στις γυναίκες σε ιδιαίτερα υψηλό κίνδυνο από αυτήν την ασθένεια (Powles 1997).

Οι συγκεντρώσεις των φυτο-οιστρογόνων στα ούρα και στο πλάσμα των των Ιαπώνων γυναικών που καταναλώνουν μια παραδοσιακή διατροφή είναι υψηλές όπως είναι και στους χορτοφάγους (Adlercreutz et al., 1991 και 1993a) και η εμφάνιση καρκίνων του μαστού, ενδομητρίου και ωοθηκών σε αυτές τις ομάδες είναι χαμηλή. Δείχθηκε εδώ και 15 έτη, ότι οι ασθενείς με καρκίνο του μαστού εξέκριναν χαμηλότερες ποσότητες φυτο-οιστρογόνων σε σύγκριση με άτομα της ίδιας ηλικίας που δεν είχαν καρκίνο του μαστού (Adlercreutz et al., 1982). Πιο πρόσφατα, μια ελεγχόμενη μελέτη επιβεβαίωσε την ιδέα ότι διατροφές πλούσιες σε φυτο-οιστρογόνα μπορούν να έχουν προστατευτικά οφέλη, δείχνοντας μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της εμφάνισης καρκίνου του μαστού και έκκρισης φυτο-οιστρογόνων στα ούρα (Messina et al., 1997; Setchell and Cassidy, 1999).

Παρά την πληθώρα των μελετών γύρω από την δυνητική ικανότητα των φυτο-οιστρογόνων στην πρόληψη του καρκίνου, λείπουν επαρκείς ενισχυτικές κλινικές μελέτες και στοιχεία αυτή τη στιγμή. Ενδεχόμενες μεγάλοι μεγέθους κλινικές μελέτες απαιτούνται για να αντιμετωπίσουν αυτό το ζήτημα επειδή τα επιδημιολογικά στοιχεία (reviewed in Messina et al., 1994) δεν είναι πειστικά. Αυτό συμβαίνει,

μερικώς επειδή αυτές οι επιδημιολογικές μελέτες δεν εξέτασαν αρχικά το ρόλο των φυτο-οιστρογόνων και της σχέσης τους με τον καρκίνο του μαστού. Έξι μελέτες εξέτασαν την κατανάλωση σόγιας και τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (βλέπε Setchell and Cassidy, 1999) και βρέθηκε μια σημαντική μείωση του κινδύνου στις τρεις από αυτές τις μελέτες. Είναι κατανοητό ότι η χαμηλή εμφάνιση των ορμονο-εξαρτώμενων καρκίνων στους πληθυσμούς που καταναλώνουν παραδοσιακές τροφές με βάση τη σόγια μπορεί να είναι περισσότερο συνάρτηση της έκθεσης στα φυτο-οιστρογόνα καθόλη τη διάρκεια της ζωής, ιδιαίτερα από τη νεαρή ηλικία (Setchell et al., 1997), και ότι αυτή η έκθεση μπορεί να προγραμματίζει προσαρμοστικές αποκρίσεις, μειώνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου αργότερα κατά τη διάρκεια της ζωής (Colditz and Frazier, 1995).

Σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση, τα επιδημιολογικά στοιχεία και η κλινική εμπειρία δείχνουν ότι η θεραπεία οιστρογόνων μετά την εμμηνόπαυση επιφέρει προστασία από καρδιαγγειακές παθήσεις, μειώνει το βαθμό της οστεοπόρωσης, βελτιώνει τη γνωστική λειτουργία και ανακουφίζει τα συμπτώματα της εμμηνόπαυσης που συνδέονται από οξεία απώλεια οιστρογόνων. Όμως επειδή υπάρχει φόβος πιθανού αυξανόμενου κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού, και λόγω των διάφορων παρενεργειών της ορμονοθεραπείας, επιδιώκεται συνεχώς η εξεύρεση εναλλακτικών πηγών εξωγενούς οιστρογόνου. Υποθετικά, τα ισοφλαβονοειδή της σόγιας μπορούν δυνητικά να παρέχουν μια εξωγενή πηγή οιστρογόνου, και η μείωση της εμφάνισης του καρκίνου του μαστού, της οστεοπόρωσης και των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης στις γυναίκες σε χώρες που καταναλώνουν σόγια στην παραδοσιακή τους διατροφή έχει αποδοθεί μερικώς στην κατανάλωση των ισοφλαβονοειδών (Breckwoldt et al., 1995; Setchell and Cassidy, 1999).

6.1β. Ισοφλαβονοειδή ως αντί-καρκινικοί παράγοντες στους άνδρες

Σήμερα υπάρχουν σχετικά ελάχιστες μελέτες που εξέτασαν τις επιδράσεις των φυτο-οιστρογόνων στους άνδρες. Φαίνεται ότι δεν υπάρχουν σαφείς διαφορές φύλου στη βιοδιαθεσιμότητα ή το μεταβολισμό των ισοφλαβονοειδών, και επομένως πολλά από τα πιθανά οφέλη που αποδίδονται στα φυτο-οιστρογόνα της διατροφής είναι πιθανώς εφαρμόσιμα και στους άνδρες.

Ο καρκίνος του προστάτη ανταποκρίνεται στη θεραπεία οιστρογόνων, και είναι γνωστό ότι η κατανάλωση φυτο-οιστρογόνων είναι υψηλότερη σε χώρες όπου τα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του προστάτη και άλλων ασθενειών σχετικών με την έκθεση σε οιστρογόνα (π.χ. ορχικοί καρκίνοι) είναι χαμηλά. Ανάλυση του πλάσματος και του προστατικού υγρού σε Ασιάτες, που έχουν έναν χαμηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη σε σχέση με Ευρωπαίους, έδειξε μια υψηλότερη συγκέντρωση των ισοφλαβονοειδών, εκουόλης (equol) και δαϊζείνης (daidzein), ενώ τα επίπεδα γενιστενίνης (Genistein) δεν μετρήθηκαν. Αυτά τα στοιχεία οδήγησαν συνεπώς στην υπόθεση ότι τα φυτο-οιστρογόνα της διατροφής μπορεί να παίζουν έναν ρόλο στη μείωση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη που είναι επίσης εμφανές από μερικές επιδημιολογικές μελέτες. Απουσία κλινικών στοιχείων, λεπτομερής υποστήριξη αυτού προέρχεται μόνο από μελέτες in vitro και σε ζώα (Barnes, 1995; Setchell and Cassidy, 1999).

7.1. Μελέτες in vitro και σε ζώα

Το ενδιαφέρον στα φυτο-οιστρογόνα ως φυσικούς αντικαρκινικούς παράγοντες διεγέρθηκε από μελέτες στα ζώα που χρησιμοποίησαν το κλασσικό ζωικό πρότυπο του χημικά προκληθέντος καρκίνου του μαστού. Σε αυτό το πρότυπο, πρωτεΐνη σόγιας πλούσια σε ισοφλαβονοειδή βρέθηκε να μειώνει σημαντικά το σχηματισμό όγκων με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (Barnes, 1995). Αυτή η επίδραση ήταν εντελώς απούσα στα ζώα διατρεφόμενα με πρωτεΐνη σόγιας απαλλαγμένη από ισοφλαβονοειδή.

Ο βαθμός και τα κρούσματα προστατίτιδας σε ένα πρότυπο μοντέλο προστατίτιδας αρουραίων ήταν μειωμένα στα ζώα που δόθηκε μια διατροφή πλούσια σε σόγια (Setchell and cassidy, 1999). Η φλεγμονή μπορεί να παίξει έναν βασικό ρόλο στο σχηματισμό όγκων ρόλου με μηχανισμούς στους οποίους εμπλέκονται η απελευθέρωση κυτταροκινών, ο σχηματισμός ελευθέρων ριζών με επακόλουθες βλάβες στο DNA, και μια μείωση στο βαθμό της φλεγμονής μπορεί γενικά να θεωρηθεί ωφέλιμη στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου. Επιπλέον μελέτες σε ένα πρότυπο μοντέλο αρουραίου έδειξαν ότι μια διατροφή πλούσια σε ισοφλαβονοειδή μείωσε την εμφάνιση του προστατικού καρκίνου και παράτεινε την περίοδο ελευθέρας νόσου κατά 27%. Εντούτοις, αυτά τα

αποτελέσματα παρατηρήθηκαν μόνο εάν η σόγια χορηγούνταν πριν από την επαγωγή του καρκίνου (Pollard and Luckert 1997). Νεογέννητα ποντίκια στα οποία χορηγούνταν διαιθυλο-στιλβεστρολή εμφάνισαν υπερπλασία και δυσπλασία στον προστάτη, μεταβολές οι οποίες αποτράπηκαν μερικώς με την προσθήκη ισοφλαβονοειδών σόγιας (Makela et al., 1995a). Εντούτοις σε ενήλικα αρσενικά ζώα, οι οιστρογονικές ή αντί-οιστρογονικές επιδράσεις της σόγιας δεν ήταν προφανείς (Makela et al., 1995b).

Αυτές οι μελέτες στα ζώα υποστηρίζονται από πολυάριθμες *in vitro* μελέτες που έδειξαν ότι η δαϊζείνη (daidzein) και η γενιστενίνη (Genistein) μπορούν να αναστείλουν την κυτταρική αύξηση (Adlercreutz 1995; Barnes 1995). Έχειδειχθεί ότι η γενιστενίνη (Genistein) και η βιοχανίνη Α (biochanin A) αναστέλλουν την αύξηση των κυττάρων του καρκίνου του προστάτη *in vitro*, ανεξάρτητα αν αυτές οι κυτταρικές σειρές ήταν ανδρογόνο- ή μη-ανδρογόνο-εξαρτώμενες (Peterson and Barnes, 1991 και 1993). Επίσης, η χορήγηση γενιστενίνης σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού έδειξε ότι αναστέλλει την κυτταρική τους αύξηση παρεμποδίζοντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2, επάγει την απόπτωση τους, αναστέλλει την έκφραση του πρωτο-ογκογονιδίου c-fos και την μεταγραφική ενεργότητα του AP-1 καθώς και τη φωσφορυλίωση της κινάσης ERK σε μερικές αλλά όχι σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Αν και αυτές οι επιδράσεις συνεισφέρουν στις ανασταλτικές ιδιότητες της γενιστενίνης δεν μπορούν να αποτελέσουν ένα γενικό μηχανισμό δράσης της γενιστενίνης (Dampier et al., 2001). Η γενιστενίνη αναστέλλει επίσης την αύξηση πολλών διαφορετικών καρκινικών σειρών *in vitro* όπως των λευχαιμικών κυτταρικών σειρών HL-60, MOLT-4 (Traganos et al., 1992) και Jurkat (Spinozzi et al., 1994), πνεύμονα (Lian et al., 1999), οισοφάγου, στομάχου και παχέος εντέρου (Yanagihara et al., 1993), λαιμού και τραχήλου (Alhasan et al., 1999), ήπατος (Mousavi and Adlercreutz, 1993), ουροδόχου κύστης (Theodorescu et al., 1998), μαστού (Peterson and Barnes, 1991; So et al., 1997) και προστάτη (Kyle et al., 1997; Peterson and Barnes, 1993).

Τα αποτελέσματα, εντούτοις, μπορεί να μην οφείλονται εξ ολοκλήρου στις ορμονικές δράσεις τους (Barnes and Peterson, 1995). Η γενιστενίνη (Genistein) μπορεί επίσης να επηρεάσει βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στην έκφραση γονιδίων στρες που ελέγχουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Zhou and Lee, 1998). Η γενιστενίνη (Genistein) φαίνεται επίσης ότι δρα σαν ένας ειδικός και αρκετά ισχυρός αναστολέας πολλών κινάσων τυροσίνης που

εμπλέκονται στη ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης (Akiyama et al., 1987; Martinez-Lorenzo et al., 2000). Επίσης η γενιστενίνη επάγει την ενεργοποίηση της c-jun αμινοτελικής κινάσης (Leung et al., 2000), μιας πρωτεΐνης που εμπλέκεται στη ρύθμιση της κυτταρικής απόπτωσης. Επίσης η γενιστενίνη (Genistein) έχει βρεθεί ότι αυξάνει την έκφραση του μετασχηματίζων αυξητικού παράγοντα β (TGFβ), ένας σημαντικός παράγοντας που παρεμποδίζει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Kim et al., 1998) και επομένως αναστέλλει την κυτταρική αύξηση. Οι αντι-πολλαπλασιαστικές επιδράσεις των φυτο-οιστρογόνων στα κύτταρα του καρκίνου του μαστού (reviewed in Adlercreutz 1995; Barnes 1995; Constantinou et al., 1998; Leung et al., 2000) μαζί με τα αναφερόμενα αντι-αγγειογενετικά αποτελέσματα, αν και χορηγούμενα σε υπερφυσιολογικές συγκεντρώσεις (Fotsis et al 1993; Jaggers et al., 1996), παρέχουν το περαιτέρω ερέθισμα για το ενδιαφέρον σε αυτές τις ενώσεις ως πιθανούς αντικαρκινικούς παράγοντες. Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η γενιστενίνη διεγείρει την κυτταρική αύξηση μερικών καρκινικών σειρών που φέρουν υποδοχείς οιστρογόνων, όπως αδενοκαρκινικές σειρές υπόφυσης (Stahl et al., 1998) και παγκρέατος (Lyn-Cook et al., 1999), όμως ο μηχανισμός διέγερσης της κυτταρικής αύξησης αυτών των κυτταρικών σειρών από τη γενιστενίνη δεν είναι κατανοητός.

In vitro, η γενιστενίνη (Genistein) έχει βρεθεί ότι αναστέλλει επίσης τη δράση της 5α-αναγωγάσης των στεροειδών και της 17β-υδροξυστεροειδούς αφυδρογονάσης στους ορχικούς δερματικούς ινοβλάστες (Evans et al., 1995;), δύο ενζύμων που εμπλέκονται στη σύνθεση των ανδρογόνων και των οιστρογόνων.

Όπως τα φλαβονοειδή, έτσι και τα ισοφλαβονοειδή έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία επιφέρει περαιτέρω πιθανές προστατευτικές ιδιότητες για τα φυτο-οιστρογόνα (Wei et al., 1995; Ruiz-Larrea et al., 1997).

Εντούτοις, υπάρχει ένας κίνδυνος στην προσπάθεια να δοθούν απλές εξηγήσεις για τα πολλά θετικά αποτελέσματα των φυτο-οιστρογόνων σε μελέτες με καρκινικές κυτταρικές σειρές σε έναν ενιαίο μηχανισμό δράσης τους. Είναι πιθανότερο ότι τα ευεργετικά αποτελέσματα αυτών των ενώσεων, ιδιαίτερα in vivo, να είναι το αποτέλεσμα πολλαπλών δράσεων που είναι κύριας και δευτερεύουσας φύσης.

ΕΝΟΤΗΤΑ Β: Μεταβολίτες οιστρογόνων

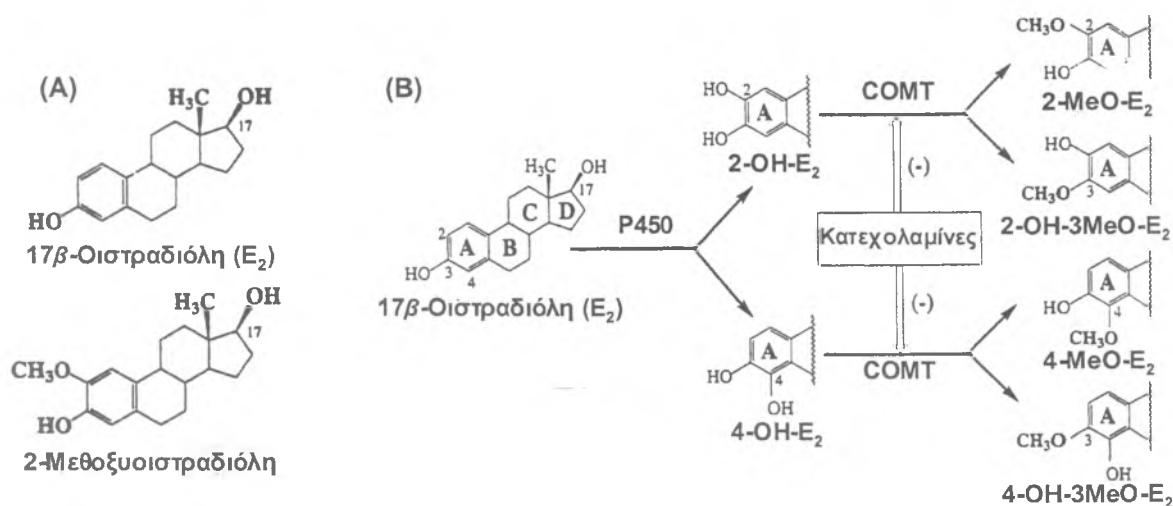
8.1. Προέλευση και σχηματισμός της 2-μεθοξυοιστραδιόλης

Η 2-μεθοξυοιστραδιόλη (2-ME) είναι ενδογενής μεταβολίτης της 17β-οιστραδιόλης. Είναι δηλαδή ένα κατεχολικό οιστρογόνο, που απαντάται στο ανθρώπινο αίμα και στα ούρα (Gelbke and Knuppen, 1976; Fotsis et al., 1994) (Σχήμα 3.1Α). Συγκεκριμένα η οιστραδιόλη μπορεί να υδροξυλιωθεί σε διάφορες θέσεις, από το NADPH-εξαρτώμενο κυτόχρωμα P450, το οποίο βρίσκεται στο ήπαρ, και σε άλλα κύτταρα στόχους εκτός του ήπατος. Τα χημικώς ενεργά κατεχολικά οιστρογόνα που προκύπτουν (2- ή 4-υδροξυοιστραδιόλη) μπορούν να Ο-μεθυλιωθούν σε μονομεθυλαιθέρες από την κατεχολο-Ο-μεθυλομεταφοράση (COMT) (Σχήμα 3.1Β).

Η κατεχολο-Ο-μεθυλομεταφοράση είναι ένα ένζυμο το οποίο συναντάται σε μεγάλες ποσότητες σε πολλά όργανα και κύτταρα, όπως συκώτι, νεφροί, εγκέφαλος, πλακούντας, μήτρα, αδένες του μαστού και τα μεγάλα ερυθρά αιμοσφαίρια (Zhu and Conney, 1998). Οι ποσότητες των μεθυλιωμένων μεταβολιτών των οιστρογόνων που παράγονται, όπως η 2-ME, είναι μεγάλες και αυτό οφείλεται στην ύπαρξη δραστητικής COMT σε πολλούς ιστούς θηλαστικών και στην πολύ γρήγορη Ο-μεθυλίωση των κατεχολικών οιστρογόνων, όπως έχει δείχθει in vivo και in vitro (Guldborg et al., 1975; Ball et al., 1980; Roy et al., 1990; Zhu et al., 1993; Zhu et al., 1994). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η 2-μεθοξυοιστραδιόλη έχει μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης στη σφαιρίνη του αίματος, η οποία δεσμεύει ορμόνες του φύλου, από ότι η οιστραδιόλη (Dunn, 1983), διότι ίσως αυτός είναι ένας επιπλέον σημαντικός παράγοντας, που συμβάλλει στα υψηλά επίπεδα κυκλοφορίας τους στο αίμα, μαζί με τον ταχύ σχηματισμό των μεθοξυοιστρογόνων.

Εύλογο είναι το ερώτημα γιατί τα ζώα και οι άνθρωποι συνθέτουν μεγάλες ποσότητες ορμονικά ανενεργών και ακόμη πιο λιπόφιλων οιστρογονικών μεταβολιτών, οι οποίοι πιθανόν να έχουν μεγαλύτερους χρόνους ημιζωής από ότι η οιστραδιόλη. Έρευνες σχετικά με την χημική δραστηριότητα και γονιδιοτοξικότητα των κατεχολικών οιστρογόνων οδήγησαν στο συμπέρασμα, ότι η Ο-μεθυλίωση ίσως να είναι μια πολύ γρήγορη πορεία απενεργοποίησης ή αποτοξίνωσης αυτών των κατεχολών, που προέρχονται από την οιστραδιόλη, όπως συμβαίνει και στις κατεχολαμίνες (Liehr et al., 1986; Liehr, 1990; Liehr et al., 1990; Han et al., 1994). Υπάρχουν, ωστόσο, αρκετές μελέτες, που αποδεικνύουν, ότι η 2-ME ίσως να μην

είναι απλά ένας ανενεργός μεταβολίτης της οιστραδιόλης, αλλά παρουσιάζει μοναδικές βιολογικές δράσεις, τις οποίες δεν συναντάμε στην οιστραδιόλη, 2-υδροξυ-οιστραδιόλη ή 4-μεθοξυοιστραδιόλη, όπως περιγράφεται πιο κάτω.



Σχήμα 3.1. Δομές των μεθυλιωμένων κατεχολικών μεταβολιτών της οιστραδιόλης και σχηματισμός της 2-μεθοξυοιστραδιόλης. (Α) Δομή της 17β-Οιστραδιόλης (E_2) και δομή της 2-μεθοξυοιστραδιόλης. **(Β)** Δομές των μονομεθυλιωμένων κατεχολικών μεταβολιτών της οιστραδιόλης. Η οιστραδιόλη υδροξυλιώνεται προς κατεχόλες (2- και 4- υδροξυοιστραδιόλη) κυρίως από το κυτόχρωμα P450. Αυτές οι κατεχόλες μπορούν να μεθυλιωθούν στο οξυγόνο της θέσης 2 από το ένζυμο κατεχόλο-O-μεθυλομεταφοράση (COMT), προς σχηματισμό μεταβολιτών μονο-μεθοξυοιστραδιόλης. Η 2-μεθοξυοιστραδιόλη και η 4-μεθοξυοιστραδιόλη είναι από τα πιο σημαντικά μεθυλιωμένα ισομερή, που σχηματίζονται από τις αντίστοιχες κατεχόλες. Λόγω του ότι το COMT καταλύει τον μεταβολισμό διαφόρων ενδογενών και εξωγενών κατεχόλων, η ενζυμική O-μεθυλίωση της οιστραδιόλης μπορεί να ρυθμιστεί από μη-οιστρογονικές κατεχόλες, όπως υδροξυλιωμένα φλαβονοειδή, κατεχολαμίνες και άλλα, κυτόχρωμα P450. 2-OH- E_2 , 2-υδροξυοιστραδιόλη; 4-OH- E_2 , 4-υδροξυοιστραδιόλη; 2-MeO- E_2 , 2-μεθοξυοιστραδιόλη; 2-OH-3-MeO- E_2 , 2-υδροξυοιστραδιόλη-3-μεθυλαιθέρας; 4-MeO- E_2 , 4-μεθοξυοιστραδιόλη; 4-OH-MeO- E_2 , 4-υδροξυοιστραδιόλη-3-μεθυλαιθέρας.

9.1. Δράση της 2-μεθοξυοιστραδιόλης

Γενικά, η 2-μεθοξυοιστραδιόλη (2-ME) δρα ανεξάρτητα από τους οιστρογονικούς υποδοχείς α (ER α) και β (ER β), αναστέλλει την αγγειογένεση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και επάγει απόπτωση *in vitro* και *in vivo* (Fotsis et al., 1994; Klauber et al., 1997; Yue et al., 1997; Zhu and Conney, 1998; Pribluda et al., 2000; La Vallee et al., 2002; Bu et al., 2002; Mabjeesh et al., 2003). Ειδικότερα, όταν η 2-ME βρίσκεται σε δόσεις, κατά τις οποίες η οιστραδιόλη E₂ και άλλοι μεταβολίτες της είναι ενεργοί, δεν επάγει δράσεις που σχετίζονται με οιστρογόνα (Martucci, 1979; Rajan, 1984). Επιπλέον, η 2-ME δεν επάγει την ανάπτυξη όγκων, που σχηματίζονται εξαιτίας των οιστρογόνων (Liehr, 1986). Τα παραπάνω στοιχεία συμφωνούν με το γεγονός ότι η 2-ME έχει χαμηλή συγγένεια για τον οιστρογονικό υποδοχέα ER α , σε σχέση με την οιστραδιόλη, και ακόμη χαμηλότερη συγγένεια για τον ER β , όπως έχει δείχθει πρόσφατα (La Vallee et al., 2002). Από την ίδια έρευνα προέκυψε ότι η 2-ME δεν παρουσιάζει την ικανότητα να προσδένεται ως αγωνιστής στους υποδοχείς οιστρογόνων ER και ότι η ανασταλτική δράση της 2-ME ως προς τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων, δεν απαιτεί έκφραση των ER και δεν επηρεάζεται από ανταγωνιστές ή αγωνιστές των ER. Η 2-ME, επομένως, παρουσιάζει αντί-αυξητική (αντι-μιτωτική) δράση, ανεξάρτητα από το αν τα κύτταρα ανταποκρίνονται στα οιστρογόνα και από την κατάσταση λειτουργίας των ER (La Vallee et al., 2002).

Η 2-ME εμφανίζει επίσης μια ισχυρή ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων αιμοφόρων αγγείων και επομένως αναστέλλει την αγγειογένεση (Fotsis et al., 1994; Mabjeesh et al., 2003). Γενικά, ο σχηματισμός αιμοφόρων αγγείων, δηλαδή η αγγειογένεση, αποτελεί απαραίτητο στοιχείο για την αύξηση όγκων. Πρόσθετες μελέτες έδειξαν ότι η 2-ME επάγει απόπτωση σε αρτηριακά ενδοθηλιακά κύτταρα, κατά ένα χρόνο- και δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, καθώς και ότι αναστέλλει τη μετανάστευση αυτών των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro* (Yue et al., 1997). Επιπλέον, η χορήγηση αυτού του μεταβολίτη της οιστραδιόλης σε ζώα αναστέλλει την αγγειογένεση στερεών όγκων και καταστέλλει την αύξηση τους *in vivo* (Fotsis et al., 1994; Klauber et al., 1997; Yue et al., 1997). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η 2-ME είναι ο πιο ισχυρός μη πρωτεϊνικός αναστολέας της αγγειογένεσης *in vitro* και η αντι-αγγειογενετική της δράση είναι εξαιρετικά εξειδικευμένη και δεν εμφανίζεται σε άλλα δομικά ανάλογα της (Fotsis et

al., 1994). Η ισχυρή αντι-αγγειογενετική δράση της 2-ME καθώς και έντονη κυτταροστατική δράση της στην ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων στην καλλιέργεια, συνεισφέρουν στις ανασταλτικές ιδιότητες της 2-ME στην αύξηση όγκων σε πειραματόζωα (Fotsis et al., 1994; Klauber et al., 1997).

Μελέτες έδειξαν ότι η 2-ME αναστέλλει την ανάπτυξη και επάγει την απόπτωση πολλών ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών *in vitro*, όπως τα ανθρώπινα MCF-7 κύτταρα του καρκίνου του μαστού (Lottering et al., 1992; Zoubine et al., 1999; La Vallee et al., 2002), κύτταρα SH-EP νευροβλαστώματος, A204 ραβδομυοσαρκώματος και Y-79 ρετινοβλαστώματος (Fotsis et al., 1994). Όμοιες δράσεις εμφανίζει σε λευχαιμικές κυτταρικές σειρές (Attala et al., 1996; Attala et al., 1998; Huang et al., 2000), σε κυτταρικές σειρές του καρκίνου του πνεύμονα (Mukhopadhyay and Roth, 1997; Mukhopadhyay and Roth, 1998), γαστρικού καρκινώματος (Lin et al., 2001), του παχέος εντέρου (Carothers et al., 2002), του παγκρέατος (Schumacher et al., 1999; Qanungo et al., 2002), του προστάτη (Qadan et al., 2001; Kumar et al., 2001; Bu et al., 2002; Basu et al., 2003; Shimada et al., 2003), καθώς και σε κυτταρικές σειρές μυελοβλαστώματος (Dingli et al., 2002; Chauhan et al., 2002), αστροκυτώματος/ γλοιοβλαστώματος (Kumar et al., 2003) και ανθρώπινου μελανώματος (Ghosh et al., 2003). Η 2-ME δεν αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και δεν επάγει την απόπτωση φυσιολογικών κυττάρων, όπως ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα (Mukhopadhyay and Roth, 1997), προστάτη (Kumar et al., 2001) και μαστού (Bu et al., 2001), ινοβλαστών δέρματος (Seegers et al., 1997), λεμφοκυττάρων (Huang et al., 2000) και μελανοκυττάρων (Ghosh et al., 2003).

10.1. Αντι-μιτωτικοί μηχανισμοί της 2-μεθοξυοιστραδιόλης

Οι αντι-μιτωτικές δράσεις της 2-ME δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως και αυτό αποτελεί πρόκληση για διεξαγωγή ολοένα και περισσότερων ερευνών, από όπου προκύπτουν νέα και διαφορετικά αποτελέσματα (Mooberg, 2003a and 2003b). Όπως έχει ήδη περιγραφεί, ένας από τους μηχανισμούς της 2-ME που σταματούν την μίτωση, είναι η αναστολή του πολυμερισμού της σωληνίνης (τουμπουλίνης). Συγκεκριμένα, η 2-ME αλληλεπιδρά με την θέση πρόσδεσης της κολχικίνης πάνω στην β-σωληνίνη και λειτουργώντας με τον τρόπο αυτό ως αντι-μικροσωληνισκικός

παράγοντας, επάγει την διακοπή της μίτωσης κατά τη μετάφαση (D'Amato et al., 1994). Αντίθετα μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι σε συγκεντρώσεις κατά τις οποίες η 2-ME αναστέλλει αποτελεσματικά την μίτωση των κυττάρων, δεν παρατηρείται αναστολή του πολυμερισμού της σωληνίνης. Ειδικότερα, η χορήγηση 2-ME σε κύτταρα Jurkat προκάλεσε τη διακοπή της μίτωσης στην G2/M φάση του κυτταρικού κύκλου, όμως τα χρωμοσώματα των κυττάρων παρέμειναν παραταγμένα στον ισημερινό της ατράκτου, δηλώνοντας ενδεχόμενη λειτουργική βλάβη της δυναμικής της μιτωτικής ατράκτου από την 2-ME. Η διακοπή της αύξησης των κυττάρων στη G2/M φάση από την 2-ME συνοδεύτηκε από την αύξηση των επιπέδων της κυκλίνης B και της δραστικότητας της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης, cdc2 (Attala et al., 1996).

Περαιτέρω έρευνες έδειξαν ότι η χορήγηση 2-ME οδηγεί στη διακοπή της αύξησης στη G2/M φάση του κυτταρικού κύκλου διαφόρων καρκινικών κυττάρων, όπως μετασχηματισμένων ανθρώπινων ινοβλαστών (Seegers et al., 1997), κυττάρων του καρκίνου του προστάτη (Kumar et al., 2001; Qadan et al., 2001), κυττάρων γαστρικού καρκινώματος (Lin et al., 2001), πολλαπλού μυελώματος (Dingli et al., 2002), μελανώματος (Ghosh et al., 2003) και κυττάρων μυελοβλαστώματος (Kumar et al., 2003). Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη G2/M φάση χαρακτηρίστηκε από την επαγωγή της αύξησης των επιπέδων της κυκλίνης B και της έκφρασης και φωσφορυλίωσης της cdc2 κινάσης (Kumar et al., 2001; Ghosh et al., 2003), αν και στα κύτταρα του μυελοβλαστώματος δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στην έκφραση της κυκλίνης B και της cdc2 κινάσης (Kumar et al., 2003). Απεναντίας η επίδραση της 2-ME στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου δεν παρουσιάζει τα ίδια χαρακτηριστικά για τα καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος και του μαστού. Στα κύτταρα του καρκίνου του παγκρέατος η χορήγηση 2-ME οδηγεί στην επιμήκυνση (παράταση) της S-φάσης (Schumacher et al., 1999), ενώ στα κύτταρα του καρκίνου του μαστού η 2-ME προκαλεί τη συσσώρευση των κυττάρων στην G1 φάση (Schumacher and Neuhaus, 2001). Η 2-ME προκάλεσε επίσης τη διακοπή της κυτταρικής αύξησης οστεοσαρκωματικών κυττάρων στις G1/S και G2/M φάσεις του κυτταρικού κύκλου όταν χορηγήθηκε σε χαμηλές και υψηλές δόσεις, αντίστοιχα (Golebiewska et al., 2002) καθώς επίσης και σε παγκρεατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές (Qanungo et al., 2002). Επιπροσθέτως, έχει δειχθεί ότι η 2-ME προκαλεί αναστολή της αύξησης και επάγει την απόπτωση ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών πνεύμονα (Mukhopadhyay and Roth, 1997) και προστάτη (Bu et

al., 2002), χωρίς να επηρεάζει την πορεία του κυτταρικού κύκλου τους. Τα παραπάνω στοιχεία μαρτυρούν ότι η 2-ME ακολουθεί ποικίλους μηχανισμούς αναστολής του πολλαπλασιασμού διαφόρων καρκινικών κυττάρων *in vitro*, επάγοντας τη διακοπή της αύξησης στις G1/S και G2/M φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

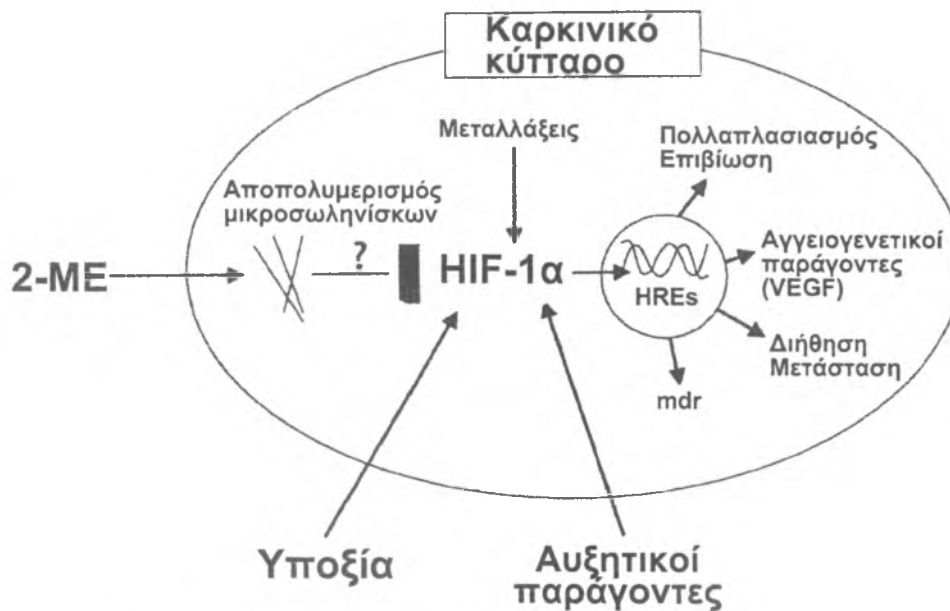
Πρόσφατες, όμως μελέτες έδειξαν ότι η διάσπαση των μικροσωληνίσκων του κυτταροσκελετού από τη 2-ME οδήγησε στη μειορρύθμιση του επαγόμενου παράγοντα-1 από υποξία (HIF-1; Hypoxia-inducible factor-1) και επομένως στην αναστολή της έκφρασης του αγγειακού αυξητικού παράγοντα, VEGF με αποτέλεσμα την αναστολή της αγγειογένεσης (Mabjeesh et al., 2003).

Οι αγγειογενείς ανασταλτικοί παράγοντες μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο *sub* ευδιάκριτες ομάδες, τους άμεσους και έμμεσους ανασταλτικούς παράγοντες (Kerbel και Folkman, 2002). Τα πρώτα στοχεύουν το ενδοθήλιο, ενώ οι δεύτεροι αγγειογενείς παράγοντες παράγονται από όγκους. Η 2-ME ταξινομήθηκε αρχικά ως άμεσος ανασταλτικός παράγοντας λόγω των αντι-πολλαπλασιαστικών και προ-αποπτωτικών αποτελεσμάτων σε ενεργά πολλαπλασιαζόμενα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα πρόσφατα στοιχεία έδειξαν ότι η 2-ME επιφέρει έμμεσα αντι-αγγειογενετικά αποτελέσματα μέσω της παρεμπόδισης της έκφρασης του HIF-1α σε καρκινικά και ενδοθηλιακά κύτταρα (Mabjeesh et al., 2003). Ο HIF-1 είναι ένας προ-αγγειογενετικός παράγοντας μεταγραφής που αλληλεπιδρά με τα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (Hypoxia response elements; HREs) για να διεγείρει τη μεταγραφή πολλών προ-αγγειογενετικών πρωτεϊνών και ειδικότερα του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (vascular endothelial growth factor; VEGF). Εκτός από τα προ-αποπτωτικά γονίδια, τα γονίδια-στόχοι του HIF-1 περιλαμβάνουν επίσης γονίδια που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στην κυτταρική επιβίωση, στην διήθηση και την ανθεκτικότητα σε φάρμακα. Λόγω του ρόλου του σε διάφορα βασικά στάδια της προόδου του καρκίνου, ο HIF-1 είναι ένας ελκυστικός μοριακός στόχος για τη θεραπεία του καρκίνου (Semenza, 2003).

Ο HIF-1 είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από τις υπομονάδες α και β. Η υπομονάδα β εκφράζεται συνεχώς, ενώ η έκφραση της υπομονάδας α ελεγχόμενη. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου ο HIF-1α αποικοδομείται γρήγορα από το πρωτεόσωμα και κατά τη διάρκεια υποξίας η πρωτεΐνη σταθεροποιείται. Ο HIF-2α ρυθμίζεται ομοίως και προκαλεί επίσης τη μεταγραφή των HREs αλλά με διαφορετική επιλεκτικότητα (Semenza, 2003). Σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων,

η έκφραση του HIF-1 μπορεί επίσης να διεγερθεί από αυξητικούς παράγοντες και γενετικές αλλαγές (Semenza, 2003). Σε αρκετούς αλλά όχι σε όλους τους καρκίνους, η αύξηση του HIF-1α συνδέεται με την αύξηση της θνησιμότητας (Semenza, 2003), επικυρώνοντας αυτήν την βασική πρωτεΐνη ως ελπιδοφόρο θεραπευτικό στόχο.

Πρόσφατα δείχθηκε ότι η 2-ME καταστέλλει την έκφραση των HIF-1α και HIF-2α σε καρκινικές κυτταρικές σειρές (Mabjeesh et al., 2003). Οι επιδράσεις της 2-ME ήταν δοδο-εξαρτώμενες και εμφανίζονται στα κύτταρα που εκτίθενται σε φυσιολογικές συνθήκες και σε συνθήκες υποξίας. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες, η 2-ME δεν μεταβάλλει την έκφραση του HIF-1β. Η μείωση των κυτταρικών επιπέδων του HIF-1α από την 2-ME οδηγούν στην παρεμπόδιση της μετατόπισης του στον πυρήνα, την καταστολή της μεταγραφής του VEGF και στη μείωση της έκκρισης του VEGF. Πάνω από 60 γονίδια έχουν προσδιοριστεί ως γονίδια-στόχοι του HIF-1 (Semenza, 2003) και μολονότι οι επιδράσεις της 2-ME στην έκφραση του VEGF έχουν επιβεβαιωθεί, η επίδραση της 2-ME στον HIF-1α αναμένεται να καταστείλει τη μεταγραφή πολυάριθμων άλλων προ-αγγειογενετικών γονιδίων (Σχήμα 4.1). Τα γονίδια που μπορούν να επηρεασθούν μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο (Semenza, 2003). Η 2-ME δεν καταστέλλει τη μεταγραφή του HIF-1α ή τη σταθερότητα της πρωτεΐνης αλλά μάλλον εμφανίζεται να δρα κατασταλτικά στο επίπεδο μετάφρασης (Mabjeesh et al., 2003). Οι επιδράσεις της 2-ME στον HIF-1α δεν περιορίζονται στα κύτταρα καρκίνου. Κάτω από συνθήκες υποξίας η 2-ME μειορρυθμίζει επίσης τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλικών φλεβών (human umbilical vein endothelial cells; HUVEC). Κατά συνέπεια, η 2-ME όχι μόνο αναστέλλει άμεσα τον πολλαπλασιασμό ενδοθηλιακών και καρκινικών κυττάρων που οδηγεί στην απόπτωση τους αλλά καταστέλλει επίσης τη μεταγραφική ενεργοποίηση των HREs από τον HIF-1 τα οποία συνδέονται άμεσα με την αγγειογένεση, τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη μετάσταση.



