



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ-ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ

«Μελέτη του ρόλου του NF-κΒ στην απόπτωση κυττάρων που εκτίθενται σε παράγοντες επαγωγής οξειδωτικού στρες και σε κυτταροκίνες».

**ΣΦΗΚΑΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2009**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ-ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ

«Μελέτη του ρόλου του NF-κΒ στην απόπτωση κυττάρων που εκτίθενται σε παράγοντες επαγωγής οξειδωτικού στρες και σε κυτταροκίνες».

**ΣΦΗΚΑΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2009**

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

Ημερομηνία αίτησης του κ. Σφήκα Αλέξανδρου: 12-1-2006

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 573^α/7-2-2006

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Καναβάρος Παναγιώτης Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία-Εμβρυολογία, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Μέλη

Γαλάρης Δημήτριος Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Κωλέττας Ευάγγελος Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στη Μοριακή Φυσιολογία, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 7-3-2006

«Ο ρόλος του NF-κB στην απόπτωση κυττάρων που εκτίθενται σε παράγοντες επαγωγής οξειδωτικού στρες και σε κυτταροκίνες»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 666^α/22-9-2009

1. Γαλάρης Δημήτριος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Καναβάρος Παναγιώτης Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία- Εμβρυολογία, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Μπάη Μαρία Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Καλφακάκου Βασιλική Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Γαλάνη Βασιλική Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογία-Εμβρυολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Κωλέττας Ευάγγελος Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στη Μοριακή Φυσιολογία, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 9-10-2009

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Γουδέβενος Ιωάννης

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας

Η Γραμματέας της Σχολής



ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ-ΖΩΗ

**Στους γονείς μου,
Αριστείδα και Ιωάννα
και στην αδερφή μου
Χριστίνα**

Στη Γεωργία

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά το χρονικό διάστημα 2006-2009, στα πλαίσια του προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2003 (Κωδικός έργου:03ΕΔ478:Μέτρο/Δράση 8.3.1), υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Παναγιώτη Καναβάρου του Εργαστηρίου Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή δεν θα είχε πραγματοποιηθεί χωρίς την ουσιαστική συμμετοχή, βοήθεια και υποστήριξη των καθηγητών, της οικογένειας και των φίλων μου. Για τον λόγο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου:

-Τον Καθηγητή κ. **Παναγιώτη Καναβάρο**, Διευθυντή του εργαστηρίου Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας και επιβλέποντά μου, για την ανάθεση σε μένα του θέματος της Διδακτορικής Διατριβής. Θέλω να του εκφράσω την εκτίμηση και την ευγνωμοσύνη μου για την υποστήριξή του, την καθοδήγησή του και τις εύστοχες υποδείξεις κατά την εκπόνηση της διατριβής μου.

-Τον Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας, μέλος της τριμελούς επιτροπής, κ. **Ευάγγελο Κωλέττα**, εφόσον συνέβαλε ουσιαστικά σε κάθε στάδιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Πιστεύω όσα ευχαριστώ και να πω, φαντάζουν λίγα μπροστά στη βοήθεια που μου προσέφερε. Η βοήθειά του ήταν πολύτιμη, αποτέλεσε για μένα πραγματικό δάσκαλο και θα του είμαι πάντα ευγνώμων.

-Τον Καθηγητή Φυσιολογίας κ. **Άγγελο Ευαγγέλου**, για την αμέριστη συμπαράστασή του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

-Τον καθηγητή Βιοχημείας, μέλος της τριμελούς επιτροπής, κ. **Δημήτριο Γαλάρη** για τις πολύτιμες συμβουλές του και τη συμπαράστασή του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου.

- Τον κ. **Γιώργο Βαρθολομάτο** για την πολύτιμη βοήθειά του, την υπομονή του και την προθυμία του, ώστε να πραγματοποιηθούν πειράματα κυτταρομετρίας ροής απαραίτητα για την ολοκλήρωση της παρούσας Διατριβής.

-Την υποψήφια Διδάκτωρ Ιατρικής, κα. **Ευαγγελία Τσελίκου**, και τη Διδάκτωρ Ιατρικής κα. **Χριστίνα Μπάτση** για την άριστη συνεργασία τους, τη βοήθειά τους και τη συμπαράστασή τους.

- Τα μέλη των εργαστηρίων Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας και Φυσιολογίας για την άριστη συνεργασία κατά την εκπόνηση της Διατριβής μου.

- Τον Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας κ. **Περικλή Παππά** και τον υποψήφιο Διδάκτωρ Ιατρικής **Μιχάλη Μάντζαρη** για τη συνεισφορά τους σε πειράματα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής.

- Την Επίκουρο Καθηγήτρια **Κατερίνα Αντωνίου** για τη συμπαράστασή της, τις πολύτιμες συμβουλές τις και την αμέριστη βοήθειά της.

- Την μητέρα μου **Ιωάννα Σφήκα**, που είναι πάντα δίπλα μου, με παροτρύνει πάντα και με αγάπη και υπομονή στηρίζει όλες μου τις επιλογές.

- Τη αδερφή μου **Χριστίνα Σφήκα** που είναι για μένα πηγή χαράς και είναι πάντα δίπλα μου.

- Τη **Γεωργία Ρέντση**, Διδάκτωρ Ιατρικής, ένα από τα πιο σημαντικά πρόσωπα στη ζωή μου, που εδώ και αρκετά χρόνια με κάνει πραγματικά ευτυχισμένο και με αγάπη και υπομονή στηρίζει τις επιλογές μου.

- Όλους μου τους φίλους που ήταν δίπλα μου αυτά τα χρόνια, με βοήθησαν σε διάφορα θέματα, με στήριξαν στα «άσχημα» και μου χάρισαν άπειρες στιγμές γέλιου και χαράς. Ειδικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον **Σάκη Πρέντζα**, τον **Φώτη Ζώτο**, τον **Αχιλλέα Τώνη**, την **Ιωάννα Λουκοπούλου**, τη **Δέσποινα Σταγγόλη**, τον **Κώστα Τριανταφύλλη** και το **Φίλιππο Σαλαπάτα**.

Όσο το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στον πατέρα μου **Αριστείδη Σφήκα**, που με έμαθε να στοχεύω ψηλά, στηρίζει κάθε επιλογή μου και με βοηθά να βρεθώ ένα βήμα πιο κοντά στα όνειρά μου.

Ιωάννινα, Ιούνιος 2009

Αλέξανδρος Α. Σφήκας.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο Πρώτο: Εισαγωγή	15
1.1 Μεταγραφικός Παράγοντας NF-κB.....	16
1.2 Κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB.....	19
1.3 Μη κανονική ή εναλλακτική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB.....	19
1.4 Άτυπη πορεία ενεργοποίησης του NF-κB.....	20
1.5 Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος.....	22
1.6 Εξωγενής και ενδογενής πορεία ενεργοποίησης της απόπτωσης.....	25
1.7 Ο ρυθμιστικός ρόλος της p53 στην απόπτωση.....	29
1.8 Ο Ρολος της PARP-1 στην απόπτωση.....	30
1.9 Ο ρόλος του NF-κB στη ρύθμιση της απόπτωσης.....	31
1.10 Μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αντι-αποπτωτική δραστηριότητα του NF-κB.....	32
1.11 Μηχανισμοί που εμπλέκονται στην προ-αποπτωτική δραστηριότητα του NF-κB.....	33
1.12 Απόπτωση επαγόμενη από οξειδωτικό στρες.....	35
1.13 Οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες στο κύτταρο.....	36
1.14 Απόπτωση επαγόμενη από H ₂ O ₂	38
1.15 Ο ρόλος του NF-κB στο οξειδωτικό στρες που επάγεται από H ₂ O ₂	40
1.16 Χημειοθεραπευτικοί παράγοντες και οξειδωτικό στρες.....	43
1.17 Πορείες απόκρισης σε βλάβες του DNA (DNA Damage Responses) ...	45
1.18 Έλεγχος του κυτταρικού κύκλου και αποκρίσεις σε βλάβες στο DNA ...	47
1.19 Κυτταρικός κύκλος και σημεία ελέγχου.....	48
1.20 Σημεία ελέγχου βλαβών στο DNA.....	52
1.21 Βλάβες στο DNA και απόπτωση.....	55
1.22 Ο ρόλος του NF-κB στις αποκρίσεις σε βλάβες στο DNA.....	58
1.23 Ο Ρόλος του NF-κB στον καρκίνο και ως θεραπευτικός στόχος.....	60
Σκοπός Μελέτης - Πειραματικός Σχεδιασμός	63