Σχήμα 4.1. Μοντέλο αναπαράστασης των επιδράσεων της 2-ME στους κυτταρικούς μικροσωληνίσκους και στον HIF-1α σε καρκινικά κύτταρα. Ο έλεγχος της ενεργότητας του HIF-1 διατηρείται λόγω της γρήγορης αποικοδόμησης του HIF-1α. Τα κυτταρικά επίπεδα του HIF-1α αυξάνονται κατά τη διάρκεια υποξίας και σε μερικά κύτταρα ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες και μεταλλάξεων. Η 2-ME παρεμποδίζει την κυτταρική συσσώρευση του HIF-1α και φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες υποξίας. Η καταστολή των επιπέδων του HIF-1α μειώνει τη δυνατότητα μετατόπισης του στον πυρήνα και οδηγεί στην αναστολή της μεταγραφής γονιδίων με HRE. Το Η 2-ME καταστέλλει τη μεταγραφή και την έκκριση του VEGF και δεν είναι αδικαιολόγητο να υποτεθεί ότι και άλλα γονίδια με HREs επίσης μειορρυθμίζονται. Οι επιδράσεις της 2-ME στον HIF-1α συσχετίζονται με τις επιδράσεις της στον αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων.

Σημαντικές μηχανιστικές μελέτες συνδέουν τη δυνατότητα της 2-ME να αναστείλει τον HIF-1α με τις επιδράσεις της στον απόπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων (Mabjeesh et al., 2003). Αυτή η σύνδεση παρέχει ένα μηχανισμό, επειδή οι αντί-μιτωτικές επιδράσεις ήταν ο πρώτος μηχανισμός που εμπλέχτηκε στις αντί-πολλαπλασιαστικές δράσεις της 2-ME (Seegers et al., 1989). Οι επιδράσεις της 2-ME στη διάσπαση των μικροσωληνίσκων και την καταστολή του HIF-1α δεν είναι μοναδικές. Η ταξόλη και η βινκριστίνη (vincristine) προκαλούν παρόμοια αποτελέσματα (Mabjeesh et al., 2003) και αυτά τα στοιχεία είναι σύμφωνα με τις αναφερόμενες αντί-αγγειογενετικές επιδράσεις των σταθεροποιητών και των αποσταθεροποιητών των μικροσωληνίσκων (Miller et al., 2001). Η καταστολή του HIF-1α συμπίπτει με τη διάσπαση των μικροσωληνίσκων, είτε με τη σταθεροποίηση ή με τον αποπολυμερισμό, και δεν είναι μόνο επακόλουθο της μιτωτικής

συσσώρευσης. Ο αναστολέας της μιτωτικής κινεσίνης (kinesin), μοναστρόλη (monastrol), που προάγει τη διακοπή της μίτωσης χωρίς να αλληλεπιδρά με τους μικροσωληνίσκους; δεν καταστέλλει τον HIF-1α (Mabjeesh et al., 2003). Κυτταρικές σειρές με μεταλλάξεις στις θέσεις δέσμευσης της ταξόλης (paclitaxel) είναι ανθεκτικές στις επιδράσεις σταθεροποίησης των μικροσωληνίσκων από την ταξόλη αλλά παραμένουν ακόμα ευαίσθητες στους παράγοντες αποσταθεροποίησης των μικροσωληνίσκων όπως η 2-ME που δεσμεύεται στη σωληνίνη (τουμπουλίνη; Tubulin) σε μη-επικαλυπτόμενες περιοχές δέσμευσης. Η 2-ME κατέστειλε τον HIF-1α στις προγονικές και ανθεκτικές στη ταξόλη (paclitaxel) κυτταρικές σειρές, ενώ η ταξόλη (paclitaxel) μειορρύθμισε τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1α μόνο στην προγονική, ευαίσθητη κυτταρική σειρά (Mabjeesh et al., 2003). Κατά συνέπεια, η δυνατότητα της 2-ME και άλλων παραγόντων καταστροφής των μικροσωληνίσκων στην καταστολή του HIF-1α εμφανίζεται να είναι επακόλουθο της διακοπής της δυσιολογικής δυναμικής των μικροσωληνίσκων (Σχήμα 4.1). Οι πορείες και τα στάδια μεταγωγής σήματος γεγονότα που οδηγούν από την καταστροφή των μικροσωληνίσκων στην καταστολή της μετάφρασης του HIF-1α παραμένουν άγνωστα.

Οι επιδράσεις της 2-ME στην καταστροφή των μικροσωληνίσκων και οι αντί-μιτωτική δράση της είναι καλά τεκμηριωμένες. Ο αποπολυμερισμός των μικροσωληνίσκων έχει ανιχνευθεί σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων (Brueggemeier et al., 2001; Mabjeesh et al., 2003; Sattler et al., 2003; Tinley et al., 2003) και 2-ME παρεμποδίζει τον πολυμερισμό της σωληνίνης (τουμπουλίνης) μέσω της αλληλεπίδρασης της στη θέση δέσμευσης της κολκικίνης (D'Amato et al., 1994; Cushman et al., 1995). Επιπλέον, υπάρχει μια αναφορά ότι η 2-ME επάγει το πολυμερισμό της κυτταρικής σωληνίνης (τουμπουλίνης) (Attalla et al., 1998).

Η σημαντική ερώτηση εάν οι επιδράσεις της 2-ME στους μικροσωληνίσκους που παρατηρούνται in vitro εμφανίζονται επίσης in vivo σε θεραπευτικές συγκεντρώσεις εξετάστηκε πρόσφατα. Σε ένα μοντέλο καρκίνου του μαστού θεραπευτικές συγκεντρώσεις 2-ME (30 και 150 mg/kg ανά ημέρα) προκάλεσαν τον αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων και το σχηματισμό μη δυσιολογικών μιτωτικών ατράκτων στα καρκινικά και ενδοθηλιακά κύτταρα (Mabjeesh et al., 2003). Η ποσοτική ανάλυση αποκάλυψε μια δοσο-εξαρτώμενη μείωση της πολυμερισμένης σωληνίνης (τουμπουλίνης) και μια αντίστοιχη αύξηση της διαλυτής σωληνίνης (τουμπουλίνης) στους όγκους που είχε χορηγηθεί η 2-ME (Mabjeesh et

al., 2003), εύρημα που συμφωνεί με τον αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων που παρατηρήθηκε μικροσκοπικά. Η δυνατότητα της 2-ME να επιφέρει μεταβολές στους μικροσωληνίσκους *in vivo* σε θεραπευτικές συγκεντρώσεις προτείνει ότι αυτές οι επιδράσεις μπορούν να διαδραματίσουν κρίσιμους ρόλους στις αντί-αγγειογενετικές και αντί-νεοπλασματικές δράσεις της.

Ο HIF-1α αυξάνει τη μεταγραφή διάφορων γονιδίων που εμπλέκονται στη $\text{O}_2\alpha$ διήθηση ιστών και τη μετάσταση καρκινικών κυττάρων. Η 2-ME αναστέλλει την κυτταρική προσκόλληση, την κινητικότητα και τη μετανάστευση των κυττάρων και αυτές οι επιδράσεις συνδέονται με τη διάσπαση των μικροσωληνίσκων (Sattler et al., 2003). Δεν είναι ακόμα γνωστό εάν αυτές οι επιδράσεις της 2-ME στην κυτταρική κινητικότητα, στη διήθηση και στη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων διεξάγονται μέσω της καταστολής του HIF-1α.

11.1. Αποπτωτικοί μηχανισμοί της δράσης της 2-μεθοξυοιστραδιόλης

Η 2-ME επάγει απόπτωση σε πολλούς διαφορετικούς τύπους καρκινικών κυττάρων μέσω διαφορετικών μοριακών μηχανισμών (Moobery 2003a and 2003b). Ένας από αυτούς τους μηχανισμούς με τους οποίους η 2-ME επάγει απόπτωση είναι η ικανότητα της να διεγείρει την παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) από τα μιτοχόνδρια. Έχειδειχθεί ότι η 2-ME επάγει την απόπτωση των σαρκοματικών κυττάρων Ewing μέσω της παραγωγής H_2O_2 , της ενεργοποίησης της JNK, της μείωσης του δυναμικού των μιτοχονδριακών μεμβρανών, της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c και της επακόλουθης ενεργοποίησης των κασπασών 9 και 8 (Djavaheri-Mergny et al., 2003). Επίσης έχειδειχθεί ότι η 2-ME αναστέλλει τη δράση του ενζύμου δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD) *με δόσο- και χρονο-εξαρτώμενο* τρόπο (Golab et al., 2003). Το ένζυμο αυτό είναι απαραίτητο για τη μετατροπή του ανιόντος του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και O_2 , προστατεύοντας με τον τρόπο αυτό τα κύτταρα από βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου. Η αναστολή της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου από τη 2-ME, προκαλεί την ενδοκυττάρια συσσώρευση του $\text{O}_2^{\cdot-}$ και οδηγεί στην καταστροφή των μεμβρανών των μιτοχονδρίων από ελεύθερες ρίζες, την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων.

Επομένως η στόχευση του ενζύμου αυτού από τη 2-ME μπορεί να οδηγήσει στην επιλεκτική θανάτωση των καρκινικών κυττάρων (Huang et al., 2000; Lambert et al., 2001; Wood et al., 2001). Επομένως η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό πρόκλησης της απόπτωσης από τη 2-ME.

Η επαγωγή της έκφρασης του αγρίου-τύπου της πρωτεΐνης p53 αποτελεί έναν ακόμη αποπτωτικό μηχανισμό της 2-ME. Η πρωτεΐνη p53 είναι μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, η οποία ρυθμίζει την απόπτωση, ως απόκριση σε ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες που προκαλούν καταστροφές στο DNA. Έχειδειχθεί, ότι η χορήγηση 2-ME σε κύτταρα του καρκίνου του πνεύμονα ενισχύει μετα-μεταγραφικά την έκφραση της λειτουργικά ενεργής αγρίου-τύπου p53, παρακάμπτοντας το σημείο ελέγχου G1/S και επάγοντας απόπτωση (Mukhopadhyay and Roth, 1997; Mukhopadhyay and Roth, 1998). Επίσης η χορήγηση 2-ME σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ορθοκολικών καρκινικών που περιείχαν φυσιολογική p53 οδήγησε στην επαγωγή της έκφρασης της p53 με αποτέλεσμα την απόπτωση τους (Carothers et al., 2002). Απεναντίας μελέτες σε κύτταρα του καρκίνου του προστάτη έδωσαν διαφορετικά αποτελέσματα. Τα LNCaP ανδρογόνο-εξαρτώμενα κύτταρα του καρκίνου του προστάτη που φέρουν φυσιολογική p53, εμφάνισαν μείωση των επιπέδων έκφρασης της p53 και της ικανότητας πρόσδεσης της στο DNA μετά από επεξεργασία με 2-ME (Kumar et al., 2001). Άλλοι ερευνητές, οι οποίοι χρησιμοποίησαν τα ίδια κύτταρα του καρκίνου του προστάτη συμπέραναν ότι η επαγωγή της p53 μέσω της p38/JNK-εξαρτώμενης ενεργοποίησης των NFκB/AP-1 ήταν απαραίτητη για την επαγωγή της απόπτωσης τους από τη 2-ME (Shimada et al., 2003). Η ταυτοποίηση του ρόλου της p53 στην 2-ME-επαγόμενη απόπτωση έγινε ακόμα πιο περίπλοκη μετά την διαπίστωση ότι η απόπτωση κυτταρικών σειρών μυελοβλαστώματος στο οποίο χορηγήθηκε 2-ME, δεν πραγματοποιήθηκε μέσω μεταβολών στην έκφραση της p53 (Kumar et al., 2003). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ο NFκB εμπλέκεται στην απόπτωση που προκαλεί η χορήγηση της 2-ME (Shimada et al., 2003; Kumar et al., 2003). Ωστόσο, ενώ η p38/JNK-εξαρτώμενη ενεργοποίηση του NF-κB ήταν απαραίτητη για την επαγόμενη απόπτωση των κυττάρων του καρκίνου του προστάτη μετά τη χορήγηση 2-ME (Shimada et al., 2003), αποδείχθηκε, ότι καρκινικά κύτταρα μυελοβλαστώματος, στα οποία χορηγήθηκε 2-ME και υπέστησαν απόπτωση, παρουσίασαν μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NFκB και της ικανότητας πρόσδεσης του στο DNA (Kumar et al., 2003). Δεδομένου ότι προηγούμενες μελέτες ανέφεραν μια

αλληλεπίδραση μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων p53 και NFκB σε άλλα κυτταρικά συστήματα (Wu and Lozano, 1994; Kirch et al., 1999; Webster and Perkins, 1999; Ryan et al., 2000), αποτελεί πρόκληση η μελέτη του ρόλου των αλληλεπιδρώντων πορειών μεταγωγής σήματος των παραγόντων p53 και NFκB στην απόπτωση που επάγεται από τη 2-ME.

12.1. Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (απόπτωση) και αντί-αποπτωτικά γονίδια

Η απόπτωση είναι μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που ενεργοποιείται στα κύτταρα, ως απόκριση σε φυσιολογικά και παθολογικά ερεθίσματα. Η απόπτωση συνδέεται με ποικίλα κυτταρικά γεγονότα, όπως η ανάπτυξη του κυττάρου, ο μηχανισμός άμυνας του οργανισμού και η καταστολή της ογκογένεσης (Ashkenazi and Dixit, 1998; Green and Reed 1998; Evan and Littlewood, 1998; Reed, 1999b; Reed, 2000).

Η απόπτωση - δηλαδή η προγραμματισμένη καταστροφή ενός κυττάρου - είναι μια πολύπλοκη διεργασία. Η απόφαση για κυτταρικό θάνατο ελέγχεται και επηρεάζεται από τη δράση πολλών γονιδίων καθώς ενεργοποιείται στο κύτταρο ένα πρόγραμμα αυτοκαταστροφής. Άπαξ και ληφθεί η απόφαση, η σωστή εκτέλεση του προγράμματος απόπτωσης απαιτεί την συνδυασμένη ενεργοποίηση και εκτέλεση πολλαπλών υποπρογραμμάτων.

Τα πολυκύτταρα ζώα συχνά χρειάζεται να απαλλαγούν από κύτταρα που έχουν σε περίσσεια, ή τους είναι εμπόδιο ή που είναι δυνητικά επικίνδυνα. Για αυτό τον σκοπό χρησιμοποιούν ένα ενεργό μοριακό πρόγραμμα, αφιερωμένο σε αυτή την διεργασία. Ο ρυθμιζόμενος (ή προγραμματισμένος) κυτταρικός θάνατος είναι τόσο σημαντικός όσο η κυτταρική διαίρεση και μετανάστευση, και επιτρέπει στον οργανισμό να ελέγχει με ακρίβεια τον αριθμό των κυττάρων και το μέγεθος των ιστών, καθώς και να προστατεύεται από παρεκτρεπόμενα κύτταρα που απειλούν την ομοιόσταση.

Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των αποπτωτικών κυττάρων είναι η συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος, πύκνωση, καταστροφή του πυρήνα (καρυορηξία), η αποδιάταξη της χρωματίνης και ο κατακερματισμός του DNA και όλα μαζί σχηματίζουν τα αποπτωτικά σωματίδια (Majno and Joris, 1995; Vaux and

Strasser, 1996; Haie et al., 1996). Τα σήματα που επάγουν απόπτωση ενεργοποιούν διαδοχικά ένζυμα που διασπούν άλλες πρωτεΐνες, οι πρωτεάσες ή κασπάσες (caspases), οι οποίες οδηγούν στην ενεργοποίηση ενδονουκλεασών. Οι ενδονουκλεάσες διασπούν με τη σειρά τους το DNA μεταξύ νουκλεοσωμάτων και σχηματίζονται πολλά τμήματα DNA χαμηλού μοριακού βάρους μήκους κατά προσέγγιση πολλαπλών των 185 bp (Green and Kroemer, 1998; Thonberry and Lazebnik, 1998; Shi, 2002).

Βλάβες στο DNA και η ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου (death receptors) έχουν αναγνωρισθεί ως τα εναρκτήρια ερεθίσματα της απόπτωσης, επάγοντας τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης (mitochondrial membrane permeabilisation; MMP) και / ή την άμεση ενεργοποίηση των κασπασών. Μια πληθώρα ευρημάτων δείχνει ότι και άλλα κυτταρικά οργανίδια, όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), τα λυσοσωμάτια, και η συσκευή Golgi, είναι επίσης κύρια σημεία ενσωμάτωσης των προ-αποπτωτικών πορειών μεταγωγής σήματος ή ανίχνευσης βλάβης. Κάθε ένα κυτταρικό οργανίδιο ανιχνεύει συγκεκριμένες μεταβολές και ενεργοποιεί τοπικά πορείες μεταγωγής σήματος και εκπέμπει σήματα τα οποία διασφαλίζουν τη διεπικοινωνία μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών οργανιδίων. Για παράδειγμα, τα λυσοσωμάτια ανιχνεύουν τοπικά αποπτωτικά ερεθίσματα, αποσταθεροποιείται η μεμβράνη τους και απελευθερώνουν καθεψίνες οι οποίες έχουν τη δυνατότητα αύξησης της MMP διαμέσου της ενεργοποίησης του *προ-αποπτωτικού* μέλους της υπεροικογένειας του Bcl-2, Bid (Ferri and Kroemer, 2001). Η ενεργοποιημένη μορφή της Bid διεγείρει τον ολιγομερισμό των *προ-αποπτωτικών* πρωτεϊνών Bax ή Bak που προκαλούν MMP. Η MMP προκαλεί με τη σειρά της την απελευθέρωση των AIF, κυτοχρώματος c και των *προ-κασπασών* από τα μιτοχόνδρια που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο (Ferri and Kroemer, 2001).

Είναι λοιπόν φανερό ότι η απόπτωση οδηγεί στη δυσλειτουργία κυτταρικών οργανιδίων από τις οποίες η πιο γνωστή είναι αυτή των μιτοχονδρίων (Green and Kroemer, 1998; Green and Reed, 1998; Kroemer and Reed, 2000). Οι αιτίες που οδηγούν τα κύτταρα σε απόπτωση είναι η ακτινοβολία UVB, το κεραμίδιο, η εναιώρηση τους σε ημι-στερεή μεθυλοκυτταρίνη, αντικαρκινικά φάρμακα, το οξειδωτικό και θερμικό στρες, κυτοκίνες και ογκογονίδια καθώς επίσης και παθολογικές αιτίες, αλλά και κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη (Green and Reed, 1998; Evan and Littlewood, 1998; Vaux and Kormeyer, 1999; Reed, 1999; Reed, 2000).

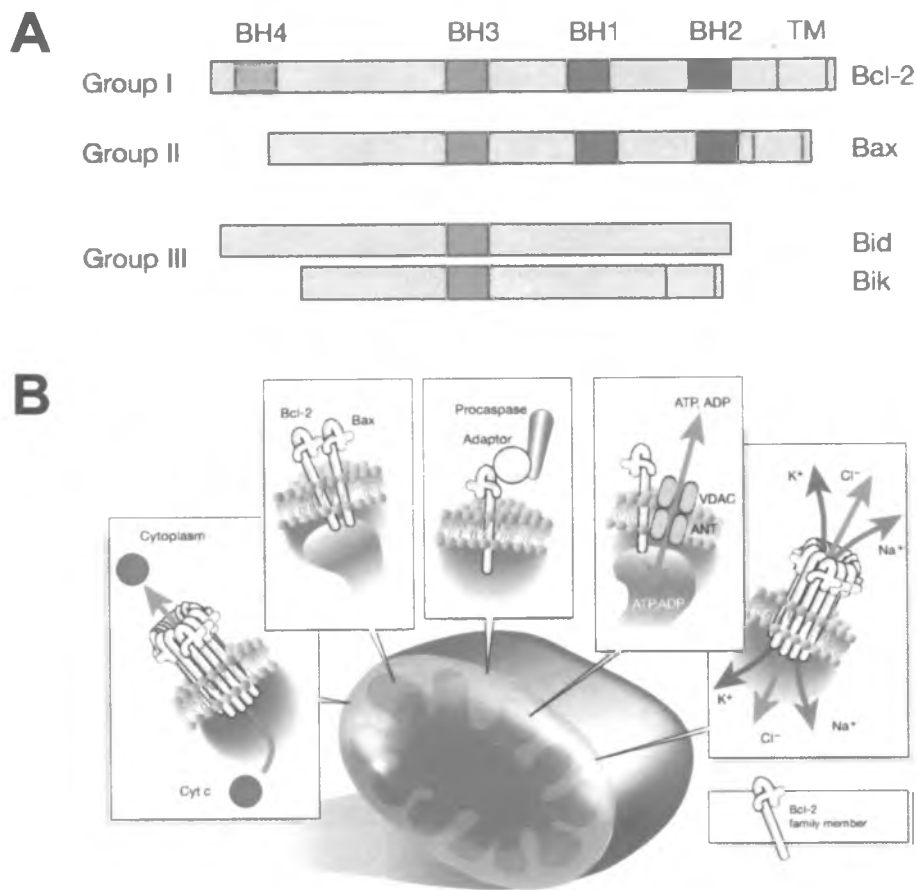
Μεταξύ των γονιδίων που εμπλέκονται στην ρύθμιση της κυτταρικής απόπτωσης είναι η υπεροικογένεια του Bcl-2 και κλαστρίνη/απολιποπρωτεΐνη J (ApoJ).

13.1. Η υπεροικογένεια του Bcl-2 στην απόπτωση

Μεταξύ των πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την αποπτωτική διαδικασία καθώς επίσης και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι τα μέλη της υπεροικογένειας του Bcl-2. Η υπεροικογένεια του Bcl-2 αποτελεί μια από τις σημαντικότερες ομάδες ρυθμιστικών πρωτεϊνών της απόπτωσης και περιλαμβάνει δυο κύριες ανταγωνιστικές ομάδες πρωτεϊνών: τα αντι-αποπτωτικά μέλη όπως Bcl-2, Bcl-X_L και Bcl-w και τα προ-αποπτωτικά μέλη όπως Bak, Bax, Bid, Bcl-xs, Bim και Bik. Αυτές οι πρωτεΐνες εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική πλευρά της μιτοχονδριακής μεμβράνης, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στην πυρηνική μεμβράνη, σαν αποτέλεσμα της προσκόλλησης του καρβοξυ-τελικού άκρου τους. Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες της ομάδας I (Bcl-2 και Bcl-X_L) προάγουν την επιβίωση των κυττάρων, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των κασπασών (πρωτεασών) που εμπλέκονται στην απόπτωση των κυττάρων. Οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες των ομάδων II (Bak και Bax) και III (Bid, Bik), δεν παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία με τις πρωτεΐνες της ομάδας I και καθιστούν τα κύτταρα πιο ευαίσθητα στην αποπτωτική δράση διαφόρων χημειοθεραπευτικών παραγόντων (Σχήμα 4.1A) (Hengartner, 2000; Corry and Adams, 2002). Τα μέλη της υπεροικογένειας Bcl-2 διμερίζονται και η ισορροπία μεταξύ αυτών των δυο λειτουργικών ομάδων πρωτεϊνών της υπεροικογένειας παίζει καθοριστικό ρόλο στην κατάληξη των κυττάρων, μετά από κάποιο αποπτωτικό ερέθισμα. Ο λόγος, δηλαδή, αντι-αποπτωτικών:προ-αποπτωτικών Bcl-2 πρωτεϊνών καθορίζει τη σχετική ευαισθησία ή αντίσταση των κυττάρων σε ένα ευρύ φάσμα αποπτωτικών διεγερτών (Adams and Cory, 1998; Reed, 1998; Gross et al., 1999; Hengartner, 2000; Cory and Adams, 2002).

Οι ρυθμιζόμενες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών είναι θεμελιώδεις για την Ταν κατανόηση της λειτουργίας ενός δεύτερου συνόλου ρυθμιστών της απόπτωσης, της οικογένειας Bcl-2. Πώς ελέγχουν τον κυτταρικό θάνατο τα μέλη της οικογένειας Bcl-2; Όλα τα μέλη φαίνεται να σπαταλούν τον περισσότερο χρόνο τους εμποδίζοντας το ένα την επόμενη κίνηση του άλλου.

Πολλά μέλη της οικογένειας μπορούν να ομοδιμεριστούν, αλλά ακόμη πιο σημαντικό είναι το ότι προαγωγά και αντιτιθέμενα στην απόπτωση μόρια μπορεί να σχηματίσουν ετεροδιμερή (Σχήμα 4.1B) (Reed, 1997; Adams and Corry, 1998; Corry and Adams, 2002). Επειδή κάθε μέλος της οικογένειας Bcl-2 μπορεί να αλληλεπιδράσει με πολλά άλλα μέλη, είναι πιθανοί μέσα σε ένα κύτταρο πολλοί συνδυασμοί ετεροδιμερών. Σε μια πρώτη προσέγγιση μπορεί να θεωρήσουμε ότι ο ετεροδιμερισμός μπορεί απλά να λογιστεί ως αμοιβαία εξουδετέρωση των προσδεδεμένων προαγωγών και ανταγωνιστών της απόπτωσης. Άρα το πρόβλημα καταλήγει σε σύγκριση των συνολικών επιπέδων αυτών των δύο κατηγοριών μορίων: κύτταρα με περισσότερες πρωτεΐνες-προαγωγούς του θανάτου είναι ευαίσθητα στον θάνατο. Κύτταρα με περίσσεια προστατευτικών μορίων είναι συνήθως ανθεκτικά. Επομένως ο λόγος προ-:αντι-αποπτωτικών μελών της υπεοικογένειας Bcl-2 καθορίζει και την έκβαση της απόκρισης των κυττάρων σε αποπτωτικούς παράγοντες (Hengartner et al., 2000).



Σχήμα 5.1. Τα μέλη της υπερικογενείας του Bcl-2. (A) Το όνομα Bcl προέρχεται από το γονίδιο που εμπλέκεται στην ανάπτυξη του λεμφώματος των B-λεμφοκυττάρων (B-cell lymphoma; bcl). Η υπερικογενεία του Bcl-2 αποτελείται από πάνω από 12 μέλη τα οποία ταξινομούνται σε τρεις λειτουργικές ομάδες I, II και III. Μέλη της ομάδας I, όπως τα Bcl-2 και Bcl-X_L, χαρακτηρίζονται από 4 μικρές διατηρημένες Bcl-2 ομόλογες (BH) περιοχές (BH1 – BH4). Φέρουν επίσης ένα υδρόφοβο C-τελικό άκρο, το οποίο εντοπίζει τις πρωτεΐνες στην εξωτερική μεμβράνη κυρίως των μιτοχονδρίων, με το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης να βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Όλα τα μέλη της ομάδας I έχουν αντί-αποπτωτικές ιδιότητες και προστατεύουν τα κύτταρα από το θάνατο. Σε αντίθεση, η ομάδα II περιλαμβάνει μέλη της υπερικογενείας Bcl-2 με *προ*-αποπτωτικές ιδιότητες, όπως Bax και Bak που έχουν σχεδόν ίδια δομή με τα μέλη της ομάδας I εκτός από την αμινο-τελική BH4 περιοχή. Η ομάδα III αποτελείται από μια μεγάλη συλογή διαφορετικών πρωτεϊνών που κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η παρουσία της BH3 περιοχής με ~12-16 αμινοξέα που πιθανά προήλθαν μέσω συγκλίνουσας εξέλιξης. Μέλη αυτής της ομάδας είναι οι *προ*-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bid και Bik. (B) Τα μέλη της υπερικογενείας Bcl-2 δρουν μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Σχηματίζουν πόρους μέσω των οποίων διαπερνά το κυτόχρωμα c (Cyt c) και άλλες πρωτεΐνες του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού χώρου. Ο σχηματισμός ετεροδιμερών μεταξύ *προ*- και αντί-αποπτωτικών μελών που επιτυγχάνεται όταν μια BH3 περιοχή ενός μορίου προσδένεται σε μια υδρόφοβη θέση (rocket) που σχηματίζεται από τις περιοχές BH1, BH2 και BH4 ενός άλλου μέλους. Άμεση ρύθμιση των κασπασών μέσω ενός προσαρμοστικού μορίου (adaptor). Αλληλεπίδραση με άλλες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, όπως η VDAC και ο μεταφορέας των νουκλεοτιδίων αδενοσίνης (ANT), είτε για το σχηματισμό ενός πόρου για την έξοδο του Cyt c ή για τη ρύθμιση της ομοιόστασης των μιτοχονδρίων (π.χ. άνοιγμα του PTP). Ολιγομερισμός για το σχηματισμό ενός ασθενά επιλεκτικού καναλιού ιόντων. (Από: Hergatner, 2000).

Οι πρωτεΐνες Bcl-2 πρέπει να κάνουν κάτι περισσότερο από το να «συνομιλούν» η μια με την άλλη, αν είναι να επηρεάσουν τον κυτταρικό θάνατο. Ποιό είναι το τελικό προϊόν όλων αυτών των αλληλεπιδράσεων; Στον νηματώδη *Caenorhabditis elegans*, το αντι-αποπτωτικό μόριο και ομόλογο του Bcl-2, το *ced-9*, προστατεύει τα κύτταρα από θάνατο προσδεδεμένο άμεσα στο μόριο-προαγωγό της απόπτωσης και ομόλογο της Araf-1, το *ced-9* (Hu et al., 1998). Έτσι, το *ced-9* αποσύρει το *ced-4* από την κυκλοφορία. Παρ' όλο που αυτό είναι ένα ελκυστικό σενάριο, δεν έχει ακόμη παρατηρηθεί παρόμοια αλληλεπίδραση στα θηλαστικά, ίσως επειδή μια τέτοια παρατήρηση είναι δύσκολο, αν όχι αδύνατον, να γίνει, τουλάχιστον κάτω από τις συνθήκες που χρησιμοποιούνται (Hu et al., 1998, Hausmann et al., 2000). Αντίθετα, η κύρια λειτουργία των μελών της οικογένειας Bcl-2 φαίνεται να είναι η ρύθμιση της απελευθέρωσης προαγωγών της απόπτωσης, ιδιαίτερα του κυτοχρώματος c, από το διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων στο κυτταροδιάλυμα (Σχήμα 4.1B) (Adams and Corry, 1998; Hergatner, 2000; Corry and Adams, 2002).

Τα μιτοχόνδρια δεν είναι μόνον ο χώρος παραγωγής ενέργειας του κυττάρου, αλλά και το οπλοστάσιό του. Τα μιτοχόνδρια αποθηκεύουν ένα ισχυρό κοκταίηλ από πρωτεΐνες-προαγωγούς της απόπτωσης, από τις οποίες η πιο σπουδαία είναι το κυτόχρωμα c. Τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει αποδείξει ότι το κυτόχρωμα c δεν είναι απλά ένας αθώος παρατηρητής, πέραν της ανάμειξής του στην οξειδωτική φωσφορυλίωση των μιτοχονδρίων, η πρωτεΐνη αυτή είναι μια από τις συνιστώσες, μαζί με την Araf-1, που απαιτούνται για την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 στο κυτταροδιάλυμα.

Ο ακριβής τρόπος με τον οποίο το κυτόχρωμα c διασχίζει την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη δεν είναι γνωστός, είναι όμως ξεκάθαρο ότι η οικογένεια Bcl-2 ενέχεται άμεσα στη ρύθμιση αυτής της διεργασίας (Σχήμα 4.1B). Για παράδειγμα, η προσθήκη μορίων της οικογένειας Bcl-2 που προάγουν την απόπτωση σε απομονωμένα μιτοχόνδρια αρκεί για να επάγει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, ενώ η υπερέκφραση μορίων της ίδιας οικογένειας που προστατεύουν από την απόπτωση, παρεμποδίζει αυτή την κίνηση του κυτοχρώματος c.

Πώς λοιπόν τα μέλη της οικογένειας Bcl-2 ρυθμίζουν την μιτοχονδριακή έξοδο του κυτοχρώματος c. Έχουν προταθεί πολλές αλληλοσυγκρουόμενες υποθέσεις, χωρίς καμιά από αυτές να έχει αποδειχθεί με βεβαιότητα (Adams and Corry, 1998;

Gross et. al., 1999; Antonsson and Martinou, 2000; Hengartner, 2000; Corry and Adams, 2002). Τα τρία βασικά μοντέλα παρατίθενται κατωτέρω.

Τα μέλη της οικογένειας Bcl-2 σχηματίζουν κανάλια που προωθούν την μεταφορά πρωτεϊνών. Με βάση την μεγάλη δομική ομοιότητα της Bcl-x_L με την προ-σχηματίζουσα υπομονάδα της τοξίνης της διφθερίτιδας, προτάθηκε ότι οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 μπορεί να δρουν με εισχώρηση στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και επακόλουθη αλλαγή στην στερεοδιάταξη, με τελικό αποτέλεσμα τον σχηματισμό καναλιών ή ακόμη μεγάλων οπών. Τα μέλη της οικογένειας Bcl-2 μπορούν πράγματι να ενδοεισχωρήσουν σε συνθετικές διπλοστοιβάδες λιπιδίων, να ολιγομεριστούν και να σχηματίσουν κανάλια με διακεκριμένες τιμές αγωγιμότητας (Hengartner, 2000; Corry and Adams, 2002). Τα μέλη της οικογένειας Bcl-2 αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες σχηματίζοντας κανάλια (Reed, 1998). Μια πιθανότητα είναι ότι οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες-μέλη της οικογένειας *στρατολογούν* άλλες πρωτεΐνες της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης για τον σχηματισμό ενός μεγάλου πόρου (καναλιού). Μια ιδιαίτερα ελκυστική υποψήφια πρωτεΐνη για αυτό τον σκοπό είναι το τασεο-εξαρτώμενο κανάλι ανιόντων (voltage dependent anion channel, VDAC), *μια* και πολλά μέλη της οικογένειας Bcl-2 μπορούν να προσδεθούν σε αυτό και να ρυθμίσουν την δραστηριότητά του (Shimizu et al., 1999). Αφού το ήδη χαρακτηρισμένο μέγεθος του πόρου του καναλιού ανιόντων είναι πολύ μικρό για να το διαπεράσουν πρωτεΐνες, *θα πρέπει να υποθέσουμε περαιτέρω ότι το VDAC υπόκειται σε μεγάλη αλλαγή της στερεοδιάταξής του μετά από πρόσδεση σε πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2* (Hengartner, 2000; Corry and Adams, 2002).

Μέλη της οικογένειας Bcl-2 επάγουν ρήξη της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Είναι πιθανόν να ελέγχουν την ομοιοστάση των μιτοχονδρίων (π.χ. *ιοντο-ανταλλαγή*, οξειδωτική φωσφορυλίωση). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, τα αποπτωτικά σήματα αλλάζουν την φυσιολογία των μιτοχονδρίων έτσι ώστε το οργανίδιο διογκώνεται και προκαλείται φυσική ρήξη της εξωτερικής μεμβράνης, έτσι ώστε απελευθερώνονται στο κυτταροδιάλυμα πρωτεΐνες του διαμεμβρανικού χώρου, οπότε η «ανάγκη» για τον σχηματισμό ενός καναλιού μέσα από το οποίο μπορεί να διέλθει το κυτόχρωμα c, υποκαθίσταται από το ότι μετά από ρήξη της εξωτερικής μεμβράνης οι πρωτεΐνες του διαμεμβρανικού χώρου απλά διαχέονται στο κυτταροδιάλυμα (Hengartner, 2000; Corry and Adams, 2002).

Η ομοιόσταση των μιτοχονδρίων θα μπορούσε να επηρεάζεται άμεσα από μέλη της οικογένειας Bcl-2 (για παράδειγμα, μέσω της προτεινόμενης δραστικότητας καναλιού ιόντων που αναφέρθηκε ανωτέρω) ή έμμεσα, μέσω τροποποίησης άλλων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Η πρωτεΐνη VDAC είναι και πάλι ένας εμφανής υποψήφιος για τέτοιο ρόλο, μια και είναι υπομονάδα του μιτοχονδριακού πόρου μεταπρωτικής διαπερατότητας (permeability transition pore, PTP), ενός μεγάλου καναλιού το άνοιγμα του οποίου οδηγεί σε απώλεια της διαφοράς δυναμικού μεταξύ των δύο πλευρών της εξωτερικής μεμβράνης και διόγκωση του οργανιδίου. Το άνοιγμα του PTP γρήγορα οδηγεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Μάλιστα δε, φαρμακολογικοί αναστολείς του PTP μπορούν να λειτουργήσουν ως ισχυροί αναστολείς της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c, και συνεπώς να παρεμποδίσουν την απόπτωση (Loeffler and Kroemer, 2000). Όμως, η έξοδος του κυτοχρώματος c από τον διαμεμβρανικό χώρο μπορεί να γίνει και χωρίς να υπάρξει απώλεια της μεμβρανικής διαφοράς δυναμικού, γεγονός που συνηγορεί στο ότι το PTP δεν είναι ο μοναδικός στόχος των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 (Gross et al., 1999; Loeffler and Kroemer, 2000; Hengartner, 2000; Corry and Adams, 2002).

Η έξοδος του κυτοχρώματος c από τον διαμεμβρανικό χώρο είναι ένα περίπου καθολικό χαρακτηριστικό του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου. Όμως, σε ορισμένες περιπτώσεις συμβαίνει σχετικά αργά στην πορεία αυτής της διεργασίας. Για παράδειγμα, η απόπτωση που επάγεται από τους υποδοχείς κυτταρικού θανάτου συχνά παρακάμπτει την μιτοχονδριακή πορεία (Lorenzo et al., 1999). Όπως μπορεί να αναμένεται, από τα μοντέλα που συζητήθηκαν πιο πάνω, τέτοιου είδους θάνατοι είναι σχετικά ανεπηρέαστοι από την προστασία μέσω των πρωτεϊνών Bcl-2, και η απελευθέρωση κυτοχρώματος c στο κυτταροδιάλυμα είναι μάλλον το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των κασπασών, παρά το αίτιό τους (Σχήμα 4.1B) (Lorenzo et al., 1999; Hengartner, 2000; Corry and Adams, 2002).

Η υπερέκφραση των Bcl-2 και Bcl-X_L μπορεί να προστατεύσει τα κύτταρα από ποικίλους παράγοντες που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο, όπως είναι η ακτινοβολία-UV και -γ, τα κυτταροτοξικά φάρμακα, Fas, ο TNFα, το μετατρέπον ένζυμο της ιντερλευκίνης 1β (ICE), οι υπεροξειδάσες, τα ανδρογόνα, η νευροτροφίνη, το αντί-CD3 και το κεραμίδιο, αλλά και η υπερέκφραση του p53 και του c-myc. Τα Bcl-2 και Bcl-x_L αναστέλλουν τις μιτοχονδριακές αλλά και τις πυρηνικές εκδηλώσεις της απόπτωσης (Reed, 1998; Green and Reed, 1998; Adams and Cory, 1998; Evan

and Littlewood, 1998; Gross et al., 1999). Ο ακριβής μηχανισμός δράσης των Bcl-2 και Bcl-x_L δεν είναι κατανοητός, όμως η αντι-αποπτωτική τους δράση αποδίδεται στη μείωση των επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου, στην μεταβολή των πόρων της μιτοχονδριακής μεμβράνης, στην αναστολή της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια προς το κυτταρόπλασμα και ακόλουθα στην αναστολή της ενεργοποίησης των κασπασών στο κυτταρόπλασμα (Reed, 1998; Green and Reed, 1998; Adams and Cory, 1998; Gross et al., 1999; Thornberry and Lazebnik, 1998; Shi, 2002).

Έχειδειχθεί ότι η γενιστενίνη καθυστερεί την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων μαστού MCF-7 στη G2/M (Constantinou et al., 1998), επηρεάζει την έκφραση και την κατάσταση φωσφορυλίωσης της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 (Constantinou et al., 1998; Leung et al., 2000), μιας πρωτεΐνης που αποκρίνεται στη δράση των οιστρογόνων, αφού ο προαγωγέας του γονιδίου Bcl-2 περιέχει στοιχεία που δεσμεύουν τα οιστρογόνα (ERE; *estrogen response elements*) (Perillo et al., 2000). Η γενιστενίνη επάγει τη φωσφορυλίωση της Bcl-2 που οδηγεί στην απενεργοποίηση της και στην επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων MCF-7 (Constantinou et al., 1998).

Η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που επάγεται από τη 2-ME φαίνεται ότι οφείλεται στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα αντι-αποπτωτικά μέλη της υπεροικογένειας του Bcl-2 εμπλέκονται στην απόπτωση που επάγεται από τη 2-ME (Attala et al., 1998; Bu et al., 2002; Shimada et al., 2003; Basu and Haldar, 2003). Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 (Haldar et al., 1998; Attala et al., 1998; Bu et al., 2002; Shimada et al., 2003) και Bcl-X_L (Basu and Haldar, 2003) μπορούν να απενεργοποιηθούν με φωσφορυλίωση στα κατάλοιπα σερίνων Ser70 και Ser62, αντίστοιχα. Η φωσφορυλιωμένη Bcl-2 δεν έχει πλέον την ικανότητα να εμποδίζει την υπεροξειδωση των λιπιδίων, πράγμα απαραίτητο για την προστασία των κύτταρων από την απόπτωση. Η φωσφορυλίωση της Bcl-2 μπορεί να επαχθεί από φάρμακα που επιδρούν στην ακεραιότητα/σταθερότητα των μικροσωληνίσκων, όπως η ταξόλη (taxol) ή 2-ME (Haldar et al., 1997; Haldar et al., 1998; Attalla et al., 1998; Bu et al., 2002; Shimada et al., 2003) και παρεμποδίζει την πρόσδεση της Bcl-2 στη Bax ώστε να την απενεργοποιεί, με αποτέλεσμα να οδηγούνται τα κύτταρα προς απόπτωση (Haldar et al., 1995; Haldar et al., 1996). Η φωσφορυλίωση και ακόλουθα η απενεργοποίηση της Bcl-2 μετά τη χορήγηση 2-ME φαίνεται ότι διεξάγεται από τη

δράση της JNK/SAPK (c-Jun N-terminal Kinase/stress-activated protein kinase) και συσχετίζεται με την απόπτωση λευχαιμικών ερυθρομυελικών κυττάρων (Attalla et al., 1998) και προστατικών καρκινικών κυττάρων (Bu et al., 2002; Shimada et al., 2003). Η χορήγηση της 2-ME στα κύτταρα αυτά, οδηγεί στη φωσφορυλίωση της Bcl-2 και της JNK/SAPK, η χρονική στιγμή όμως της τροποποίησης αυτής είναι διαφορετική για τις δύο πρωτεΐνες, γεγονός που δηλώνει ότι η JKN/SAPK δεν είναι άμεσα υπεύθυνη για την φωσφορυλίωση της Bcl-2 (Attalla et al., 1998). Απεναντίας, η χορήγηση 2-ME σε κύτταρα του καρκίνου του προστάτη προκάλεσε ενεργοποίηση της JNK η οποία φωσφορυλίωσε την Bcl-2 με αποτέλεσμα την απόπτωση των κυττάρων (Bu et al., 2002; Shimada et al., 2003).

14.1. Κλαστρίνη/Απολιποπρωτεΐνη J (ApoJ): Ένα δυνητικά αντι-αποπτωτικό γονίδιο

Η κλαστρίνη (ApoJ, TRPM-2, SGP-2, SP40, gp80, T64, CLI, γλυκοπρωτεΐνη III ή αναστολέας της λύσης του συμπληρώματος) είναι μια ετεροδιμερής γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται από πολλούς ιστούς και βρίσκεται στα περισσότερα βιολογικά υγρά.

Ένας αριθμός φυσιολογικών λειτουργιών έχει αποδοθεί στην κλαστρίνη/απολιποπρωτεΐνη J (ApoJ) λόγω της κατανομής της και τις ιδιότητες της. Η ApoJ φαίνεται να εμπλέκεται σε μια σειρά φυσιολογικών λειτουργιών όπως: στη ρύθμιση του συμπληρώματος, στην ωρίμανση του σπέρματος, στην ενδοκρινή έκκριση, στην προαγωγή κυτταρικών αλληλεπιδράσεων, στην ρύθμιση της απόπτωσης στην προστασία των μεμβρανών και στον μεταβολισμό των λιπιδίων. Ένα βασικό χαρακτηριστικό της ApoJ είναι η επαγωγή της σε παθολογικές καταστάσεις, όπως στην σπειραματονεφρίτιδα, πολυκυστική νόσος των νεφρών, βλάβη των νεφρικών σωληναρίων και στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως στη νόσο του Alzheimer).

Η κλαστρίνη/απολιποπρωτεΐνη J (ApoJ) βρίσκεται συνδεδεμένη με την απολιποπρωτεΐνη A-1 και κυκλοφορεί ως μέρος της HDL ή VHDL και το σύμπλοκο ειδικά συσχετίζεται με την παροξονάση (paroxonase), μια 44 kDa εστεράση του ορού. Επομένως μια ιδιότητα που έχει αποδοθεί στην ApoJ είναι η μεταφορά των λιπιδίων από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ. Ο μόνος υποδοχέας που γνωρίζουμε για την ApoJ είναι ο gp330 που έχει μεγάλη συγγένεια με αυτήν (Jenne

and Tschopp, 1992; Rosenberg and Silksen, 1995; Jones and Jomary, 2002). Η εύρεση φυσιολογικών συγκεντρώσεων της ApoJ σε ασθενείς με ανεπάρκεια Apo A1, Apo A11 και HDL (σύνδρομο Tangier) υποδηλώνει πως η Apo A1 δεν είναι απαραίτητη για την κυκλοφορία στον ορό της ApoJ (Choi-Miura et al., 1993). Οι συγκεντρώσεις της ApoJ στον ορό έχουν ανακοινωθεί να είναι μεταξύ 50 και 340 mg/ml (Rosenberg and Silksen, 1995).

Η ApoJ λειτουργεί και ως αναστολέας του συμπληρώματος, και αναστέλλει *in vitro* την κυττόλυση (cytolysin) που επάγεται από το συμπλήρωμα με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (Jenne and Tschopp, 1992).

Η ApoJ συνθέτεται στα μεγακαρυοκύτταρα και αυτό εξηγεί την αφθονία της στα αιμοπετάλια ($2,5 \text{ mg}/10^9$ αιμοπεταλίων) (Tschopp et al., 1993). Η ApoJ είναι παρούσα κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα των όρχεων, της επιδιδυμίδας, του ήπατος, του στομάχου και του εγκεφάλου (Aronow et al., 1993), όμως δεν εκφράζεται από όλα τα κύτταρα σε ένα δεδομένο όργανο. Στον καρδιακό μύ το mRNA της ApoJ ανιχνεύεται στα μυοκύτταρα των κόλπων και όχι των κοιλιών και στο στομάχο συνθέτεται από τα κύρια ή θεμέλια κύτταρα (chief) και όχι από τα καλυπτήρια ή οξυντικά (parietal) κύτταρα. Στον εγκέφαλο το mRNA της ApoJ ανιχνεύεται στα αστροκύτταρα, με πολύ ειδική κατανομή σε ορισμένους νευρώνες. (Danik et al., 1993; O' Bryan et al., 1993; Pasinetti et al., 1994). Σε πολλά όργανα η ApoJ εκφράζεται στις επιφάνειες ιστών και σε βιολογικά υγρά, υποδηλώνοντας πιθανό προστατευτικό της ρόλο στις κυτταρικές μεμβράνες από τη δράση του γαστρικού υγρού, της χολής, των ούρων και του παγκρεατικού υγρού (Aronow et al., 1993). Στους επίμυες το mRNA της ApoJ ανιχνεύεται στα κύτταρα του φθαρτού υμένα της μήτρας 7,5 ημέρες μετά την έναρξη της εγκυμοσύνης και στα επιθηλιακά κύτταρα του λεκιθικού σάκου του ώριμου πλακούντα (Aronow et al., 1993). Επιπλέον η ApoJ ανευρίσκεται σε μυοκύτταρα των κόλπων και των κοιλιών, στην καρδιά του εμβρύου ποντικού, όμως μόνο στα μυοκύτταρα των κόλπων στην καρδιά ενήλικου ποντικού. Στους νεφρούς η ApoJ ανιχνεύτηκε στα επιθηλιακά κύτταρα του ουρητήρα, αλλά όχι στα μεσεγχυματικά (French et al., 1993), όπως και στα νεοσχηματιζόμενα ουροφόρα σωληνάρια, εν αντιθέσει με τα νεφρικά σπειράματα, όπου δεν ανευρέθηκε ποτέ.

Στον ενήλικα ποντικό η έκφραση της ApoJ στα ουροφόρα σωληνάρια είναι ισχνή εν αντιθέσει με την υπερέκφρασή της στα ουροφόρα σωληνάρια των νεογνών. Στον αναπτυσσόμενο εμβρυϊκό πνεύμονα ποντικού η ApoJ ανιχνεύεται

στο βρογχικό δέντρο, ενώ δεν ανευρίσκεται στον πνεύμονα ενηλίκου ποντικού (O' Bryan et al., 1993).

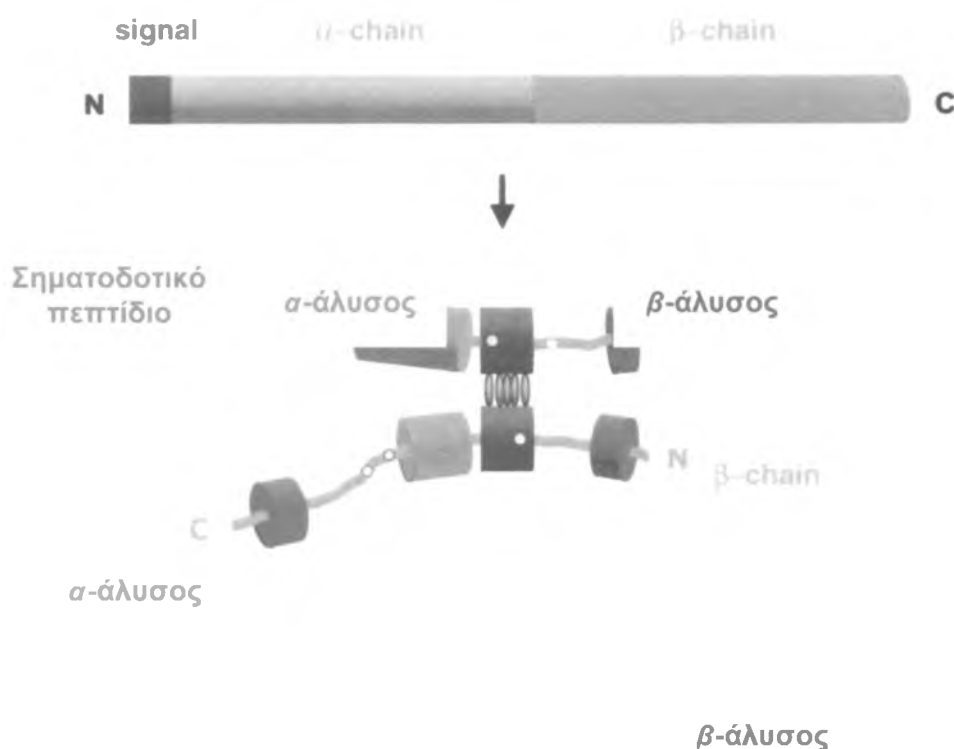
Η έκφραση της ApoJ σε συγκεκριμένες φάσεις ανάπτυξης των οργάνων και των συστημάτων του σώματος μπορεί να υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο της στην οργανογένεση, ίσως διαμέσου της καταλυτικής επίδρασής της στις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Ο φυσιολογικός ρόλος της ApoJ δεν είναι επαρκώς γνωστός. Θεωρείται πως είναι κυτταροπροστατευτική στα όρια χυμών-κυτταρικής μεμβράνης, διευκολύνει το μεταβολισμό συγκριμάτων ιστών σε περιοχές ενεργούς αναδόμησης (remodeling) κατά τη διάρκεια της αναγέννησης επιθηλίων σε ανταπόκριση τραύματος (French et al., 1993). Έχει επίσης προταθεί η εμπλοκή της στη νευροεκφυλιστικές ασθένειες, στη ρύθμιση της κυτταρικής απόπτωσης, στην προστασία των κυτταρικών μεμβρανών και στην προαγωγή κυτταρικών αλληλεπιδράσεων. Η πρωτεΐνη της ApoJ αφθονεί στη αθηρωματικές αλλοιώσεις των αγγείων και γι' αυτό συνδέθηκε με την αθηρωμάτωση (Witte et al., 1993). Ενοχοποιείται για τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών και των κυττάρων των λείων μυϊκών ινών και όπως προαναφέρθηκε υπερεκφράζεται κατά την διάρκεια της μορφογένεσης, υποδηλώνοντας τον ρόλο της στην οργανογένεση (Witte et al., 1994).

Η σύνδεση έκφρασης ή υπερέκφρασης της ApoJ και της απόπτωσης επιτεύχθηκε για πρώτη φορά όταν ο παράγοντας TRPM-2 αναγνωρίστηκε και κλωνοποιήθηκε ως ο κύριος παράγοντας που υπερεκφράστηκε κατά την διάρκεια της παλινδρόμησης του προστάτη αρουραίου μετά τον ευνουχισμό. Από τότε η ApoJ συνδέθηκε και με άλλους ιστούς που υφίστανται απόπτωση (Jenne and Tschopp, 1992). Ένα βασικό χαρακτηριστικό της ApoJ είναι η επαγωγή της σε παθολογικές καταστάσεις, όπως στην σπειραματονεφρίτιδα, στην πολυκυστική νόσο των νεφρών και στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Alzheimer). Η έκφραση της απολιποπρωτεΐνης σε ποικίλες παθήσεις, όπως η αθηρωμάτωση (ικανότητα δέσμευσης λιπιδίων), τα μυοκαρδιακά έμφρακτα (υπερέκφραση στα κατεστραμμένα μυοκύτταρα του *εμφραγματικού* μυοκαρδίου και απουσία στα υγιή), οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Scrapie, Alzheimer), όπου ανευρίσκεται στους δυστροφικούς νευρώνες, στις αμυλοειδείς πλάκες, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στα ενεργά αστροκύτταρα, ο καρκίνος (υπερέκφραση σε ποικίλο αριθμό καρκινικών κυτταρικών σειρών, σε αδενοκαρκινώματα του μαστού και της μήτρας σε νεφρικούς όγκους και σε γλοιώματα, (gliomas) νευροβλαστώματα), η νεφρική νόσος (σπειραματονεφρίτιδα,

κυστική νόσος, χρόνια ενδιάμεση νεφρίτιδα (tubulointerstitial disease) αποτελεί ένα puzzle για τους ερευνητές.

Η κλαστρίνη/ApoJ είναι μία N-γλυκοπρωτεΐνη, προϊόν ενός μόνο γονιδίου που ανευρίσκεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 8 (8p21), κοντά στο γονίδιο της λιποπρωτεϊνικής κινάσης. Η πρωτεΐνη μεταφράζεται από ένα mRNA 1674 νουκλεοτιδίων ως προ-πρωτεΐνη 449 αμινοξέων με 10 κατάλοιπα κυστεΐνης, 6 πιθανές θέσεις γλυκοσυλίωσης και με ένα αμινο-τελικό άκρο 20-21 αμινοξέων, χαρακτηριστικό ενός σηματοδοτικού εκκρινόμενου πεπτιδίου.

Η προ-πρωτεΐνη ωριμάζει με περιορισμένη πρωτεόλυση σχηματίζοντας μια ετεροδιμερή γλυκοπρωτεΐνη 80 kDa που αποτελείται από δύο αλυσίδες, α και β, μοριακού βάρους 36-40kDa η καθεμία, συνδεδεμένες μεταξύ τους με 5 δισουλφιδικούς δεσμούς (Σχήμα 6.1) (Jenne and Tschopp, 1992; Rosenberg and Silkensen, 1995; Wilson and Easterbrook-Smith, 2000; Jones and Jomary, 2002; Trougakos and Gonos, 2003). Σε ανθρώπινα κύτταρα υπάρχουν πολλαπλές μορφές της ApoJ Trougakos and Gonos, 2003): Η ετεροδιμερής εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη 80 kDa, η ενδοκυττάρια μορφή 60 kDa (λιγότερο γλυκοσυλιωμένη μορφή) (Petrovoulou et al., 2001) και μια πυρηνική μορφή 45-50 kDa που φαίνεται ότι προσδένει στην K470/K480 DNA δεσμευτική υπομονάδα επιδιορθωτικής πρωτεΐνης (Yang et al., 2000). Περαιτέρω ανάλυση του ανθρώπινου γονιδίου έδειξε ότι η πρωτεΐνη περιέχει τέσσερις αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localisation signals ή nls) κατάρρους του σηματοδοτικού πεπτιδίου που εντοπίζεται μεταξύ δύο θέσεων έναρξης ATG (Yang et al., 2000). Η επαγωγή της έκφρασης της ApoJ από το δεύτερο ATG μετά από ιονίζουσα ακτινοβολία οδηγεί στην ενεργοποίηση της και τον εντοπισμό της πρωτεΐνης στον πυρήνα των κυττάρων.



Σχήμα 6.1. Η δομή της ανθρώπινης κλαστρίνης/απολιποπρωτεΐνης J. Το πρόδρομο μόριο (επάνω) διασπάται πρωτεολυτικά για να αφαιρεθεί το 22-μερές εκρινόμενο σηματοδοτικό πεπτιδίο (θαμάσκη) και ακόλουθα μεταξύ των κατάλοιπων 227/228 για να δημιουργηθούν οι α- (πορτοκαλί) και β- (ανοιχτό μπλέ) αλυσίδες. Αυτές οι αλυσίδες συγκροτούνται αντι-παράλληλα για να σχηματίσουν ένα ετεροδιμερές μόριο (κάτω) στο οποίο τα κέντρα κατάλοιπων κυστεΐνης (κόκκινοι κύλινδροι) συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς (σκούρες κόκκινες ελλειψοειδείς δομές) και συνορεύουν με δύο προβλεπόμενα σπειρωμένα σπειράματα (coiled-coil) α-ελίκων (πράσινο) και τρεις προβλεπόμενους αμφιπαθείς α-έλικες (σκούρο μπλε). Οι θέσεις της N-γλυκοζυλίωσης απεικονίζονται με κίτρινες μικρές κηλίδες (Jones and Jomary, 2002).

Η ρύθμιση της έκφρασης της απολιποπρωτεΐνης J από κυτταρικούς αυξητικούς παράγοντες έχει επίσης μελετηθεί. Ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας β (TGFβ) που επενεργεί σε μεγάλο αριθμό διαφορετικών ειδών κυττάρων ρυθμίζοντας τον πολλαπλασιασμό τους, την διαφοροποίησή τους και την απόπτωση καταστέλλει την έκφρασή του mRNA της ApoJ σε κύτταρα χοίρου λείων μυικών ινών (Thomas-Salgar and Millis, 1994). Πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν επίσης ότι ο TGFβ είτε επάγει, είτε αναστέλλει την ApoJ σε αστροκύτταρα αρουραίου, κάτι που εξαρτάται από το σύνολο του κυτταρικού τύπου των καλλιεργούμενων κυττάρων (Morgan et

al., 1995). Όταν τα αστροκύτταρα συγκαλλιεργούνται παρουσία ολιγοδενδριτικών και μικρογλοιακών κυττάρων, αυξάνουν τις συγκεντρώσεις mRNA της AroJ ως απόκριση στον TGFβ. Όταν τα αστροκύτταρα καλλιεργούνται μόνα τους, τότε η παρουσία του TGFβ καταστέλλει την έκφραση της AroJ.

Οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης της AroJ παραμένουν άγνωστοι παρόλη τη σημαντική εμπλοκή της σε φυσιολογικά και παθοφυσιολογικά φαινόμενα του οργανισμού. Επιπρόσθετα αδιευκρίνηστο παραμένει εάν η Aro J είναι πραγματικά μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη ή ένας κοινός μηχανισμός υποκρίπτεται και προάγει όλα τα φυσιολογικά και παθοφυσιολογικά φαινόμενα που εμπλέκεται.

Έχει προταθεί ότι η AroJ επάγεται από κύτταρα που υφίστανται στρες κατά τη διάρκεια τραυματισμού του ιστού ή της αναδόμησής του, ώστε να προάγουν κυτταρικές αλληλοαποκρίσεις, οι οποίες διαταράσσονται λόγω των επιδρώντων στρεσογόνων παραγόντων. Η υπόθεση των ερευνητών βασίζεται στις εν δυνάμει ιδιότητες της AroJ να προάγει κυτταρικές αλληλοεπιδράσεις ιδιαίτερα σε περιόδους όπως της οργανογένεσης, που η εισαγωγή των ορθών κυτταρικών αλληλοαποκρίσεων είναι κριτικής σημασίας για την τελική έκβαση της ανατομικής και φυσιολογικής δομής του ιστού (Rosenberg and Silkensen, 1995).

Παρομοίως η διατήρηση των κυτταρικών αλληλοαποκρίσεων σε περιόδους ασθενειών είναι βασική προϋπόθεση για τη διατήρηση της ακεραιότητας του οργάνου. Η επαγωγή της AroJ μετά από οστική βλάβη με αποτέλεσμα την επαύξηση των κυτταρικών αλληλοαποκρίσεων θα μπορούσε θεωρητικά να είναι προς όφελος ιστών που υπόκεινται παθοφυσιολογικές μεταβολές (απόπτωση των κυττάρων του προστάτη αδένος επαγομένη από ευνουχισμό ή έμφρακτο μυοκαρδίου) με την πρόληψη των διαταραχών που επέρχονται στην αρχιτεκτονική των προσβεβλημένων ιστών.

Είναι λοιπόν φανερό ότι ο ρόλος της AroJ στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση κυττάρων δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί, αλλά φαίνεται ότι εξαρτάται από την μορφή της, τον κυτταρικό τύπο και το είδος του παράγοντα στρες.

Η κατανόηση του ρόλου της AroJ σε περιπτώσεις διαταραγμένων κυτταρικών αποκρίσεων (χρόνιες παθήσεις ή βλάβες ιστών) θα μπορούσε να υποδείξει δυνητικά θεραπευτικά μοντέλα που να τροποποιούν τις αποκρίσεις των οργάνων σε περίπτωση βλάβης, ακόμα και η χορήγηση της AroJ θα μπορούσε να επιφέρει εμφανή οφέλη.

Η έκφραση της ApoJ επάγεται επίσης από πολλούς στρεσογόνους παράγοντες όπως το θερμικό και οξειδωτικό στρες (Schwochau et al., 1998; Viard et al., 1999; Petropoulou et al., 2001), από κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες, όπως ο TGFβ (Wegrowski et al., 1999; Jin and Howe, 1999), TNFα (Sensibar et al., 1995), EGF και NGF (Gutacker et al., 1999), έκθεση σε υν και ιονίζουσα ακτινοβολία (Viard et al., 1999; Yang et al., 1999; Yang et al., 2000) και χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Miyake et al., 2000a,b; Muenchen et al., 2001).

Η επαγωγή της κλαστρίνης/ApoJ και η ιδιότητα της ως συνοδού-πρωτεΐνης φανερώνει την εμπλοκή της στην προστασία των κυττάρων από στρεσογόνους παράγοντες και φαίνεται να παράγεται και από τα γειτονικά κύτταρα που επιβιώνουν μετά από έκθεση τους σε αυτούς τους παράγοντες (French et al., 1993; Schwochau et al., 1998; Humphreys et al., 1999; Wilson and Easterbrook-Smith, 2000; Poon et al., 2000; Lakins et al., 2002; Poon et al., 2002).

Είναι αδιευκρίνιστο εάν η ApoJ εμπλέκεται άμεσα στη διαδικασία της απόπτωσης ή η εισαγωγή της είναι δευτερεύουσα στη διαδικασία της απόπτωσης και έμμεση ως προστατευτικός και αμυντικός μηχανισμός του κυττάρου. Επομένως ο ρόλος της ApoJ στον ενεργό κυτταρικό θάνατο είναι ακόμα διφορούμενος. Προσφάτως έχουν διατυπωθεί επιχειρήματα τα οποία προτείνουν την κλαστρίνη (ApoJ) ως μια μορφή της εκκρινόμενης πρωτεΐνης του θερμικού στρες, ή συνοδού μορίου, εν όψει της επαγόμενης της έκφρασης από θερμικό, οξειδωτικό ή μηχανικό στρες, την ποικιλία των προσδετών της, την ικανότητά της να αναστέλλει την επαγόμενη από στρες καθίζηση πρωτεϊνών, και τις αναφερόμενες δράσεις της σε *in vivo* συστήματα ως προστατευτικού μορίου κατά κυτταροτοξικών παραγόντων (Schwochau et al., 1998). Στα πλαίσια του ενεργού κυτταρικού θανάτου, αυτά τα τεκμήρια δεν συνηγορούν υπέρ του ρόλου της ApoJ ως προαποπτωτικού μορίου, που ενισχύονται περαιτέρω από την αποτυχία της στοχευόμενης υπερέκφρασης του γονιδίου να προκαλέσει αυξημένο ποσοστό θανάτου κυττάρων φωτοϋποδοχέων σε ένα διαγονιδικό πρότυπο (Jomary et al., 1999).

Η υπερέκφραση της εκκρινόμενης μορφής της ApoJ σε ανθρώπινα κύτταρα παρείχε αμφίβολα αποτελέσματα (Viard et al., 1999; Dumont et al., 2000; Petropoulou et al., 2001; Dumont et al., 2002). Η χορήγηση ή υπερέκφραση της εκκρινόμενης κλαστρίνης σε ανθρώπινα ανδρογονοεξαρτώμενα προστατικά *καρκινικά* κύτταρα LNCaP επέφερε ανθεκτικότητα στην επαγόμενη απόπτωση από τον TNFα (Sensibar et al., 1995; Sintich et al., 1999) και τα κατέστησε μη

ανδρογονοεξαρτώμενα *in vivo* (Miyake et al, 2000a,b). Σε καρκινικά επιδερμικά κύτταρα A341 η AroJ δεν μετέβαλε τις αποκρίσεις των κυττάρων σε θερμικό και οξειδωτικό στρες, όμως η εισαγωγή του γονιδίου σε αντινοσηματική κατεύθυνση ευαισθητοποίησε τα κύτταρα στους δύο προαναφερόμενους παράγοντες στρες και οδήγησε στην απόπτωση τους (Viard et al, 1999). Η υπερέκφραση της εκκρινόμενης AroJ επέφερε ανθεκτικότητα σε αιθανόλη και τετρβουτυλυδροπεροξείδιο, αλλά όχι σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (Petrovoulou et al., 2001; Dumont et al., 2002). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν επίσης ότι η εκκρινόμενη Aro J μειώνει το ρυθμό *πολλαπλασιασμού* προστατικών επιθηλιακών κυττάρων αθανатоποιημένων με SV40 (Bettuzi et al, 2002). Με τεχνικές ανοσοφθορισμού σε κύτταρα MCF-7 καλλιεργούμενων με βιταμίνη D₃, η χορήγηση της οποίας επιφέρει απόπτωση, αποδείχθηκε η αντι-αποπτωτική δράση της AroJ στην επαγόμενη απόπτωση των κυττάρων MCF-7 από τη βιταμίνη D₃ (Wilson et al., 1995). Είναι λοιπόν φανερό ότι ο ρόλος της κλαστρίνης/απολιποπρωτεΐνηςJ στον *πολλαπλασιασμό* και την απόπτωση κυττάρων δεν έχει ακόμη διευκρινισθεί, αλλά φαίνεται ότι εξαρτάται από την μορφή της, τον κυτταρικό τύπο και το είδος του στρες.

Όμως δεν είναι όλες οι μορφές της AroJ που επιδεικνύουν αυτές τις *αντι-αποπτωτικές* ιδιότητες. Πρόσφατα, μια πυρηνική μορφή 55 kDa της AroJ, επαγόμενη από ακτινοβολία *in vitro* έχει ανευρεθεί να στοχεύει στον πυρήνα, όπου φαίνεται να δρά ως σήμα θανάτου (Yang et al., 2000). Υπερέκφραση της πυρηνικής μορφής της σε αδενοκαρκινικά κύτταρα μαστών MCF -7 επάγει την απόπτωσή τους (Yang et al, 1999, Yang et al, 2000). Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι οι έρευνες σε *ποντίκια*, όπου το γονίδιο της AroJ εκμηδενίστηκε (Knockout) (Clu1) έχουν καταδείξει τις δύο όψεις των δράσεων της κλαστρίνης. Συγκεκριμένα, από την μια πλευρά η απουσία της μειώνει το ποσοστό νεκρών κυττάρων σε εγκεφαλική βλάβη που επάγεται από υποξεία-ισχαιμία, πράγμα που υποδηλώνει ότι το μόριο λειτουργεί φυσιολογικά για να επιτείνει τη βλάβη νευρώνων υπό τέτοιες συνθήκες (Han et al., 2001). Από την άλλη, στα ίδια πειραματόζωα με εκμηδενισμένο το γονίδιο, η αυτοάνοση βλάβη στο μυοκάρδιο αυξάνεται, υποδηλώνοντας ένα φυσιολογικά προστατευτικό ρόλο (McLaughlin et al., 2000).

Είναι πιθανόν, κατόπιν όλων αυτών ότι όπως συμβαίνει και με ορισμένα αλλά επίλεκτα μόρια, όπως η p53, η Bcl-X_L, η AroJ να μπορεί να δρά είτε ως προαγωγέας, είτε ως αναστολέας του κυτταρικού θανάτου, ανάλογα με το είδος του κυττάρου ή τις συγκεκριμένες μοριακές οντότητες.

15.1. Ο ρόλος της p21^{Waf1/Cip1} στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης

Η p21^{Waf1/Cip1}, που απομονώθηκε αρχικά ως πρωτεΐνη που επάγεται από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 (Xiong et al., 1993), έχει διττό ρόλο στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, ρυθμίζοντας τη σύνθεση του DNA αλλά και την ενεργότητα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs; Cyclin-dependent kinases). Η p21 αλληλεπιδρά, μέσω μιας αμινοτελικής θέσης πρόσδεσης, με τα σύμπλοκα διαφόρων κυκλινών-CDKs, τα οποία προωθούν το κύτταρο στη φάση S, και αναστέλλει την ενεργότητά τους με συνέπεια τη διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου (Sherr and Roberts, 1999). Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι η p21 προσδένεται με τη PCNA, έναν συνεργοποιητή των DNA πολυμερασών δ και ε, με αποτέλεσμα να αναστέλλει τη δράση αυτών των ενζύμων και επομένως της σύνθεσης του DNA (Waga et al., 1994; Kelman and O'Donnell, 1995; Gulbis et al., 1996). Αν και οι παραπάνω πληροφορίες συμφωνούν με το συμπέρασμα, ότι η p21 δρα ως αναστολέας της προόδου του κυτταρικού κύκλου, αρκετές πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η p21 λειτουργεί επίσης ως θετικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου. Μολονότι έχει δείχθει ότι η p21 αναστέλλει μεν τα σύμπλοκα κυκλίνης E-CDK2, συμμετέχει δε στη συγκρότηση και την ενεργοποίηση των συμπλόκων κυκλίνης D1-CDK4/6, τα οποία δρουν ως αισθητήρες αυξητικών παραγόντων στη G1/S φάση του κυτταρικού κύκλου (LaBaer et al., 1997; Cheng et al., 1999; Weiss et al., 2000).

Επιπροσθέτως των λειτουργιών της στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, η p21 παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης (Gorospe et al., 1999). Για παράδειγμα, τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα, όπως τα μυϊκά (Lawlor et al., 2000), αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (Cheng et al., 2000) και μακροφάγα (Asada et al., 1999) εκφράζανε αυξημένα επίπεδα p21 και η αναστολή της έκφρασης αυτής της πρωτεΐνης είχε ως συνέπεια τον αποπτωτικό θάνατο των κυττάρων. Η p21 προφανώς δρα ως συντονιστής της σύνδεσης του DNA και της διακοπής του κυτταρικού κύκλου, καθώς κύτταρα στα οποία έχει απαλειφθεί το γονίδιο της p21 μπορούν να εμφανίσουν αντιγραφή κατεστραμμένου DNA, με αποτέλεσμα τον εσωτερικό αναδιπλασιασμό και την επακόλουθη απόπτωση (Waldman et al., 1996; Stewart et al., 1999a; Stewart et al., 1999b). Επιπλέον, η p21 μπορεί να προστατέψει από θάνατο διάφορους τύπους κυττάρων, που ακολουθούν αντικαρκινικές θεραπείες (Gorospe et al., 1996; Gorospe et al., 1997; Stewart et al.,

1999a; Zhang et al., 1999a). Η μείωση ή η απουσία της έκφρασης της p21 ευαισθητοποιεί τα κύτταρα σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες όπως ανδριαμυκίνη, ετοποσίδιο, ταξόλη (paclitaxel), βινκριστίνη (vincristine), cis-πλατίνα (cisplatin) ή γ-ακτινοβολία (Waldman et al., 1996; Polyak et al., 1996; Waldman et al., 1997; Stewart et al., 1999b; Zhang et al., 1999a; Zhang et al., 1999b; Tian et al., 2000). Περιληπτικά, η p21 διεξάγει σημαντικές λειτουργίες τόσο στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου όσο και στην κυτταρική επιβίωση. Η p21 επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο αρνητικά αλλά και θετικά και δρα ως θετικός παράγοντας της κυτταρικής επιβίωσης κατά την τελική διαφοροποίηση κυττάρων ή κατά την εφαρμογή γονιδιατοξικού στρες.

Η p21 μπορεί να φωσφορυλιωθεί από την AKT/PKB κινάση (Scott et al., 2000; Zhou et al., 2001; Rossig et al., 2001; Ying Li et al., 2002). Η AKT/PKB είναι μια κινάση που καταστέλλει την κυτταρική απόπτωση και αυξάνει την επιβίωση των κυττάρων και είναι υπερενεργοποιημένη σε πολλούς όγκους τελικού σταδίου (Wu et al., 1998). Η p21 *φωσφορυλιώνεται* στο καρβοξυτελικό της άκρο, στις θέσεις Thr¹⁴⁵ και Ser¹⁴⁶, από την AKT/PKB κινάση *in vitro* και *in vivo*. Η φωσφορυλίωση της Thr¹⁴⁵ αναστέλλει την πρόσδεση της p21 στον PCNA, ενώ η φωσφορυλίωση της Ser¹⁴⁶ ενισχύει σημαντικά τη σταθερότητα της πρωτεΐνης p21. Κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος με ενεργή AKT/PKB έδειξαν αυξημένη σταθερότητα της p21 και εμφάνισαν μεγαλύτερη αντίσταση στις τοξικές ιδιότητες της ταξόλης (taxol). Η τροποποιημένη p21 από την ενεργή AKT/PKB δεν αναστέλλει την κυκλίνη E-CDK2, αλλά προσδένεται στο σύμπλοκο κυκλίνη D1-CDK4 και το ενεργοποιεί (Li et al., 2002). Τα παραπάνω στοιχεία δείχνουν πως τα αυξημένα επίπεδα της p21 στους όγκους οφείλονται, κατά ένα μέρος, στην φωσφορυλίωση της από την ενεργή AKT/PKB κινάση. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση και η υπερέκφραση της p21 αποτελούν, προφανώς, έναν νέο μηχανισμό ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από την AKT/PKB.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ

Παρατίθεται παρακάτω μια λίστα με τα σημαντικότερα αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μελέτης.

Υλικά	Εταιρεία
RPMI-1640	Biochrom KG, Germany
DMEM	Biochrom KG, Germany
Ορός εμβρύου μόσχου (FCS)	Biochrom KG (Seromed), Germany
Πεκικιλλίνη/Στρεπτομυκίνη (10000 IU/ml / 10000 µg/ml)	Biochrom KG, Germany
L-γλουταμίνη (200 mM)	Biochrom KG, Germany
Θρυψίνη - EDTA	Biochrom KG, Germany
PBS	Sigma Chemical Co.
Θρυπτόνη (Bacto-tryptone)	Lab M, U.K.
Εκχύλισμα ζύμης (Bacto-yeast extract)	Lab M, U.K.
Άγαρ	Lab M, U.K.
Διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO)	Sigma Chemical Co.
Πολυβρίνη (Polybrene)	Aldrich Chemical Co.
1 kb DNA ladder	Life Technologies Inc.
Lambda DNA-Hind III digest	Life Technologies Inc.
Lambda DNA-BstEII Digest	Life Technologies Inc.
Ένζυμα περιορισμού DNA	New England Biolabs
Αγαρόζη	Life Technologies Inc.
Πρότυποι μάρτυρες πρωτεϊνών	BioRad Laboratories, USA

(Kaleidoscope Prestained Standards)	
QiaGen kit απομόνωσης πλασμιδιακού DNA	QiaGen, Germany
Nucleobond kit απομόνωσης πλασμιδιακού DNA	Nucleobond
Μεμβράνες Genescreen (RNA)	NEN, DuPont, USA
Μεμβράνες νιτροκυτταρίνης	Schleicher & Schuell, Optitran BA-S-85
SuperSignal West Pico Chemiluminescent kit	Pierce, USA
ECL kit	Amersham International
Random Primer Labelling kit	Pharmacia LKB
Αντισώματα	SantaCruz Biotech, USA BD Pharmigen/Transduction Laboratories, USA Dako
Διάφορα στερεά χημικά (MOPS, SDS, EDTA, NaCl, NaOH, Tris, βορικό οξύ, LiCl, ουρία, βρωμοφαινόλη, κρυσταλλικό ιώδες, οξικό νάτριο, γλυκίνη, βρωμιούχο αιθίδιο, φαινόλη, ακρυλαμίδιο, δις-ακρυλαμίδιο)	Riedel, Germany ή Sigma Chemical Co.
Διάφορα υγρά χημικά (Αιθανόλη, χλωροφόρμιο, ισοαμλική αλκόλη, ισοπροπανόλη, οξικό οξύ, φορμαλδεΰδη, γλυκερόλη, DEPC, β-μερκαπτοαιθανόλη, TEMED)	Riedel, Germany ή Sigma Chemical Co. ή BDH-Merck (Analar)
Πλαστικά υλικά κυτταροκαλλιέργειας (Τρυβλία, πιπέττες)	CellTek
Πλαστικοί σωλήνες (15 ml, 50 ml)	Falcon
Μικροσωλήνες	Eppendorff, Germany

ΜΕΘΟΔΟΙ

ΕΝΟΤΗΤΑ Α: ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

1.2. Παρασκευή L-broth (Luria-Bertani; LB) και τριβλίων με L-άγαρ (L- agar)

Η παρασκευή των τριβλίων αυτών έγινε παράλληλα με την παρασκευή διαλύματος L- Broth. 10g θρυπτόνης (Bacto-tryptone), 5g εκχυλίσματος ζύμης (Bacto-yeast extract) και 10g χλωριούχου νατρίου (Riedel, Germany), διαλύθηκαν με ανάδευση και αύξηση της θερμοκρασίας σε 1000 ml δις απεσταγμένου νερού και το διάλυμα μεταβιβάστηκε σε 2 φιάλες των 500 ml. Στη μια φιάλη προστέθηκαν 7.5g άγαρ και αφού έγινε αποστείρωση σε αυτόκαυστο, η L-άγαρ αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για να κατέβει η θερμοκρασία *στους* 55°C και στη συνέχεια προστέθηκε στη φιάλη αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml. Τέλος τοποθετήθηκαν 25 ml L-άγαρ σε καθένα από 20 τρυβλία, και η L-άγαρ αφέθηκε να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου και να αφυδατωθεί σε επωαστικό κλίβανο *στους* 37°C. Όταν ετοιμάστηκαν τα τρυβλία με τη πολυμερισμένη L-άγαρ περιτυλίχθηκαν με φιλμ παραφίνης (parafilm) και τοποθετήθηκαν στον ψυχρό θάλαμο. Τα τρυβλία L-άγαρ με την αμπικιλίνη διατηρούνται για περίπου ένα μήνα στους 4°C.

25 mg/ml Αμπικιλίνης: Διάλυμα του άλατος νατρίου της αμπικιλίνης (Sigma chemical Co.) σε συγκέντρωση 25 mg/ml σε αποστειρωμένο ddH₂O φιλτραρίστηκε μέσω ενός αποστειρωμένου μικροφίλτρου 0.45 µm και διατηρήθηκε στους -20°C σε μικρές ποσότητες (aliquots).

2.2. Παρασκευή βακτηρίων επιδεκτικών προς μετασχηματισμό (competent cells)

Για να δημιουργηθούν επιδεκτικά προς μετασχηματισμό βακτήρια, απαιτείται η κατεργασία τους με παράγοντες που ευνοούν το σχηματισμό οπών/καναλιών στο κυτταρικό τους τοίχωμα, που θα επιτρέψουν την εισαγωγή με παθητική διάχυση, εξωγενώς προστιθέμενου DNA. Η κατεργασία αυτή πρέπει να γίνεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης των βακτηρίων.

Τα συνηθισμένα βακτηριακά στελέχη για την παρασκευή βακτηρίων επιδεκτικών προς μετασχηματισμό με πλασμίδια είναι τα στελέχη *E. Coli* HB101, DH5α, JM109 και MC1061. Αυτά τα βακτηριακά στελέχη χρησιμοποιήθηκαν αφού υπέστησαν επεξεργασία ώστε να γίνουν 'ικανά κύτταρα' (competent cells), δηλαδή κύτταρα ικανά να μετασχηματιστούν (να δεχτούν πλασμίδια).