2.1 ΥΛΙΚΑ	67
2.2 Βακτηριακές Τεχνικές	69
2.3 Κυτταρική καλλιέργεια	74
2.4 Προσδιορισμός του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής	79
2.5 Προσδιορισμός αποπτωτικών και δευτερευόντως νεκρωτικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής	80
2.6 Χορήγηση H ₂ O ₂ σε κύτταρα A549	80
2.7 Χορήγηση ετοποσιδίου/VP- 16 σε κύτταρα A549 και MRC5-TERT	81
2.8 Χορήγηση κυκοεξαμίδιου (CHX) σε κύτταρα A549	81
2.9 Χορήγηση TNFα σε κύτταρα A549.....	81
2.10 Προσδιορισμός των ενδογενών επιπέδων ΔΜΟ σε κύτταρα A549 και MRC5-TERT.....	82
2.11 Ανάλυση με γονίδιο αναφοράς NF-κΒ λουσιφεράσης.....	82
2.12 Έμμεσος ανοσοφθορισμός και συνεστιακή μικροσκοπία.....	83
2.13 Απομόνωση και Ανάλυση Νουκλεϊκών οξέων.....	83
2.14 Απομόνωση και Ανάλυση Πρωτεϊνών.....	87
2.15 Απομόνωση ολικού RNA.....	95
2.16 Αντίδραση αντίστροφης τρανσκριπτάσης/πολυμεράσης [Reverse transcriptase/polymerase chain reaction (RTPCR)].....	96
2.17 Εισαγωγή γονιδίων σε κύτταρα θηλαστικών.....	97

Μέρος Πρώτο: Ο ρόλος του NF-κΒ στις αποκρίσεις των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες που επάγεται από το H₂O₂	106
--	------------

3.1 Η χορήγηση H ₂ O ₂ είχε ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση των ενδογενών επιπέδων ΔΜΟ και εκκίνησε μια απόκριση σε βλάβες στο DNA.....	107
3.2 Η χορήγηση H ₂ O ₂ ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επήγαγε τη συσσώρευση των κυττάρων A549 στη G2-M φάση του κυτταρικού κύκλου	109

3.3 Η χορήγηση H ₂ O ₂ επήγαγε την απόπτωση στα κύτταρα A549	112
3.4 Η κατάσταση του NF-κB στα κύτταρα A549 ως απόκριση στη χορήγηση H ₂ O ₂	115
3.5 Η υπερέκφραση ενός υπερκαταστολέα του NF-κB, IκBαSR, επηρέασε την έκφραση των πρωτεϊνών που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο	120
3.6 Η υπερέκφραση ενός υπερκαταστολέα του NF-κB, IκBαSR, ευαισθητοποίησε τα κύτταρα A549 στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ απόπτωση	124
3.7 Η ιδιοστατικά ενεργός μορφή της IKKβ, IKKβca, κατέστειλε την επαγόμενη από το H ₂ O ₂ απόπτωση	127
3.8 Διαφορικές αποκρίσεις στο H ₂ O ₂ των κυττάρων A549 στα οποία αποσιωπήθηκε η έκφραση είτε της IKKα ή της IKKβ	131

Μέρος Δεύτερο: Ο ρόλος του NF-κB στις αποκρίσεις των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες που επάγεται από το ετοποσίδιο/VP16

3.9 Το ετοποσίδιο/VP16 επήγαγε τη συσσώρευση των ενδογενών ΔMO και ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό	138
3.10 Το ετοποσίδιο/VP16 επήγαγε την πρόκληση βλαβών στο DNA, οδηγώντας στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των ανθρωπίνων κυττάρων	140
3.11 Η χορήγηση VP16 ενεργοποίησε τον NF-κB στα κύτταρα A549	143
3.12 Η μειορρύθμιση της έκφρασης της Cdc6 ως απόκριση στο VP16 και ο συσχετισμός της με την έκφραση του E2F1	149
3.13 Αποσιώπηση της IKKα ή της IKKβ στα κύτταρα A549	153
3.14 Η αποσιώπηση της IKKα, αλλά όχι της IKKβ, είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια της έκφρασης της Cdc6	156
3.15 Διαφορετικές επιδράσεις της αποσιώπησης των IKKα και IKKβ στη σταθερότητα της πρωτεΐνης Cdc6	160
3.16 Διαφορετικές επιδράσεις της αποσιώπησης της IKKα ή IKKβ στη διεγερμένη με ορό έκφραση της Cdc6	161
3.17 Η Αποσιώπηση της IKKα ή IKKβ επηρεάζει διαφορετικά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση στο VP16	163

3.18 Η κυτταροκίνη TNF α δεν επήγαγε σημαντική απόπτωση στα κύτταρα A549.....	168
--	-----

Κεφάλαιο Τέταρτο: Συζήτηση	171
-----------------------------------	------------

4.1 Η χορήγηση H ₂ O ₂ και ετοποσιδίου/VP16 προκαλούν τη συσσώρευση ενδογενών δραστικών μορφών οξυγόνου (ΔΜΟ) και οδηγούν στην ενεργοποίηση της πορείας απόκρισης σε βλάβες στο DNA	172
4.2 Η χορήγηση H ₂ O ₂ και ετοποσιδίου/VP16 που προκαλούν την ενδογενή συσσώρευση των ΔΜΟ επηρεάζουν διαφορετικά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου	172
4.3 Το H ₂ O ₂ και το ετοποσίδιο/VP16 διαφέρουν ως προς τις επιδράσεις τους στην απόπτωση των κυττάρων	175
4.4 Η κατάσταση ενεργοποίησης του NF-κΒ στα κύτταρα A549 ήταν διαφορετική ως απόκριση στο H ₂ O ₂ ή ετοποσίδιο/VP16	177
4.5 Ο ρόλος της κανονικής πορείας του NF-κΒ στις επιδράσεις του H ₂ O ₂ στα κύτταρα A549	182
4.6 Σύγκριση του ρόλου των κινασών ΙΚΚ α και ΙΚΚ β στις αποκρίσεις των κυττάρων A549 στο H ₂ O ₂	186
4.7 Ο ρόλος του NF-κΒ στη ρύθμιση της έκφρασης του αδειοδοτικού παράγοντα της αντιγραφής του DNA, της πρωτεΐνης Cdc6	189
4.8 Σύγκριση του ρόλου των κινασών ΙΚΚ α και ΙΚΚ β στις επιδράσεις του ετοποσιδίου/VP16 στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων A549	192

Συμπεράσματα	193
---------------------	------------

Περίληψη	195
-----------------	------------

Summary	197
----------------	------------

Βιβλιογραφία	199
---------------------	------------

Ανακοινώσεις-Δημοσιεύσεις	232
----------------------------------	------------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μεταγραφικός Παράγοντας NF-κB

Ο πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας NF-κB (Nuclear Factor-κB), ταυτοποιήθηκε το 1986 από την ερευνητική ομάδα του D. Baltimore, ως ένας πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας που έχει την ικανότητα να προσδένεται στον επαυξητή της κ-ελαφριάς αλυσίδας στα Β-λεμφοκύτταρα. Ανήκει σε μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων, που παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης, τα οποία ρυθμίζουν τις αποκρίσεις των κυττάρων στο στρες και την γένεση της επίκτητης και της έμφυτης ανοσίας (Baltimore, 2009; Karin and Delhase, 2000; Hayden and Ghosh, 2004; Karin and Greten, 2005; Teragaonkar, 2006).