Αρχικά, μη ικανά βακτήρια τοποθετήθηκαν σε 5 ml L-Broth και επωάστηκαν σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C για 24 ώρες ώστε να αναπτυχθούν. Την επομένη ημέρα, 0.5 ml της ολονύχτιας υγρής βακτηριακής καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 20 ml L-broth σε μια αποστειρωμένη κωνική φιάλη και τα βακτήρια επωάστηκαν για 2 περίπου ώρες σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C για να αναπτυχθούν μέχρις ότου η OD₆₀₀ ήταν 0.3. Κατά τη διάρκεια της επώασης των βακτηρίων παρασκευάστηκαν τα διαλύματα Α και Β, τα οποία τοποθετήθηκαν στον πάγο. Η υγρή καλλιέργεια των βακτηρίων φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 5000 στροφές, στους 4°C και αφού αναρροφήθηκε το υπερκείμενο, το βακτηριακό ίζημα εναιωρήθηκε σε 1 ml διαλύματος Α. Στη συνέχεια προστέθηκαν άλλα 9 ml διαλύματος Α και μετά την ανάμιξη τα βακτήρια φυγοκεντρήθηκαν και πάλι για 5 λεπτά, στις 5000 στροφές και στους 4°C. Το υπερκείμενο αναρροφήθηκε προσεκτικά και το βακτηριακό ίζημα εναιωρήθηκε με 1 ml διαλύματος Β. Αφού προστέθηκε άλλα 9 ml διαλύματος Β, το εναιώρημα αφέθηκε στον πάγο για 30 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 5000 στροφές και στους 4°C. Το βακτηριακό ίζημα εναιωρήθηκε σε 1 ml διαλύματος Β που περιείχε 10% γλυκερόλη (Riedel, Germany) και δείγματα των 50-100 μl βακτηρίων τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένους σωλήνες errendorff και αποθηκεύτηκαν στους -70°C για μελλοντική χρήση.

Τα 'ικανά κύτταρα' διατηρήθηκαν σε χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂) και χλωριούχο ρουβίδιο (RbCl₂) διότι τα ιόντα Ca²⁺ δημιουργούν σύμπλοκα με το φώσφορο του DNA και κατ' αυτόν τον τρόπο καθιζάνουν ως ίζημα. Μέσω του βακτηριακού μετασχηματισμού αυξάνεται η διαπερατότητα της μεμβράνης και τα κύτταρα αρχίζουν να εκκρίνουν έναν παράγοντα που ονομάζεται 'παράγοντας μετασχηματισμού' (competent factor).

Διάλυμα Α: 10 mM MOPS PH 7.0, 10 mM RbCl₂

Διάλυμα Β: 10 mM MOPS PH 6.5, 10 mM RbCl₂, και 50 mM CaCl₂

Διάλυμα αποθήκευσης βακτηρίων: 10 mM MOPS PH 6.5, 10 mM RbCl₂, 50 mM CaCl₂ και 10% γλυκερόλη

3.2. Μετασχηματισμός βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA

50-100 μl ικανών βακτηριακών στελεχών *E. Coli* αναμίχθηκαν με περίπου 20 μl πλασμιδιακού DNA (100-500 ng DNA) σε σωλήνες erpendorff και αφέθηκαν στον πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια εκτέθηκαν σε θερμοκρασία 42°C για δύο λεπτά έτσι ώστε να υποστούν θερμικό στρες (heat shock) και να γίνει εισαγωγή του πλασμιδίου στα βακτηριακά κύτταρα. Προστέθηκε 1 ml L-Broth στους σωλήνες erpendorff και επωάστηκαν στους 37°C για μία ώρα. Τα βακτήρια φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στις 6500 στροφές και στους 4°C, αφαιρέθηκε το περισσότερο υπερκείμενο και το βακτηριακό ίζημα εναιωρήθηκε σε 300 μl υπερκειμένου. Τέλος με την υγρή αυτή καλλιέργεια εμβολιάσθηκαν τρυβλία L-άγαρ σύν 100 μg/ml αμπικιλλίνης με τη βοήθεια μιας ράβδου που διατηρήθηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να απορροφηθεί το εμβολίασμα. Στη συνέχεια τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C για όλη τη νύχτα ώστε να σχηματιστούν αποικίες βακτηρίων. Να σημειωθεί ότι μετά την ολονύχτια επώαση αναπτύσσονται με τη μορφή αποικιών μόνον τα βακτήρια στα οποία έχει εισέλθει ο πλασμιδιακός φορέας, ο οποίος φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό (π.χ. αμπικιλλίνη).

4.2. Ανάπτυξη υγρών καλλιεργειών βακτηρίων

Για απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρούς όγκους (mini prep) ήταν απαραίτητη η ανάπτυξη υγρών καλλιεργειών βακτηρίων. 5 ml L-Broth και 100 μg/ml αμπικιλλίνης εμβολιάσθηκαν με αποικίες ή αποθέματα γλυκερόλης βακτηρίων, με τη χρήση κρικοφόρου στυλεού και επωάστηκαν σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα (orbital shaker) στους 37°C για όλη τη νύχτα (>16 ώρες).

Για απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλους όγκους (maxi prep), η ανάπτυξη υγρών καλλιεργειών βακτηρίων γινόταν με ανάμιξη 0.5 ml ανεπτυγμένης καλλιέργειας βακτηρίων σε 5 ml L-Broth και 100 μg/ml αμπικιλλίνης σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C για όλη τη νύχτα (>16 ώρες) και στη

συνέχεια με τον εμβολιασμό 100 ml L-Broth και 100 µg/ml αμπικιλλίνης με 5 ml της ολονύχτιας αναπτυγμένης βακτηριακής καλλιέργειας και επώαση σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C για όλη τη νύχτα.

5.2. Παρασκευή βακτηριακών αποθεμάτων γλυκερόλης

Τα αποθέματα γλυκερόλης παρασκευάζονταν αναμιγνύοντας 1.2 ml αναπτυγμένης υγρής καλλιέργειας βακτηρίων και 300 µl γλυκερόλης (10% τελική συγκέντρωση γλυκερόλης) (Riedel, Germany). Τα αποθέματα διατηρούνταν στους -70°C για περαιτέρω χρήση.

6.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρούς όγκους (mini prep)

1.5 ml υγρής καλλιέργειας βακτηρίων, προερχόμενες από αποικίες (παρ. 2.4), 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 200 µl διαλύματος λύσης βακτηρίων. Μετά από 5 λεπτά επώασης σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκαν 400 µl αλκαλικού διαλύματος και το μίγμα αφέθηκε στον πάγο για 5 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 300 µl διαλύματος οξικού νατρίου pH 5.2, έγινε ελαφριά ανάειξη και το εναιώρημα αφέθηκε στον πάγο για 10 λεπτά (η χρήση οξικού νατρίου pH 5.2 υποβοηθεί στη καθίζηση πρωτεϊνών, RNA και χρηματοσωμικού DNA). Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, στις 13000 στροφές στους 4°C, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε έναν καθαρό αποστειρωμένο σωλήνα errendorff και προστέθηκαν 0.6 όγκοι ισοπροπανόλης (Riedel, Germany). Το πλασμιδιακό DNA αφέθηκε να κατακρημνιστεί για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 13000 στροφές στους 4°C. Το ίζημα DNA εκπλύθηκε με 70% αιθανόλη και ξηράνθηκε σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού. Το πλασμιδιακό DNA εναιωρήθηκε σε 50 µl 1xTE pH 8.0 και αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

Ο έλεγχος του παρασκευάσματος γίνεται μετά από πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα (παρ. 2.22) και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (παρ. 2.20).

Διάλυμα λύσης βακτηρίων (Bacterial lysis buffer): 50 mM Γλυκόζη, 25 mM Tris pH8.0, 10 mM ml EDTA pH 8.0 και 4 mg/ml λυσοζύμη

Αλκαλικό διάλυμα: 0.2 NaOH, 1% SDS

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

7.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλους άγκους (maxi prep)

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA έγινε είτε με τη χρήση QiaGen kit ή με τη χρήση Nucleobond kit.

Οι καλλιέργειες των βακτηρίων που αναπτύχθηκαν σε όγκο 50-100 ml L-Broth με 100 µg/ml αμπικιλίνης φυγοκεντρήθηκαν για 25 λεπτά, στις 5200 στροφές και στους 4°C. Το βακτηριακό ίζημα εναιωρήθηκε σε 4 ml ρυθμιστικού διαλύματος εναιώρησης (resuspension buffer) που περιείχε RNAση και ήταν διατηρημένο στους 4°C, με δίνη (vortexing). Στη συνέχεια προστέθηκαν 4 ml αλκαλικού διαλύματος, έγινε ελαφριά ανάμιξη και το εναιώρημα αφέθηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος προστέθηκαν 4 ml 'ρυθμιστικού διαλύματος εξουδετέρωσης' (neutralization buffer), έγινε ελαφριά ανάμιξη και το εναιώρημα αφέθηκε στον πάγο. Μετά από 20 λεπτά έγινε φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές, για 30 λεπτά και στους 4°C. Στο μεταξύ οι ειδικές στήλες 'QIAGEN tip-100 ή Nucleobond tip-100' εκπλύθηκαν με 4 ml 'ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης' (equilibration buffer). Στη συνέχεια το υπερκείμενο που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση μεταβιβάστηκε στις στήλες και αφέθηκε να περάσει διαμέσου των στηλών, στα οποία κατακρατήθηκε το πλασμιδιακό DNA. Μετά οι στήλες εκπλύθηκαν 2 φορές με 10 ml 'ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης' (wash buffer) και το πλασμιδιακό DNA εκχυλίστηκε από τις στήλες με 5 ml 'ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης' (elution buffer). Στη συνέχεια προστέθηκαν 3.5 ml ισοπροπανόλης (Riedel, Germany), έγινε ανάμιξη (vortexing) και το πλασμιδιακό DNA αφέθηκε να κατακρημνιστεί για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές για 30 λεπτά στους 4°C για τη συλλογή του πλασμιδιακού DNA. Ακολούθησε έκπλυση με 70% αιθανόλη και ξήρανση σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού. Το πλασμιδιακό DNA εναιωρήθηκε σε 100-200 µl 1xTE pH8.0, μεταφέρθηκε σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα erpendorff και αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

Η ποσότητα του απομονωμένου DNA υπολογίζεται φωτομετρικά, με μέτρηση στα 260 nm και με βάση τον τύπο: Οπτική πυκνότητα (O.D.) =1 αντιστοιχεί σε 50 µg DNA. Ελέγχουμε το DNA μετά από πέψη με ενδονουλεάσες περιορισμού (παρ. 22.2) και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (παρ. 20.2).

ΕΝΟΤΗΤΑ Β: ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

8.2. Κυτταρικές σειρές και καλλιέργεια κυττάρων

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν (Πίνακας 1):

Πίνακας 1. Περιγραφή κυτταρικών σειρών

Κυτταρική σειρά	Περιγραφή	Βιβλιογραφική αναφορά
Jurkat κλώνος E6-1	Ανθρώπινη T-λεμφοκυτταρική καρκινική σειρά	(ATCC No: TIB-152, American Tissue Culture Collection)
Ψ2	Οικοτροπική κυτταρική σειρά πακεταρίσματος ρετροϊών	Mann et al., (1983)
PA317	Αμφοτροπική κυτταρική σειρά πακεταρίσματος ρετροϊών	Miller and Buttimore, (1986)

Jurkat κλώνος E6-1 (ATCC No: TIB-152, American Tissue Culture Collection) είναι μια ανθρώπινη T-λεμφοκυτταρική καρκινική σειρά, η οποία καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 (Life Technologies, Inc) εμπλουτισμένο με 10% θερμοαδρανολογημένο (heat-inactivated) ορό εμβρύου βοός (foetal calf serum; FCS), 2 mM L-γλουταμίνη, 100 units/ml πενικιλίνη και 100 µg/ml στρεπτομυκίνη στους 37°C, 5%CO₂. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων Jurkat διεξαγόταν κάθε 3-4 ημέρες.

Η οικοτροπική Ψ2 (Mann et al., 1983) και η αμφοτροπική κυτταρική σειρά πακεταρίσματος ρετροϊών PA317 (Miller and Buttimore, 1986), είναι αυθόρμητα αθανатоποιημένοι ινοβλάστες τρωκτικών NIH3T3, κατάλληλα κατασκευασμένοι ώστε να έχουν τη δυνατότητα πακεταρίσματος ρετροϊών. Οι κυτταρικές σειρές Ψ2 και PA317 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (foetal calf serum; FCS), 2 mM L-γλουταμίνη, 100 IU/ml πενικιλίνη και 100 µg/ml στρεπτομυκίνη στους 37°C, 5%CO₂. Τα υλικά κυτταροκαλλιέργειας ήταν από τη Biochrom KG, Germany.

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων Jurkat διεξαγόταν στην εστία κυτταροκαλλιέργειας κάθετης νηματικής ροής (Tissue culture hood) κάθε 3-4 ημέρες σε αναλογία 1:4, 1:8 ή 1:16 (παρ. 2.9). Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων Ψ2 και PA317 σε πλήρες ταπήτιο διεξαγόταν μετά από την έκπλυση τους δύο φορές με PBS (Phosphate Buffered Saline) (Sigma Chemical Co.) και επεξεργασία με 1.0-1.5 ml θρυψίνης-EDTA (Biochrom KG, Germany).

Η ανάπτυξη οποιασδήποτε κυτταρικής καλλιέργειας έχει συνήθως απαίτηση εμπλουτισμού του βασικού καλλιεργητικού υλικού με ορό. Μη ταυτοποιημένα ακόμη συστατικά του ορού, κυρίως αυξητικοί παράγοντες (growth factors), είναι αναγκαίοι για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Εξαιρετική πηγή των παραγόντων αυτών θεωρείται ο ορός από έμβρυο μόσχου ο οποίος και χρησιμοποιήθηκε.

Πλήρες θρεπτικό υλικό κυττάρων RPMI-1640: Σε 440 ml RPMI-1640 που περιείχε 3.7g/l NaHCO_3 και 1.0g/l D-γλυκόζης προστέθηκαν 50 ml θερμοαδρανοποιημένου ορού από έμβρυο μόσχου, 5.0 ml 10000IU/ml πενικιλίνης και 10000μg/ml στρεπτομυκίνης και 5 ml 200 mM L- γλουταμίνης. Οι τελικές συγκεντρώσεις που προέκυψαν ήταν: 10% ορός από έμβρυο μόσχου, 100 μg/ml στρεπτομυκίνης, 100 U/ml πενικιλίνης και 2 mM L- γλουταμίνης.

Πλήρες θρεπτικό υλικό κυττάρων DMEM: Σε 440 ml Dulbecco's MEM (DMEM) που περιείχε 3.7g/l NaHCO_3 και 1.0g/l D-γλυκόζης προστέθηκαν 50 ml ορού από έμβρυο μόσχου, 5.0 ml 10000IU/ml πενικιλίνης και 10000μg/ml στρεπτομυκίνης και 5 ml 200 mM L- γλουταμίνης. Οι τελικές συγκεντρώσεις που προέκυψαν ήταν: 10% ορός από έμβρυο μόσχου, 100 μg/ml στρεπτομυκίνης, 100 U/ml πενικιλίνης και 2 mM L- γλουταμίνης.

Ρυθμιστικό διάλυμα φυσιολογικού ορού - φωσφορικού άλατος (Phosphate Buffered Saline; PBS): Μία ταμπλέτα PBS (Sigma chemical Co.) διαλύθηκε με ανάδευση σε 200 ml δίζ-απεσταγμένου νερού και προέκυψαν οι εξής συγκεντρώσεις: 0.01 M ρυθμιστικού φωσφορικού άλατος, 0.0027 M χλωριούχου καλίου και χλωριούχου νατρίου σε pH 7.4. Η PBS αποστειρώθηκε στο αυτόκαυστο.

Θερμοαδρανοποιημένος ορός εμβρύου βοός: Ορός εμβρύου βοός επεξεργασμένος για 1 ώρα στους 56°C.

9.2. 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 νηματικής ροής (Tissue culture hood).

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων Jurkat διεξάγονταν σε πλαστικά τρυβλία καλλιέργειας βακτηρίων 10 cm. Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων Jurkat, επιλέχθηκαν τρυβλία των 100 cm, με κύτταρα σε υψηλή πυκνότητα (confluent). 2.0, 1.0 ή 0.5 ml εναιωρήματος κυττάρων τοποθετήθηκαν σε καθαρά αποστειρωμένα τρυβλία και προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI-1640 σε τελικό όγκο 10 ml ώστε να δώσει μια αναλογία σποράς των κυττάρων 1:5, 1:10 ή 1:20, αντίστοιχα. Στη συνέχεια τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5%CO₂, ώστε να αναπτυχθούν τα κύτταρα εκ νέου.

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων Ψ2 και PA317, αρχικά επιλέχθηκαν τρυβλία των 10 cm, με κύτταρα σε πλήρες ταπτήριο (confluent) και το θρεπτικό υλικό DMEM αναρροφήθηκε με τη βοήθεια αποστειρωμένων πιπετών Pasteur. Στη συνέχεια τα τρυβλία εκπλύθηκαν δύο φορές με 10 ml PBS και ύστερα προστέθηκε 1 ml διάλυμα θρυψίνης – EDTA (Biochrom KG, Germany) σε αυτά. Το διάλυμα περιείχε 0.05% θρυψίνη / 0.02% EDTA (w/v) σε PBS χωρίς ιόντα ασβεστίου (Ca²⁺) και μαγνησίου (Mg²⁺). 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 PBS στα τρυβλία, ώστε να γίνουν οι επιθυμητές διαιρέσεις, συνήθως σε αναλογίες 1:4, 1:8 ή 1:16. Τέλος αφού προστέθηκε ο κατάλληλος όγκος εναιωρήματος κυττάρων στα νέα τρυβλία, ανάλογα με τη διαίρεση, προστέθηκαν και 10 ml πλήρους DMEM και τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5%CO₂, ώστε να αναπτυχθούν τα κύτταρα εκ νέου.

Ανάπτυξη, διατήρηση και αποθήκευση κυτταρικών σειρών

10.2. Διατήρηση των κυττάρων σε υγρό άζωτο (κατάψυξη κυττάρων)

Η μακροχρόνια διατήρηση των κυτταρικών σειρών είναι δυνατή με την τοποθέτηση τους σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Τα κύτταρα αποθηκεύονται σε υγρό άζωτο (-192°C) σε υλικό που αποτελείται από 90% FCS και 10% διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO) (Tissue culture grade, Sigma Chemical Co.).

Για τη διατήρηση και τη βαθιά κατάψυξη των κυττάρων Jurkat, επιλέχθηκαν τρυβλία με κύτταρα σε 70-80% πυκνότητα. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε ένα σωλήνα Falcon 15 ml και φυγοκεντρήθηκαν στο ψυχρό θάλαμο για 5-10 λεπτά στις 1500-2000 rpm, και αφού οι σωλήνες μεταφέρθηκαν στην εστία κυτταροκαλλιέργειας κάθετης νοηματικής ροής, το υπερκείμενο αναρροφήθηκε προσεκτικά ώστε να μην υποστεί ζημιά το κυτταρικό ίζημα. Στη συνέχεια, το κυτταρικό ίζημα εκπλύθηκε με 10 ml PBS και επαναφυγοκεντρήθηκε. Σε κάθε σωλήνα Falcon προστέθηκαν 2 ml ορού (FCS) που περιείχε διμέθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO) (Sigma Chemical Co., Germany) και τα κύτταρα εναιωρήθηκαν με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης πλαστικής πιπέττας. Να σημειωθεί ότι το διμέθυλο-σουλφοξείδιο κάνει τις μεμβράνες ημιδιαπερατές, ενώ ταυτόχρονα ελαχιστοποιεί τον μεταβολισμό των κυττάρων. Επίσης παρεμποδίζει το σχηματισμό κρυστάλλων προστατεύοντας έτσι την ακεραιότητα των κυτταρικών μεμβρανών. Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρθηκε σε 2 ειδικές αμπούλες (cryovials) των 2 ml, για κάθε Falcon (1 ml εναιωρήματος ανά Falcon). Οι αμπούλες τοποθετήθηκαν σε ειδικό ισοθερμικό δοχείο ('Mister Frosty', NalGene) που περιείχε ισοπροπανόλη και μεταφέρθηκαν στους -70°C για όλη τη νύχτα ώστε να παγώσουν σταδιακά ($1^{\circ}\text{C}/\text{λεπτό}$). Την επομένη ημέρα μεταφέρθηκαν στο υγρό άζωτο για μακροπρόθεσμη διατήρηση.

Για τη διατήρηση και τη βαθιά κατάψυξη των κυττάρων Ψ2 και PA317, επιλέχθηκαν τρυβλία με κύτταρα σε ημι-πλήρες ταπήτιο (semi-confluent) και αποκολλήθηκαν με θρυψίνη-EDTA όπως περιγράφεται στην παράγραφο 'ανακαλλιέργεια κυττάρων' (παρ. 2.9). Στη συνέχεια προστέθηκαν 9 ml PBS στα τρυβλία με τα αποκολλημένα κύτταρα και τη θρυψίνη-EDTA και τα εναιωρήματα των κυττάρων μεταβιβάστηκαν σε αποστειρωμένους σωλήνες Falcon των 15 ml. Έγινε φυγοκέντρηση στο ψυχρό θάλαμο για 5-10 λεπτά στις 1500-2000 rpm, και

αφού οι σωλήνες μεταφέρθηκαν στην εστία κυτταροκαλλιέργειας κάθετης νοηματικής ροής, το υπερκείμενο αναρροφήθηκε προσεκτικά ώστε να μην υποστεί ζημιά το κυτταρικό ίζημα. Στη συνέχεια, σε κάθε σωλήνα Falcon προστέθηκαν 2 ml ορού (FCS) που περιείχε διμέθυλο-σουλφοξειδίο (DMSO) (Sigma Chemical Co.), τα κύτταρα εναιωρήθηκαν και 1 ml του εναιωρήματος των κυττάρων μεταφέρθηκε σε κάθεμια από 2 ειδικές αμπούλες (cryovials) των 2 ml. Οι αμπούλες τοποθετήθηκαν σε ειδικό ισοθερμικό δοχείο ('Mister Frosty', NalGene) που περιείχε ισοπροπανόλη και μεταφέρθηκαν στους -70°C για όλη τη νύχτα ώστε να παγώσουν σταδιακά ($1^{\circ}\text{C}/\text{λεπτό}$). Την επομένη ημέρα μεταφέρθηκαν στο υγρό άζωτο για μακρυπρόθεσμη διατήρηση.

Μέσο διατήρησης κυττάρων: 1.8 ml FCS και 0.2 ml DMSO (FCS –10% DMSO)

11.2. Απόψυξη και ανασύσταση κυττάρων

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 φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας των 25cm^2 όπου προστέθηκαν σιγά σιγά 8 ml πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM για Ψ2 και PA317 ή RPMI-1640 για κύτταρα Jurkat. Τα κύτταρα ανακινήθηκαν ελαφρά και τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C , $5\%\text{CO}_2$.

Την επόμενη ημέρα, αφού τα κύτταρα Ψ2 και PA317 προσκολλήθηκαν στον πάτο των φλασκών, το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και προστέθηκαν 6 ml φρέσκου πλήρους DMEM και οι φλάσκες επανατοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο, ώσπου τα κύτταρα να σχηματίσουν πλήρες ταπήτιο. Όταν αυτά αναπτύχθηκαν σε πλήρες ταπήτιο θρυψινοποιήθηκαν και ανακαλλιεργήθηκαν όπως περιγράφηκε παραπάνω (παρ. 2.9). Αντίθετα, τα κύτταρα Jurkat επωάστηκαν για 2 ώρες στους 37°C , $5\%\text{CO}_2$, μετά την απόψυξη τους για να προσαρμοστούν στην καλλιέργεια και στη συνέχεια συλλέχθηκαν σε σωλήνα Falcon 15 ml και φυγοκεντρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου στις 1500 rpm για 10 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα εναιωρήθηκε σε 2 ml πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI-1640 και μεταφέρθηκε σε τρυβλία 10 cm όπου προστέθηκαν άλλα 8 ml πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI-1640 και τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C , $5\%\text{CO}_2$ για να αναπτυχθούν. Η διαδικασία αυτή των

κυττάρων Jurkat μετά την απόψυξη τους θεωρήθηκε απαραίτητη καθώς θεωρούνται πιο ευαίσθητα κύτταρα στη παρουσία DMSO από ότι οι ινοβλάστες τρωκτικών Ψ2 και PA317.

12.2. Επεξεργασία κυττάρων Jurkat με γενιστενίνη (Gen) ή δαϊζείνη (Dz)

Η γενιστενίνη (GEN; Genistein) ή 4',5,7-τριϋδροξυ-ισοφλαβόνη και η δαϊζείνη ή 4',7-διϋδροξυ-ισοφλαβόνη (Dz; daizein) (Sigma Chemical Co., Germany) διαλύθηκαν σε ψυχρή 100% αιθανόλη. Έγινε σπορά 1.5×10^6 κυττάρων Jurkat σε τρυβλία 10 cm και ακολούθησε επώαση τους για 2 ώρες σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI-1640 τους 37°C , 5%CO₂. Μετά το πέρας των 2 ωρών χορηγήθηκε γενιστενίνη ή δαϊζείνη σε συγκεντρώσεις 0, 10, 20, 30, 40 και 50 μM ή αιθανόλη (0.05%.) και τα κύτταρα επωάστηκαν 24 ώρες στους 37°C , 5%CO₂. Κύτταρα με ή χωρίς αιθανόλη ή γενιστενίνη ή δαϊζείνη συλλέχθηκαν, απομονώθηκαν από αυτά χαμηλού μοριακού βάρους γενωμικό DNA (παρ. 17.2) και πρωτεΐνες (παρ. 20.2) και αναλύθηκαν σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται παρακάτω (παρ. 18.2 και παρ. 21.2, αντίστοιχα).

13.2. Χορήγηση 2-μεθοξυστραδιόλης (2-ME) σε κύτταρα Jurkat

Η 2-μεθοξυοιστραδιόλη (2-ME) (Sigma Chemical Co., Germany) διαλύθηκε σε ψυχρή 100% αιθανόλη. Έγινε σπορά 1.5×10^6 κυττάρων Jurkat σε τρυβλία 10 cm και ακολούθησε επώαση τους για 2 ώρες σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI-1640 τους 37°C , 5%CO₂. Μετά το πέρας των 2 ωρών χορηγήθηκε 2-ME σε συγκεντρώσεις 0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 και 10 μM ή αιθανόλη (0.05%.) και τα κύτταρα επωάστηκαν 12, 24 και 48 ώρες. Κύτταρα με ή χωρίς αιθανόλη ή 2-μεθοξυοιστραδιόλη συλλέχθηκαν, απομονώθηκαν από αυτά χαμηλού μοριακού βάρους γενωμικό DNA (παρ. 2.16) και πρωτεΐνες (παρ. 2.19) και αναλύθηκαν σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται παρακάτω (παρ. 17.2 και παρ. 20.2, αντίστοιχα).

14.2. Καταμέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο (Neubauer Chamber)

10 μ l εναιωρήματος κυττάρων Jurkat τοποθετήθηκαν στο αιμοκυτταρόμετρο (Neubauer Chamber) όπου και έγινε η μέτρηση των κυττάρων σε δύο διαγώνια τετράγωνα από το σταυρό (τα οποία είναι διαιρεμένα σε 16 επιμέρους τετραγωνάκια, δηλαδή 2×16). Η μέτρηση επαναλήφθηκε τρεις φορές, υπολογίσθηκε ο μέσος όρος των κυττάρων των μετρήσεων, διαιρέθηκε δια 100 και πολλαπλασιάστηκε $\times 10^6$ δίνοντας έτσι το συνολικό αριθμό των κυττάρων $\times 10^6$ ανά ml του αρχικού εναιωρήματος κυττάρων.

15.2. Καμπύλες αύξησης των κυττάρων Jurkat

Έγινε σπορά $2,5 \times 10^4$ κυττάρων Jurkat (JurkatPuro και JurkatBcl-2) σε πολυτρυβλία 24-θέσεων (πηγαδάκια) και διαμέτρου 18mm σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI-1640 και ακολούθησε επώαση στους 37°C , 5% CO_2 . Μετά από 24 h από τη σπορά τους μετρήθηκαν κύτταρα από δύο πηγαδάκια για κάθε κυτταρική σειρά με τη βοήθεια αιμοκυτταρομέτρου. Η ανάπτυξη των κυττάρων ακολουθήθηκε για διάστημα 10-12 ημερών, με ημερήσια μέτρηση κυττάρων δύο πηγαδιών ανά κυτταρική σειρά σε αιμοκυτταρόμετρο ώστε να κατασκευασθούν καμπύλες αύξησης και να υπολογισθεί ο ρυθμός αύξησης των κυττάρων.

16.2. Ανάλυση των κυττάρων Jurkat με κυτταρομετρία ροής

Πραγματοποιήθηκε σπορά ενεργώς πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων Jurkat, JurkatPuro, JurkatBcl-2 σε πυκνότητα 1×10^6 κύτταρα ανά τρυβλίο 10 cm και τα κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI-1640. Στη συνέχεια, χορηγήθηκε στα κύτταρα 0.5 μM και 1.0 μM 2-ME ή αιθανόλη (0.05%) και ακολούθησε επώαση 12 και 24 ωρών. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση, ξεπλύθηκαν δύο φορές με παγωμένο PBS και σταθεροποιήθηκαν σε παγωμένη αιθανόλη 70% όλη τη νύχτα στους 4°C . Ακολούθησε φυγοκέντρηση των κυττάρων, ξέπλυμα με PBS, επαναιώρηση τους σε 0.5 ml PBS και σε 1 ml ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης DNA (192 mM Na_2HPO_4 , 8 mM κιτρικό οξύ, pH7.8) και επωάστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 2000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου, εναιωρήθηκαν σε 0.3 ml διαλύματος χρώσης (1 $\mu\text{g/ml}$

ιωδιούχο προπύδιο και 100 µg/ml RNάση A σε PBS) και επωάστηκαν 35 λεπτά σε σκοτεινό χώρο. Τα χρωματισμένα κύτταρα πλύθηκαν μια φορά με PBS, επαναιωρήθηκαν σε 0.2 ml PBS και αναλύθηκαν σε ένα FACScan Becton Dickinson κυτταρόμετρο ροής (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

ΕΝΟΤΗΤΑ Γ: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ

ΟΞΕΩΝ

17.2. Απομόνωση χαμηλού μοριακού βάρους γενωμικού DNA

Χαμηλού μοριακού βάρους γενωμικό DNA απομονώθηκε από κύτταρα Jurkat και κύτταρα Jurkat που έφεραν διαφορετικά γονίδια (JurkatPuro, JurkatBcl-2 και JurkatApoJ) όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Sugiki et al., 2000). Σε ένα 1.5×10^6 κύτταρα τα οποία αναπτύχθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI-1640, χορηγήθηκαν σε αυξανόμενες δόσεις 2-ME ή αιθανόλη, για διαφορετικές χρονικές περιόδους, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Τα κύτταρα Jurkat με ή χωρίς 2-ME συλλέχθηκαν σε σωλήνες Falcon 15 ml και φυγοκεντρήθηκαν στις 2000 rpm στους 4°C. Το κυτταρικό ίζημα εναιωρήθηκε σε 1 ml PBS που περιείχε 1 mM EDTA pH8.0, μεταφέρθηκε σε σωλήνες eppendorf και επαναφυγοκεντρήθηκε σε μικροφυγόκεντρο στις 6500 rpm στους 4°C. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 µl ψυχρού ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης DNA (DNA lysis buffer), επωάστηκε 5 λεπτά στον πάγο και φυγοκεντρήθηκε για 20 λεπτά στις 13000 rpm στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό σωλήνα eppendorf και επωάστηκε διαδοχικά με 400 µg/ml DNase free RNase A (4 µl από 10 mg/ml) για 2 ώρες στους 37°C και με 400 µg/ml πρωτεΐνάση K (2 µl από 20 mg/ml) για 2 ώρες στους 37°C. Μετά τις επωάσεις, προστέθηκαν 20 µl 5 M NaCl και 120 µl ισοπροπανόλης και τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -20°C όλη τη νύχτα ώστε να κατακρημνιστεί το DNA. Μετά από φυγοκέντρηση στις 13000 rpm στους 4°C για 20 λεπτά, το DNA εκπλύθηκε με 70% αιθανόλη και το ίζημα του DNA αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά για να στεγνώσει. Στη συνέχεια εναιωρήθηκε σε 20 µl ρυθμιστικό διάλυμα 1XTE pH7.4.

Τα δείγματα του DNA αναλύθηκαν σε 1.6% πηχτή αγορόζης, που περιείχε 0.5 µg/ml βρωμιούχο εθίδιο σε 0.5 x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης DNA (TBE) σε τάση 70 V για 3 ώρες. Το DNA ανιχνεύθηκε κάτω από λάμπα υν και φωτογραφήθηκε (παρ. 20.2).

Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης DNA (DNA lysis buffer): 10 mM Tris-Cl pH7.4, 10 mM EDTA pH8.0, 0.5% Triton X-100

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης DNA (1X TBE, Tris-Βορικό οξύ- EDTA): 89 mM Tris, 9 mM Βορικό οξύ, 20 mM EDTA pH 8.0

1XTE pH7.4: 10 mM Tris pH7.4, 1 mM EDTA pH8.0

18.2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA σε πηκτή αгарόζης έγινε για τους εξής λόγους:

1. Για να γίνει έλεγχος των πλασμιδιακών και των ρετροϊκών φορέων έκφρασης (παρ. 2.34, 2.35) ώστε να επιβεβαιωθεί ότι είναι οι ορθές κατασκευές και ότι περιλαμβάνουν τα επιθυμητά γονίδια μετά την απομόνωση τους από βακτηριακές καλλιέργειες.
2. Για την απομόνωση ενός επιθυμητού γονιδίου ή τμήματος γονιδίου με προορισμό την παρασκευή κατάλληλου ιχνηθέτη (παρ. 2.28) για τον υβριδισμό νουκλεϊκών οξέων (παρ. 2.29).

Η ηλεκτροφόρηση χαμηλού μοριακού βάρους γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε για να εκτιμηθεί ο βαθμός της απόπτωσης των κυττάρων μετά από έκθεση σε διάφορους παράγοντες σε συγκεκριμένες ποσότητες και για ορισμένα χρονικά διαστήματα.

Η ηλεκτροφόρηση του DNA γίνεται σε πηκτή αгарόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.5XTBE (0.0445 M Tris, 0.0445 M βορικό οξύ, 0.001 M EDTA). Το μοριακό βάρος των τμημάτων του DNA προσδιορίζεται με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας επιτρέπει τον εντοπισμό των τμημάτων του DNA στην πηκτή αгарόζης. Η κινητικότητα μορίων DNA σε πηκτή αгарόζης εξαρτάται από τις εξής παραμέτρους: α) από το μέγεθός τους β) τη μορφή τους (ευθύγραμμα, κυκλικά υπερελικωμένα, κυκλικά με εγκοπές) και γ) από την περιεκτικότητα της πηκτής σε αгарόζη.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οριζόντιες πηκτές αгарόζης 1% σε 0.5XTBE για την ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού ή ρετροϊκού DNA και πηκτές αгарόζης 1.6% σε 0.5XTBE για την ηλεκτροφόρηση χαμηλού μοριακού βάρους

γενωμικού DNA. Η στερεά αγαρόζη σε 0.5XTBE θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι βρασμού και αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία 50–56°C πριν την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0.5 µg/ml. Το διάλυμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και εισήχθη στο διάλυμα ένα κατάλληλο χτενάκι για τη δημιουργία επίπεδης πηκτής με υποδοχές ('πηγαδάκια'). Μετά το πολυμερισμό της αγαρόζης και το σχηματισμό της πηκτής (gel), προστέθηκε ο απαραίτητος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος 0.5XTBE ώστε να καλυφθεί η πηκτή αγαρόζης και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις υποδοχές ('πηγαδάκια') της πηκτής αφού αναμείχθηκαν σε αναλογία 1:10 με διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων (sample loading buffer) για την κατακρήμνιση του DNA και την παρακολούθηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης (ολικός όγκος δειγμάτων 25 µl). Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν και μάρτυρες DNA με γνωστά, κλιμακούμενα μοριακά βάρη όπως 1 kb DNA ladder, Lambda DNA-Hind III digest και Lambda DNA-BstEII Digest (Gibco BRL Life Technologies Inc.). Μπορούν έτσι να υπολογιστούν προσεγγιστικά τα μοριακά βάρη των προς έλεγχο τμημάτων του DNA.

Η ηλεκτροφόρηση διεξήχθη σε θερμοκρασία δωματίου σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και σύνδεσης της συσκευής με τροφοδοτικό σταθερής τάσης 70–120 volt (τροφοδοτικό Consort) για 2-3 ώρες.

Η πηκτή αγαρόζης παρατηρήθηκε σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας για την πρόοδο της ηλεκτροφόρησης και τον υπολογισμό του μεγέθους των τμημάτων του DNA καθώς επίσης και για φωτογράφιση. Να σημειωθεί ότι επειδή το βρωμιούχο αιθίδιο αποτελεί μεταλλαξιγόνο παράγοντα η χρήση του γίνεται σύμφωνα με τους θεσμοθετημένους κανόνες ασφαλείας και ο χειρισμός της πηκτής αγαρόζης με γάντια.

10XTBE (Tris -Borate/EDTA buffer): 890 mM Tris, 890 mM Βορικό οξύ, 20 mM EDTA

10ΧΔιάλυμα φόρτωσης δειγμάτων (Sample loading buffer): 50% γλυκερόλη, (αποστειρωμένη σε δις-απεσταγμένο νερό), 1 mM EDTA pH 8.0, 0.4% κυανού της βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue), 0.4% xylene cyanol FF

Βρωμιούχο αιθίδιο: 10 mg/ml Βρωμιούχο αιθίδιο σε αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό

19.2. Κοπή πλασμιδίων με περιοριστικά ένζυμα

Κοπή πλασμιδιακού DNA με περιοριστικές ενδοκουκλεάσες γίνεται αφενός μεν, σε μικρούς όγκους, για να γίνει έλεγχος εάν απομονωμένα πλασμίδια περιλαμβάνουν συγκεκριμένα γονίδια με ηλεκτροφόρηση DNA, και αφετέρου δε, σε μεγάλους όγκους, για να απομονωθούν συγκεκριμένα γονίδια από πλασμίδια με ηλεκτροφόρηση DNA και με ηλεκτροδιήθηση DNA.

Οι περιοριστικές ενδοκουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν, BamHI, EcoRI, XhoI και XbaI ήταν από την New England Biolabs ή την Gibco BRL Life Technologies, Inc. Η πέψη του πλασμιδιακού φορέα και του προς ενσωμάτωση τμήματος του DNA διεξάγεται με τις ίδιες ενδοκουκλεάσες περιορισμού. Η πέψη πραγματοποιείται σε όγκο 20 μl, στους 37°C, για 1.5-2 ώρες, στο προτεινόμενο (ανάλογα με το ένζυμο) ρυθμιστικό διάλυμα. Η πέψη του DNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με πρότυπες μεθόδους (Sambrook et al., 1989).

ΕΝΟΤΗΤΑ Δ: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

20.2. Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων για την ανάλυση πρωτεϊνών

Κύτταρα Jurkat, JurkatPuro και JurkatBcl-2 στα οποία χορηγήθηκε 2-μεθοχυστραδιόλη όπως ακριβώς περιγράφηκε παραπάνω (παρ. 13.2) χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων, σύμφωνα με προηγούμενες μεθόδους που έχουν περιγραφεί (Lane and Harlow, 1989; Sambrook et al., 1989).