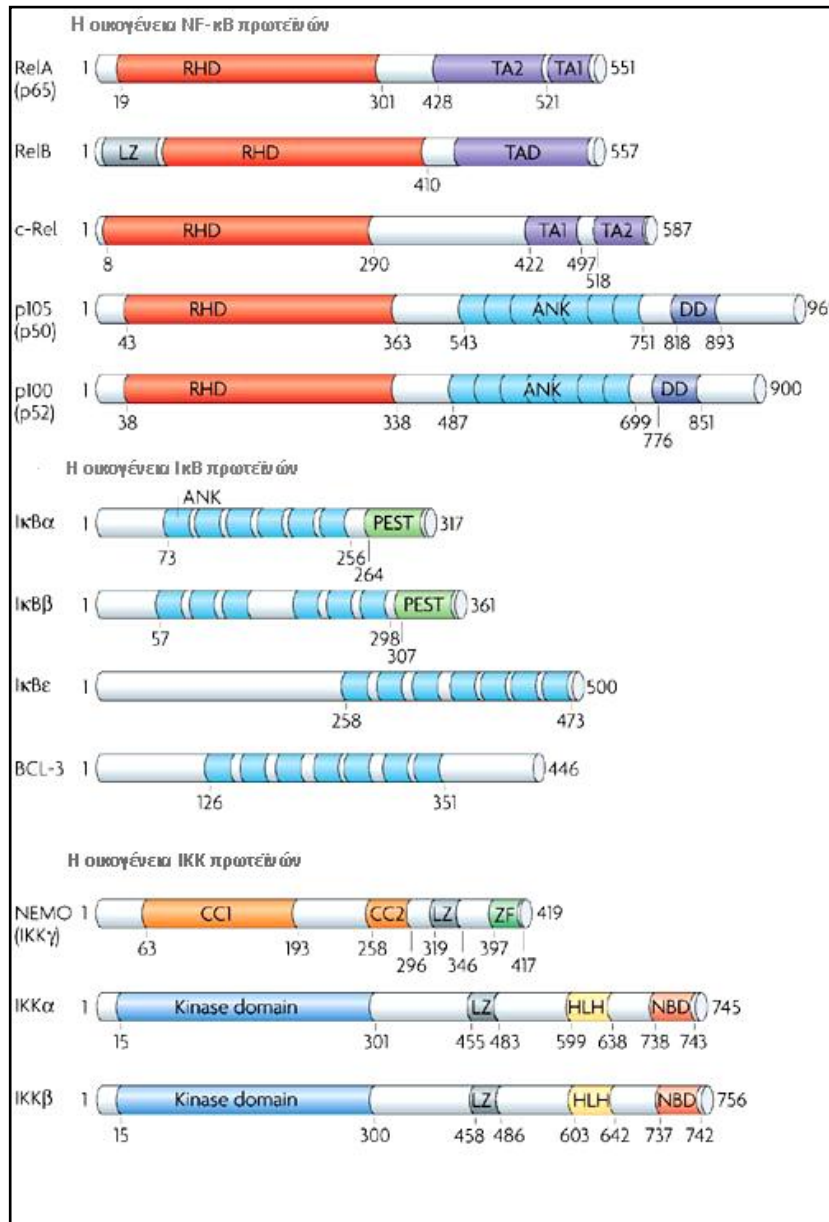
Τα πρωτεϊνικά μέλη της οικογένειας του NF-κB δεσμεύονται στο DNA ως έτερο- ή ομο-διμερή σύμπλοκα, τα οποία προκύπτουν επιλεκτικά από πέντε πιθανές υπομονάδες: RelA/p65, c-Rel, RelB, p50 (p105/NF-κB1) και p52 (p100/NF-κB2). Οι υπομονάδες αυτές φέρουν μια Rel ομόλογη περιοχή (RHD; Rel homology domain) στο N-τελικό άκρο τους, τριακοσίων περίπου αμινοξέων, η οποία παρουσιάζει ικανότητα δέσμευσης στο DNA και ονομάζεται κB-θέση δέσμευσης, ευρισκόμενη σε προαγωγείς και εκκινητές γονιδίων (Perkins, 2007). Παρά τις ομοιότητές τους, οι πρωτεΐνες της οικογένειας του NF-κB μπορούν να διαχωριστούν σε δυο επιπλέον υποοικογένειες, τα μέλη της υποοικογένειας RelA, c-Rel και RelB, που περιέχουν στο C-τελικό άκρο τους περιοχές μεταγραφικής ενεργοποίησης και συντίθενται ως ώριμα μόρια και τις υπομονάδες p50 και p52, που συντίθενται ως μεγαλύτερα πρόδρομα μόρια, τις p105 και p100 αντίστοιχα και φέρουν στο C-τελικό άκρο τους επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (μοτίβα) αγκυρίνης (Perkins, 2007; Karin et al., 2002; Hoffmann et al., 2006).

Στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους τα διμερή πρωτεϊνικά σύμπλοκα των υπομονάδων του NF-κB εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα δεσμευμένα από μια οικογένεια ανασταλτικών πρωτεϊνών γνωστές ως αναστολείς του NF-κB (inhibitors of NF-κB) τις IκBs (IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBε και Bcl3). Παρόλα αυτά, ομο-διμερή των υπομονάδων p50 και p52 δεν υπόκεινται στον έλεγχο των IκBs και πολύ συχνά εντοπίζονται συνεχώς στον πυρήνα. Όταν, όμως, οι υπομονάδες p50 και p52 σχηματίζουν ετερο-διμερή με τις υπομονάδες Rel, τότε υπόκεινται κανονικά σε ρύθμιση από τις IκBs, εξαίρεση σε αυτόν τον

κανόνα είναι το σύμπλοκο των υπομονάδων p52-RelB, το οποίο έχει χαμηλή συγγένεια με τις IκBs, και για αυτό δεν υπόκειται στον συγκεκριμένο μηχανισμό ρύθμισης (Dobranski et al., 1994; Perkins, 2007).

Η ενεργοποίηση του NF-κB, ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα, γίνεται μέσω τριών διαφορετικών πορειών, στις οποίες εμπλέκονται κυρίως οι κινάσες σερίνης/θρεονίνης IKKα, IKKβ και IKKγ/NEMO (NF-κB essential molecular). Οι κινάσες αυτές σχηματίζουν πρωτεϊνικά σύμπλοκα και φωσφορυλιώνουν τις IκBs σε συγκεκριμένα κατάλοιπα σερίνης (Perkins, 2006; Scheidereit, 2006; Gloire et al., 2006), με αποτέλεσμα την απελευθέρωση και μετατόπιση των διμερών συμπλόκων των υπομονάδων του NF-κB στον πυρήνα και την πρόσδεση τους σε γονίδια στόχους.

Η πιο συχνά παρατηρούμενη πορεία ενεργοποίησης του NF-κB είναι η κανονική πορεία ενεργοποίησης, η οποία επάγεται ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα, μεταξύ των οποίων οι προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNFα (tumor necrosis factor-α) και η IL-1(interleukin-1), η ενεργοποίηση των υποδοχέων των T-λεμφοκυττάρων (TCR), η έκθεση σε βακτηριακά προϊόντα, όπως οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) ή η χορήγηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Αυτή η πορεία χαρακτηρίζεται από την καταλυτική φωσφορυλίωση της IκBa στα κατάλοιπα των σερίνων Ser32 και 36 και την επακόλουθη αποδόμηση της μέσω ουβικιίνωσης από το πρωτεόσωμα 26S. Σε πολλούς κυτταρικούς τύπους και οι IκBβ και IκBε υπόκεινται σε φωσφορυλίωση, αλλά με πιο αργό ρυθμό (Karin et al., 2002; Perkins, 2006; Perkins, 2007).



Εικόνα 1: (α) Στα κύτταρα των θηλαστικών υπάρχουν πέντε μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών του NF-κB: RelA/p65, RelB, c-Rel, p50/p105 (NF-κB1) και p52/p100 (NF-κB2). Όλες οι πρωτεΐνες της οικογένειας του NF-κB φέρουν μια Rel-ομόλογη περιοχή στο N-τελικό άκρο τους (RHD: Rel homology domain), η οποία συμβάλλει στην πρόσδεση των πρωτεϊνών στο DNA και η οποία περιλαμβάνει την περιοχή εντοπισμού στον πυρήνα (nuclear localization sequence; NLS). Η υπο-οικογένεια πρωτεϊνών Rel, δηλαδή οι RelA, RelB και c-Rel περιλαμβάνουν και περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (TADs: transcriptional activation domains) στο C-τελικό τους άκρο. Οι TA1 και TA2 είναι υπο-περιοχές της περιοχής TAD. (β) Οι ανασταλτικές πρωτεΐνες του NF-κB, η οικογένεια των IκB πρωτεϊνών, αποτελείται από τις IκBα, IκBβ, IκBε και BCL3. Όπως οι p105 και p100, οι IκB πρωτεΐνες φέρουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (μοτίβα) αγκυρίνης (ANK) στο C-τελικό άκρο τους. (γ) Απεικονίζονται οι τρεις κύριες υπομονάδες του συμπλόκου των κινασών των IκBs (IKK), οι οποίες είναι οι τρεις καταλυτικές υπομονάδες IKKα, IKKβ και NEMO ή IKKγ με τα κύρια δομικά τους στοιχεία (μοτίβα). [CC, coiled-coil; DD, region with homology to a death domain; HLH, helix-loop-helix; LZ, RelB-transactivation-domain containing a putative leucine-zipper-like motif; NBD, NEMO-binding domain; PEST, domain rich in proline (P), glutamate (E), serine (S) and threonine (T); ZF, zinc-finger domain.