Περίληπτικά, κύτταρα καλλιεργημένα σε τρυβλία των 10 cm συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 1500-2000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C εκπλύθηκαν δύο φορές με 5 ml ψυχρής PBS-1mM EDTA pH8.0 και στη συνέχεια εναιωρήθηκαν σε 1.0 ml ψυχρής PBS-1mM EDTA pH 8.0 και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα eppendorf. Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στις 6500 rpm για 2 λεπτά στο ψυχρό θάλαμο (cold room) και το υπερκείμενο αφαιρέθηκε. Κατόπιν προστέθηκαν 100 – 150 μ l διαλύματος RIPA το οποίο περιείχε αναστολείς πρωτεασών, ομογενοποιήθηκαν με δίνη (vortex) και το μίγμα παρέμενε στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολούθησε ανάδευση με δίνη (vortex) για περίπου 1 λεπτό και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό, αποστειρωμένο σωλήνα eppendorf και μικρή ποσότητα των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τα αντιδραστήρια της Biorad. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε μικρότερα (aliquots) των 25 μ l και προστέθηκε $\frac{1}{4}$ του όγκου 4X διάλυμα πρωτεϊνικού δείγματος (Protein Loading buffer) και τα εκχυλίσματα διατηρήθηκαν στους -40°C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

RIPA: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1% NP-40, 1% SDS, 1 mM EDTA pH8.0 και 0.5% δεοξυχολικό άλας του νατρίου (Na Deoxycholate) το οποίο περιείχε 1mM Dithiothreitol (DTT) και αναστολείς πρωτεασών - 1 μ g/ml πεψιστατίνη (pepstatin), 1 μ g/ml λευπεψίνη (leupeptin), 1 mM PMSF και 1 mM ορθοβαναδικό άλας του νατρίου.

4XΔιάλυμα πρωτεϊνικού δείγματος (Protein Loading buffer): 250 mM Tris-Cl pH6.8, 40% γλυκερόλη, 8% SDS, 2.8 M β -μερκαπτοαιθανόλη και 0.2% κυανούνης της βρωμοφαινόλης

21.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Με την ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Το ακρυλαμίδιο πολυμερίζεται με μηχανισμό ελευθέρων ριζών μετά από προσθήκη υπερθειικού αμμωνίου και TEMED και δημιουργεί τρισδιάστατο δίκτυο. Ο σύνδεσμος των αλυσίδων του ακρυλαμιδίου για τη δημιουργία του δικτύου είναι το N,N-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο. Η προσθήκη του ανιονικού απορρυπαντικού SDS (θειικό δωδεκακυλικό νάτριο) έχει ως αποτέλεσμα τη δέσμευση SDS-πρωτεϊνών και προσδίδει στα μόρια καθαρό αρνητικό φορτίο ανάλογο με τη μάζα τους. Έτσι η κινητικότητα των πρωτεϊνών πάνω στην πηκτή είναι αντιστρόφως ανάλογη του μοριακού τους βάρους.

Η ηλεκτροφόρηση έγινε με τη μέθοδο του Laemmli (1970) σε σύστημα κάθετων γυάλινων πλακών (Lane and Harlow, 1989; Sambrook et al., 1989). 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.

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες πηκτές SDS-PAGE: 15% για την ανάλυση της Bcl-2, p21^{Waf1/Cip1} και p27^{Kip1}, 10% για την Bak και 8% για την πολυμεράση της πολύ-ADP ριβόζης (Poly-ADP ribose polymerase; PARP), σύμφωνα με προηγούμενες μεθόδους που έχουν περιγραφεί (Lane and Harlow, 1989; Sambrook et al., 1989).

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) πραγματοποιήθηκε σε μικρή διπλή συσκευή (Mini-Protean gel electrophoresis tank; Bio-Rad Laboratories, USA)

Όγκοι πηκτής επιστίβαξης (για δύο πηκτές: 10 ml)

Διάλυμα	Όγκος (ml)	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο ddH ₂ O	6.84	
30% μίγμα ακρυλαμιδίου (29.2% ακρυλαμίδιο, 0.8% Δις-ακρυλαμίδιο)	1.7	5% w/v
1.0 M Tris pH6.8	1.25	0.125 M
10% SDS	0.1	0.1%
10% υπερθειϊκό αμμώνιο	0.1	0.1%
TEMED	0.01	
Τελικός όγκος (ml)	10	

Όγκοι πηκτών διαχωρισμού (για δύο πηκτές: 20 ml)

Πηκτή	Διάλυμα	Όγκος (ml)	Τελική συγκέντρωση
8%	Αποστειρωμένο ddH ₂ O	9.3	
	30% μίγμα ακρυλαμιδίου (29.2% ακρυλαμίδιο, 0.8% Δις-ακρυλαμίδιο)	5.3	8% w/v
	1.5 M Tris pH8.8	5.0	0.375 M
	10% SDS	0.2	0.1%
	10% υπερθειϊκό αμμώνιο	0.2	0.1%
	TEMED	0.012	
	Τελικός όγκος (ml)	20	
10%	Αποστειρωμένο ddH ₂ O	7.9	
	30% μίγμα ακρυλαμιδίου (29.2% ακρυλαμίδιο, 0.8% Δις-ακρυλαμίδιο)	6.7	10% w/v
	1.5 M Tris pH8.8	5.0	0.375 M
	10% SDS	0.2	0.1%
	10% υπερθειϊκό αμμώνιο	0.2	0.1%
	TEMED	0.008	
	Τελικός όγκος (ml)	20	
15%	Αποστειρωμένο ddH ₂ O	4.6	
	30% μίγμα ακρυλαμιδίου (29.2% ακρυλαμίδιο, 0.8% Δις-ακρυλαμίδιο)	10	10% w/v
	1.0 M Tris pH 6.8	5.0	0.375 M
	10% SDS	0.2	0.1%
	10% υπερθειϊκό αμμώνιο	0.2	0.1%
	TEMED	0.008	
	Τελικός όγκος (ml)	20	

Το μίγμα αφέθηκε να πολυμερισθεί με την προσθήκη TEMED σε θερμοκρασία δωματίου για 20-30 λεπτά. Τα πρωτεϊνικά δείγματα (~100 μg πρωτεΐνης) θερμάνθηκαν για 10 λεπτά στους 100°C, φορτώθηκαν στην πηκτή και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σέ 100V σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης για ~2 ώρες. Ως δείκτες των μοριακών βαρών των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ένα πρότυπο έγχρωμο μίγμα πρωτεϊνών (Kaleidoscope prestained standards; Bio-Rad Laboratories, USA) που περιείχε: μυοσίνη 199 kDa (μπλε), β-γαλακτοσιδάση 133 kDa (πορφυρό), λευκωματίνη ορού μόσχου 87 kDa (πράσινο), ανθρακική ανυδράση 40.1 kDa (βιολετί), αναστλέας θρυψίνης από σόγια 31.6 kDa (πορτοκαλί), λυσοζύμη 18.5 kDa (κόκκινο) και απροτινίνη 7.1 kDa (μπλε).

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (1X Tris – γλυκίνη/SDS): 25 mM Tris, 250 mM γλυκίνη, 0.1% SDS

22.2. Χρώση της πηκτής SDS-παλσακρυλαμίδιου

Η χρώση της πηκτής πραγματοποιήθηκε για 2 ώρες υπό ανάδευση σε διάλυμα χρωστικής. Ο αποχρωματισμός γίνεται σταδιακά υπό ανάδευση σε διαλύματα αποχρωματισμού .

Διάλυμα χρωστικής: 0.125% w/v Coomassie Brilliant Blue R σε 100% αιθανόλη, 5% v/v οξικό οξύ σε αναλογία 1:1

Διαλύματα αποχρωματισμού: Ανάμιξη 95% αιθανόλης και 5% οξικού οξέος σε αναλογία:

(α) 2:3 για 60-120 λεπτά

(β) 1.5:3.5 για 60-120 λεπτά

(γ) 1:4 για 120 λεπτά

(δ) 350 ml 5% οξικού οξέος και 150 ml

αποστειρωμένου δις-απεσταγμένου νερού για 60 λεπτά – όλη τη νύχτα

23.2. Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσο-αποτύπωμα κατά Western

Η προσπάθεια διαχωρισμού και ανίχνευσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση σε SDS-πηκτική πολυακρυλαμίδιου, μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Schleicher & Schell) και ανίχνευση με τη χρήση αντισωμάτων (Ανοσο-αποτύπωμα ή 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 (Lane and Harlow, 1989; Sambrook et al., 1989).

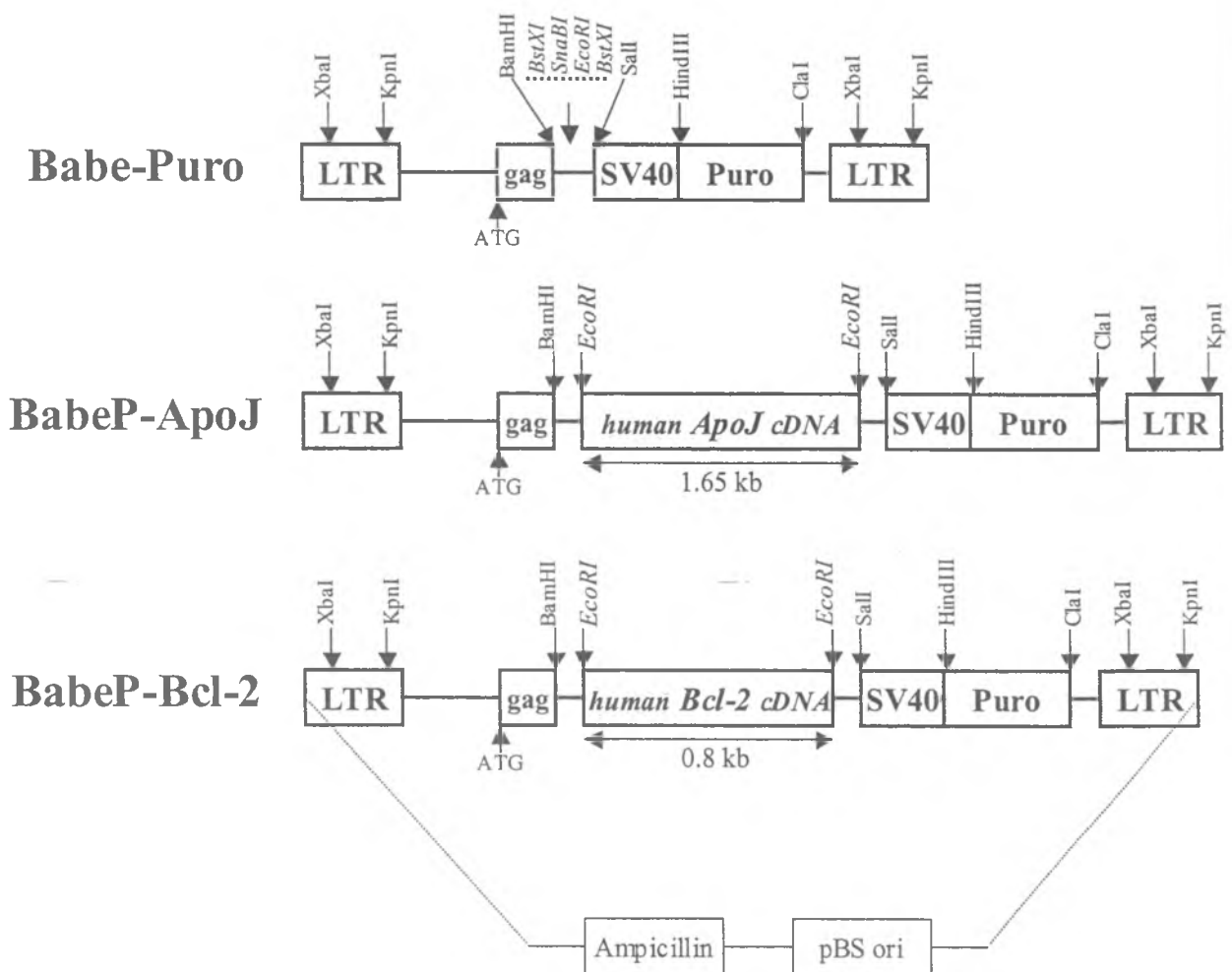
Μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών, οι μεμβράνες επωάστηκαν για 3 ώρες—όλη τη νύχτα σε 5% άπαχο γάλα σκόνη ελεύθερο λιπιδίων διαλυμένο σε PBS το οποίο περιείχε 0.05% Tween-20 (5% blocking solution). Στην συνέχεια οι μεμβράνες επωάστηκαν με το πρώτο αντίσωμα αντίσωμα σε 5% blocking solution. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: για την Bcl-2 - 1:1000 mouse monoclonal anti-human Bcl-2, (sc-509, SantaCruz Biotechnology, CA, USA), για την Bak - 1:500 mouse monoclonal anti-Bak (Novacastra Laboratories Ltd, UK), για την PARP - 1:500 mouse monoclonal anti-PARP (CII-10) (BD PharminGen, 556362), για την p21^{Waf1/Cip1} - 1:1000 mouse monoclonal anti-p21 (sc-817, SantaCruz Biotechnology, CA, USA), και για την p27^{Kip1} - 1:500 mouse monoclonal anti-p27 (Novacastra Laboratories Ltd, UK) για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μεμβράνες εκπλύθηκαν 3 φορές από 10 λεπτά με PBS που περιείχε 0.05% Tween-20 και εκτέθηκαν στο δεύτερο αντίσωμα σε αναλογία 1:1500 (goat-anti mouse IgG-HRP) σε 5% blocking solution για 1.5 - 2 ώρες. Οι μεμβράνες εκπλύθηκαν 3 φορές από 10 λεπτά με PBS που περιείχε 0.05% Tween-20 και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν σε σκοτεινό θάλαμο χρησιμοποιώντας το Pierce Super Signal West Pico Chemiluminescence kit (Pierce, USA). σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, και εκτέθηκαν σε φιλμ Kodak-XOMAT AR.

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

ΕΝΟΤΗΤΑ Ε: ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

24.2. Ρετροϊικοί φορείς (Retroviral vectors)

Οι ρετροϊικοί φορείς Babe-Puro (MorGenstern and Land, 1990), Babe-Puro/Bcl-2 (BabeP-Bcl-2) (Tang et al., 2001) και Babe-Puro/ApoJ (BabeP-ApoJ) (Petropoulou et al., 2001) έχουν περιγραφεί προηγουμένως. Ο ρετροϊικός φορέας Babe-Puro φέρει το γονίδιο της πουρομυκίνης (Puro) ως μάρτυρα επιλογής κυττάρων θηλαστικών κάτω από το μεταγραφικό έλεγχο του προαγωγέα της πρώιμης περιοχής του ιού του SV40 (MorGenstern and Land, 1990), ενώ ο BabeP-Bcl-2 (Tang et al., 2001) και ο BabeP-ApoJ (Petropoulou et al., 2001) φέρουν επιπλέον του γονιδίου της πουρομυκίνης, το ανθρώπινο Bcl-2 cDNA και το ανθρώπινο cDNA της κλαστρίνης/απολιποπρωτεΐνης J (ApoJ) (Σχήμα 1.2). Το ανθρώπινο Bcl-2 cDNA (0.8 kb) είναι κλωνοποιημένο στη θέση EcoRI του Babe-Puro, ενώ το ανθρώπινο ApoJ cDNA (1.65 kb) είναι κλωνοποιημένο στη θέση BamHI του Babe-Puro. Και τα δύο γονίδια βρίσκονται κάτω από το μεταγραφικό έλεγχο του προαγωγέα του ρετροϊού (5' LTR). Το BabeP-hApoJ και το BabeP-hBcl-2 ήταν ευγενείς προσφορές των Δρ. Ευσταθίου Γκόνου, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα και Dr. Damu Tang, University of Montreal, Canada, αντίστοιχα.



Σχήμα 1.2. Ρετροϊικοί φορείς έκφρασης της κλαστρίνης/απολιποπρωτεΐνης J (hApoJ) και του hBcl-2. Στον ρετροϊό ελέγχου Babe-Puro κλωνοποιήθηκε στη θέση BamHI το ανθρώπινο cDNA της κλαστρίνης/απολιποπρωτεΐνης J (hApoJ) για την κατασκευή του ρετροϊικού φορέα BabeP-ApoJ (Petroroulou et al., 2001) και στη θέση EcoRI το ανθρώπινο cDNA του Bcl-2 για την κατασκευή του ρετροϊικού φορέα BabeP-Bcl-2 (Tang et al., 2001). [h (human), ανθρώπινο].

25.2. Παραγωγή ρετροϊών με διαμόλυνση DNA

Για την παραγωγή ρετροϊών χρησιμοποιήθηκε η αμοτροπική κυτταρική σειρά πακεταρίσματος ρετροϊών Phoenix (ΦNX) η οποία διαμολύνθηκε με τους επιθυμητούς ρετροϊικούς φορείς (Babe-Puro, BabeP-Bcl-2 ή BabeP-ApoJ,) με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου (Gorman et al., 1983; Gorman et al., 1985; Gonos et al., 1994). Τα ρετροϊικά σωματίδια που προέκυψαν μετά τη διαμόλυνση

των κυττάρων ΦΝΧ χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση των κυττάρων Jurkat (Kolettas et al., 1994; Kolettas and Rosenberger, 1998).

Διαμόλυνση των κυττάρων Phoenix με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου

Η διαμόλυνση των κυττάρων ΦΝΧ με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου στηρίζεται στην ικανότητα των κυττάρων να ενσωματώνουν, πιθανά μέσω ενδοκύττωσης, συμπλέγματα φωσφορικού ασβεστίου-DNA όταν αυτά προστίθενται εξωγενώς. Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την επιμόλυνση των κυττάρων παρασκευάζονται λίγο πριν τη χρήση τους και αποστειρώνονται σε φίλτρα 0.2 μm Sartorius. Η διαμόλυνση γίνεται με την μεγαλύτερη δυνατή ταχύτητα, ώστε το pH της καλλιέργειας να μην μεταβληθεί.

Περίληπτικά, έγινε σπορά 3×10^6 κύτταρα ΦΝΧ ανά 6cm τριβλίο και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C , 5% CO_2 . Μετά την επώαση, έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού με 3 ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM τουλάχιστον 2 ώρες πριν τη διαμόλυνση των κυττάρων με τους ρετροϊκούς φορείς. Στη συνέχεια αναμίχθηκαν με δίνη (vortex) 15 μg ρετροϊκού DNA σε 1XTE pH8.0 με 31 μl 2M CaCl_2 και αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 250 μl . Το μίγμα προστέθηκε στάγδην και υπό χαμηλή συνεχή ανάδευση, σε 250 μl αποστειρωμένου διαλύματος 2XHBS pH7.12. Το καθαρό (διαφώτιστο; translucent) ίζημα συμπλεγμάτων DNA- CaPO_4 που σχηματίστηκε (όγκος 500 μl) προστέθηκε αμέσως στάγδην στα κύτταρα που τοποθετήθηκαν αμέσως στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C , 5% CO_2 , για να μην μεταβληθεί το pH της καλλιέργειας, και ακολούθησε επώαση για όλη τη νύχτα (>18 ώρες).

Μετά από τουλάχιστον 18 ώρες επώασης, το θρεπτικό υλικό που περιείχε το DNA αναρροφήθηκε και τα διαμολυσμένα κύτταρα εκπλύθηκαν δύο φορές με 3 ml RPMI-1640 που περιείχε αντιβιοτικά και L-γλουταμίνη χωρίς ορό. Μετά τη προσθήκη 4ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI-1640, τα διαμολυσμένα κύτταρα ΦΝΧ επώαστηκαν στους 37°C , 5% CO_2 για 24 – 48 ώρες πριν τη συλλογή των ρετροϊκών σωματιδίων για την επιμόλυνση των κυττάρων Jurkat.

2XHBS, pH7.12: 50mM Hepes, 280mM NaCl, 15mM Na_2HPO_4 , pH 7.12

10 mg/ml πολυβρίνη σε αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό

Τα διαλύματα αποστειρώθηκαν με φιλτράρισμα διαμέσου ενός μικροφίλτρου 0.2 μm (Sartorius) και διατηρήθηκαν στους 4°C.

26.2. Επιμόλυνση των κυττάρων Jurkat με τους ρετροϊούς

Οι ανασυνδυασμένοι ρετροϊοί ελαττωματικής αντιγραφής (replication-defective recombinant retroviruses) που παράχθηκαν με τη διαμόλυνση των κυττάρων ΦΝΧ με τους ρετροϊικούς φορείς χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση των κυττάρων Jurkat όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Kolettas et al., 1994; Kolettas and Rosenberger, 1998).

Περίληπτικά η διαδικασία πραγματοποιείται σε δύο βασικά στάδια:

- (i) Το θρεπτικό υλικό των διαμολυσμένων κυττάρων ΦΝΧ που περιείχε τα ρετροϊικά σωματίδια συλλέχθηκε μετά από 24 ώρες και φιλτραρίσθηκε διαμέσου ενός μικροφίλτρου 0.45 μm (Sartorius). Στα 4 ml του διηθήματος προστέθηκε πολυβρίνη σε τελική συγκέντρωση 8 $\mu\text{g/ml}$, τα οποία στη συνέχεια προστέθηκαν στα κύτταρα Jurkat (βλέπε ii).
- (ii) Έγινε σπορά 5×10^5 κυττάρων Jurkat σε τρυβλία 6 cm και τα κύτταρα επώαστηκαν για 2 ώρες στους 37°C, 5%CO₂. Μετά την επώαση τα κύτταρα συλλέχθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν στις 1500 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και εναιωρήθηκαν σε 4 ml διηθήματος από τα διαμολυσμένα κύτταρα ΦΝΧ (βλέπε i) και η επώαση στους 37°C, 5%CO₂ συνεχίστηκε για όλη τη νύχτα. Μετά την επώαση τα κύτταρα συλλέχθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν στις 1500 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, εναιωρήθηκαν σε 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI-1640, μεταφέρθηκαν σε τρυβλία 10 cm και η επώαση συνεχίστηκε στους 37°C, 5%CO₂ για 24-48 ώρες πριν την επιλογή των επιμολυσμένων κυττάρων σε πουρομυκίνη.

Μετά την επώαση το θρεπτικό υλικό των επιμολυσμένων κυττάρων Jurkat ανανεώθηκε πάλι με 10 ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού υλικού RPMI-1640 που περιείχε 1 $\mu\text{g/ml}$ πουρομυκίνη και η επώαση συνεχίστηκε στους 37°C, 5%CO₂ για 14 ημέρες για την επιλογή σταθερών κυτταρικών πλυθισμών. Το θρεπτικό υλικό

με το αντιβιοτικό επιλογής ανανεώνονταν κάθε 3-4 ημέρες καθόλη τη διάρκεια της επιλογής των επιμολυσμένων κυττάρων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

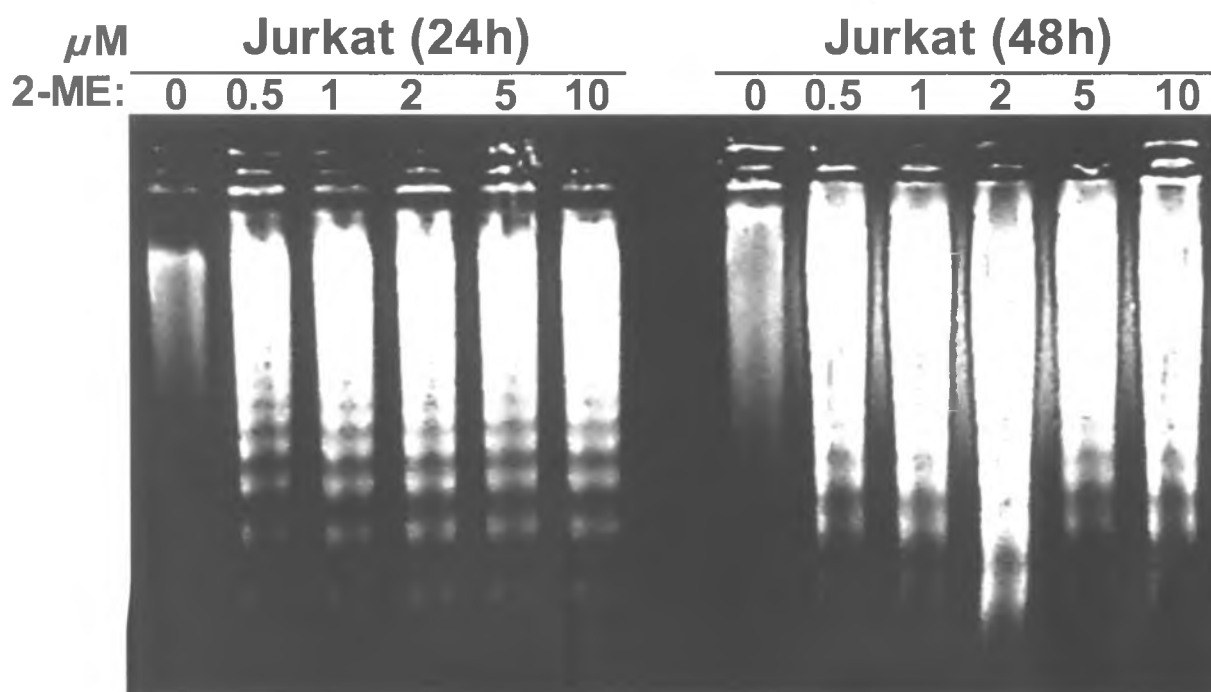
ΕΝΟΤΗΤΑ Α

Οι επιδράσεις της 2-μεθοξυοιστραδιόλης στην απόπτωση και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Jurkat: Ο ρόλος της Bcl-2

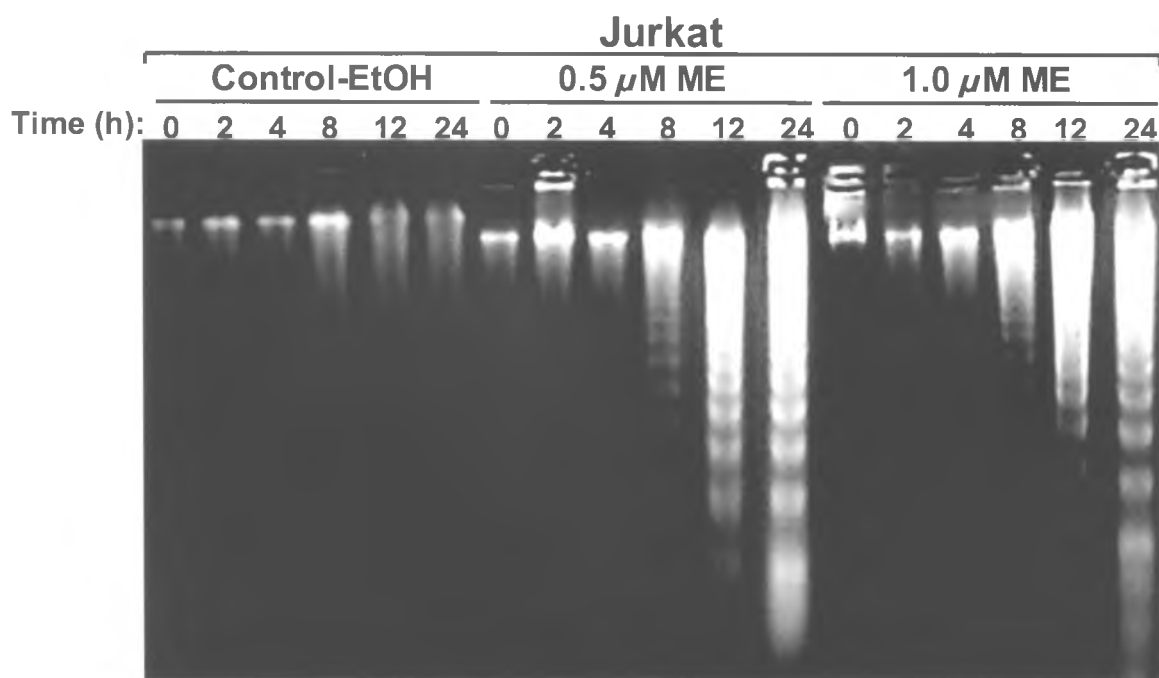
1.3. Η 2-μεθοξυοιστραδιόλη επάγει απόπτωση στα κύτταρα Jurkat

Σε ενεργά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα Jurkat χορηγήθηκαν 2-μεθοξυοιστραδιόλη (2-ME), σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0,5 μM έως 10 μM ή αιθανόλη για 24 και 48 ώρες. Από τα κύτταρα αυτά απομονώθηκε χαμηλού μοριακού βάρους DNA και αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (Σχήμα 1.3). Ενώ στα κύτταρα χωρίς αιθανόλη ή επεξεργασμένα με αιθανόλη δεν παρατηρήθηκε απόπτωση, τα κύτταρα, στα οποία χορηγήθηκε 2-ME σε όλες τις συγκεντρώσεις, παρουσίασαν ενδονουκλεοσωμική θραυσματοποίηση του DNA, κύριο χαρακτηριστικό κυττάρων που υφίστανται απόπτωση. Ο βαθμός της απόπτωσης των κυττάρων στα οποία χορηγήθηκε 2-ME φαίνεται να ήταν υψηλότερος σε εκείνα τα κύτταρα Jurkat στα οποία χορηγήθηκε 2-ME σε συγκεντρώσεις ίσες ή μεγαλύτερες από 1,0 μM 2-ME, γεγονός που διαπιστώθηκε από την παρουσία και την ένταση θραυσμάτων DNA, χαμηλού μοριακού βάρους. Επιπρόσθετα, η χορήγηση 2-ME σε συγκεντρώσεις 0,5 - 10 μM για 48 ώρες προκάλεσε απόπτωση σε αρκετά μεγαλύτερο βαθμό και αυτό ήταν εμφανές από την πυκνότητα των παραγομένων θραυσμάτων DNA (Σχήμα 1.3).

Προκειμένου να μελετηθεί η χρονο-εξαρτώμενη απόπτωση των κυττάρων Jurkat χορηγήθηκε σε αυτά 0,5 μM και 1,0 μM 2-ME ή αιθανόλη για διαφορετικές χρονικές περιόδους, που κυμαίνονταν από 0 έως 24 ώρες, απομονώθηκε DNA χαμηλού μοριακού βάρους και αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (Σχήμα 2.3). Η επαγωγή της απόπτωσης παρατηρήθηκε στις 8 ώρες και εκδηλώθηκε πιο έντονα στις 12 και 24 ώρες και στις δύο συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν.

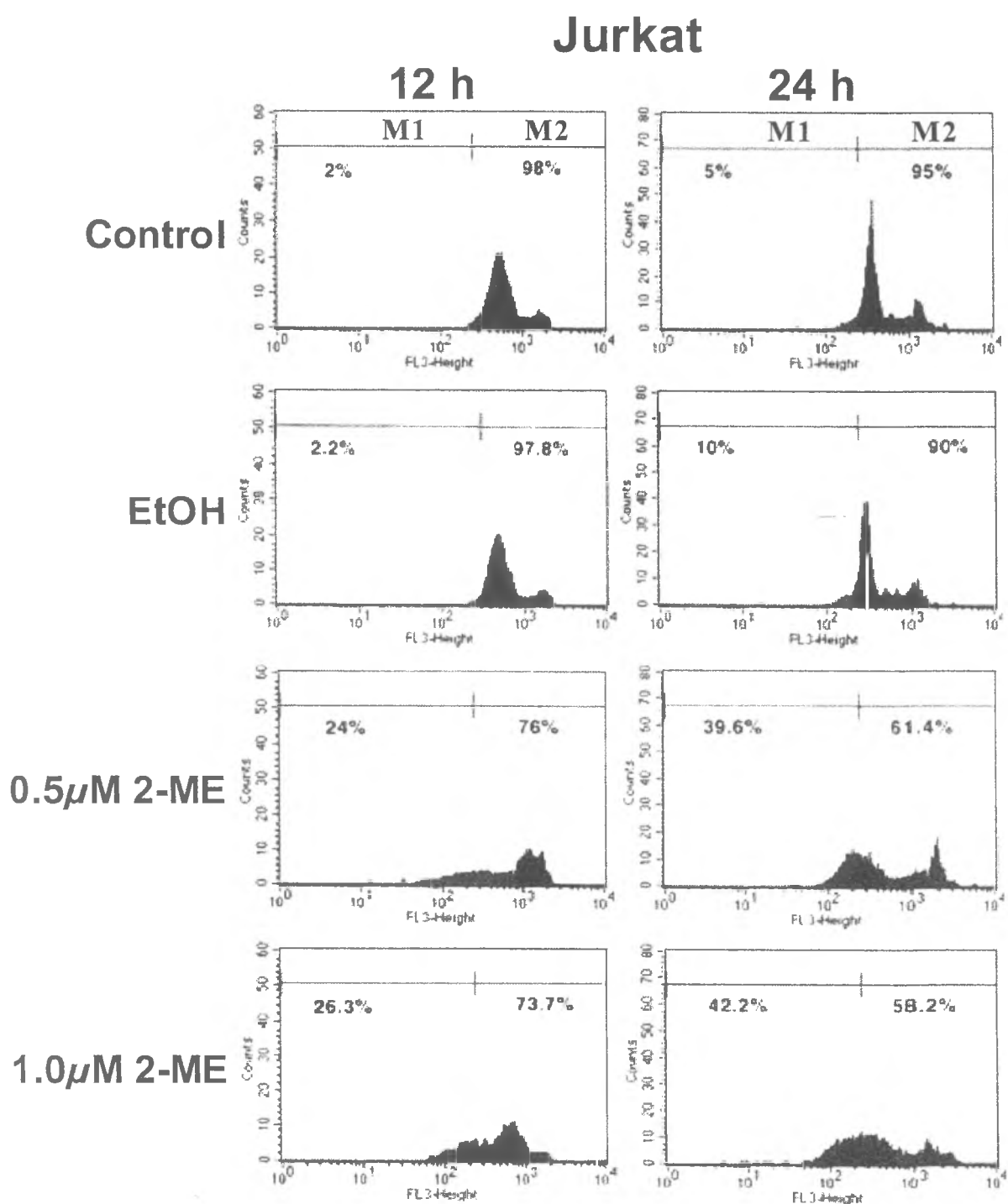


Σχήμα 1.3. Δοσο-εξαρτώμενη επαγωγή της απόπτωσης κυττάρων Jurkat από τη 2-ME. Στα Jurkat χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις 2-ME που κυμαίνονταν από 0,5 μM ως 10 μM ή αιθανόλη (Et) για 24 h και 48 h και χαμηλού μοριακού βάρους DNA απομονώθηκε και αναλύθηκε σε 1.6% πηκτή αгарόζης.



Σχήμα 2.3. Χρονο-εξαρτώμενη επαγωγή της απόπτωσης κυττάρων Jurkat από τη 2-ME. Στα Jurkat χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις 2-ME που κυμαίνονταν από 0,5 μM ως 10 μM ή αιθανόλη για διαφορετικές χρονικές περιόδους (0 - 24 h) και χαμηλού μοριακού βάρους DNA απομονώθηκε και αναλύθηκε σε 1.6% πηκτή αгарόζης.

Η *δοσο- και χρονο-εξαρτώμενη* απόπτωση των κυττάρων Jurkat που προκαλεί η 2-ME, εκτιμήθηκε επιπλέον με κυτταρομετρία ροής (Σχήμα 3.3). Κύτταρα Jurkat επεξεργασμένα με 2-ME για 12 ώρες παρουσίασαν μείωση του πληθυσμού στην G1 φάση και αύξηση του πληθυσμού στην G2/M φάση του κυτταρικού κύκλου. Αυτό ανέβη, διότι ένας σημαντικός αριθμός κυττάρων εμφανίστηκε ως υποπληθυσμός της G1 φάσης μετά τη χορήγηση 2-ME λόγω της 2-ME-επαγόμενης απόπτωσης. Αυτός ο υπό-G1 πληθυσμός που έχει υποστεί απόπτωση παρουσίασε αύξηση στα κύτταρα ελέγχου από περίπου 2% στα 24% και 26,3% μετά από χορήγηση 0,5 μ M και 1,0 μ M 2-ME αντίστοιχα, για 12 ώρες (Σχήμα 3.3). Ενώ τα εναπομείναντα ζωντανά κύτταρα συνέχιζαν τον κυτταρικό κύκλο, ένα αρκετά μεγαλύτερο μέρος των κυττάρων παρουσίασε απόπτωση όπως φαίνεται από την αύξηση του πληθυσμού των αποπτωτικών κυττάρων στην υπό-G1 φάση από 5% στο 39,6% και 42,2% μετά από χορήγηση 0,5 μ M και 1,0 μ M 2-ME για 24 ώρες., αντίστοιχα. Συνοψίζοντας, τα παραπάνω στοιχεία έδειξαν ότι η απόπτωση που προκάλεσε η 2-ME στα κύτταρα Jurkat, πραγματοποιήθηκε κατά ένα *χρονο- και δοσο-εξαρτώμενο* τρόπο, αλλά ο χρόνος φαίνεται ότι είναι ο κρισιμότερος παράγοντας στην 2-ME-επαγόμενη απόπτωση των κυττάρων Jurkat (βλέπε επίσης Σχήμα 5.3) .

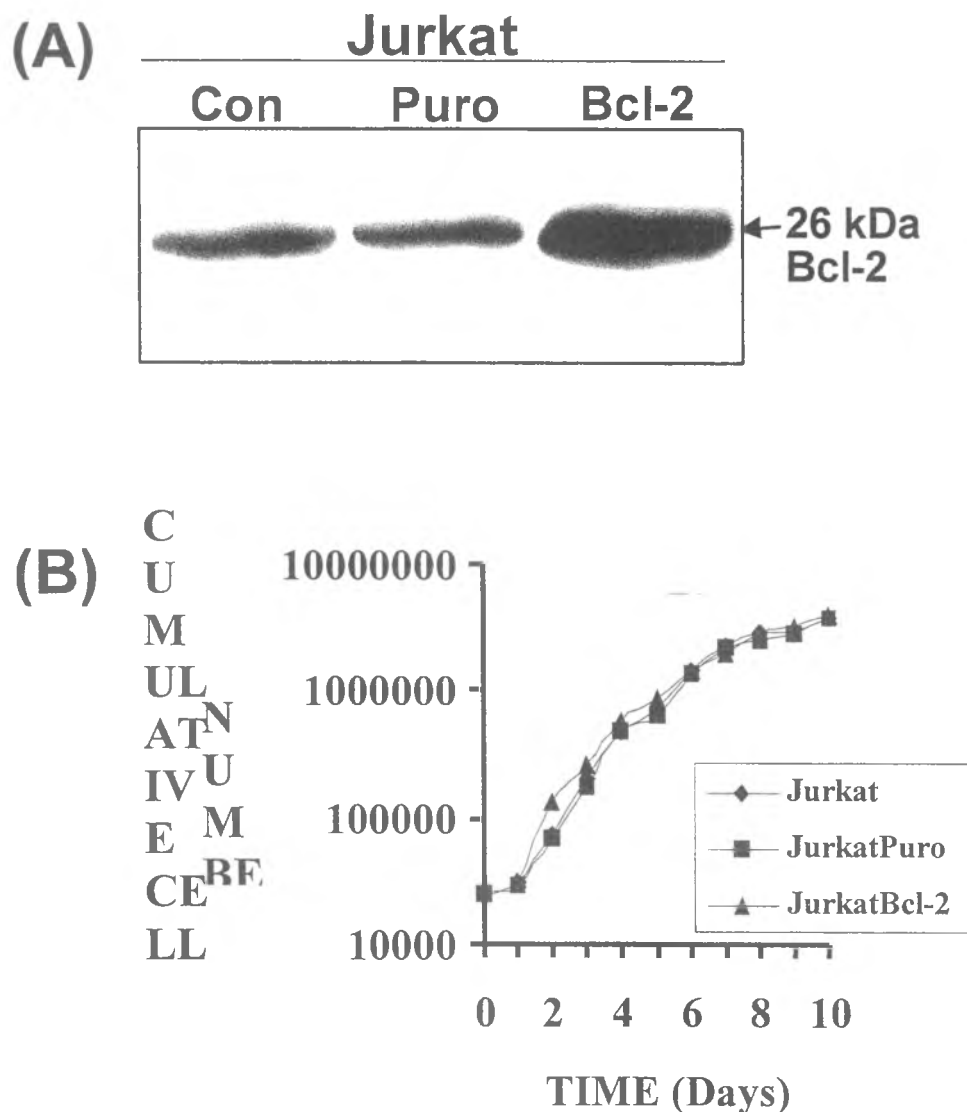


Σχήμα 3.3. Ανάλυση της 2-ME-επαγόμενης απόπτωσης των κυττάρων Jurkat με κυτταρομετρία ροής. Κύτταρα Jurkat στα οποία χορηγήθηκε αιθανόλη (EtOH) ή 0,5 μ M και 1,0 μ M 2-ME για 12 h και 24 h συλλέχθηκαν, επεξεργάσθηκαν και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής όπως περιγράφεται στα υλικά και μέθοδοι.

2.3. Η Bcl-2 αναστέλλει την απόπτωση που επάγεται από τη 2-ME

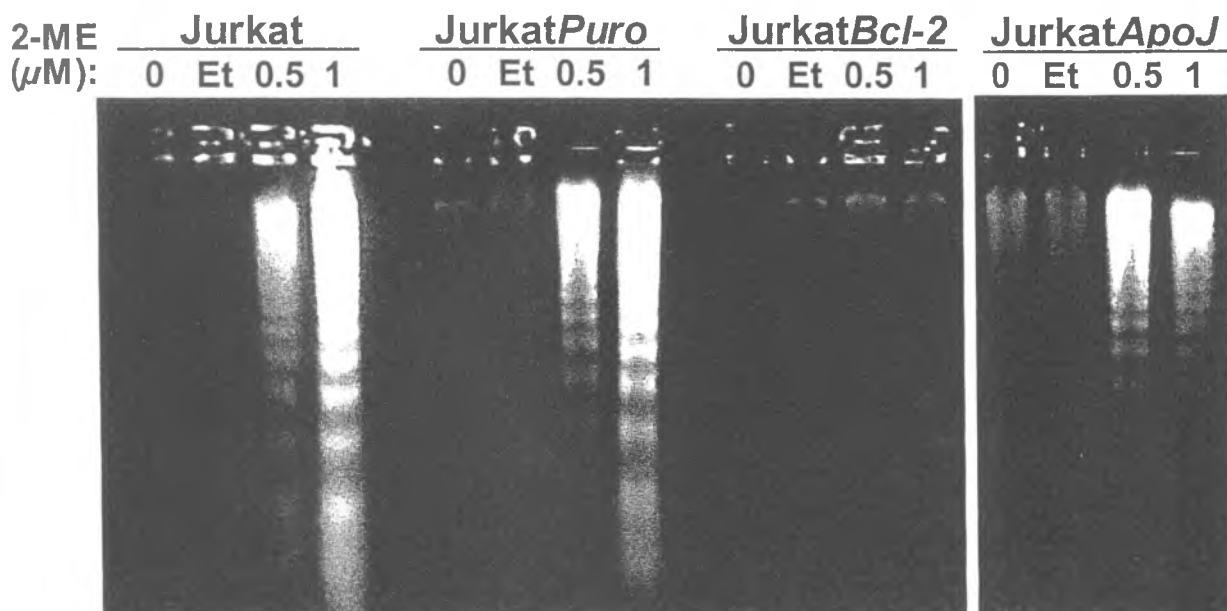
Όπως είναι γνωστό, η Bcl-2 εμπλέκεται στην 2-ME-επαγόμενη απόπτωση (Attala et al., 1998; Bu et al., 2002; Shimada et al., 2003; Basu and Haldar, 2003) γι'αυτό θεωρήθηκε σκόπιμη η κατασκευή κυττάρων Jurkat, που εκφράζουν ένα φορέα ελέγχου (Babe-Puro) ή την ανθρώπινη Bcl-2 πρωτεΐνη (BabeP-Bcl-2), με επιμόλυνση με ρετροϊικούς φορείς. Η ανάλυση των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από κύτταρα Jurkat, JurkatPuro και JurkatBcl-2 με ανοσοαποτύπωμα κατά western έδειξε ότι τα μετασχηματισμένα κύτταρα με το γονίδιο Bcl-2 εκφράζανε την ανθρώπινη πρωτεΐνη Bcl-2 μοριακού βάρους 26 kDa σε πολύ υψηλότερα επίπεδα, από ότι τα επιμολυσμένα κύτταρα με τον φορέα Babe-Puro ή τα μη-επιμολυσμένα ομόλογα τους (Σχήμα 4.3A).

Προκειμένου να ερευνηθεί αν η υπερέκφραση της Bcl-2 επηρέασε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Jurkat, κατασκευάστηκαν καμπύλες αύξησης (Σχήμα 4.3B). Δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στο βαθμό ανάπτυξης των κυττάρων Jurkat που υπερεκφράζουν την Bcl-2, σε σύγκριση με τα επιμολυσμένα με τον φορέα ελέγχου ή όχι ομόλογα τους.



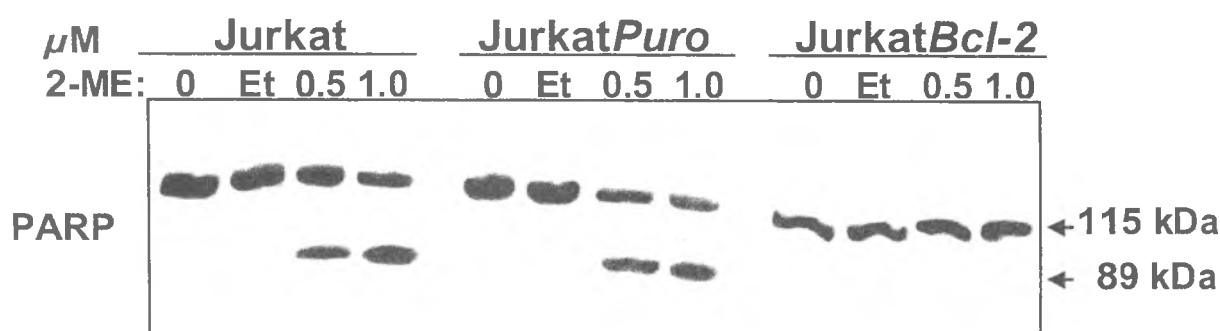
Σχήμα 4.3. Έκφραση της Bcl-2 στα επιμολυσμένα κύτταρα Jurkat και καμπύλες αύξησης. **(A)** Ολικές πρωτεΐνες απομονώθηκαν από μη-επιμολυσμένα κύτταρα Jurkat (Con) και από Jurkat επιμολυσμένα με τους ρετροϊούς Babe-Puro (Puro) ή BabeP-Bcl-2 (Bcl-2), διαχωρίστηκαν σε 15% SDS-πηκτή πολυακρυλαμιδίου και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά western χρησιμοποιώντας ένα μονοκλωνικό αντίσωμα της Bcl-2. **(B)** Καμπύλες αύξησης των κυττάρων Jurkat, JurkatPuro και JurkatBcl-2 που κατασκευάστηκαν όπως περιγράφεται στα υλικά και μέθοδοι.

Για να εξεταστεί η επίδραση της Bcl-2 στην απόπτωση των κυττάρων Jurkat μετά από χορήγηση 2-ME, προστέθηκαν σε όλα τα διαφορετικά κύτταρα Jurkat 0,5 μ M και 1,0 μ M 2-ME ή αιθανόλη για 24 ώρες και το DNA που απομονώθηκε από τις καλλιέργειες αυτές αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (Σχήμα 5.3). Τα αποτελέσματα της παραπάνω ανάλυσης έδειξαν ότι ενώ η 2-ME προκάλεσε τη θραυσματοποίηση του DNA, χαρακτηριστικό της απόπτωσης, σε κύτταρα Jurkat και JurkatPuro κατά ένα δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, η υπερέκφραση της Bcl-2 ανέστειλε πλήρως την απόπτωση των κυττάρων Jurkat που επάγεται από την 2-ME. Σε αντίθεση, ένα άλλο αντι-αποπτωτικό γονίδιο, η κλαστρίνη/απολιποπρωτεΐνη J (ApoJ) κατέστειλε μερικώς την 2-ME-επαγόμενη απόπτωση (Σχήμα 5.3), που σημαίνει είτε ότι η ApoJ έχει ασθενέστερη αντι-αποπτωτική δράση από αυτή της Bcl-2 ή ότι δρα σε διαφορετική ενδοκυττάρια θέση από τη Bcl-2.



Σχήμα 5.3. Ανάλυση της θραυσματοποίησης του DNA των φυσιολογικών και των επιμολυσμένων κυττάρων Jurkat μετά από χορήγηση 2-ME. DNA απομονώθηκε από μη-επεξεργασμένα (0) και από επεξεργασμένα με αιθανόλη (Et) ή 0,5 μ M και 1,0 μ M 2-ME για 24 h κύτταρα Jurkat, JurkatPuro, JurkatBcl-2 και JurkatApoJ και αναλύθηκε σε 1.6% πηκτή αгарόζης.

Η διάσπαση της πολυ-ADP ριβόσυλο-πολυμεράσης (PARP) αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό κυττάρων, που υφίστανται απόπτωση από ποικίλα αποπτωτικά ερεθίσματα. Η PARP είναι ένα πυρηνικό ένζυμο 115 kDa που βρίσκεται στην χρωματίνη και καταλύει την μεταφορά των μονάδων ADP-ριβόζης από το NAD^+ σε διάφορες πυρηνικές πρωτεΐνες όπως ιστόνες, τοποϊσομεράσες και στον εαυτό της. Η καταλυτική ενεργότητα της PARP αυξάνεται σε μη-αποπτωτικά κύτταρα μετά από επαγωγή βλάβης στο DNA. Επιπλέον η PARP είναι επίσης στόχος της δράσης των κασπασών, ενζύμων που εμπλέκονται στην απόπτωση των κυττάρων. Κατά την απόπτωση, η 115 kDa PARP διασπάται σε δύο τμήματα 89 kDa και 25 kDa, διαχωρίζοντας έτσι το αμινο-τελικό τμήμα του ενζύμου που προσδένει στο DNA από το καρβοξυ-τελικό τμήμα με αποτέλεσμα την απώλεια της δράσης του. Έτσι η διάσπαση της PARP θεωρείται ως ένας αξιόπιστος δείκτης της απόπτωσης των κυττάρων.



Σχήμα 6.3. Έκφραση της PARP σε φυσιολογικά και σε επιμολυσμένα κύτταρα Jurkat μετά από χορήγηση 2-ME. Ολικές πρωτεΐνες απομονώθηκαν από μη-επεξεργασμένα (0) και από επεξεργασμένα με αιθανόλη (Et) ή 0,5 μM και 1,0 μM 2-ME για 24 h κύτταρα Jurkat, JurkatPuro και JurkatBcl-2, διαχωρίστηκαν σε 8% SDS-πηκτή πολυακρυλαμιδίου και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά western χρησιμοποιώντας ένα μονοκλωνικό αντίσωμα της PARP.

Η διάσπαση της PARP εξετάστηκε σε μη-επεξεργασμένα ή επεξεργασμένα με 2-ME ή αιθανόλη κύτταρα Jurkat, JurkatPuro και JurkatBcl-2. Η ανάλυση των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από αυτά τα κύτταρα με ανοσοαποτύπωμα κατά western, έδειξε ότι τα μη-επεξεργασμένα ή επεξεργασμένα με αιθανόλη κύτταρα Jurkat και JurkatPuro εξέφρασαν τη φυσιολογική μη-διασπασμένη μορφή του

ενζύμου, μεγέθους 115 kDa. Στα κύτταρα όμως που χορηγήθηκε 0,5 μ M και 1,0 μ M 2-ME για 24 ώρες ανιχνεύθηκαν και οι δύο μορφές του ενζύμου. Η μια αντιστοιχούσε στην ακέραια 115 kDa μορφή σε κατά πολύ μειωμένα επίπεδα σε σύγκριση με αυτές των ομολόγων τους κυττάρων με ή χωρίς αιθανόλη, ενώ η δεύτερη μορφή του ενζύμου αντιστοιχούσε στην υδρολυμένη 89 kDa μορφή της PARP, που είχε υποστεί πρωτεολυτική διάσπαση (Σχήμα 6.3). Αντίθετα, στα μη-επεξεργασμένα ή επεξεργασμένα με 2-ME ή αιθανόλη κύτταρα Jurkat που υπερέκφραζαν την Bcl-2 ανιχνεύθηκε μόνο η φυσιολογική μορφή του ενζύμου PARP μεγέθους 115 kDa (Σχήμα 6.3). Επομένως, σύμφωνα με τα παραπάνω, η υπερέκφραση της Bcl-2 ανέστειλε πλήρως την απόπτωση των κυττάρων Jurkat που προκαλείται από την 2-ME.

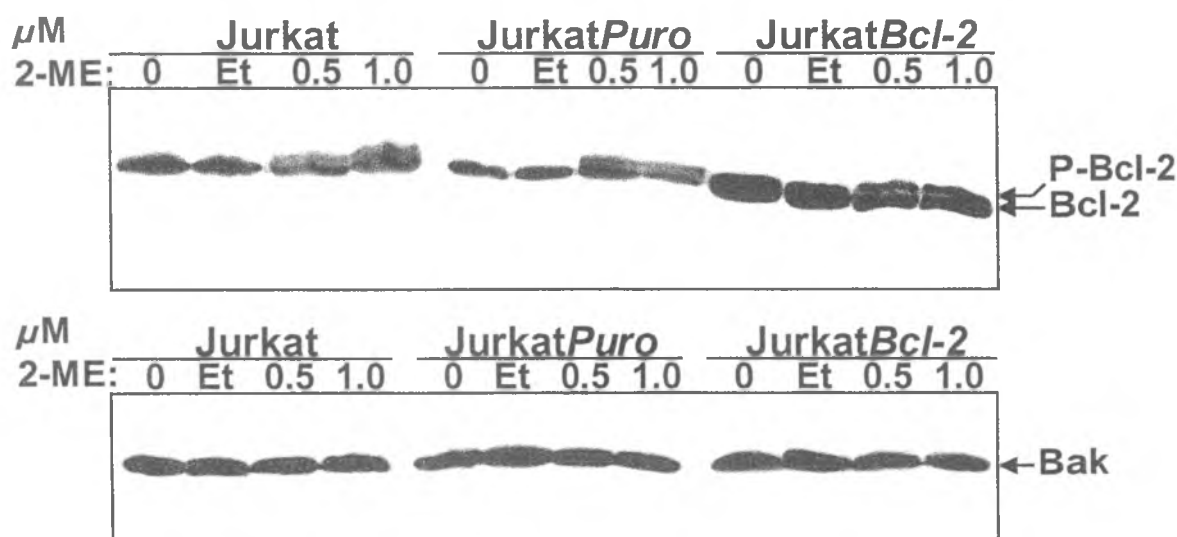
3.3. Η επίδραση της 2-μεθοξυοιστραδιόλης στην έκφραση των Bcl-2 και Bak

Η επαγωγή της απόπτωσης από την 2-μεθοξυοιστραδιόλη επιτυγχάνεται μέσω της φωσφορυλίωσης και απενεργοποίησης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 (Attala et al., 1998; Bu et al., 2002; Shimada et al., 2003). Προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση της 2-ME στην Bcl-2, χορηγήθηκε στα Jurkat, JurkatPuro και JurkatBcl-2 0,5 μ M και 1,0 μ M 2-ME ή αιθανόλη για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών απομονώθηκαν οι ολικές πρωτεΐνες των παραπάνω κυττάρων και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western, ως προς την έκφραση και την κατάσταση της δομής της Bcl-2 (Σχήμα 7.3, άνω μέρος εικόνας). Η 2-ME και στις δύο συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκε προκάλεσε τη φωσφορυλίωση της Bcl-2, σε σύγκριση με τα μη-επεξεργασμένα ή επεξεργασμένα με αιθανόλη κύτταρα Jurkat, επιβεβαιώνοντας τα πρόσφατα ευρήματα μελετών σε αυτό το θέμα (Attala et al., 1998; Bu et al., 2002; Shimada et al., 2003). Επιπλέον, στα κύτταρα JurkatBcl-2 ανιχνεύθηκε επίσης η φωσφορυλιωμένη μορφή της Bcl-2 λόγω της χορήγησης της 2-ME, παρόλα αυτά όμως τα επίπεδα της έκφρασης της Bcl-2 στα κύτταρα JurkatBcl-2 διατηρήθηκαν υψηλά, ακόμα και μετά την χορήγηση της 2-ME λόγω της εξωγενώς εισαχθείσης Bcl-2 πρωτεΐνης (Σχήμα 7.3, άνω μέρος εικόνας).

Η φωσφορυλίωση της Bcl-2 εμποδίζει το διμερισμό της με προ-αποπτωτικά μέλη της υπεροικογένειας της Bcl-2 (Halдар et al., 1995; Halдар et al., 1996) και η αναλογία των αντι-αποπτωτικών ως προς τα προ-αποπτωτικά μέλη της

υπεροικογένειας της Bcl-2 καθορίζει την ευαισθησία των κυττάρων σε ποικίλα αποπτωτικά ερεθίσματα (Reed, 1998; Hengartner, 2000).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω καθώς και τη φωσφορυλίωση της Bcl-2 μετά από χορήγηση 2-ME, εξετάστηκε και η έκφραση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bak, μέλος της υπερικογένειας Bcl-2, η οποία φαίνεται από προηγούμενες μελέτες να παίζει ρόλο-κλειδί στην απόπτωση των κυττάρων Jurkat (Wang et al., 2001a; Wang et al., 2001b). Παρασκευάστηκε, επομένως, μια μεμβράνη νιτροκυταρίνης με ανοσοαποτύπωμα κατά Western και επωάστηκε με ένα ειδικό αντίσωμα για την ανθρώπινη Bak (Σχήμα 7.3, κάτω μέρος εικόνας). Η έκφραση της Bak ήταν υψηλή σε όλα τα διαφορετικά κύτταρα Jurkat και παρέμεινε αμετάβλητη μετά από προσθήκη 2-ME σε αυτά.



Σχήμα 7.3. Έκφραση της Bcl-2 και Bak σε φυσιολογικά και σε επιμολυσμένα κύτταρα Jurkat μετά από χορήγηση 2-ME. Ολικές πρωτεΐνες απομονώθηκαν από μη-επεξεργασμένα (0) και από επεξεργασμένα με αιθανόλη (Et) ή 0,5 μM και 1,0 μM 2-ME για 24 h κύτταρα Jurkat, JurkatPuro και JurkatBcl-2, διαχωρίστηκαν σε 15% SDS-πηκτή πολυακρυλαμιδίου και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά western χρησιμοποιώντας ένα μονοκλωνικό αντίσωμα της Bcl-2 (ανω μέρος εικόνας) ή της Bak (κάτω μέρος εικόνας). P-Bcl-2; φωσφορυλιωμένη μορφή της Bcl-2.

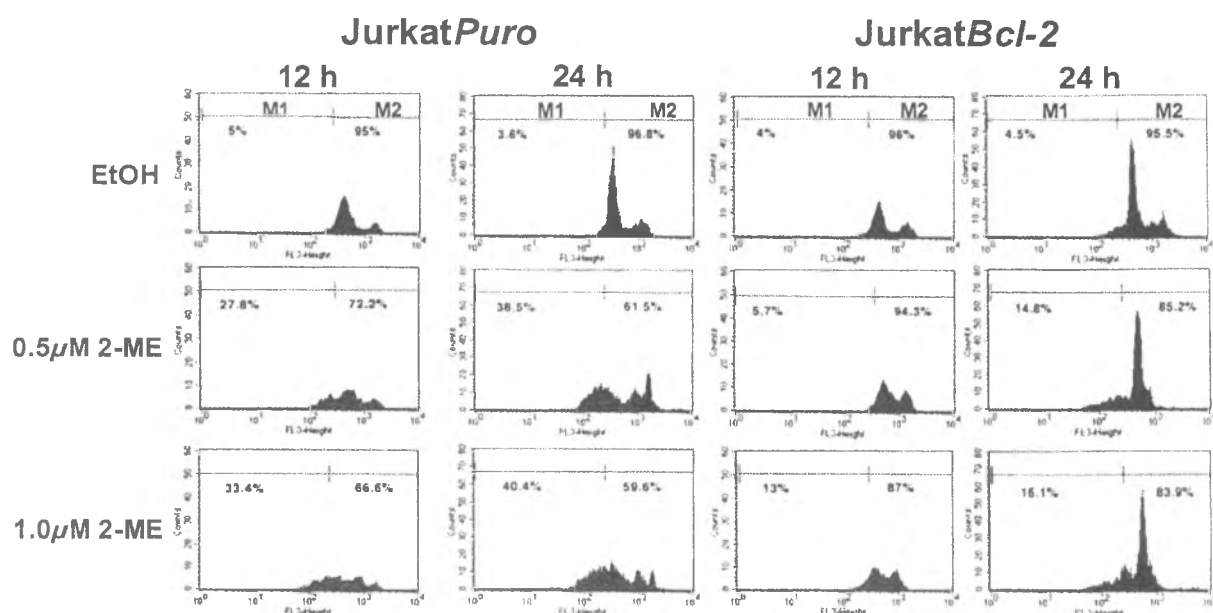
Συνοπτικά, η 2-ME προκάλεσε τη φωσφορυλίωση και συνεπώς απενεργοποίηση της Bcl-2 των κυττάρων Jurkat και JurkatPuro χωρίς να επηρεάσει την έκφραση της Bak με αποτέλεσμα να μεταβληθεί η αναλογία Bcl-2:Bak προς τα προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας και τα κύτταρα έγιναν πιο ευαίσθητα στην 2-ME-επαγόμενη απόπτωση. Απεναντίας, η συνεχής υπερέκφραση της Bcl-2 στα επιμολυσμένα κύτταρα JurkatBcl-2 μετέβαλε το λόγο Bcl-2:Bak προς την αντι-αποπτωτική Bcl-2 πρωτεΐνη, παρέχοντας με τον τρόπο αυτό ανθεκτικότητα στα κύτταρα Jurkat στην 2-ME-επαγόμενη απόπτωση.

4.3. Η Bcl-2 επάγει τη διακοπή της αύξησης των Jurkat στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου μετά τη χορήγηση 2-μεθοξυοιστραδιόλης

Προκειμένου να εξεταστεί περαιτέρω ο μηχανισμός με τον οποίο η Bcl-2 προστάτεψε τα κύτταρα από την 2-ME-επαγόμενη απόπτωση, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (Σχήμα 8.3).

Όπως ήταν αναμενόμενο τα κύτταρα JurkatPuro είχαν το ίδιο προφίλ κυτταρικού κύκλου με αυτή των κυττάρων Jurkat με ή χωρίς 2-ME (Σχήμα 8.3). Ο υπό-G1 πληθυσμός, ο οποίος είναι ενδεικτικός των κυττάρων που υφίστανται απόπτωση, αυξήθηκε από 5% (κύτταρα επεξεργασμένα με αιθανόλη) στο 27,8% και 33,4% μετά από χορήγηση 0,5 μ M και 1,0 μ M 2-ME για 12 ώρες, αντίστοιχα, και από 3,6% (κύτταρα επεξεργασμένα με αιθανόλη) στο 38,5% και 40,4% μετά από προσθήκη 0,5 μ M και 1,0 μ M 2-ME για 24 ώρες, αντίστοιχα (Σχήμα 8.3, Πίνακας 2).

Σε αντίθεση, στα κύτταρα JurkatBcl-2 το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων που εμφανίζεται σαν υπο-φάση G1 αυξήθηκε από 4% (κύτταρα επεξεργασμένα με αιθανόλη) στο 5,7% και 13% μετά από χορήγηση 0,5 μ M και 1,0 μ M 2-ME για 12 ώρες, αντίστοιχα, και από 4,5% (κύτταρα επεξεργασμένα με αιθανόλη) στο 14,8% και 16,1% μετά από προσθήκη 0,5 μ M και 1,0 μ M 2-ME για 24 ώρες, αντίστοιχα (Σχήμα 8.3), επιβεβαιώνοντας την προστατευτική δράση της Bcl-2 έναντι της 2-ME-επαγόμενης απόπτωσης.

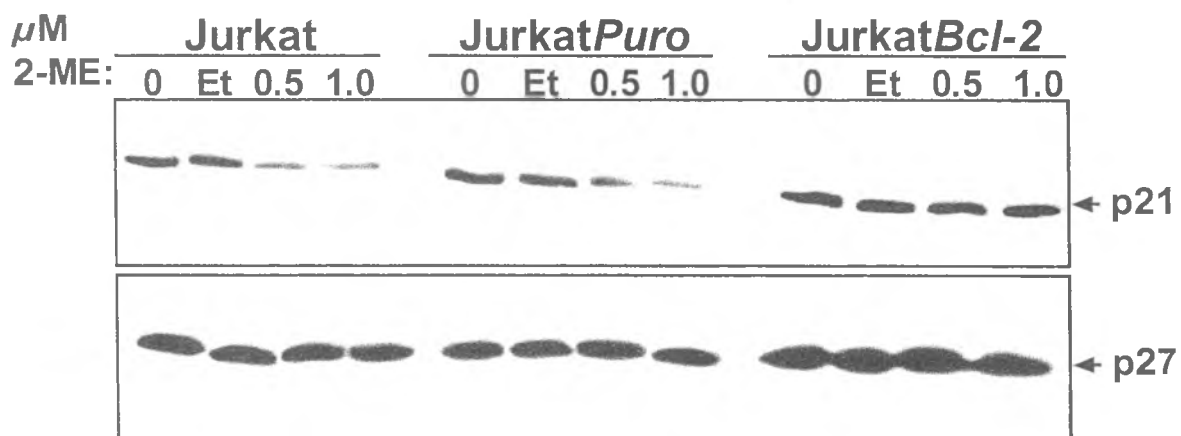


Σχήμα 8.3. Ανάλυση της 2-ME-επαγόμενης απόπτωσης των κυττάρων JurkatPuro και JurkatBcl-2 με κυτταρομετρία ροής. Κύτταρα JurkatPuro και JurkatBcl-2 στα οποία χορηγήθηκε αιθανόλη (EtOH) ή 0,5 μM και 1,0 μM 2-ME για 12 h και 24 h συλλέχθηκαν, επεξεργάστηκαν και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής όπως περιγράφεται στα υλικά και μέθοδοι.

Ωστόσο, το προφίλ του κυτταρικού κύκλου των JurkatPuro και JurkatBcl-2 ήταν διαφορετικό μετά από χορήγηση 0,5 μM και 1,0 μM 2-ME για 24 ώρες (Σχήμα 3.8). Αν και δεν έγινε κάποιος ποσοτικός προσδιορισμός, ήταν εμφανές ότι τα περισσότερα κύτταρα που εισήχθησαν στην S-φάση, ήταν τα JurkatBcl-2 σε σχέση με τα κύτταρα JurkatPuro. Επιπλέον, η Bcl-2 προκάλεσε διακοπή της αύξησης στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου μετά από χορήγηση 0,5 μM και 1,0 μM 2-ME για 24 ώρες, σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου αυτών, τα JurkatPuro (Σχήμα 8.3). Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 από την Bcl-2 μετά από προσθήκη 2-ME, μπορεί να αποτελέσει ένα μηχανισμό με τον οποίο η Bcl-2 ασκεί την προστατευτική της δράση έναντι της 2-MEεπαγόμενης απόπτωσης, επιτρέποντας, ενδεχομένως, στα κύτταρα να επιδιορθώσουν το κατεστραμμένο DNA, που προκλήθηκε από τη 2-ME, πριν συνεχιστεί ο κυτταρικός κύκλος.

5.3. Η διακοπή της αύξησης των Jurkat στη G1-φάση του κυτταρικού κύκλου σχετίζεται με τη μεταβολή της έκφρασης των κυκλινο-εξαρτώμενων αναστολέων των κινασών, p21^{Waf1/Cip1/Sid1} και p27^{Kip1}

Προκειμένου να αποκτηθεί μια σαφέστερη εικόνα του μηχανισμού δράσης της Bcl-2 στη διακοπή της G1 φάσης μετά από χορήγηση 2-ME, εξετάστηκε η έκφραση των κυκλινο-εξαρτώμενων (cdks) αναστολέων των κινασών, p21^{Waf1/Cip1/Sid1} και p27^{Kip1} με ανοσοαποτύπωμα κατά Western (Σχήμα 9.3). Και οι δύο οι cdks p21 και η p27 ανιχνεύτηκαν σε όλους τους διαφορετικούς τύπους των κυττάρων Jurkat. Η p27 εκφράζονταν σε υψηλότερα επίπεδα από ότι η p21. Όμως στα κύτταρα Jurkat και JurkatPuro στα οποία χορηγήθηκε 2-ME, τα επίπεδα έκφρασης της p21 μειώθηκαν σημαντικά, ενώ τα επίπεδα της p27 παρέμειναν αμετάβλητα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα των κυττάρων ελέγχου (JurkatPuro) με ή χωρίς αιθανόλη. Αντίθετα, η υπερέκφραση της Bcl-2 είχε σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης της p21 και σε μικρότερο βαθμό της p27. Επιπλέον, τα επίπεδα της p21 παρέμειναν αμετάβλητα μετά τη χορήγηση 2-ME στα κύτταρα που υπερέκφραζαν τη Bcl-2 σε σύγκριση με τα ομόλογα τους κύτταρα ελέγχου με ή χωρίς αιθανόλη (Σχήμα 9.3, άνω μέρος εικόνας), αποδεικνύοντας ότι η ενισχυμένη έκφραση της Bcl-2 αύξησε πιθανά τη σταθερότητα της p21.



Σχήμα 9.3. Έκφραση της p21^{Waf1/Cip1} και p27^{Kip1} σε κύτταρα Jurkat, JurkatPuro και JurkatBcl-2 μετά από χορήγηση 2-ME. Ολικές πρωτεΐνες απομονώθηκαν από μη-επεξεργασμένα (0) και από επεξεργασμένα με αιθανόλη (Et) ή 0,5 μM και 1,0 μM 2-ME για 24 h κύτταρα Jurkat, JurkatPuro και JurkatBcl-2, διαχωρίστηκαν σε 15% SDS-πηκτή πολυακρυλαμίδιου και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά western χρησιμοποιώντας ένα μονοκλωνικό αντίσωμα της p21^{Waf1/Cip1} (άνω μέρος εικόνας) ή της p27^{Kip1} (κάτω μέρος εικόνας).

Επιπροσθέτως, δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στην έκφραση της p27 στα Jurkat Bcl-2, στα οποία χορηγήθηκε 2-ME (Σχήμα 9.3, κάτω μέρος εικόνας) που έδειξε πως η επίδραση της 2-ME στους αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cdks) ήταν ειδική για την p21. Συνοπτικά, τα παραπάνω στοιχεία οδήγησαν στην ταυτοποίηση ενός μηχανισμού, ο οποίος συμπεριλαμβάνει αυξορρύθμιση των αναστολέων των cdks p21 και p27 καθώς και ενίσχυση της πρωτεϊνικής σταθερότητας τους και ιδιαίτερα της p21 μετά την έκθεση των κυττάρων σε 2-ME κατά την οποία η Bcl-2 προκαλεί διακοπή της αύξησης στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων Jurkat.

ΕΝΟΤΗΤΑ Β

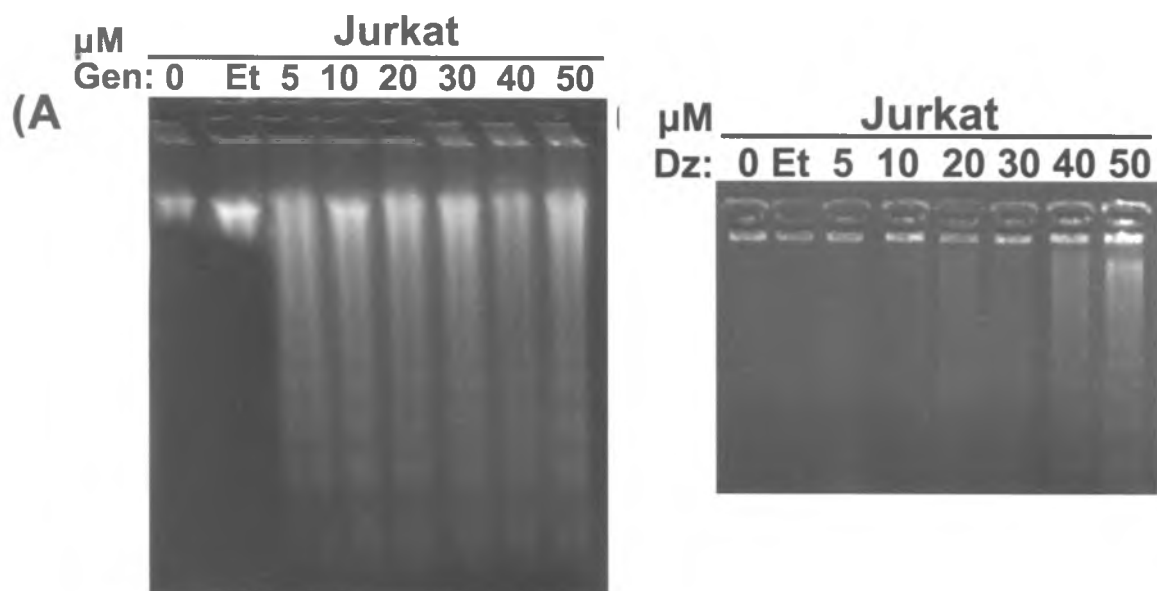
Οι επιδράσεις των φυτο-οιστρογόνων ισοφλαβονοειδών γενιστενίνης και δαϊζείνης στον πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση των κυττάρων Jurkat: Ο ρόλος της Bcl-2

6.3. Η γενιστενίνη είναι ισχυρότερος επαγωγέας της απόπτωσης των καρκινικών T-λεμφοκυττάρων Jurkat από τη δαϊζείνη

Για να εξεταστεί η επίδραση των ισοφλαβονοειδών, δαϊζείνης (Dz) και γενιστενίνης (Gen) στην απόπτωση των κυττάρων Jurkat, σε ενεργά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα Jurkat χορηγήθηκαν γενιστενίνη (Gen) (Σχήμα 10.3A) ή δαϊζείνη (Dz) (Σχήμα 10.3B) σε συγκεντρώσεις από 0 μ M έως 50 μ M ή αιθανόλη για 24 ώρες. Μετά την επώαση των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ισοφλαβονοειδών για 24 ώρες, απομονώθηκε χαμηλού μοριακού βάρους DNA από αυτές τις καλλιέργειες και αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.

Παρατητήθηκε ότι και τα δύο ισοφλαβονοειδή, γενιστενίνη (Gen) και δαϊζείνη (Dz) επήγαγαν την ενδονουκλεοσωμική θραυσματοποίηση του DNA των κυττάρων Jurkat, χαρακτηριστική των κυττάρων που υφίστανται προγραμματισμένο θάνατο ή απόπτωση, συγκρινόμενη με τα κύτταρα στα οποία δεν είχαν χορηγηθεί τα ισοφλαβονοειδή ή είχαν επωαστεί μόνο με 0,05% αιθανόλη (Σχήμα 10.3).

Όμως, το προφίλ της απόπτωσης των κυττάρων Jurkat ήταν διαφορετικό για τα δύο ισοφλαβονοειδή που χρησιμοποιήθηκαν. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η γενιστενίνη (Gen) ήταν ισχυρότερος επαγωγέας της απόπτωσης των κυττάρων Jurkat από τη δαϊζείνη (Dz). Η επαγωγή της ενδονουκλεοσωμικής θραυσματοποίησης (DNA ladder) ήταν εμφανής και σημαντική σε συγκέντρωση δαϊζείνης 5 μ M και σχεδόν ολοκληρωτική αφού δεν φαίνεται να αυξήθηκε περισσότερο σε συγκεντρώσεις από 10 μ M έως 50 μ M γενιστενίνης για 24 ώρες (Σχήμα 10.3A).



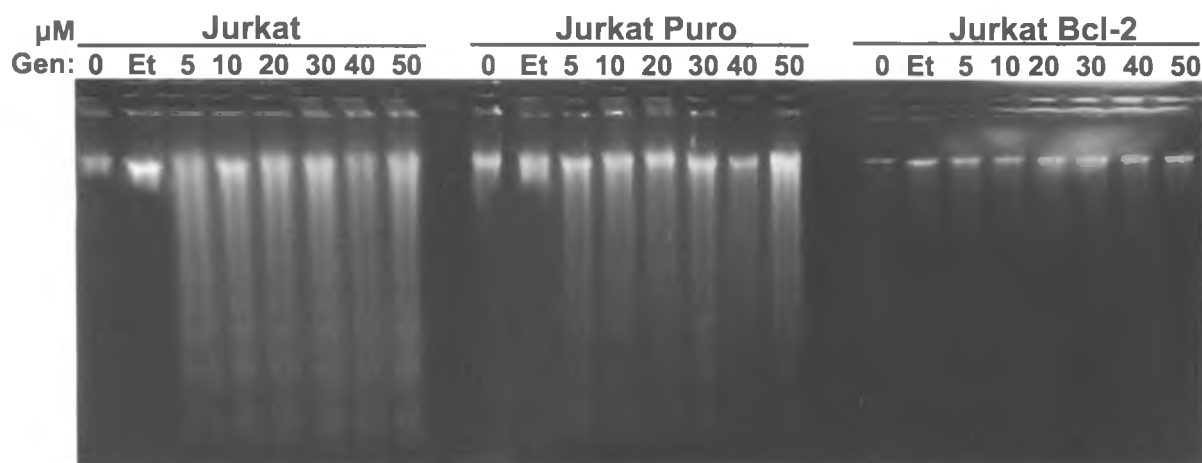
Σχήμα 10.3. Επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων Jurkat από τη γενιστενίνη (Gen) και τη δαϊζείνη (Dz). Σε ενεργά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα Jurkat, χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις **(A)** γενιστενίνης (Gen) ή **(B)** δαϊζείνης (Dz) που κυμαίνονταν από 0 ως 50 μM ή αιθανόλη (Et) για 24 h και χαμηλού μοριακού βάρους DNA απομονώθηκε και αναλύθηκε σε 1.6% πηκτή αγαρόζης.

Επομένως, η απόπτωση των κυττάρων Jurkat στα οποία χορηγήθηκε γενιστενίνη (Gen) δεν φαίνεται να ήταν δοσο-εξαρτώμενη, αφού ακόμη και σε συγκεντρώσεις χαμηλές ως και 5 μM ήταν ικανά να επάγει την κυτταρική απόπτωση, χωρίς εμφανή αύξηση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (Σχήμα 10.3A). Αντίθετα, η απόπτωση των κυττάρων Jurkat μετά τη χορήγηση δαϊζείνης (Dz) ήταν εμφανής σε συγκεντρώσεις πάνω από 20 μM μετά από 24 ώρες και αυξήθηκε σημαντικά με αυξανόμενες συγκεντρώσεις γενιστενίνης, και ιδιαίτερα σε συγκεντρώσεις 40 μM και 50 μM δαϊζείνης (Dz) για 24 ώρες (Σχήμα 10.3B). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η γενιστενίνη (Gen) ήταν ισχυρότερος επαγωγέας των καρκινικών T-λεμφοκυττάρων Jurkat από τη δαϊζείνη (Dz).

7.3. Η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 αναστέλλει την απόπτωση των κυττάρων Jurkat που επάγεται από τα ισοφλαβονοειδή, γενιστενίνη και δαϊζείνη

Για να εξεταστεί η επίδραση της Bcl-2 στην απόπτωση των κυττάρων Jurkat μετά από τη χορήγηση γενιστενίνης (Gen) ή δαϊζείνης (Dz), σε ενεργά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα JurkatPuro και JurkatBcl-2 (Σχήμα 4.3A), χορηγήθηκαν γενιστενίνη (Gen), (Σχήμα 11.3) ή δαϊζείνη (Dz) (Σχήμα 12.3) σε συγκεντρώσεις από 0 μ M έως 50 μ M ή αιθανόλη για 24 ώρες. Μετά την επώαση των κυττάρων με τα ισοφλαβονοειδή απομονώθηκε χαμηλού μοριακού βάρους DNA από αυτές τις καλλιέργειες και αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.

Η χορήγηση της γενιστενίνης (Gen) (Σχήμα 11.3) προκάλεσε την ενδονουκλεοσωμική θραυσματοποίηση του DNA, κύριο χαρακτηριστικό κυττάρων που υφίστανται απόπτωση στα κύτταρα JurkatPuro, δίνοντας το ίδιο προφίλ απόπτωσης όπως και στα μη επιμολυσμένα κύτταρα Jurkat και σε όλες τις συγκεντρώσεις που χορηγήθηκαν. Η απόπτωση των κυττάρων JurkatPuro στα οποία χορηγήθηκε η γενιστενίνη (Gen) δεν φαίνεται να ήταν δοσο-εξαρτώμενη επιβεβαιώνοντας το παραπάνω εύρημα στα κύτταρα Jurkat (Σχήμα 10.3A). Σε αντίθεση, η υπερέκφραση της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 ανέστειλε πλήρως την απόπτωση των κυττάρων Jurkat που επάγεται από τη γενιστενίνη (Gen) (Σχήμα 11.3).



Σχήμα 11.3. Η Επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων Jurkat από τη γενιστενίνη (Gen) αναστέλλεται από τη Bcl-2. Στα κύτταρα JurkatPuro και JurkatBcl-2 χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις γενιστενίνης (Gen) που κυμαίνονταν από 0 ως 50 μ M ή

αιθανόλη (Et) για 24 h και χαμηλού μοριακού βάρους DNA απομονώθηκε και αναλύθηκε σε 1.6% πηκτή αгарόζης.



Σχήμα 12.3. Η επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων Jurkat από τη δαϊζείνη (Dz) αναστέλλεται από τη Bcl-2. Στα κύτταρα JurkatPuro και JurkatBcl-2 χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις δαϊζείνης (Dz) που κυμαίνονταν από 0 ως 50 μM ή αιθανόλη (Et) για 24 h και χαμηλού μοριακού βάρους DNA απομονώθηκε και αναλύθηκε σε 1.6% πηκτή αгарόζης.