1.2 Κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB

Στην κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB η IκBα φωσφορυλιώνεται από το πρωτεϊνικό σύμπλοκο ενεργοποίησης των IKK. Το υψηλού μοριακού βάρους σύμπλοκο των IKK αποτελείται από ένα μόριο της καταλυτικής κινάσης IKKα, ένα της IKKβ και τουλάχιστον δύο μόρια της IKKγ/NEMO. Οι μελέτες έχουν δείξει πως η πιο ενεργή κινάση σε αυτή την πορεία είναι η IKKβ (Bonizzi and Karin, 2004; Pasparakis et al., 2006). Οι IKKα (85kD) και IKKβ (87kD) είναι τυπικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης, που φέρουν μια καταλυτική περιοχή στο αμινοτελικό τους άκρο και δυο περιοχές κοντά στο καρβόξυτελικό τους άκρο, όμοιες με τις δομές φερμουάρ λευκίνης (LZ) και έλικας-βρόγχου-έλικας (HLH). Ακόμα, οι IKKα και IKKβ σχηματίζουν ομο- και έτερο-διμερή *in vivo* μέσω φερμουάρ λευκίνης. Η ενεργοποίηση της IKKβ εξαρτάται από την φωσφορυλίωσή της, η οποία επάγεται από το κατάλληλο ερέθισμα, στις σερίνες 177 και 181 στον T-βρόγχο ενεργοποίησής της (Li et al., 2002; Karin et al., 2004; Hacker and Karin, 2006; Scheidereit, 2006; Perkins, 2006). Η IKKβ-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της IκBα στις σερίνες 32/36 και η επακόλουθη πρωτεολυτική αποδόμηση της έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση του ετερο-διμερούς συμπλόκου των υπομονάδων p50-RelA(p65), τη μετατόπιση του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και τη δέσμευση του σε προαγωγείς ή εκκινητές γονιδίων-στόχων του, που οδηγεί στην επαγωγή της μεταγραφής αυτών των γονιδίων (Εικόνα 2A).

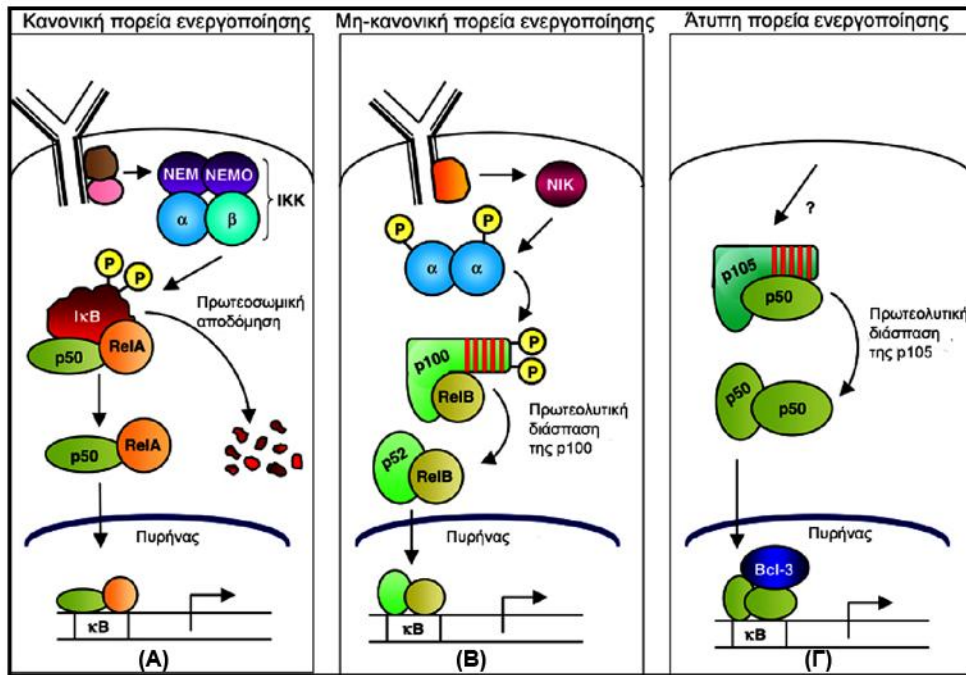
1.3 Μη κανονική ή εναλλακτική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB

Ένα μέρος των ερεθισμάτων που ενεργοποιούν τον NF-κB, όπως οι υποδοχείς CD40, οι υποδοχείς της λεμφοτοξίνης β και ο παράγοντας ενεργοποίησης των B-λεμφοκυττάρων της οικογένειας του TNF, ενεργοποιούν τη μη-κανονική ή εναλλακτική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB (Perkins, 2003; Bonizzi and Karin, 2004; Perkins, 2007). Στη μη-κανονική πορεία ενεργοποίησης, η κινάση επαγωγής του NF-κB (NIK; NF-κB inducing kinase) ενεργοποιείται και με τη σειρά της ενεργοποιεί, μέσω φωσφορυλίωσης, την κινάση IKKα, η οποία σχηματίζει ένα ομο-διμερές (Dejardin, 2006; Gilmore, 2006; Perkins 2007).

Το ομο-διμερές της IKKα φωσφορυλιώνει το πρόδρομο μόριο p100, το οποίο έχει την ιδιαιτερότητα, όπως και το ομόλογο του πρόδρομο μόριο p105, να ανήκει τόσο στην οικογένεια των πρωτεϊνών του NF-κB, όσο και σε αυτή των IκBs. Η αναδίπλωση των περιοχών αγκυρίνης του C-τελικού του άκρου, του επιτρέπουν να δρά ως αυτό-αναστολέας και να παραμένει στο κυτταρόπλασμα σε κύτταρα που δεν υπόκεινται σε κανένα ερέθισμα. Ωστόσο, με την φωσφορυλίωσή του από το ομο-διμερές των IKKα, σε συγκεκριμένα κατάλοιπα σερίνης, οδηγείται σε μερική πρωτεολυτική διάσπαση από το πρωτεόσωμα 26S, παράγοντας το ώριμο μόριο p52 (Dejardin, 2006; Gilmore, 2006; Perkins, 2007). Το p52 σχηματίζει έτερο-διμερή με τις άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας του NF-κB, αλλά συνηθέστερα με τη RelB. Μάλιστα, μελέτες αναφέρουν πως το p100 είναι ο κύριος αναστολέας της p52 και το σύμπλοκο p52-RelB σχηματίζεται από την πρωτεολυτική διάσπαση ενός διμερούς p100-RelB (Dejardin, 2006; Gilmore, 2006; Perkins 2007). Το ετερο-δομερές p52-RelB μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, δεσμεύεται σε προαγωγείς γονιδίων-στόχων του με αποτέλεσμα τη επαγωγή της μεταγραφής αυτών των γονιδίων (Εικόνα 2B).

1.4 Άτυπη πορεία ενεργοποίησης του NF-κB

Η άτυπη πορεία ενεργοποίησης του NF-κB είναι μια πορεία ανεξάρτητη των κινασών IKK. Έχει παρατηρηθεί σε αποκρίσεις βλαβών στο DNA, και μπορεί να ενεργοποιηθεί από ερεθίσματα όπως η δοξορουβικίνη και η υπεριώδης ακτινοβολία (UV), που έχουν ως συνέπεια τη φωσφορυλίωση της IκBa από την κινάση της καζεΐνης 2 (CK2) (Perkins and Gilmore, 2006; Perkins 2006) ή όπως η υποξεία, το H₂O₂ και η χορήγηση σε κύτταρα του νευρικού αυξητικού παράγοντα (NGF; nerve growth factor), που έχουν ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της IκBa στη θέση τυροσίνη42 και την επακόλουθη αποδόμησή της (Perkins, 2007). Μέσω της άτυπης πορείας ενεργοποιούνται σύμπλοκα υπομονάδων του NF-κB, στην πλειοψηφία τους ετερο-διμερή p50-RelA(p65), τα οποία μετατοπίζονται στον πυρήνα και επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων-στόχων τους, μέσω ενός μηχανισμού, που μοιάζει περισσότερο με την κανονική πορεία ενεργοποίησης (Perkins, 2007) (Εικόνα 2Γ).



Εικόνα 2: Πορείες ενεργοποίησης του NF-κB.

(A) Στην κανονική ή κλασσική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB, διμερή του NF-κB όπως το p50-RelA(p65) παραμένουν στο κυτταρόπλασμα, λόγω της αλληλεπίδρασής τους με ένα ανεξάρτητο μόριο IκB, συνήθως την IκBα. Σε πολλές περιπτώσεις, η πρόσδεση ενός προσδετικού μορίου σε έναν επιφανειακό υποδοχέα του κυττάρου, όπως TNF-R ή TLR, έχει ως αποτέλεσμα τη στρατολόγηση προσαρμοστικών μορίων, όπως TRAFs, στην κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα. Στη συνέχεια τα προσαρμοστικά μόρια στρατολογούν ένα σύμπλοκο των IKK, το οποίο περιλαμβάνει τις καταλυτικές υπομονάδες IKKα και IKKβ και δύο μόρια NEMO. Η συνάθροιση μορίων στους υποδοχείς ενεργοποιεί το σύμπλοκο IKK. Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο των IKK φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη IκB σε δυο κατάλοιπα σερίνης, Ser32/36, κάτι που έχει ως συνέπεια την πρωτεοσωμική αποδόμησή της. Τότε τα ετερο-διμερή των πρωτεϊνών του NF-κB, p50-RelA(p65), μετατοπίζονται στον πυρήνα και προσδένονται σε προαγωγείς γονιδίων-στόχων τους.