Η χορήγηση της δαϊζείνης (Dz) στα κύτταρα JurkatPuro ή JurkatBcl-2 (Σχήμα 12.3) προκάλεσε την ενδονουκλεωσμική θραυσματοποίηση του DNA, στα κύτταρα JurkatPuro, δίνοντας το ίδιο προφίλ απόπτωσης όπως και στα μη επιμολυσμένα κύτταρα Jurkat και σε όλες τις συγκεντρώσεις που χορηγήθηκαν. Η απόπτωση των κυττάρων JurkatPuro στα οποία χορηγήθηκε η δαϊζείνη (Dz) φαίνεται να ήταν δοσο-εξαρτώμενη, και ισχυρή σε συγκεντρώσεις των 40 μM και 50 μM Dz, επιβεβαιώνοντας το παραπάνω εύρημα στα κύτταρα Jurkat (Σχήμα 10.3B). Σε αντίθεση, η υπερέκφραση της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 ανέστειλε πλήρως την απόπτωση των κυττάρων Jurkat που επάγεται από τη δαϊζείνη (Dz) (Σχήμα 12.3).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπερέκφραση της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 ήταν ισχυρός αναστολέας της απόπτωσης των κυττάρων Jurkat που προκαλείται από τα ισοφλαβονοειδή, γενιστενίνη (Gen) και δαϊζείνη (Dz).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μηχανισμός δράσης της 2-μεθοξυοιστραδιόλης σε καρκινικά κύτταρα σε σχέση με την κυτταρική αύξηση και επιβίωση

Η 2-ME είναι ένα αντι-αυξητικό μόριο που επάγει αποτελεσματικά απόπτωση σε ενεργώς αυξανόμενα κύτταρα *in vitro* και *in vivo* (Pribulba et al., 2000). Είναι ένας ενδογενής μεταβολίτης της 17β-οιστραδιόλης που σχηματίζεται από διαδοχική υδροξυλίωση και μεθυλίωση στη θέση-2, στο ήπαρ (Zhu and Cooney, 1998). Η 2-ME δρα ανεξάρτητα από τους οιστρογονικούς υποδοχείς α και β καθώς και αναστέλλει την αγγειογένεση *in vitro* και *in vivo* (La Valle et al., 2002; Yu et al., 1997). Η αντι-πολλαπλασιαστική δράση της 2-ME είναι επιλεκτική και περιορίζεται σε καρκινικά κύτταρα (Fotsis et al., 1994; Mukhopodhay and Roth, 1997; Seegers et al., 1997; Huang et al., 2000; Kumar et al., 2001; Bu et al., 2001; Ghosh et al., 2003) και αυτό την καθιστά μη τοξική χημειοθεραπευτική ουσία (Wassberg, 1999; Fotsis et al., 1994).

Οι συνθήκες και οι ποσότητες χορήγησης της 2-ME, που προκάλεσαν προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο πολλών κυτταρικών σειρών *in vitro* και *in vivo*, ήταν διαφορετικές για τον κάθε κυτταρικό τύπο. Για παράδειγμα, συγκεντρώσεις των 10 nM 2-ME προκάλεσαν αναστολή του πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων κυττάρων του καρκίνου του μαστού MCF-7 (Lottering et al., 1992). Σε αρκετά υψηλότερες συγκεντρώσεις της τάξης των $\geq 1,0$ μ M, η 2-ME εμφάνισε αυξημένη κυτταροτοξικότητα σε πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές που περιελάμβαναν κύτταρα του καρκίνου του τραχήλου HeLa και του καρκίνου του μαστού MCF-7 (Seegers et al., 1997), ενώ στα 10 μ M, η 2-ME προκάλεσε απόπτωση στις

κυτταρικές σειρές PC-3 και LNCaP του καρκίνου του προστάτη μετά από 6 και 36 ώρες, αντίστοιχα (Bu et al., 2002).

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν επιπλέον οι επιδράσεις της 2-ME στα ανθρώπινα T-λευχαιμικά κύτταρα Jurkat και ο ρόλος της Bcl-2 στην απόπτωση που προκαλείται από τη 2-ME. Τα κύρια ευρήματα της παρούσας εργασίας ήταν ότι η 2-ME προκάλεσε την απόπτωση των κυττάρων Jurkat κατά ένα δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο, με τον δεύτερο να είναι πιο κρίσιμος παράγοντας στη 2-ME-επαγόμενη απόπτωση. Δεύτερον, η επαγωγή της απόπτωσης των Jurkat από τη 2-ME σχετιζόταν με τη φωσφορυλίωση και κατ' ακολουθία απενεργοποίηση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2. Η υπερέκφραση της Bcl-2 ανέστειλε πλήρως την απόπτωση των κυττάρων Jurkat από τη 2-ME. Τρίτον, η 2-ME μείωσε τα επίπεδα έκφρασης του αναστολέα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών $p21^{Waf/Cip1}$ και τέταρτον, η υπερέκφραση της Bcl-2 προκάλεσε τη διακοπή της κυτταρικής αύξησης στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου μετά τη χορήγηση 2-ME αυξάνοντας την έκφραση των $p21^{Waf/Cip1}$ και $p27^{Kip1}$ και τη σταθερότητα της $p21^{Waf/Cip1}$. Αυτά τα ευρήματα χαρακτηρίζουν ένα μοριακό μηχανισμό με τον οποίο η Bcl-2 προστάτεψε τα κύτταρα Jurkat από την 2-ME-επαγόμενη απόπτωση.

Στην παρούσα μελέτη αποδείχθηκε ότι η 2-ME αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και επάγει την απόπτωση των κυττάρων Jurkat κατά ένα δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο. Η 2-ME προκάλεσε απόπτωση στα κύτταρα Jurkat τόσο όταν χορηγήθηκε σε μικρές ποσότητες των 0,5 μM , όσο και στις μεγαλύτερες δόσεις των 10 μM , για 24 και 48 ωρών. Η διαπίστωση αυτή προέκυψε μετά από εφαρμογή μιας δοσο-εξαρτώμενης διαδικασίας με τα κύτταρα Jurkat, τα οποία εμφάνισαν επαγωγή της ενδονουκλεοσωμικής θραυσματοποίησης του DNA (DNA laddering) στις παραπάνω συγκεντρώσεις. Κατά τη μελέτη της χρονο-εξαρτώμενης απόπτωσης, διαπιστώθηκαν ότι η επαγωγή της θραυσματοποίησης του DNA ξεκίνησε στις 8 ώρες και ήταν πιο έντονη στις 12 και 24 ώρες στις 0,5 μM και 1,0 μM 2-ME που χορηγήθηκαν. Η χρόνο- και δοσο-εξαρτώμενη απόπτωση των κυττάρων Jurkat επιβεβαιώθηκε και με εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής, καθώς και με την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP, η οποία θεωρείται αξιόπιστος δείκτης της απόπτωσης των κυττάρων. Η επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων Jurkat από τη 2-ME ήταν ανεξάρτητη από την p53 καθώς τα κύτταρα Jurkat φέρουν μεταλλαγμένα αντίγραφα της p53.

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η Bcl-2 συμμετέχει στην αποπτωτική δράση της 2-ME σε πολλά καρκινικά κύτταρα. Ειδικότερα, έχει δειχθεί ότι η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 μπορεί να φωσφορυλιωθεί στη θέση Ser70 και ακολούθως να απενεργοποιηθεί από ουσίες οι οποίες αποσταθεροποιούν τους μικροσωληνίσκους, όπως η ταξόλη (taxol) (Haldar et al., 1996; Blagosklonny et al., 1996; Haldar et al., 1997; Wang et al., 1998; Srivastava et al., 1999) ή η 2-ME (Haldar et al., 1997; Attala et al., 2002; Bu et al., 2002; Shimada et al., 2003). Όμως, η Bcl-2 δεν φωσφορυλιώνεται σε κύτταρα επεξεργασμένα με προ-αποπτωτικά φάρμακα τα οποία δεν επηρεάζουν τη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων δείχνοντας ότι η καταστροφή των μικροσωληνίσκων αποτελεί ερέθισμα για τη φωσφορυλίωση της Bcl-2 (Haldar et al., 1996; Blagosklonny et al., 1997; Haldar et al., 1997). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η επαγόμενη απόπτωση των ερυθρομυελοειδών λευχαιμικών κυττάρων (Attala et al., 1998) και προστατικών κυττάρων (Bu et al., 2002) από τη 2-ME οφείλεται στη φωσφορυλίωση της c-jun αμινοτελικής κινάσης (JNK) η οποία συσχετίζεται με τη φωσφορυλίωση της Bcl-2, μολονότι ο μηχανισμός αυτός παραμένει μη κατανοητός (Lei et al., 2002). Όμοια, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι παράγοντες που επηρεάζουν τη δυναμική των μικροσωληνίσκων τουμπουλίνης επάγουν επίσης τη φωσφορυλίωση ενός άλλου αντι-αποπτωτικού μέλους της υπεροικογένειας της Bcl-2, της Bcl-X_L στο κατάλοιπο Ser62 η οποία συσχετίζεται με τη φωσφορυλίωση της JNK (Basu and Haldar, 2003). Ο ρόλος της φωσφορυλίωσης της Bcl-2 στη ρύθμιση της απόπτωσης δεν είναι σαφής διότι μερικές μελέτες δείχνουν ότι η φωσφορυλίωση ενισχύει ενώ άλλες ότι απενεργοποιεί την αντι-αποπτωτική της δράση (Haldar et al., 1995; Horiuchi et al., 1997; Ito et al., 1997; Yamamoto et al., 1999; Deng et al., 2000; Deng et al., 2001). Τα αποτελέσματα στην παρούσα εργασία συνηγορούν στην απενεργοποίηση της Bcl-2 με φωσφορυλίωση και επομένως στην απώλεια ή μείωση της αντι-αποπτωτικής της δράσης. Η φωσφορυλίωση της Bcl-2 εμποδίζει τη διμερισμό της στην Bak πρωτεΐνη, η τελευταία δεν απενεργοποιείται και τα κύτταρα οδηγούνται στην απόπτωση (Haldar et al., 1995; Haldar et al., 1996). Η φωσφορυλίωση και απενεργοποίηση της Bcl-2 προκάλεσε απόπτωση σε λευχαιμικά κύτταρα ερυθρού μυελού (Attala et al., 1998) καθώς και σε κύτταρα του καρκίνου του προστάτη (Bu et al., 2002; Shimada et al., 2003). Τα παραπάνω στοιχεία αποδεικνύουν ότι η φωσφορυλίωση και απενεργοποίηση της Bcl-2 είναι σημαντικός παράγοντας της 2-ME-επαγόμενης

απόπτωσης, δεν είναι όμως, γνωστό αν η Bcl-2 μπορεί να προστατέψει από τον θάνατο που προκαλεί η ουσία αυτή.

Προκειμένου να μελετηθεί ο αντι-αποπτωτικός ρόλος της Bcl-2 στην επαγόμενη απόπτωση των κυττάρων Jurkat από τη 2-ME κατασκευάστηκαν κύτταρα Jurkat που εκφράζουν έναν φορέα ελέγχου (Puro) και Jurkat που εκφράζουν ανθρώπινη Bcl-2. Η ανθεκτικότητα των Jurkat που υπερέκφραζαν την Bcl-2 έναντι των Jurkat και JurkatPuro ήταν εμφανής μετά από επώαση τους για 24 h με 0,5 μ M και 1,0 μ M ή αιθανόλη και ανάλυση των εκχυλισμάτων DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Η υπερέκφραση της Bcl-2 στα κύτταρα JurkatBcl-2 παρεμπόδισε πλήρως την ενδονουκλεοσωμική θραυσματοποίηση του DNA καθώς και την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP, δύο σημαντικών δεικτών της απόπτωσης των κυττάρων.

Προκειμένου να ερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση της 2-ME στην έκφραση της Bcl-2, χορηγήθηκαν 0,5 μ M και 1,0 μ M 2-ME ή αιθανόλη σε κύτταρα Jurkat, JurkatPuro και JurkatBcl-2 για 24 h. Η ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωμα κατά Western έδειξε ότι η 2-ME προκάλεσε φωσφορυλίωση των Bcl-2 σε όλους τους διαφορετικούς τύπους Jurkat. Παρόλ' αυτά, στα JurkatBcl-2 τα επίπεδα της μη-φωσφορυλιωμένης Bcl-2 παρέμειναν υψηλά, παρά την φωσφορυλίωση ενός μέρους αυτής, λόγω της υπερέκφρασης της Bcl-2.

Τα μέλη της υπεροικογένειας της Bcl-2 είναι οι κύριοι ρυθμιστές της απόπτωσης διαμέσου της μιτοχονδριακής πορείας. Οι αντι- (Bcl-2 και Bcl-X_L) και προ- (Bax και Bak) αποπτωτικές Bcl-2 πρωτεΐνες ρυθμίζουν την απόπτωση, μερικώς, ελέγχοντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια. Οι Bcl-2 και Bcl-X_L παρεμποδίζουν την ανακατανομή του κυτοχρώματος C ως απόκριση σε ποικίλα αποπτωτικά ερεθίσματα, ενώ οι Bax και Bak προάγουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια. Ο λόγος μεταξύ προ- και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών καθορίζει μερικώς την επιδεκτικότητα των κυττάρων σε αποπτωτικά ερεθίσματα (Gross et al., 1999; Kroemer and Reed, 2000; Hengartner, 2000). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η Bak παίζει σημαντικό ρόλο στον αποπτωτικό μηχανισμό απελευθέρωσης του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια και συνεπώς στη ανθεκτικότητα σε χημειοθεραπευτικά των ανθρώπινων Τ-λευχαιμικών κυττάρων Jurkat (Wang et al., 2001a; Wang et al., 2001b).

Εφόσον ο λόγος Bcl-2:Bak είναι καθοριστικός για την τύχη των κυττάρων μετά από επίδραση αποπτωτικών διεγερτών (Reed, 1998; Green and Reed, 1998; Hengartner, 2000), κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη της έκφρασης της Bak στην παρούσα

έρευνα. Η ανάλυση της πρωτεΐνης Bak όλων των εξεταζόμενων κυττάρων Jurkat, έδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης της Bak παρέμειναν αμετάβλητα ακόμη και μετά από χορήγηση 2-ME. Τα αποτελέσματα αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στα κύτταρα με φωσφορυλιωμένη Bcl-2 ο λόγος Bcl-2:Bak μετακινείται προς τη Bak, ενώ στα κύτταρα Jurkat με υπερεκφρασμένη Bcl-2 ο λόγος Bcl-2:Bak μεταβάλλεται προς τη Bcl-2. Στην πρώτη περίπτωση τα κύτταρα είναι πιο ευαίσθητα στην απόπτωση που προκαλείται από τη χορήγηση της 2-ME, ενώ στη δεύτερη περίπτωση η υπερέκφραση της Bcl-2 αναστέλλει την αποπτωτική πορεία των κυττάρων μετά από επεξεργασία με αντικαρκινικές ουσίες όπως η 2-ME. Αυτά τα αποτελέσματα μεταβολής του λόγου Bcl-2:Bak από τη 2-ME ή/και την υπερέκφραση της Bcl-2 είναι σημαντικά δεδομένης της μεγάλης σημασίας της Bak στην απόπτωση των κυττάρων Jurkat. Κύτταρα Jurkat ελλειμματικά σε Bak βρέθηκαν να είναι ανθεκτικά στην απόπτωση που προκαλείται από UV ή από αντικαρκινικά φάρμακα λόγω της αδυναμίας να απελευθερώσουν κυτόχρωμα C από τα μιτοχόνδρια ή τον παράγοντα επαγωγής της απόπτωσης AIF (apoptosis-inducing factor) (Wang et al., 2001a). Επιπλέον ευρήματα έδειξαν ότι η χορήγηση εξωγενούς Bak μπορούσε να επάγει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από μιτοχόνδρια απομονωμένα από κύτταρα Bax^{-/-}, Bid^{-/-} ή Bid^{-/-}Bax^{-/-} διαγονιδιακών ποντικών, δηλαδή ελλειμματικά σε Bax ή/και Bid, συμπεραίνοντας ότι η λειτουργία της Bak είναι ανεξάρτητη από τις Bax και Bid (Wang et al., 20001a). Συνοπτικά, αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι η Bak συμμετέχει είτε στη ρύθμιση ή στη διεξαγωγή της απόπτωσης διαμέσου της μιτοχονδριακής πορείας. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προτείνουν ότι η απενεργοποίηση λόγω φωσφορυλίωσης της Bcl-2 και ο λόγος Bcl-2:Bak ήταν καθοριστικά στην απόπτωση των κυττάρων Jurkat από τη 2-ME και ότι η Bcl-2 βρίσκεται στην πορεία της αποπτωτικής πορείας αυτών των κυττάρων που ενεργοποιείται από τη 2-ME.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η 2-ME επάγει τη διακοπή της αύξησης διαφόρων καρκινικών σειρών σχεδόν σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου που εξαρτάται από τη δόση της 2-ME και από το κυτταρικό τύπο. Για παράδειγμα, η 2-ME παρεμποδίζει τη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου καρκινικών κυττάρων μαστού στη φάση G1 (Schumacher and Neuhaus, 2001), οστεοσαρκωματικών κυττάρων στις φάσεις G1/S και G2/M που εξαρτάται από τη συγκέντρωση της 2-ME (Golebiewska et al., 2002), κυττάρων Jurkat (Attala et al., 1996), ενώ μετασχηματισμένων κυττάρων ανθρώπινων ινοβλαστών (Seegers et al., 1997),

καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων προστάτη (Kumar et al., 2001; Qadan et al., 2001), γαστρικού καρκινώματος (Lin et al., 2001), πολλαπλού μυελώματος (Dingli et al., 2002), μελανώματος (Ghosh et al., 2003) και μυελοβλαστώματος (Kumar et al., 2003) στη φάση G2/M, ενώ σε κύτταρα καρκίνου του παγκρέατος προκαλεί παράταση της S-φάσης (Schumacher et al., 1999). Άλλες μελέτες έδειξαν ότι επάγει την απόπτωση καρκινικών κυττάρων όπως πνεύμονα (Mukhopadhyay and Roth, 1997) και προστάτη (Bu et al., 2002) χωρίς να επηρεάζει τη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η μελέτη της επίδρασης της 2-ME στον κυτταρικό κύκλο των Jurkat ήταν αναγκαία στην παρούσα έρευνα, προκειμένου να ερευνηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός με τον οποίο η Bcl-2 προστατεύει τα κύτταρα από τη 2-ME-επαγόμενη απόπτωση. Πράγματι, η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής, έδειξε ότι η Bcl-2 επάγει τη διακοπή της αύξησης των κυττάρων στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου μετά από χορήγηση 2-ME. Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση λόγω δράσης της Bcl-2, πιθανότατα, μαρτυρεί έναν αντι-αποπτωτικό μηχανισμό, κατά τον οποίο δίνεται η ευκαιρία στα κύτταρα να επιδιορθώνουν το κατεστραμμένο, από την 2-ME, DNA, προτού προχωρήσει το κύτταρο στις επόμενες φάσεις του κύκλου.

Αυτή η διακοπή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων Jurkat στην G1 φάση, ήταν αφορμή για την εξέταση της έκφρασης πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου όπως η p21^{Waf1/Cip1} και p27^{Kip1} (Sherr and Roberts, 1999). Χορήγηση 2-ME σε κύτταρα Jurkat και JurkatPuro προκάλεσε τη μειορρύθμιση της p21 αλλά όχι της p27. Αντίθετα, σε κύτταρα JurkatBcl-2 υπήρχε μια αυξορρύθμιση των p21 και p27 και τα επίπεδα έκφρασης της p21 παρέμειναν αμετάβλητα μετά τη χορήγηση 2-ME, δείχνοντας ότι πιθανά η υπερέκφραση της Bcl-2 να ενισχύει τη σταθερότητα της p21. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες η πρωτεΐνη p21 δεν έχει μόνο ανασταλτικές δράσεις στην πορεία του κυτταρικού κύκλου, αλλά είναι δυνατό να δρα και ως θετικός ρυθμιστής αυτού (Sherr and Roberts, 1999; Cheng et al., 1999; Weiss et al., 2000; Ying et al., 2002) αλλά και να παίζει σημαντικό ρόλο στην αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης (Gorospe et al., 1999). Εφόσον από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι η Bcl-2 προκάλεσε τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη G1 φάση, τότε προφανώς ευθύνεται και για την αύξηση των επιπέδων έκφρασης αλλά και της σταθερότητας της p21 μετά τη χορήγηση 2-ME. Η μειορρύθμιση της p21 από τη 2-ME στα Jurkat και JurkatPuro μπορεί να οφείλεται σε μεταγραφικό μηχανισμό ή στη διάσπαση της p21 από την κασπάση-3 καθώς η p21 αλλά και η p27 αποτελούν υποστρώματα αυτής της πρωτεάσης (Levkau et al., 1998;

Zhang et al., 1999a; Zhang et al., 1999b). Η αναστολή της ενεργότητας της κασπάσης-3 (βασικής έκφρασης του ενζύμου λόγω του ότι τα Jurkat εμφανίζουν αυθόρμητη απόπτωση αλλά και επαγόμενης από τη 2-ME) από τη Bcl-2 θα δικαιολογούσε μια αυξορρύθμιση των επιπέδων των p21 και p27 αλλά και διατήρηση των επιπέδων αυτών των πρωτεϊνών. Η σταθερότητα της p21, που επάγεται από φωσφορυλίωση από την AKT/PKB κινάση (Li et al., 2002), αποκαλύπτει έναν πιθανό μηχανισμό, κατά τον οποίο επιτρέπεται η επιδιόρθωση του κατεστραμμένου DNA μετά από χορήγηση αντικαρκινικών ουσιών, όπως η 2-ME, ο οποίος μηχανισμός είναι δυνατό να οδηγήσει στην κυτταρική επιβίωση. Επομένως, η αύξηση και σταθερότητα της p21 μετά από χορήγηση 2-ME μπορεί να συνδεθεί με την αντι-αποπτωτική δράση της Bcl-2, εφόσον η τελευταία προκαλεί τη διακοπή της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου.

Συνοψίζοντας όλες τις παραπάνω πληροφορίες που προκύπτουν από τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης, αποδεικνύεται ότι πράγματι η 2-ME είναι μια ουσία με αντι-πολλαπλασιαστική και αποπτωτική δράση στα κύτταρα Jurkat. Στον αποπτωτικό μηχανισμό δράσης της 2-ME εμπλέκεται η φωσφορυλίωση της Bcl-2 και η μειορρύθμιση της p21. Η υπερέκφραση, όμως, της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση που επάγεται από τη 2-ME μεταβάλλοντας το λόγο Bcl-2:Bak και προκαλώντας την αυξορρύθμιση των p21 και p27 και πιθανά αυξάνοντας τη σταθερότητα της p21.

Οι επιδράσεις των ισοφλαβονοειδών γενιστενίνης και δαϊζείνης σε καρκινικά κύτταρα

Τα ισοφλαβονοειδή είναι φυσικά φυτικά φυτο-οιστρογόνα τα οποία φαίνεται να έχουν χημειοπροστατευτικές ιδιότητες, αντι-πολλαπλασιαστικές και αντι-μιτωτικές επιδράσεις, επάγουν την απόπτωση διαφόρων καρκινικών κυττάρων και τη διαφοροποίηση τους. Επίσης φαίνεται ότι έχουν ευεργετικά αποτελέσματα για την πρόσληψη του καρκίνου ή τη μείωση του ρυθμού εμφάνισης ορισμένων καρκίνων. Μεταξύ των ισοφλαβονοειδών φυτο-οιστρογόνων που έχουν μελετηθεί είναι η γενιστενίνη και η δαϊζείνη. Η γενιστενίνη, που βρίσκεται κυρίως στη σόγια, χαρακτηρίστηκε αρχικά σαν ένα φυτο-οιστρογόνο το οποίο ανταγωνίζεται με την οιστραδιόλη για δέσμευση στους οιστρογονικούς υποδοχείς στα αδενοκαρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7 (Cheng et al., 1953; Martin et al., 1978). Στη συνέχεια, η γενιστενίνη χαρακτηρίστηκε ως ένας εξιδεικευμένος αναστολέας των κινασών τυροσίνης (Akiyama et al., 1987) και της τοποϊσομεράσης-II (Markovits et al., 1989). Η δαϊζείνη, όπως και η γενιστενίνη, παίζει και αυτή ρόλο στην παρεμπόδιση των *ορμονο-επαγόμενων* καρκίνων και αυτό οφείλεται στις αντι-πολλαπλασιαστικές και αποπτωτικές επιδράσεις της σε καρκινικά κύτταρα καθώς επίσης και στη δράση της ως εξιδεικευμένος αναστολέας των κινασών τυροσίνης αλλά όχι της τοποϊσομεράσης-II (Constantinou et al., 1995).

Η γενιστενίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό παρεμποδίζοντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών όπως ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος μαστού MCF-7 (Pagliacci et al., 1993; Constantinou et al., 1998; Dampier et al., 2001), MDA-MB-231 (Constantinou et al., 1998; Li et al., 1999; Dampier et al., 2001) και άλλων (Dampier et al., 2001), παγκρέατος (Lyn-Cook et al., 1999), ηπατώματος (Su et al., 2003), προστάτη (Shen et al., 2000), κεφαλής και τραχήλου (Alhasan et al., 1999; Alhasan et al., 2000; Alhasan et al., 2001), μελανώματος B16 (Iwashita et al., 2000), ερυθρολευχαιμικών κυτταρικών σειρών (Traganos et al., 1992; Jing and Waxman, 1995; Constantinou et al., 1998) και λευχαιμικών κυτταρικών σειρών συμπεριλαμβανομένων των Jurkat T-λευχαιμικών κυττάρων (Pagliacci et al., 1993; Finlay et al., 1994; Spinozzi et al., 1994; Martinez-Lorenzo et al., 2000). Η παρεμπόδιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων στη φάση G2/M από τη γενιστενίνη οφείλεται εν μέρει στην αυξορρύθμιση του αναστολέα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών

p21^{Waf1/Cip1} (Alhasan et al., 1999; Li et al., 1999; Alhasan et al., 2000; Shen et al., 2000). Η γενιστενίνη (Gen) αναστέλλει επίσης την αύξηση των καρκίνων που επάγονται από χημικά καρκινογόνα σε επιμύες καθώς επίσης και ανθρωπίνων λευχαιμικών κυττάρων που μεταφυτεύονται σε πονικούς (Lamartiniere et al., 1995; Uckun et al., 1995; Su et al., 2003).

Σε σύγκριση με τη γενιστενίνη (Gen), ελάχιστες μελέτες έχουν διαξαχθεί για το ρόλο της δαϊζείνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αναφορές έδειξαν ότι και η δαϊζείνη (Dz) αναστέλλει την αύξηση καρκινικών κυτταρικών σειρών όπως ερυθρολευχαιμικών (Jing and Waxman, 1995) και ηπατώματος (Su et al., 2003), αλλά η αποτελεσματικότητα / δραστηριότητα της σε σχέση με τη γενιστενίνη είναι πολύ μικρότερη (Jing and Waxman, 1995) και ο μηχανισμός δράσης της δεν έχει μελετηθεί.

Η δράση της γενιστενίνης (Gen) δεν περιορίζεται μόνο στις αντι-πολλαπλασιαστικές επιδράσεις της σε καρκινικά κύτταρα *in vitro*. Έχειδειχθεί ότι η γενιστενίνη επάγει την απόπτωση διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών, όπως ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος μαστού MCF-7 (Constantinou et al., 1998; Dampier et al., 2001; Hu et al., 2001), MDA-MB-231 (Constantinou et al., 1998; Li et al., 1999; Dampier et al., 2001) και άλλων (Dampier et al., 2001), ηπατώματος (Su et al., 2003), στομάχου (Zhou et al., 2004), προστάτη (Shen et al., 2000), κεφαλής και τραχήλου (Alhasan et al., 1999; Alhasan et al., 2000; Alhasan et al., 2001), μελάνωματος (Iwashita et al., 2000; Tamura et al., 2003), ερυθρολευχαιμικών κυτταρικών σειρών (Constantinou et al., 1998) και λευχαιμικών κυτταρικών σειρών συμπεριλαμβανομένων των Jurkat T-λευχαιμικών κυττάρων (Finlay et al., 1994; Spinozzi et al., 1994). Σε αντίθεση η αποπτωτική δράση της δαϊζείνης είναι μικρότερη από αυτή της γενιστενίνης (Constantinou et al., 1998; Su et al., 2003). Η επαγωγή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων από τη γενιστενίνη συσχετίζεται με τη μειορρύθμιση της έκφρασης του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (Alhasan et al., 2001; Baxa et al., 2003), της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2 (Constantinou et al., 1998; Alhasan et al., 2000; Hu et al., 2001; Li et al., 1999; Su et al., 2003; Zhou et al., 2004), Bcl-X_L (Su et al., 2003), γονιδίων-στόχων του NF-κB (Catz and Johnson, 2001; Heckman et al., 2002), και την αυξορρύθμιση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης bax (Alhasan et al., 2000; Zhou et al., 2004). Επίσης, οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η επαγωγή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων από τη γενιστενίνη ήταν ανεξάρτητη της κατάστασης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης

p53, μια σημαντική ένδειξη, καθώς οι περισσότεροι καρκίνοι φέρουν μεταλλαγμένες μορφές της p53 που συνήθως τους καθιστούν χημειοανθεκτικούς. Τα ευρήματα των παραπάνω μελετών είναι επίσης σημαντικά καθώς ο λόγος των προ-αποπτωτικών μελών προς των αντι-αποπτωτικών μελών της υπεροικογένειας του Bcl-2 καθορίζει τις αποκρίσεις των κυττάρων σε αποπτωτικούς παράγοντες (Hengartner et al., 2000). Επίσης έχειδειχθεί ότι η γενιστενίνη αυξάνει τη φωσφορυλίωση της bcl-2 με αποτέλεσμα να απενεργοποιεί την αντι-αποπτωτική δράση της πρωτεΐνης (Constantinou et al., 1998). Συνολικά φαίνεται, πρώτον, ότι η γενιστενίνη μεταβάλλει το λόγο προ- : αντι-αποπτωτικών μελών της υπεροικογένειας του Bcl-2 προς τα πρώτα, και δεύτερο, η πρωτεΐνη bcl-2 εμπλέκεται στην πορεία απόπτωσης που ενεργοποιείται από, τουλάχιστον, τη γενιστενίνη. Όμως ο ρόλος της bcl-2 στην απόπτωση καρκινικών κυττάρων από ισοφλαβονοειδή φυτο-οιστρογόνα δεν έχει μελετηθεί.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή κατασκευάσαμε κύτταρα Jurkat που υπερέκφραζαν την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη bcl-2 προκειμένου να μελετηθούν οι επιδράσεις του στην απόπτωση που επάγεται από τα ισοφλαβονοειδή φυτο-οιστρογόνα, γενιστενίνη (Gen) και δαϊζείνη (Dz). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και τα δύο ισοφλαβονοειδή φυτο-οιστρογόνα, γενιστενίνη (Gen) και δαϊζείνη (Dz) επήγαγαν την απόπτωση των Jurkat T-λευχαιμικών ανθρωπίνων κυττάρων, αλλά η αποπτωτική δράση της γενιστενίνης ήταν ισχυρότερη από αυτή της δαϊζείνης, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (Jing and Waxman, 1995; Constantinou et al., 1998). Μολονότι δεν μελετήθηκε ή έκφραση της bcl-2 ή η κατάσταση φωσφορυλίωσης της μετά τη χορήγηση γενιστενίνης ή δαϊζείνης, η υπερέκφραση της bcl-2 στα κύτταρα Jurkat επέφερε ανθεκτικότητα στην απόπτωση που επάγεται από τα ισοφλαβονοειδή φυτο-οιστρογόνα, γενιστενίνη (Gen) και δαϊζείνη (Dz). Αυτό το νέο έυρημα κρίνει περαιτέρω μελέτης προκειμένου να καθιερωθεί ο ρόλος της bcl-2 στην απόπτωση των Jurkat T-λευχαιμικών ανθρωπίνων κυττάρων που επάγεται από τα ισοφλαβονοειδή φυτο-οιστρογόνα, γενιστενίνη (Gen) και δαϊζείνη (Dz).

Μελλοντικές ερευνητικές κατευθύνσεις

Η έκφραση της Bcl-2 επάγεται από τον πυρηνικό μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ (Catz and Johnson, 2001; Heckman et al., 2002) επομένως θα είναι σημαντικό να μελετηθεί αν η ενεργοποίηση του NF-κΒ στα κύτταρα Jurkat επάγει την έκφραση του Bcl-2 και επιφέρει ανθεκτικότητα στη 2-ME-επαγόμενη απόπτωση.

Επίσης, δεδομένου ότι η $p21^{Waf1/Cip1}$ εμπλέκεται στον αποπτωτικό μηχανισμό δράσης της 2-ME αλλά και της προστασίας που επάγεται από τη Bcl-2 και ότι η υπερέκφραση της $p21^{Waf1/Cip1}$ αυξάνει την κυτταρική επιβίωση και επιφέρει ανθεκτικότητα σε αντικαρκινικά φάρμακα και θεραπείες (Gorospe et al., 1999), θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί περαιτέρω ο ρόλος της $p21$ στη 2-ME-επαγόμενη απόπτωση των κυττάρων Jurkat. Συγκεκριμένα μπορεί να μελετηθούν οι επιδράσεις: (α) της $p21^{Waf1/Cip1}$ (i) στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και (ii) στην κυτταρική επιβίωση των κυττάρων Jurkat μετά τη χορήγηση 2-ME, χρησιμοποιώντας τη προσέγγιση της παρεμπόλης RNA (RNAi; RNA interference) και (β) να αναλυθεί με μικροσυστοιχίες cDNA (cDNA microarrays) η μεταβολή στην έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης από τη 2-ME σε κύτταρα που υπερεκφράζουν Bcl-2 ή / και δεν εκφράζουν τη $p21^{Waf1/Cip1}$ παρουσία / απουσία 2-ME προκειμένου να χαρακτηρισθούν οι κρίσιμες μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση των κυττάρων που εμπλέκονται τόσο στην 2-ME-επαγόμενη απόπτωση, όσο και στη παρεμπόδιση του κυτταρικού κύκλου από τη Bcl-2 μετά τη χορήγηση 2-ME.

Αναφορές στη βιβλιογραφία δείχνουν ότι τα ισοφλαβονοειδή φυτο-οιστρογόνα επάγουν την απόπτωση καρκινικών κυττάρων εν μέρει επάγοντας τη μειορρύθμιση και τη φωσφορυλίωση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2. Θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθούν: (α) οι επιδράσεις της γενιστενίνης και της δαϊζείνης στην έκφραση και την κατάσταση φωσφορυλίωσης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2, (β) να μελετηθούν οι μηχανισμοί με τους οποίους επάγονται αυτές οι μεταβολές στη bcl-2 και (γ) να μελετηθεί ο ρόλος φωσφορυλιωμένων μορφών της bcl-2 στην απόπτωση των κυττάρων Jurkat.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελέτη της επίδρασης φυτικών προϊόντων και μεταβολιτών οιστρογόνων στη φυσιολογία καρκινικών κυττάρων

Ελένη Λενέτη, Γεωπόνος, Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεμπιστήμιο Ιωαννίνων

Η 2-μεθοξυοιστραδιόλη (2-ME) είναι ένας ενδογενής μεταβολίτης της 17β-οιστραδιόλης (E_2), που δρα ανεξάρτητα από την πρόσδεση της στους υποδοχείς των οιστρογόνων α και β . Η 2-ME αναστέλλει την αγγειογένεση και την αύξηση καρκινικών κυττάρων *in vitro* και *in vivo* και επάγει την απόπτωση τους. Οι μηχανισμοί της αντι-μιτωτικής και αποπτωτικής δράσης της 2-ME δεν είναι κατανοητοί. Η 2-ME πιθανά επηρεάζει τον πολυμερισμό της τουμπουλίνης και κατ' επέκταση την αύξηση της σταθερότητας των μικροσωληνίσκων ή τη δυναμική της ατράκτου κατά τη μίτωση που τελικά οδηγούν στη διακοπή της κυτταρικής αύξησης. Η 2-ME φαίνεται να δρα μέσω της ενεργοποίησης (φωσφορυλίωσης) της c-jun αμινοτελική κινάσης (JNK) που έμμεσα οδηγεί στην φωσφορυλίωση και την απενεργοποίηση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2. Η αναστολή της αύξησης και η επαγωγή της απόπτωσης υφίστανται με τρόπο εξαρτώμενο ή μη από την p53.

Στην προτεινόμενη πτυχιακή εργασία έγιναν προσπάθειες να εξετασθούν οι επιδράσεις της 2-ME στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση της ανθρώπινης T-λευχαιμικής κυτταρικής σειράς Jurkat και ο ρόλος των αντι-αποπτωτικών γονιδίων Bcl-2 και κλαστρίνης/απολιποπρωτεΐνης J (ApoJ). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι η 2-ME προκάλεσε την απόπτωση των κυττάρων Jurkat κατά *χρονο-* και *δοσο-*εξαρτώμενο τρόπο. Η επαγωγή της απόπτωσης των Jurkat συσχετιζόταν με τη φωσφορυλίωση και συνεπώς απενεργοποίηση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 αλλά και με τη μειορρύθμιση της έκφρασης της p21^{Waf1/Cip1}. Η υπερέκφραση της Bcl-2 στα κύτταρα Jurkat επέφερε ανθεκτικότητα στη 2-ME-επαγόμενη απόπτωση μεταβάλλοντας το λόγο Bcl-2:Bak προς το Bcl-2. Σε αντίθεση, η υπερέκφραση της ApoJ ανέστειλε μερικώς την 2-ME-επαγόμενη απόπτωση. Η Bcl-2 προκάλεσε τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 μετά τη χορήγηση 2-ME που συσχετιζόταν με την αυξορρύθμιση των επιπέδων των p21^{Waf1/Cip1} και p27^{Kip1} αλλά και με τη διατήρηση των επιπέδων έκφρασης τους μετά

τη χορήγηση 2-ME, ιδιαίτερα της $p21^{Waf1/Cip1}$ που πιθανά να οφείλονταν στην αύξηση της σταθερότητας αυτής της πρωτεΐνης, μιας πρωτεΐνης που εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου αλλά και στην αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης. Συνολικά τα αποτελέσματα επιδεικνύουν ένα μοριακό μηχανισμό με τον οποίο η 2-ME επάγει την απόπτωση των κυττάρων Jurkat στον οποίο εμπλέκεται η φωφορυλίωση της Bcl-2, η μεταβολή του λόγου Bcl-2:Bak και η μειορρύθμιση της $p21^{Waf1/Cip1}$ αλλά και με τον οποίο η Bcl-2 επιφέρει ανθεκτικότητα στα κύτταρα Jurkat στην 2-ME-επαγόμενη απόπτωση.

Σε αντίθεση, τα φυτο-οιστρογόνα ισοφλαβονοειδή, δαΐζείνη (Dz) και γενιστενίνη (Gen) δρουν μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων και επάγουν την απόπτωση διαφόρων καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων, πιθανά μέσω της μεταβολής της έκφρασης ή της κατάστασης φωσφορυλίωσης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2. Στην παρούσα διατριβή έγιναν προσπάθειες να μελετηθούν οι επιδράσεις των φυτο-οιστρογόνων ισοφλαβονοειδών, γενιστενίνης (Gen) και δαΐζείνης (Dz) στην απόπτωση των ανθρωπίνων καρκινικών T-λεμφοκυττάρων Jurkat καθώς και οι επιδράσεις της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2 στην κυτταρική απόπτωση.

Η χορήγηση της της γενιστενίνης (Genistein; Gen) και της δαΐζείνης (Daidzein; Dz) επήγαγε την απόπτωση των κυττάρων Jurkat. Η επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων Jurkat από τη δαΐζείνη (Dz) φαίνεται να ήταν δοσο-εξαρτώμενη και ιδιαίτερα ισχυρή σε συγκεντρώσεις 40 μM και 50 μM δαΐζείνης (Dz) για 24 ώρες. Σε αντίθεση, η επαγωγή της απόπτωσης από τη γενιστενίνη (Gen) δεν φαίνεται να ήταν δοσο-εξαρτώμενη, αφού ακόμη και συγκεντρώσεις χαμηλές όσο 5 μM για 24 ώρες ήταν ικανή να επάγει την ενδονουκλεοσωμική θραυσματοποίηση του DNA των κυττάρων Jurkat, χαρακτηριστικό ενός αποπτωτικού φαινοτύπου, και δεν αυξήθηκε ιδιαίτερα σημαντικά με αυξανόμενες συγκεντρώσεις γενιστενίνης (Gen). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η γενιστενίνη (Gen) ήταν ισχυρότερος επαγωγέας της απόπτωσης των κυττάρων Jurkat από ότι η δαΐζείνη (Dz).