(B) Κατά τη μη-κανονική η εναλλακτική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB, ενεργοποιούνται κυρίως τα σύμπλοκα p100-RelB. Αυτή η πορεία διαφέρει από την κανονική στο ότι μόνο συγκεκριμένα ερεθίσματα, όπως ο BAFF και το CD40, είναι ικανά να την ενεργοποιήσουν και στο ότι προωθείται μέσω ενός IKK ομο-διμερούς συμπλόκου, που αποτελείται από δυο υπομονάδες IKKα. Στη μη κανονική πορεία η πρόσδεση μορίων στους υποδοχείς έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κινάσης NIK, η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί το σύμπλοκο των IKKα. Αυτό με τη σειρά του φωσφορυλιώνει δύο κατάλοιπα σερίνης, που βρίσκονται στις C-τελικές περιοχές αγκυρίνης της p100. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι η μερική πρωτεόλυση της p100 και η απελευθέρωση του ετρο-δαιμερούς συμπλόκου p52-RelB που μετατοπίζεται στον πυρήνα και προσδένεται σε προαγωγείς γονιδίων-στόχων τους.

(Γ) Στην άτυπη πορεία ενεργοποίησης ομοδιμερή p50 ή p52 εισέρχονται στον πυρήνα όπου ενεργοποιούν τη μεταγραφή γονιδίων, μέσω της αλληλεπίδρασής τους με την Bcl-3. Το πώς ρυθμίζεται η άτυπη πορεία δεν έχει διαλευκανθεί. Και στα τρία μονοπάτια ενεργοποίησης οι υπομονάδες του NF-κB υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες ρυθμίζουν τη μεταγραφική τους ενεργότητα (Gilmore, 2006; Perkins, 2006).

1.5 Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος

Οι πολυκύτταροι οργανισμοί, πολύ συχνά, χρειάζεται να ελέγχουν τον αριθμό των κυττάρων τους, και για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούν ένα πολύ σημαντικό μοριακό πρόγραμμα, τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι το ίδιο σημαντικό με την κυτταρική διαίρεση και τον κυτταρικό διαχωρισμό και επιτρέπει στους οργανισμούς να ελέγχουν αυστηρά τον αριθμό των κυττάρων τους και το μέγεθος των ιστών τους, έτσι ώστε να προστατεύονται από επικίνδυνα κύτταρα που απειλούν την ομοιόσταση. Τέτοια κύτταρα μπορεί να προκύψουν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, οπότε και πολλά κύτταρα παράγονται σε πλεόνασμα, ή από κύτταρα που είναι καρκινικά, προσβεβλημένα από ιούς ή κύτταρα του ανοσοποιητικού, τα οποία αναγνωρίζουν κύτταρα του οργανισμού, προκαλώντας αυτοάνοσα νοσήματα (Meier Pet al., 2000; Prindull, 1995). Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος αναφέρεται ως απόπτωση και το όνομα του δόθηκε από τους Kerr, Wyllie και Currie το 1972, οι οποίοι και πρότειναν την ιδέα του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου μετά από ιστολογικές και μορφολογικές μελέτες σε ισχαιμικά ηπατοκύτταρα (Hengartner, 2000; Hail et al., 2006). Αποτυχία της έναρξης του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις, όπως αναπτυξιακά ελαττώματα, αυτοάνοσα νοσήματα, εκφυλισμός νευρικών κυττάρων, καρκίνος και άλλες (Jin and El-Deiry, 2005).

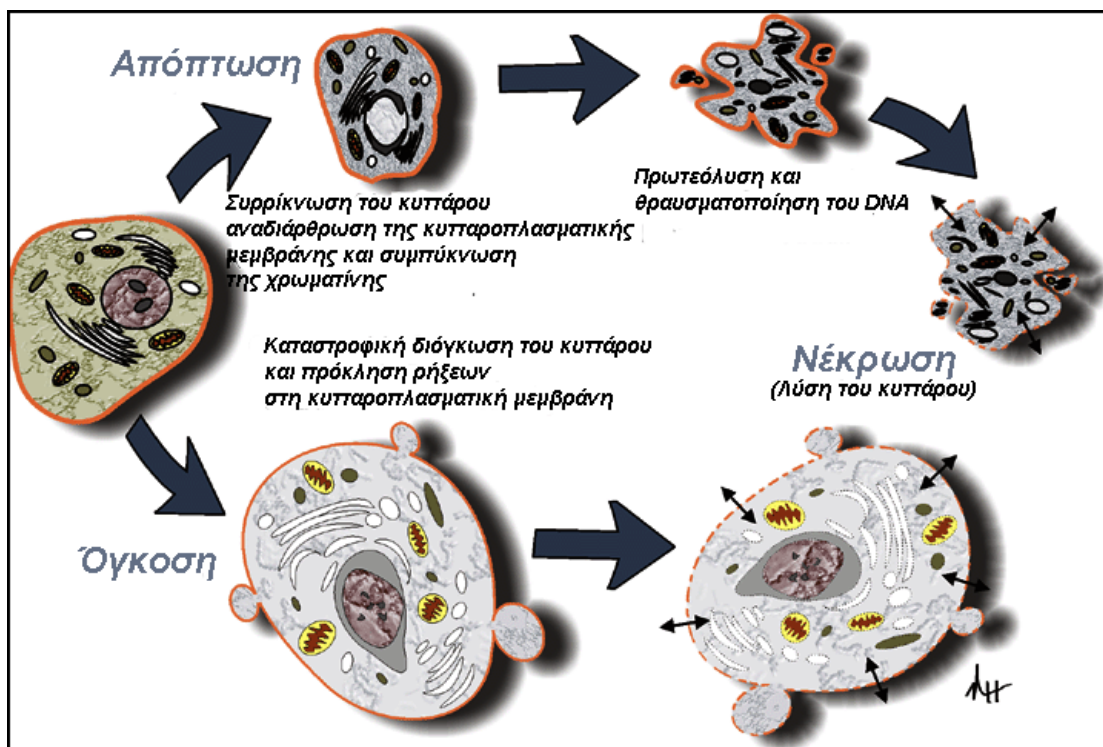
Υπάρχουν δύο τύποι κυτταρικού θανάτου, ο προγραμματισμένος ή αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος και ο παθολογικός μη προγραμματισμένος ή νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος, οι οποίοι παρουσιάζουν διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά μεταξύ τους, που αποτελούν και τα κύρια στοιχεία για τον διαχωρισμό των δύο ειδών κυτταρικού θανάτου (Εικ. 3).

Ένα αποπτωτικό κύτταρο υπόκειται σε συρρίκνωση, σε συμπύκνωση της χρωματίνης του, κατάρρευση του πυρήνα (καρυορήξη), σε αναδιάρθρωση ή κατάτμηση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και του κυτταροπλάσματος, πρωτεόλυση, κατάτμηση του DNA, γεγονότα που οδηγούν στο σχηματισμό του ή των αποπτωσωμάτων (Εικ. 3) (Majno and Joris, 1995). Τελικά, τα αποπτωτικά κύτταρα χάνουν την ακεραιότητα της κυτταροπλασματικής τους μεμβράνης και γίνονται νεκρωτικά *in vitro*, ωστόσο κάτι τέτοιο δε συμβαίνει

συχνά *in vivo*, γιατί εκπέμπουν σήματα μέσω της κυτταροπλασματικής τους μεμβράνης, τα οποία προκαλούν την απομάκρυνσή τους μέσω φαγοκύτωσης (Kerr et al., 1995).

Αντίθετα, κατά τον νεκρωτικό θάνατο αρχικά παρατηρείται διόγκωση του κυττάρου και των οργανιδίων του, ένα φαινόμενο που ονομάζεται όγκωση, ρήξη των οργανιδίων, χωρίς να παρατηρείται αναδιάρθρωση της χρωματίνης, με αποτέλεσμα το κύτταρο να υπόκειται σε λύση του κυτταροπλάσματος, κάτι που είναι και το τελικό χαρακτηριστικό της νέκρωσης (Εικ. 3) (Majno and Joris, 1995).

Η απόπτωση μπορεί να διαιρεθεί σε τρεις φάσεις, την έναρξη, τη διαδραστική φάση και την αποδόμηση (Green and Kroemer, 1998). Μια μεγάλη ποικιλία εξωγενών σημάτων μπορεί να πυροδοτήσει τις δύο κύριες αποπτωτικές πορείες του κυττάρου, την *εξωγενή ή πορεία των υποδοχέων θανάτου* και την *ενδογενή ή μιτοχονδριακή πορεία της απόπτωσης*. Η εξωγενής πορεία ενεργοποιείται από εξωγενή αποπτωτικά ερεθίσματα αποτελούμενα από προσδέματα (ligands) πρόκλησης θανάτου σε επιφανειακούς υποδοχείς των κυττάρων. Σε άλλες περιπτώσεις η έναρξη της απόπτωσης γίνεται μέσω της ενδογενούς πορείας, η οποία ενεργοποιείται από ενδογενή σήματα, όπως είναι η καταστροφή του DNA, που προκαλείται από ραδιενέργεια ή χημικούς παράγοντες, τη στέρηση αυξητικών παραγόντων ή το οξειδωτικό στρες. Γενικά η ενδογενής πορεία εκκινεί την απόπτωση μέσω της συμμετοχής των μιτοχονδρίων (Jin and El-Deiry, 2005).