Η υπερέκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 στα κύτταρα Jurkat ανέστειλε πλήρως την κυτταρική απόπτωση που επάγεται από τα ισοφλαβονοειδή φυτο-οιστρογόνα γενιστενίνη (Gen) και δαΐζείνη (Dz), σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, επέφεροντας έτσι έναν φαινότυπο ανθεκτικό σε αυτά τα ισοφλαβονοειδή φυτο-οιστρογόνα. Επομένως, η Bcl-2 δρα ως ένας ισχυρός αναστολέας της απόπτωσης των κυττάρων Jurkat που προκαλείται από στα φυτο-οιστρογόνα ισοφλαβονοειδή, δαΐζείνη (Dz) και γενιστενίνη (Gen).

ABSTRACT

Studies on the effects of plant phytoestrogens and oestrogen metabolites on the physiology of cancer cells

Eleti Leneti, B.Sc. Agriculture, Laboratory of Experimental Physiology, School of Medicine, University of Ioannina, Ioannina, Greece

The endogenous estrogen metabolite 2-methoxyestradiol (2-ME) inhibits angiogenesis and tumour cell proliferation and induces apoptosis, through phosphorylation and inactivation of the anti-apoptotic protein Bcl-2. In the present report, the role of Bcl-2 in 2-ME-induced apoptosis of Jurkat cells was investigated. Treatment of cells with 2-ME induced dose- and time-dependent apoptosis as determined by DNA fragmentation and flow cytometry. Induction of apoptosis correlated with downregulation and phosphorylation of Bcl-2 without affecting the expression levels of Bak. Forced expression of Bcl-2 by retroviral infection completely abolished 2-ME-induced apoptosis compared to vector-infected or uninfected Jurkat cells as demonstrated by DNA fragmentation and PARP cleavage. Interestingly, exogenously introduced Bcl-2 was still phosphorylated following 2-ME treatment but the higher levels of expression were sufficient to protect cells from 2-ME-induced apoptosis. No change in the expression of Bak was detected in the infected cells or in the 2-ME-treated cells. Flow cytometry showed that Bcl-2-expressing cells were arrested in G1 phase following treatment with 2-ME, which correlated with increased levels of expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors p27 and p21 and enhanced protein stability of p21. As p21 has been implicated both in inhibiting cell cycle progression but also in enhancing cell survival, these results show that Bcl-2 protected cells from 2-ME-induced apoptosis by altering Bcl-2:Bak ratio towards Bcl-2 and enhancing protein stability of p21, thus providing evidence of a molecular mechanism by which Bcl-2 protects cells from 2-ME-induced apoptosis.

Isoflavones are natural plant phytoestrogens which have been shown to have anti-neoplastic and chemopreventive effects. Genistein and daidzen are plant-derived isoflavones displaying oestrogenic activity and possessing anti-proliferative,

apoptotic and antiangiogenic properties. Both phyto-estrogens induce growth arrest at G2/M boundary of the cell cycle and apoptosis, mainly by down-regulating and inducing the phosphorylation of the ant-apoptotic protein bcl-2 and up-regulating the expression of the pro-apoptotic member of the bcl-2 family, bax, hence shifting the ratio of bax:bcl-2 towards the pro-apoptotic members of the family. However, the effect of bcl-2 in phytoestrogen-induced apoptosis has not been investigated. In this report, we showed that both genistein and daidzein induced growth inhibition and apoptosis of Jurkat human T-cell leukemic cells. Further, we showed that genistein was a more potent inducer of apoptosis than daidzein. Moreover, ectopic overexpression of the human bcl-2 protein in Jurkat cells conferred resistance to phytoestrogen-mediated apoptosis. These results suggest that phytoestrogens might be promising agents for the treatment of human leukemia.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adams, J.M. and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.

Adlercreutz, H. (1995). Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ. Health. Perspect.* 103, 103-111.

Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, S., Watanabe, S., Itoh, N., Shiyba, M. and Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* 262, 5592-5595.

Alhasan, S.A., Aranha, O. and Sarkar, F.H. (2001). Genistein elicits pleiotropic molecular effects head and neck cancers cells. *Clin. Cancer Res.* 7, 4174-4181.

Alhasan, S.A., Ensley, J. and Sarkar, F.H. (2000). Genistein induced molecular changes in squamous cell carcinoma of the head and neck cell line. *Int. J. Oncol.* 16, 333-338.

Alhasan, S.A., Pietrasczkiwicz, H., Alonso, M.D., Ensley, J. and Sarkar, F.H. (1999). Genistein-induced cell cycle arrest and apoptosis in a head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Nutr. Cancer* 34, 12-19.

Anderson, J.J.B. and Garner, S.C. (1997). Phytoestrogens and health function. *Nutr. Today* 32, 232-239.

Asada, M., Yamada, T., Ichijo, H., Delia, D., Miyazano, K, Fukumuro, K. and Mizutani, S. (1999). Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21^{Cip1/WAF1} in monocytic differentiation. *EMBO J.* 18, 1223-1234.

Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signalling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.

Attalla, H., Mäkelä, T.P., Adlercreutz, H. and Andersson, L.C. (1996). 2-methoxyestradiol arrests cells in mitosis without depolymerising tubulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228, 467-473.

Attalla, H., Westberg, J.A., Andersson, L.C., Adlercreutz, H. and Mäkelä, T.P. (1998). 2-methoxyestradiol-induced phosphorylation of Bcl-2: Uncoupling from JNK/SAPK activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 616-619.

Ball, P. and Knuppen, R. (1980). Catecholoestrogens (2-and 4-hydroxyoestrigenes): chemistry, biogenesis, metabolism, occurrence and physiological significance. *Acta Endocrinol.* 232, 1-127.

Barnes, S. (1995). Effects of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *J. Nutr.* 125, 777S-783S.

Barnes, S. and Peterson, T.G. (1995). Biochemical targets of the isoflavone genistein in tumor cell lines. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208, 103-108.

Basu, A. and Haldar, S. (2003). Identification of a novel Bcl-X_L phosphorylation site regulating the sensitivity of taxol-or 2-methoxyestradiol-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 538, 41-47.

Baxa, D.M. and Yoshimura, F.K. (2003). Genistein reduces NF-kappa B in T lymphoma cells via a caspase-mediated cleavage of I kappa B alpha. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1009-1018.

Blagosklonny, M.V., Giannakakou, P., El-Deiry, W.S., Kingston, D.G., Higgs, P.I., Neckers, L.M. and Fojo, T. (1997). Raf/Bcl-2 phosphorylation: a step from microtubule damage to cell death. *Cancer Res.* 57, 130-135.

Blagosklonny, M.V., Schulte, T., Nguyen, P., Trepel, J. and Neckers, L.M. (1996). Bcl-2 protein downregulation is not required for differentiation of multidrug resistant HL60 leukaemia cells. *Cancer Res.* 56, 1851-1854.

Brann, D.W., Hendry, L.B. and Mahesh, V.B. (1995). Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *J. steroid Biochem. Mol. Biol.* 52, 113-133.

Breckwoldt, M., Keck, C. and Karck, U. (1995). Benefits and risks of hormone replacement therapy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53, 205-208.

Brzozowski, A.M., Pike, A.C.W., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O. et al. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753-758.

Bu, S., Blaukat, A., Fu, X., Heldin, N-E. and Landstrom, M. (2002). Mechanisms for 2-methoxyestradiol-induced apoptosis of prostate cancer cells. *FEBS Lett.* 531, 141-151.

Carothers, A.M., Hughes, S.A., Ortega, D. and Bertagnolli, M.M. (2002). 2-methoxyestradiol induces p53-associated apoptosis of colorectal cancer cells. *Cancer Lett.* 187, 77-86.

Cassidy, A. (1996). Physiological effects of phyto-oestrogens in relation to cancer and other human health risks. *Proc. Nutr. Soc.* 55, 399-417.

Catz, S.D. and Johnson, J.L. (2001). Transcriptional regulation of Bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene* 20, 7342-7351.

Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J.A, Fero, M., Roberts, J.M., Roussel, M. and Sherr, C.J. (1999). The p21^{Cip1} and p27^{Kip1} CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.* 18, 1571-1583.

Cheng, T., Rodrigues, N, Shen, H. M., Yang, Y.G., Dombkowski, D., Sykes, M. and Scadden, D.T. (2000). Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21^{cip1/waf1}. *Science* 287, 1804-1808.

Cheng, E., Story, C.D., Yoder L., Hale, W.H., Burroughs, W. (1953). Estrogenic activity of isovlavone derivatives extracted and prepared from soybean oil meal. *Science* 118, 164-165.

Colditz, G.A. and Frazier, A.L. (1995). Models of breast cancer show that risk is set by events of early life: prevention efforts must shift focus. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 4, 567-571.

Constantinou, A.I., Kamath, N. and Murley, J.S. (1999). Genistein inactivates bcl-2, delays the G2/M phase of the cell cycle, and induces apoptosis of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Eur. J. Cancer* 34, 1927-1934.

Constantinou, A.I., Mehta, R.G., Runyan, C, Rao, K.V.N., Vaughan, A. and Moon, R.C. (1995). Plant flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. *J. Nat. Prod.* 58, 217-225.

Coward, L., Barnes, N.C., Setchell, K.D.R. and Barnes, S. (1993). Genistein and daidzein, and their β -glycoside conjugates: anti-tumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1961-1967.

Cunningham, A.R., Klopman, G. and Rosenkranz, H.S. (1997). A dichotomy in the lipophilicity of natural estrogens, xenoestrogens and phytoestrogens. *Environ. Health Perspect.* 105, 665-668.

Cushman, M., He, H.M., Katzenellenbogen, J.A., Lin, C.M. and Hamel, E. (1995). Synthesis, antitubulin and antimitotic activity, and cytotoxicity of analogs of 2-methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite of estradiol that inhibits tubulin polymerization by binding to the colchicine binding site. *J. Med. Chem.* 38, 2041-2049.

D'Amato, R.J., Lin, C.M., Flynn, E., Folkman, J. and Hamel, E. (1994). 2-methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3964-3968.

Dampier, K., Hudson, E.A., Howells, M.M., Walker, R.A. and Gescher, A. (2001). Differences between human breast cell lines in susceptibility towards growth inhibition by genistein. *Br. J. Cancer* 85, 618-624.

Deng, X., Ruvolo, P., Carr, B. and May, Jr W.S. (2000). Survival function of ERK1/2 as IL-3-activated, staurosporine-resistant Bcl-2 kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1578-1583.

Deng, X., Xiao, L., Lang, W., Gao, F., Ruvolo, P. and May, Jr W.S. (2001). Novel role for JNK as a stress-activated kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 23681-23688.

Dingli, D., Timm, M., Russell, S.J., Witzig, T.E. and Rajkumar, S.V. (2002). Promising preclinical activity of 2-methoxyestradiol in multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* 8, 3948-3954.

Dodge J.A., Lugar, C.W., Cho, S., Short, L.L., Sato, M., Yang, N.N. et al. (1996). Evaluation of the major metabolites of raloxifene as modulators of tissue selectivity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 61, 97-106.

Dunn, I.F. (1983). Transport of estrogens in human plasma. In: G.R. Merrian and M.B. Lipsett (eds.), *Catechol Estrogens*, pp. 167-176. New York: Raven Press.

Evan, G.I. and Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science* 281, 1317-1322.

Finlay G.J., Holdway, K.M. and Baguley, B.C. (1994). Comparison of the effects of genistein and amscarine on leukemia cell proliferation. *Oncol. Res.* 6, 33-37.

Fotsis, T., Zhang, Y., Pepper, M.S., Adlercreutz, H., Montesano, R., Nawroth, P.P. and Schweigerer, L. (1994). The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* 368, 237-239.

Gelbeke, H.P. and Knuppen, R. (1976). The excretion of five different 2-hydroxyestrogen monomethylethers in human pregnancy urine. *J. Steroid Biochem.* 7, 457-463.

Ghosh, R., Ott, A.M., Seetharam, D., Slaga, T.J. and Kumar, A.P. (2003). Cell cycle block and apoptosis induction in a human melanoma cell line following treatment with 2-methoxyestradiol: therapeutic implications. *Melanoma Res.* 13, 119-127.

Golebiewska, J., Rozwadowski, P., Spodnik, J.H., Knap, N., Wakabayashi, Y. and Wozniak, M. (2002). Dual effect of 2-methoxyestradiol on cell cycle events in human osteosarcoma 143b cells. *Acta Biochim. Pol.* 49, 59-65.

Gorospe, M., Cirielli, C., Wang, X., Seth, P., Capogrossi, M. and Holbrook, N.J. (1997). p21^{Waf1/Cip1} protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene* 14, 929-935.

Gorospe, M., Wang, X. and Holbrook, N.J. (1999). Functional role of p21 during the cellular response to stress. *Gene Expr.* 7, 377-385.

Gorospe, M., Wang, X., Guyton, K.Z. and Holbrook, N.J. (1996). Protective role of p21^{Waf1/Cip1} against prostaglandin A2-mediated apoptosis of human colorectal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6654-6660.

Green, D.R. and Kroemer, G. (1998). The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* 8, 267-271.

Green D.R. and Reed J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.

Gross, A., McDonnell, J.M. and Korsmeyer, S.J. (1999). Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13, 1899-1911.

Gulberg, H.C. and Marsden, C.A. (1975). Catechol-o-methyltransferase. Pharmacological aspects and physiological role. *Pharmacol. Rev.* 27, 135-206.

Gulbis, J., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (1996). Structure of the C-terminal region of p21^{WAF1/CIP1} complexed with human PCNA. *Cell* 87, 297-306.

Haldar, S., Basu, A. and Croce, C.M. (1997). Bcl-2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer Res.* 57, 229-233.

Haldar, S., Basu, A. and Croce, C.M. (1998). Serine-70 is one of the critical sites for drug-induced Bcl-2 phosphorylation in cancer cells. *Cancer Res.* 58, 1609-1615.

Haldar, S., Chintapalli, J. and Croce, C.M. (1996). Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 56, 1253-1255.

Haldar, S., Jena, N. and Croce, C.M. (1995). Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4507-4511.

Hale, A.I., Smith, C.A., Sutherland, L.C., Stoneman, V.E., Longthorne, V.L., Culhane, A.C. and Williams, G. T. (1996). Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur. J. Biochem.* 236, 1-26.

Han, X. and Liehr, I.G. (1994). 8-hydroxylation of guanine bases in kidney and liver DNA of hamsters treated with estradiol: role of free radical damage preceding renal malignancy. *Carcinogenesis* 15, 997-1000.

Heckman, C.A., Mehew, J.W. and Boxer, L.M. (2002). NF-kappaB activates Bcl-2 expression in t(14;18) lymphoma cells. *Oncogene* 21, 3898-3908.

Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.

Horiuchi, M., Hayashida, W., Kambe, T., Yamada, T. and Dzau, V.J. (1997). Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 19022-19026.

Hu, Y., Dragowska, W.H., Wallis, A., Duronio, V. and Mayer, L. (2001). Cytotoxicity induced by manipulation of signal transduction pathways is associated with down-regulation of Bcl-2 but not Mcl-1 in MCF-7 human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 70, 11-20.

Huang, P., Feng, L., Oldham, E.A., Keating, M.J. and Plunkett, W. (2000). Superoxide dismutase as a target for killing of cancer cells. *Nature* 407, 390-395.

Ito, T., Deng, X., Carr, B. and May, Jr W.S. (1997). Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptotic function. *J. Biol. Chem.* 272, 11671-11673.

Iwashita, K., Kobori, M., Yamaki, K. and Tsushida, T. (2000). Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1813-1820.

Jordan, V.C. (1990). The only true antioestrogen is a no oestrogen. *Mol. Cell. Endocrinol.* 74, C91-C96.

Kim, H., Paterson, T.G. and Barnes, S. (1998). Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role of the effects through transforming growth factor signalling. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1418S-1425S.

Kirch, H.C, Flaswinkel, S., Rumpf, H., Brockmann, D. and Esche, H. (1999). Expression of human p53 requires synergistic activation of transcription from the p53 promoter by AP-1, NF-kappaB and Myc/Max. *Oncogene* 18, 2728-2738.

Klauber, N., Paragni, S., Flynn, E., Hamel, E. and D'Amato, R.J. (1997). Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol. *Cancer Res.* 57, 81-86.

Kroemer, G. and Reed, J.C. (2000). Mitochondria and cell death. *Nat. Med.* 6, 513-519.

Knight, D.C. and Eden, J.A. (1996). A review of the clinical effects of phytoestrogen. *Obstet. Gynecol.* 87, 897-904.

Kuiper, G.G.J.M., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nisson, S. and Gustaffson, J.A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863-870.

Kuiper, G.G.J.M., Enmark, E., Peltouhikki, M., Nisson, S. and Gustaffson, J.A. (1996). Cloning of a novel estrogen receptorexpressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5925-5930.

Kumar, A.P., Garcia, G.E., Orborn, J., Levin, V.A. and Slaga, T.J. (2001). 2-methoxyestradiol interferes with NF- κ B transcriptional activity in primitive neuroectodermal brain tumours: implications for management. *Mol. Carcinog.* 24, 209-216.

Kumar, A.P., Garcia, G.E. and Slaga, T.J. (2003). 2-methoxyestradiol blocks cell cycle progression at G2/M phase and inhibits growth of human prostate cancer cells. *Mol. Carcinog.* 31, 111-124.

Key, T.J.A. and Pike, M.C. (1988). The role of estrogens and progesterones in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 24, 29-43.

Kyle, E., Neckers, L., Takimoto, C, Curt G. and Bergan, R. (1997). Genistein-induced apoptosis of prostate cancer cells is preceded by a specific decrease in focal adhesion kinase activity. *Mo. Pharmacol.* 51, 193-200.

LaBaer, J., Garrett, M., Stevenson, L., Slingerland, J., Sandhu, C., Chou, H., Fattaey, A., and Harlow, E., (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* 11, 847-862.

Lamartiniere, C.A., Moore, J.B., Brown, N.M., Thompson, R., Hardin, M.J. and Barnes, S. (1995). *Genistein suppresses mammary cancer in rats. Carcinogenesis* 16, 2833-2840.

Lambert, C., Thews, O., Biesalski, H.K., Vaupel, P., Kellehe, D.K. and Frank, J. (2002). 2-methoxyestradiol enhances reactive oxygen species formation and increases the efficacy of oxygen radical generating tumour treatment. *Eur. J. Med. Res.* 7, 404-414.

La Vallee, T.M., Zhan, X.H., Herbstritt, C.J., Kough, F.C., Green, S.J. and Pribluba, V.S. (2002). 2-methoxyestradiol inhibits proliferation and induces apoptosis independently of estrogen receptors α and β . *Cancer Res.* 62, 3691-3697.

Lawlor, M.A. and Rotwein, P. (2000). Insulin-like growth factor-mediated muscle cell survival: central roles for Akt and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Mol. Cell Biol.* 20, 8983-8995.

Leclercq, G. and Hauson, J.C. (1979). Physiological and pharmacological effects of estrogens in breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 560, 427-455.

Lei, K., Nimnual, A., Zhong, W-X., Kennedy, N.J., Flavell, R.A., Thompson, C.B., Bar-Sagi, D. and Davis, R.J. (2002) The Bax subfamily of bcl-2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-jun NH₂-terminal kinase. *Mol. Cell Biol.* 22, 4929-2942.

Leung, L.K. and Wang, T.T. (2000). Bcl-2 is not reduced in the death of MCF-7 cells at low genistein concentration. *J. Nutr.* 130, 2922-2926.

Levkau, B., Koyama, H., Raines, E.W., Clurman, B.E., Herren, B., Orth, K., Roberts, J.M. and Ross, R. (1998). Cleavage of p21^{Cip1/Waf1} and p27^{Kip1} mediates apoptosis in endothelial cells through activation of cdk2: role of a caspase cascade. *Mol. Cell.* 1, 553-563.

- Li, Y., Dowbenko, D. and Lasky, L.A. (2002). AKT/PKB phosphorylation of p21^{Cip/WAF1} enhances protein stability of p21^{Cip/WAF1} and promotes cell survival. *J. Biol. Chem.* 277, 11352-11361.
- Li, Y., Upadhyay, S., Bhuiyan, M. and Sarkar, F.H. (1999). Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein. *Oncogene* 18, 3166-3172.
- Lian, F., Li, Y., Bhuiyan, M. and Sarkar, F.H. (1999). p53-independent apoptosis induced by genistein in lung cancer cells. *Nutr. Cancer* 33, 125-131.
- Liehr, I.G., Fang, W.F., Shirbasku, D.A. and Ariulubelen, A. (1986). Carcinogenicity of catechol estrogens in Syrian hamsters. *J. Steroid Biochem.* 24, 353-356, 1986
- Liehr, I.G., Ulubelen, A.A. and Strobel, H.W. (1986). Cytochrome P450-mediated redox cycling of estrogens. *J. Biol. Chem.* 261, 16865-16870.
- Liehr, I.G. (1990). Genotoxic effects of estrogens. *Mutat. Res.* 238, 269-276.
- Liehr, I.G. and Roy, D. (1990). Free radical generation by redox cycling of estrogens. *Free Radical Biol. Med.* 8, 415-423.
- Lin, H.L., Liu, T.Y., Wu, V.W. and Chi, C.W. (2001). 2-methoxyestradiol-induced caspase-3 activation and apoptosis occurs though G2/M arrest dependent and independent pathways in gastric carcinoma cells. *Cancer* 92, 500-509.
- Lottering, M-L., Haag, M. and Seegers, J.C. (1992). Effects of 17 β -estradiol metabolites on cell cycle events in MCF-7 cells. *Cancer Res.* 52, 5926-5932.
- Lyn-Cook, B.D., Stottman, H.L., Yan, Y., Blann, E., Kadlubar, F.F. and Hammons, G.J. (1999). The effects of phytoestrogens on human pancreatic tumor cells in vitro. *Cancer Lett.* 142, 111-119.
- Mabjeesh, N.J., Escuin, D., La Vallee, T.M., Pribluba, V.S., Swartz, G.M. Johnson, M.S., Willard, M.T., Zhong, H., Simons, J.W. and Giannakakou, P. (2003). 2ME₂

inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell* 3, 363-375.

Makela, S.I., Pylkkanen, L.H., Santti, R.S.S. and Adlercreutz, H. (1995a). Dietary soybean may be antiestrogenic in male mice. *J. Nutr.* 125, 437-445.

Makela S.I., Santti, R.S.S., Salo, L. and McLachlan, J.A. (1995b). Phytoestrogens are partial estrogen agonists in the male mouse. *Environ. Health Perspect* 103, 123-127.

Mann, R., Mulligan, R.C. and Baltimore, D. (1983). Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* 33, 153-159.

Markovits, J., Linassier, C., Fosse, P. et al. (1989). Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res.* 49, 5111-5117.

Martin, P.M., Horwitz, K.B., Ryan, D.S. and McGuire, W.L. (1978). Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology* 103, 1860-1867.

Martínez-Lorenzo, M.J., Anel, A., Monleón, I., Sierra, J.J., Piñeiro, A., Naval, J. and Alava, M.A. (2000). Tyrosine phosphorylation of the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase correlates with high proliferation rates in sublines derived from Jurkat leukaemia. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 435-445.

Martucci, C.P. and Fishman, I. (1979). Impact of continuously administered catechol estrogens on uterine growth and luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 105, 1288-1292.

Mendelson, C.R. (1996). Mechanism of steroid hormone action. In: *Textbook of endocrine physiology*, 3rd ed. (Griffin, J.E. and Ojeda, S.R., eds), pp. 29-65, Oxford University Press, New York, NY.

Messina, M.J., Barnes, S. and Setchell, K.D.R. (1997). Phytoestrogens and breast cancer. *Lancet* 350, 971-972, (editorial).

Messina, M.J., Persky, V., Setchell, K.D.R. and Barnes, S. (1994). Soy intake and cancer risk: a review of the in vivo and in vitro data. *Nutr. Cancer* 21, 113-131.

Miller, A.D. and Buttimore, C. (1986). Redesign of a retrovirus packaging cell line to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol. Cell. Biol.* 6, 2895-2902.

Moobery, S.L. (2003). New insights into 2-methoxyestradiol, a promising antiangiogenic and antitumor agent. *Curr. Opin. Oncol.* 15, 425-430.

Moobery, S.L. (2003). Mechanism of action of 2-methoxyestradiol: new developments. *Drugs Resistance Updates* 6, 355-361.

Morgenstern, J.P. and Land, H. (1990). Advanced mammalian Gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res.* 18, 3587-3596.

Mousavi, Y. and Adlercreutz, H. (1993). Genistein is an effective stimulator of sex hormone-binding globulin production in hepatocarcinoma human liver cancer cells and suppresses proliferation of these cells in culture. *Steroids* 58, 301-304.

Mukhopadhyay, T. and Roth, J.A. (1997). Induction of apoptosis in human cancer cells after wild-type p53 activation by methoxyestradiol. *Oncogene* 14, 379-384.

Mukhopadhyay, T. and Roth, J.A. (1998). Superinduction of wild-type p53 protein after 2-methoxyestradiol treatment of Adp53-transduced cells induces tumor cell apoptosis. *Oncogene* 16, 241-246.

Murkies, A.L., Wilcox, G. and Davies, S. (1998). Phytoestrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 297-303.

Murphy, P.A. (1982). Phytoestrogen content of processed soybean products. *Food Technol.* 34, 60-64.

Nagata, C., Takatsuka, N., Kurisu, Y. and Shimizu, H. (1998). Decreased serum total cholesterol concentration is associated with high intake of soy products in Japanese men and women. *J. Nutr.* 128, 209-213.

Pagliacci, M.C., Spinozzi, F., Migliorati, G., Fumi, G., Smacchia, M., Grignani, F., Riccardi, C. and Nicoletti, I. (1993). Genistein inhibits tumor cell growth in vitro but enhances mitochondrial reduction of tetrazolium salts: a further pitfall in the use of the MTT assay for evaluating cell growth and survival. *Eur. J. Cancer* 29A, 1573-1577.

Paech, K., Webb, P., Kuiper, G.G.J.M., Nilsson, S., Gustafsson, J-A., Kushner, P.J. and Scanlan, T.S. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors $Er\alpha$ and $Er\beta$ at AP1 sites. *Science* 277, 1508-1510.

Peterson, G. and Barnes, S. (1991). Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: independence from estrogen receptors and the multidrug resistance gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 661-667.

Peterson, G. and Barnes, S. (1993). Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation. *Prostate* 22, 335-345.

Pollard, M. and Luckert, P.H. (1997). Influence of isoflavones in soy protein isolates on development of induced prostate-related cancers in L-W rats. *Nutr. Cancer* 28, 41-45.

Polyak, K., Waldman, T., He, T.C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1996). Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes Dev.* 10, 1945-1952.

Powles, T.J. (1997). Chemoprevention of breast cancer using tamoxifen. *Endocrinol. Relat. Cancer* 4, 255-260.

Pribluda, V.S., Gubish, E.R. Jr., LaVallee, T.M., Treston, A., Swartz, G.M. and Green, S.J. (2000). 2-methoxyestradiol: an endogenous antiangiogenic and antiproliferative drug candidate. *Cancer Metastasis Rev.* 19, 173-179.

Qadan, L.R., Perez-Stable, C.M., Abderson, C., D'Ippolito, G., Herron, A., Howard, G.A. and Roos, B.A. (2001). 2-methoxyestradiol induces G2/M arrest and apoptosis in prostate cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 1252-1266.

Qanungo, S., Basu, A., Das, M. and Haldar, S. (2002). 2-methoxyestradiol induces mitochondrial dependent apoptotic signaling in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 21, 4149-4157.

Reed, J.C. (1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17, 3225-3236.

Reed, J.C. (1999). Deregulation of apoptosis in cancer. *J. Clin. Oncol.* 17, 2941-2953.

Reinli, K. and Block, G. (1996). Phytoestrogen content of foods – compendium of literature values. *Nutr. Cancer* 26, 123-148.

Rossig, L., Jadidi, A.S., Urbich, C., Badorff, C., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S. (2001). Akt-dependent phosphorylation of p21^{Cip1} regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5644-5657.

Roy, D., Weisz, I. and Liehr I.G. (1990). The O-methylation of 4-hydroxyestradiol is inhibited by 2-hydroxyestradiol: implications for estrogen-induced carcinogenesis. *Carcinogenesis* 11, 459-462.

Ruiz-Larrea, M.B., Mohan, A.R., Paganga, G., Miller, N.J., Bolwell, G.P. and Rice-Evans, C.A. (1997). Anti-oxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radic. Res.* 26, 123-148.

Ryan, K.M., Ernst, M.K., Rice, N.R. and Vousden, K.H. (2000). Role of NF- κ B in p53-mediated programmed cell death. *Nature* 404, 892-897.

Safe, S.H. (1995). Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem?. *Environ. Health Perspect.* 103, 346-351.

Schumacher, G., Kataoka, M., Roth, J.A. and Mukhopadhyay, T. (1999). Potent antitumor activity of 2-methoxyestradiol in human pancreatic cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.* 5, 493-499.

Schumacher, G. and Neuhaus, P. (2001). The physiological estrogen metabolite 2-methoxyestradiol reduces tumour growth and induces apoptosis in human solid tumors. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127, 405-410.

Scott, M.T., Morrice, N. and Ball, K.L. (2000). Reversible phosphorylation at the C-terminal regulatory domain of p21^{Waf1/Cip1} modulates proliferating cell nuclear antigen binding. *J. Biol. Chem.* 275, 11529-11537.

Seegers, J.C., Lottering, M.L., Grobler, C.J., van Papendrop, D.H., Habbersett, R.C., Shou, Y. and Lehnert, B.E. (1997). The mammalian metabolite, 2-methoxyestradiol, affects p53 levels and apoptosis induction in transformed cells but not in normal cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 62, 253-267.

Setchell, K.D.R. (1998). Phytoestrogens: biochemistry, physiology and implications of human health of soy isoflavones. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1333S-1346S.

Setchell, K.D.R. and Adlercreutz, H. (1998). Mammalian lignans and phytoestrogens. Recent studies on their formation, metabolism and biological role in health and disease. In: *Role of the gut flora in toxicity and cancer* (Rowland, I.R., ed.), pp. 315-345, Academic Press, London, U.K.

Setchell, K.D.R. and Cassidy, A. (1999). Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health. *J. Nutr.* 129, 758S-767S.

Shen, J.C., Klein, R.D., Wei, Q., Guan, Y., Contois, J.H., Wang, T.T., Chang, S. and Hursting, S.D. (2000). Low-dose genistein induces cyclin-dependent kinase inhibitors and G1 cell cycle arrest in human prostate cancer cells. *Mol. Carcinog.* 29, 92-102.

Sherr, C.J. and Roberts, J. (1999). CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1 phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501-1512.

Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell* 9, 459-470.

Shimada, K., Nakamura, M., Ishida, E., Kishi, M. and Konishi, N. (2003). Roles of p38- and c-jun_NH₂-terminal kinase-mediated pathways in 2-methoxyestradiol-induced p53 induction and apoptosis. *Carcinogenesis* 24, 1067-1075.

Shimizu, H., Ross, R.K., Bernstein, L., Pike, M.C. and Hendersom, B.E. (1990). Serum estrogen levels in postmenopausal women – comparison of American whites and Japanese in Japan. *Br. J. Cancer* 62, 451-453.

So, F.V., Guthrie, N., Chambers, A.F. and Carroll, K.K. (1997). Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. *Cancer Lett.* 112, 127-132.

Spinozzi, F., Pagliacci, C., Migliorati, G., Moraca, R., Grignani, F., Riccardi, C. and Nicoletti, I. (1994). The natural tyrosine kinase inhibitor genistein produces cell cycle arrest and apoptosis in Jurkat T-leukemia cells. *Leukemia Res.* 18, 431-439.

Srivastava, R.K., Mi, Q-S., Hardwick, M. and Longo, D.L. (1999). Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3775-3780.

Stahl, S., Chum, T-Y. and Gray W.G. (1998). Phytoestrogens act as estrogen agonists in an estrogen-positive pituitary cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 152, 41-48.

Stewart, Z.A., Leach, S.D. and Pietenpol, J.A. (1999a). p21^{Waf1/Cip1} inhibition of cyclin E/Cdk2 activity prevents endoreduplication after mitotic spindle disruption. *Mol. Cell. Biol.* 19, 206-215.

Stewart, Z.A., Mays, D. and Pietenpol, J.A. (1999b). Defective G1-S cell cycle checkpoint function sensitises cells to microtubule inhibitor-induced apoptosis. *Cancer Res.* 59, 3831-3837.

Su, S.J., Chow, N.H., Kung, M.L., Hung, T.C. and Chang, K.L. (2003). Effects of soy isoflavones on apoptosis induction and G2-M arrest in human hepatoma cells involvement of caspase-3 activation, Bcl-2 and Bcl-x_L downregulation and cdc2 kinase activity. *Nutr. Cancer* 45, 113-123.

Sugiki, H., Hozumi, Y., Maeshima, H., Katagata, Y., Mitsunashi, Y. and Kondo, S. (2000). C₂-ceramide induces apoptosis in a human squamous cell carcinoma cell line. *Br. J. Dermatol.* 143, 1154-1163.

Tamura, S., Bito, T., Ichihashi, M., and Ueda, M. (2003). Genistein enhances the cisplatin-induced inhibition of cell growth and apoptosis in human malignant melanoma cells. *Pigment Cell Res.* 16, 470-476.

Tang, D, Okada, H., Ruland, J., Liu, L., Stambolic, V., Mak, T.W. and Ingram, A.J. (2001). Akt is activated in response to an apoptotic signal. *J. Biol. Chem.* 276, 30461-30466.

Theodorescu, D., Laderoute, K.R., Calaoagan, J.M. and Guilding, K.M. (1998). Inhibition of human bladder cancer cell motility by genistein is dependent on epidermal growth factor receptor but not p21ras gene expression. *Int. J. Cancer* 78, 775-782.

Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.

Tian, H., Wittmack, E.K. and Jorgensen, T.J. (2000). p21^{Waf1/Cip1} antisense therapy radiosensitises human colon cancer by converting growth arrest to apoptosis. *Cancer Res.* 60, 679-684.

Traganos, F., Ardelt, B., Halko, N., Bruno, S. and Darzynkiewicz, Z. (1992). Effects of genistein on the growth and cell cycle progression of normal human lymphocytes and human leukemic MOLT-4 and HL-60 cells. *Cancer Res.* 52, 6200-6208.

Uckhun, F.M., Evans, W.E., Forstyth, C.J. et al. (1995). Biotherapy of B-cell precursor leukaemia by targeting genistein to CD19-associated tyrosine kinase. *Science* 267, 886-891.

Yamamoto, K., Ichijo, H. and Korsmeyer, S.J. (1999). Bcl-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G₂/M. *Mol. Cell. Biol.* 19, 8469-8478.

Yue, T.L., Wang, X., Loudon, C.S., Gupta, S., Pillarisetti, K., Gu, J.L., Hart, T.K., Lysko, P.G. and Feuerstein, G.Z. (1997). 2-methoxyestradiol, an endogenous estrogen metabolite, induces apoptosis in endothelial cells and inhibits angiogenesis: possible role for stress-activated signalling pathway and Fas expression. *Mol. Pharmacol.* 51, 951-962.

Vaux, D.L. and Strasser, A. (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2239-2944.

Vaux, D.L. and Korsmeyer, S.J. (1999). Cell death in development. *Cell* 96, 245-254.
Waga, S., Hannon, G., Beach, D. and Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369, 574-578.

Waldman, T., Lengauer, C., Kinzler, K. and Vogelstein, B. (1996). Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature* 381, 713-716.

Waldman, T., Zhang, Y., Dillehay, L., Yu, J., Kinzler, K., Vogelstein, B. and Williams, J. (1997). Cell cycle arrest versus cell death in cancer therapy. *Nat. Med.* 3, 1034-1036.

Wang, G-Q., Gastman, B.R., Wieckowski, E., Goldstein, L.A., Gambotto, A., Kim, T-H., Fang, B., Rabinovitz, A., Yin X-M., Rabinowich, H. (2001a). A role for mitochondrial Bak in apoptotic response to anticancer Drugs. *J. Biol. Chem.* 276, 34307-34317.

Wang, G-Q., Wieckowski, E., Goldstein, L.A., Gastman, B.R., Rabinovitz, A., Gambotto, A., Li, S., Fang, B., Yin, X-M. and Rabinowich, H. (2001b). Resistance to granzyme B-mediated cytochrome c release in Bak-deficient cells. *J. Exp. Med.* 194, 1325-1337.

Wang, T.H., Wang, H.S., Ichijo, H., Giannakakou, P., Foster, J.S., Fojo, T. and Wimalasena, H. (1998). Microtubule-interfering agents activate c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase through both Ras and apoptosis signal-regulating kinase pathways. *J. Biol. Chem.* 273, 4928-4936.

Webster, G.A. and Perkins, N.D. (1999). Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3485-3495.

Wei, H., Bowen, R., Cai, Q., Barnes, S. and wang, Y. (1995). Anti-oxidant and antiproliferative effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208, 124-130.

Weiss, R., Joo, A. and Randour, C. (2000). p21^{Waf1/Cip1} is an assembly factor required for platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 275, 10285-10290.

Willy, P.J. and Mangelsdorf, D.J. (1998). Nuclear orphan receptors: the search for novel ligands and signalling pathways. In: *Hormones and Signalling*, Vol. 1 (O'Malley, B.W., ed.), pp. 307-358, Academic Press, New York, NY.

Wood, L., Leese, M.R., Leblond, B., Woo, L.W., Ganeshapillai, D., Purohit, A., Reed, M.J., Potter, B.V. and Packham, G. (2001). Inhibition of superoxide dismutase by 2-methoxyestradiol analogues and oestroGen derivatives: structure-activity relationships. *Anticancer Drugs Res.* 16, 209-215.

Wu, H. and Lozano, G. (1994). NF-kappaB activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. *J. Biol. Chem.* 269, 20067-20074.

Wu, X., Senechal, K., Neshat, M.S., Whang, Y.E. and Sawyers, C.L. (1998). The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95, 15587-15591.

Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. and Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-704.

Yanagihara, K., Ito, A., Toge, T. and Numoto, M. (1993). Antoproliferative effects of isoflavones on human breast cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Res.* 53, 5815-5821.

Zhang, Y., Fujita, N. and Tsuruo, T. (1999a). Caspase-mediated cleavage of p21^{Waf1/Cip1} converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene* 18, 1131-1138.

Zhang, Y., Fujita, N. and Tsuruo, T. (1999b). p21^{Waf1/Cip1} acts in synergy with bcl-2 to confer multidrug resistance in a camptothecin-selected human lung cancer cell line. *Int. J. Cancer* 83, 790-797.

Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.H. and Hung, M.C. (2001). Cytoplasmic localization of p21^{Cip1/WAF1} by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat. Cell Biol.* 3, 245-252.

Zhou, H.B., Chen, J.J, Wang, W.X., Cai, J.T. and Du, Q. (2004). Apoptosis of human primary gastric carcinoma cells induced by genistein. *World J. Gastroenterol.* 10, 1822-1825.

Zhou, Y. and Lee, A.S. (1998). Mechanism for the suppression of the mammalian stress response by genistein, an anticancer phytoestrogen from soy. *J. Nutl. Cancer Inst.* 90, 381-388.

Zhu, B.T., Bui, Q.D., Weisz, I. and Liehr, I.G. (1994). Conversion of estrone to 2- and 4-hydroxyestrone by hamster kidney and liver microsomes: implication for the mechanism of estrogen- induced carcinogenesis. *Endocrinology* 135, 1772-1779.

Zhu, B.T. and Conney, A.H. (1998). Is 2-methoxyestradiol an endogenous estrogens metabolite that inhibits mammary carcinogenesis. *Cancer Res.* 58, 2269-2277.

Zhu, B.T., Roy, D. and Liehr, I.G. (1993). The carcinogenic activity of ethinyl estrogens is determined by both their hormonal characteristics and their conversion to catechol metabolites. *Endocrinology* 132, 577-583.

Zoubine, M.N., Weston, A.P., Johnson, D.C., Campbell, D.R. and Banerjee, S.K. (1999). 2-methoxyestradiol-induced growth suppression and lethality in estrogen responsive MCF-7 cells may be mediated by downregulation of p34^{cdc2} and cyclin B1 expression. *Int. J. Oncol.* 15, 639-646.