Εικόνα 3: Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης, της όγκοσης και της νέκρωσης (Hail et al., 2006).

1.6 Εξωγενής και ενδογενής πορεία ενεργοποίησης της απόπτωσης

Η εξωγενής πορεία ενεργοποιείται από επιφανειακούς κυτταρικούς υποδοχείς θανάτου, όπως είναι οι υποδοχείς του Fas, οι υποδοχείς TNF-R (υποδοχέας του παράγοντα νέκρωσης όγκου ή tumor necrosis factor receptor), οι υποδοχείς CD95 ή οι υποδοχείς TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Κάθε ένας από τους υποδοχείς θανάτου έχει μια ενδοκυττάρια περιοχή θανάτου (DD; death domain), η οποία είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση των κατάλληλων κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, που θα πυροδοτήσουν το αποπτωτικό μονοπάτι. Η διέγερση που προκαλούν τα προσδέματα επαγωγής κυτταρικού θανάτου έχουν ως αποτέλεσμα τον ολιγομερισμό των υποδοχέων και τη στρατολόγηση των προσαρμοστικών πρωτεϊνών, που έχουν και αυτές περιοχές DD, όπως η FADD (Fas-associated death domain). Η περιοχή DD των προσαρμοστικών πρωτεϊνών προσδένεται στην περιοχή DD της κασπάσης-8, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου επαγωγής θανάτου, του DISC (death-inducing signaling complex). Η ενεργοποίηση της κασπάσης-8 από την αλληλεπίδραση του ζυμογόνου της με τις προσαρμοστικές πρωτεΐνες στο σύμπλοκο DISC, ακολουθείται από την ενεργοποίηση των τελεστών κασπασών, συμπεριλαμβανομένων των κασπασών-3, -6 και -7, που λειτουργούν ως καθοδικοί τελεστές στο κυτταρικό πρόγραμμα θανάτου (Ashkenazi and Dixit, 1998; Jin and El-Deiry, 2005). Η ενεργοποίηση της κασπάσης-8 μπορεί να ανασταλεί από τη στρατολόγηση του εκφυλισμένου ομολόγου της κασπάσης-8 την c-FLIP (cellular Fas-associated DD-like interleukin (IL)-1-converting enzyme inhibitory protein) (Irmeler et al., 1997; Hengartner, 2000). Σε συγκεκριμένα κυτταρικά συστήματα η ενεργοποίηση της κασπάσης-8 είναι επαρκής για να εκκινήσει τον πρωτεολυτικό καταρράκτη, που απαιτείται για να επιτευχθεί η αποπτωτική κυτταρική αποδόμηση (Thornberry and Lazebnik, 1998; Ashkenazi and Dixit, 1998; Hengartner, 2000). Ωστόσο, έχει δειχθεί πως η ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου προωθεί τη στρατολόγηση και την καθοδική ενεργοποίηση της ενδογενούς πορείας, κάτι που φαίνεται να είναι απαραίτητο για να επιτευχθεί η απόπτωση σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους (Εικ. 4) (Lou X et al., 1998; YinX-M et al., 1999).

Τα μιτοχόνδρια είναι το μέρος όπου λαμβάνει χώρα ο ευκαρυωτικός οξειδωτικός μεταβολισμός, με αποτέλεσμα την παραγωγή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μέσω της πορείας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και του κυτοχρώματος-c. Η μιτοχονδριακή λειτουργία είναι σημαντική για μερικά κύτταρα και για την εκτέλεση προγραμματών θανάτου. Η ενεργοποίηση αυτών των κυτταρικών οργανιδίων είναι ένα κρίσιμο βήμα για τον συντονισμό και την ολοκλήρωση διάφορων ανοδικών και καθοδικών αποπτωτικών πορειών.

Όπως περιγράφηκε προηγουμένως, όταν ένας προσδέτης της υπέρ-οικογένειας TNF προσδεθεί στον κυτταρικό του υποδοχέα, ο υποδοχέας ολιγομερίζεται, η ενδοκυττάρια περιοχή DD στρατολογεί κυτταροπλασματικές σηματοδοτικές πρωτεΐνες και σχηματίζεται ένα σύμπλοκο DISC που φέρει: την περιοχή DD του υποδοχέα, την περιοχή DD ενός προσαρμοστικού μορίου (π.χ. FADD) και την ανενεργή προκασπάση-8, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιείται μέσω πρωτεόλυσης. Η ποσότητα της ενεργής κασπάσης-8, που παράγεται στο DISC, καθορίζει το κατά πόσο μια μιτοχονδριακά εξαρτώμενη (χαμηλή ποσότητα) ή ανεξάρτητη (υψηλή ποσότητα) αποπτωτική πορεία θα πυροδοτηθεί (Scaffidi et al., 1998; Schultz and Harrington, 2003). Ακόμα, η κασπάση-8 πρωτεολύει και ενεργοποιεί μια προ-αποπτωτική BH3 (Bcl-2 homologue 3) πρωτεΐνη της οικογένειας Bcl-2, τη Bid, της οποίας τα ολιγομερή είναι ικανά να πυροδοτήσουν τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης (mitochondrial membrane permeabilization) MMP, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του AIF (apoptosis inducing factor), μιας πυρηνικής φλαβοπρωτεΐνης και του ενδιάμεσου της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, του κυτοχρώματος c, από το μιτοχονδριακό στο διαμεμβρανικό χώρο (Lou et al., 1998; Yin et al., 1999). Το κυτόχρωμα c μόλις απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα μπορεί να συνδεθεί με τα dATP ή ATP και APAF-1 (apoptosis protease-activating factor 1), για να σχηματιστεί το αποπτώσωμα, το οποίο ενεργοποιεί την εναρκτήρια κασπάση-9 και την πρωτεΐνη Smac/DIABLO, η οποία προέρχεται από τα μιτοχόνδρια και αναστέλλει τις πρωτεΐνες της οικογένειας IAPs (inhibitors of apoptosis). Η κασπάση-9 είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση των τελεστών κασπασών -3 και -7 (Green and Kroemer, 1998; Kroemer and Reed, 2000; Hail et al., 2006), ενώ δρά και

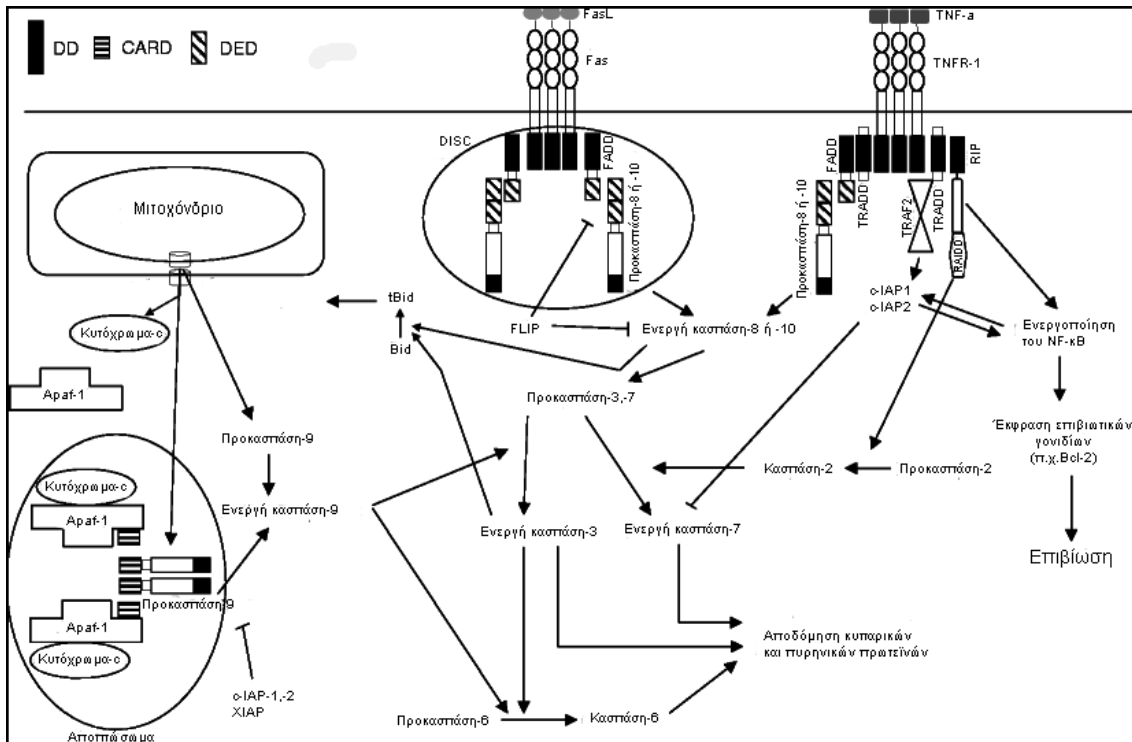
απευθείας στον πυρήνα επάγοντας τη θραυσματοποίηση του DNA (Εικ. 4) (Susin et al., 1996; Susin et al., 1997; Schultz and Harrington, 2003).

Η ενδογενής πορεία μπορεί να ρυθμιστεί από την οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2 (Reed et al., 1998; Hengartner, 2000), από πρωτεάσες (Guicciardi et al., 2000) αλλά και παράγοντες όπως οι δραστικές μορφές οξυγόνου και τα Ca^{2+} , που προάγουν τη μεταβατική διαπερατότητα του μιτοχονδρίου (Zoratti and Szabo, 1995; Hail et al., 2005;). Οι περισσότερες πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 εδρεύουν στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, αποτελούνται τόσο από προ-αποπτωτικά μέλη (π.χ Bax, Bad και Bak), όσο και από αντι-αποπτωτικά (π.χ. Bcl-2 και Bcl-X_L) και η έκφρασή τους βρίσκεται σε μια κατάσταση ισορροπίας ελέγχοντας τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Hengartner, 2000; Tsujimoto, 2003; Adams and Cory, 2007; Chipuk and Green, 2008). Η ισορροπία στο ισοζύγιο της έκφρασής τους, μπορεί να αποσταθεροποιηθεί, είτε λόγω μειωμένης έκφρασης ή λόγω της επαγωγής της έκφρασης των προ-αποπτωτικών ή αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2.

Οι δύο πορείες συγκλίνουν στο επίπεδο της ενεργοποίησης των τελεστών κασπασών-3 και -7. Η ενεργοποίηση και η ενεργότητα των κασπασών αυτών ανταγωνίζεται από τις πρωτεΐνες IAP, οι οποίες με τη σειρά τους ανταγωνίζονται από την πρωτεΐνη Smac/DIABLO, που απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια. Ένας από τους πιο σημαντικούς στόχους των κασπασών-3 και -7 είναι η DFF45/ICAD (DNA fragmentation factor 45/inhibitor of caspase activated DNase), η οποία σχηματίζει ένα ισχυρό ανασταλτικό σύμπλοκο με την DFF40/CAD (DNA fragmentation factor 45/ caspase activated DNase), που είναι μια εν δυνάμει DNάση, αν απελευθερωθεί. Η θραυσματοποίηση της DFF45/ICAD από τις κασπάσες-3 και -7 απελευθερώνει την DFF40/CAD, η οποία είναι υπεύθυνη για την αποδόμηση των χρωμοσωμάτων σε νουκλεοσωμικά θραύσματα κατά τη διάρκεια της απόπτωσης. Στην αποδόμηση του DNA κατά τη διάρκεια της απόπτωσης συμμετέχει κι άλλη μια νουκλεάση, η ενδονουκλεάση G, που επίσης απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια (Εικ. 4) (Yan and Shi, 2005).

Είναι φανερό πως επιπρόσθετα μονοπάτια επαγωγής της απόπτωσης πρέπει να υπάρχουν, καθώς έχει δειχθεί πως η αναπτυξιακή απόπτωση σε

ποντίκια με ελαττωματικά τα μονοπάτια των κασπασών-8 και -9, ήταν φυσιολογική (Earnshaw et al., 1999; Wang and Lenardo, 2000).



Εικόνα 4: Πορείες σηματοδότησης της απόπτωσης. Εξωγενής και ενδογενής πορεία ενεργοποίησης της απόπτωσης. (→) ενεργοποίηση, (-) αναστολή. DD (death domains); CARD (caspase recruitment domain); DED (death effector domain) (Vermeulen et al., 2005).

1.7 Ο ρυθμιστικός ρόλος της p53 στην απόπτωση

Ο μεταγραφικός παράγοντας p53 είναι ο πιο εκτεταμένα μελετημένος καταστολέας όγκων και δρα ως απόκριση σε διάφορες μορφές κυτταρικού στρες διαμεσολαβώντας για την έναρξη πολλών αντί-πολλαπλασιαστικών διαδικασιών. Έτσι, ο p53 μπορεί να ενεργοποιηθεί από την καταστροφή του DNA, που μπορεί να προκληθεί από οξειδωτικό στρες, από ακτινοβολία, από καταστάσεις υποξείας ή από ασυνήθιστη έκφραση ογκογονιδίων, ρυθμίζοντας με τη σειρά του τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, την επιδιόρθωση του DNA, την κυτταρική γήρανση και την απόπτωση (Levine, 1997; Agarwal, et al., 1998; Glazko et al, 2004; Braithwaite et al., 2005; Vousden and Lane, 2007; Riley et al., 2008).

Όσον αφορά την απόπτωση, ο p53 μπορεί να παίξει ένα ρυθμιστικό ρόλο, επιδρώντας σε σημεία ελέγχου τόσο του ενδογενούς όσο και του εξωγενούς μονοπατιού απόπτωσης. Η πιο σημαντική επίδραση του p53 στο ενδογενές μονοπάτι είναι η ικανότητα του να ελέγχει τη μεταγραφή των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2. Σε αυτές περιλαμβάνονται η πρωτεΐνη Bax (Fridman and Lowe., 2003; Miyashita et al., 1994), και οι πρωτεΐνες με μοναδική BH3-περιοχή όπως Puma (Nakano and Vousden, 2001; Fridman and Lowe, 2003), Noxa (Oda et al., 2000a; Fridman and Lowe, 2003) και Bid (Sax et al., 2002; Fridman and Lowe, 2003). Επί πρόσθετα με τους παράγοντες ελέγχου, που δρουν ανοδικά των μιτοχονδρίων, ο p53 μπορεί να ενεργοποιήσει διάφορα γονίδια, τα προϊόντα των οποίων αποτελούν μέρος της αποπτωτικής μηχανής. Ένα από αυτά είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί τον Apaf-1 (Kannan et al., 2001; Moroni et al., 2001; Robles et al., 2001, Fridman and Lowe, 2003), ο οποίος δρα ως συν-ενεργοποιητής της κασπάσης-9 και συμβάλλει στην έναρξη του καταρράκτη κασπασών. Επιπρόσθετα, ο p53 μπορεί να επαυξήσει τη δράση της κασπάσης-6, οδηγώντας έτσι στην ενισχυμένη ευαισθητοποίηση ορισμένων κυτταρικών τύπων στα χημειοθεραπευτικά (MacLachlan et al., 2002; Fridman and Lowe, 2003). Είναι πολύ πιθανό αυτό το σημείο ελέγχου να μην είναι κρίσιμο για την έναρξη της απόπτωσης, αλλά μπορεί να προωθεί την απόπτωση παρουσία ελεύθερου κυτοχρώματος-c (Juin et al., 2002; Fridman and Lowe, 2003). Ο p53 παίζει ρυθμιστικό ρόλο και στο εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι, μόνο που

για τον ακριβή του ρόλο υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία, ενώ η ικανότητα του p53 να ενεργοποιεί την Bid είναι πιθανό να συμβάλλει στη διεπικοινωνία μεταξύ της ενδογενούς και εξωγενούς πορείας απόπτωσης (Sax et al., 2002; Fridman and Lowe, 2003).

1.8 Ο Ρολος της PARP-1 στην απόπτωση

Η Πόλυ(ADP-ριβόζη) πολυμεράση-1 (PARP-1) είναι το κύριο υπεύθυνο ένζυμο για την παραγωγή πολυμερών πόλυ-ADP-ριβόζης (PAR) (Sallmann et al., 2000; Hassa et al., 2006) και εντοπίζεται στα κεντροσωμάτια και τα χρωμοσώματα, γνωστή ως ένα πυρηνικό ένζυμο, που ενεργοποιείται από σχάσεις της αλυσίδας του DNA, έτσι ώστε να λάβει μέρος στην επιδιόρθωσή του (Kanai et al., 2000, Wang et al 2005). Σε φυσιολογικές συνθήκες, η PARP παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας, στον έλεγχο του ομόλογου ανασυνδιασμού και στη ρύθμιση της λειτουργίας των κεντροσωμάτιων (d'Adda di Fagagna et al., 1999; Kanai et al., 2003; Schultz et al., 2003; Wang et al 2005; Caldecott, 2007).

Σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως η μαζική καταστροφή του DNA, η ενεργοποίηση της PARP έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του υποστρώματός της, του NADc (nicotinamide adenine dinucleotide), που μαζί με την επακόλουθη μείωση της ATP, οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο (Ha and Snyder, 1999; Kim et al., 2000, Wang et al 2005). Αναστολείς της PARP μπορούν να προστατέψουν πολλούς κυτταρικούς τύπους από την απόπτωση, που μπορεί να προκαλείται από διάφορους παράγοντες (Guo et al., 1998; Pogrebniak et al., 2003; Hatip-Al-Khatib et al., 2004, Wang et al 2005), το ίδιο μπορεί να επιτευχθεί και με μεταλλάξεις στην PARP, έτσι ώστε αυτή να μη μπορεί να υποβληθεί σε διάσπαση ή με την παρεμβολή RNA, κατευθυνόμενου ενάντια στην PARP (Oliver et al., 1998; Herceg and Wang, 1999; Kameoka et al., 2004). Η ενεργοποίηση της PARP είναι συνήθως η συνέπεια της ενεργοποίησης της κασπάσης-3, αν και υπάρχουν μερικές μελέτες που αναφέρουν πως η διάσπαση της PARP είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της κασπάσης-7 (Boulares et al., 1999; Germain et al., 1999; Tian et al., 2000; Yinjun et al., 2004; Wang et al 2005). Επιπρόσθετα μια άλλη μελέτη έδειξε πως η κασπάση-3 δεν ήταν απαραίτητη για τη

θραυσματοποίηση του DNA και τη διάσπαση της PARP επάχθηκε από τον TGF-beta (Yang et al., 2004; Wang et al 2005). Έτσι, το ποια κασπάση είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση της PARP και το αν οι κασπάσες εμπλέκονται σε αυτό το γεγονός μπορεί να εξαρτάται από το αίτιο που προκαλεί την απόπτωση. Επίσης, πολλές μελέτες έχουν δείξει πως ο AIF είναι ένας απαραίτητος καθοδικός τελεστής της PARP. Όταν ενεργοποιείται, η PARP ρυθμίζει την μετατόπιση του AIF από τα μιτοχόνδρια στον πυρήνα όπου, ο τελευταίος, επάγει την αποδόμηση και τη μεγάλης κλίμακας θραυσματοποίηση του DNA (Yu et al., 2003; Xiao et al., 2004, Wang et al 2005), ακόμα και ανεξάρτητα των κασπασών (Susin et al., 1996; Susin et al., 1999; Wang et al 2005).

1.9 Ο ρόλος του NF-κB στη ρύθμιση της απόπτωσης

Ο NF-κB σχετίζεται με μια πληθώρα ασθενειών, όπως το AIDS, ο καρκίνος, η αρθρίτιδα, ο διαβήτης και οι ιογενείς λοιμώξεις, καθώς και με φυσιολογικές λειτουργίες, όπως η ανάπτυξη και οι αποκρίσεις του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτό συμβαίνει, γιατί ο NF-κB εμπλέκεται στη ρύθμιση πολλών λειτουργιών και μια από τις πιο σημαντικές είναι η απόπτωση. Το κατά πόσο ο ρόλος του στη ρύθμιση της απόπτωσης είναι προ-αποπτωτικός ή αντι-αποπτωτικός, είναι κάτι που βρίσκεται υπό συνεχή μελέτη, ωστόσο, έχει δειχθεί πως μπορεί να δράσει είτε με τον έναν ή με τον άλλο τρόπο (Perkins, 2007) .

Ο αντι-αποπτωτικός ή προ-αποπτωτικός ρόλος του NF-κB έγκειται στην ικανότητα του να ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων, αν και υπάρχουν ορισμένες εξαιρέσεις (Kucharczak et al., 2003; Luo et al., 2005; Papa et al., 2006; Perkins, 2007). Για να αναστείλει ή να επάγει την απόπτωση, ο NF-κB ενεργοποιεί τη μεταγραφή μιας πολύ μεγάλης ποικιλίας γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων εμπλέκονται σε διαφορετικά σημεία της εξωγενούς ή της ενδογενούς πορείας του αποπτωτικού θανάτου (Miyamoto, 2004; Luo et al., 2005; Dutta et al., 2006; Perkins, 2007; Chariot, 2009).

1.10 Μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αντι-αποπτωτική δραστηριότητα του NF-κΒ

Τα γονίδια-στόχοι του NF-κΒ, που κωδικοποιούν αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, περιλαμβάνουν τις ανασταλτικές πρωτεΐνες της απόπτωσης (IAPs) XIAP, c-IAP1 και c-IAP2, οι οποίες εμπλέκονται στην αναστολή της ενεργοποίησης της προκασπάσης-9 και των κασπασών-3 και -7, με πιο σημαντική την XIAP (Liston et al., 2003; Wright and Duckett, 2005; Dutta et al., 2006), ενώ πρόσφατα προστέθηκε στους αντι-αποπτωτικούς στόχους, που ρυθμίζονται από τον NF-κΒ και μια μοναδική πρωτεΐνη της οικογένειας των IAP, η survivin (Kawakami et al., 2005; Shishodia et al., 2006; Dutta et al., 2006). Σημαντικά γονίδια-στόχοι του NF-κΒ αποτελούν, επίσης, τα γονίδια, που κωδικοποιούν τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, τις Bcl-X_L, Bfl-1/A1 και Bcl-2 και οι οποίες αναστέλλουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c και της Smac/Diablo από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα, ανταγωνιζόμενες τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 (Dutta et al., 2006).

Επιπλέον, υπάρχουν μόρια, όπως τα προσαρμοστικά μόρια TRAF1 και TRAF2, τα οποία, σε συνεργασία με τις c-IAP1 και c-IAP2, ενισχύουν την πορεία ενεργοποίησης του NF-κΒ (Wang et al., 1998; Dutta et al., 2006). Με αντίστοιχο τρόπο φαίνεται πως δρα και η c-FLIP σε συνεργασία με την κασπάση-8, οι οποίες προωθούν την ενεργοποίηση του NF-κΒ μέσω των BCL-10, MALT1 (mucosa-associated-lymphoid tissue lymphoma-translocation gene 1) και RIP1 (Launay et al., 2005; Budd et al., 2006).

Υπάρχουν και άλλοι τρόποι με τους οποίους ο NF-κΒ αυξάνει την επιβιωσιμότητα των κυττάρων, όπως η μεταγραφική καταστολή γονιδίων που επάγουν την απόπτωση, για παράδειγμα η εξαρτώμενη από την υπομονάδα του NF-κΒ, RelA(p65), καταστολή της έκφρασης της κασπάσης-8 και των υποδοχέων TRAIL, DR4 και DR5, καθώς και η καταστολή της επαγόμενης από υποξεία πρωτεΐνης BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3), η οποία εμπλέκεται στον κυτταρικό θάνατο (Chen et al., 2003; Baetz et al., 2005). Ακόμα, η μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κΒ σχετίζεται με τη βελτίωση της ικανότητας επιβίωσης του κυττάρου, μέσω της ενισχυμένης αποδόμησης του ογκοκατασταλτικού παράγοντα p53, η οποία επιτυγχάνεται

από την ελεγχόμενη, από τον NF-κB, μεταγραφική αυξορρύθμιση της Mdm2, ενός αρνητικού ρυθμιστή της p53. Η αποσταθεροποίηση του p53 έχει αποδοθεί στην ικανότητα της IKKβ να προωθεί την ανθεκτικότητα κυττάρων ποντικού στο χημειοθεραπευτικό φάρμακο δοξορουβικίνη (Tergaonkar et al., 2002; Dutta et al., 2006), ενώ, σε συνάρτηση με αυτή την παρατήρηση, έχει δειχθεί πως η IκB σχετιζόμενη Bcl-3 πρωτεΐνη, η οποία δρα ως μεταγραφικός συν-ενεργοποιητής με τα όμο-διμερή p50 ή p52, καταστέλλει την προ-αποπτωτική ενεργοποίηση του p53 ως απόκριση σε βλάβες στο DNA, μέσω της επαγωγής της έκφρασης της πρωτεΐνης Hdm2, προκαλώντας έτσι την αποδόμηση της p53 (Kashatus et al., 2006; Dutta et al., 2006). Μολονότι μένει να καθορισθεί το κατά πόσο η σχέση μεταξύ IKKβ και p53 εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο ή όχι, πρόσφατα δείχθηκε ότι η ιδιοστατικά ενεργός μορφή της IKKβ (IKKβca) αποσταθεροποιεί την p53 (Batsi et al., 2009) μέσω της φωσφορυλίωσης της στις σερίνες 362 και 366 και την επακόλουθη ουβικιτινίωση της από την β-TrCP1 και αποδόμηση της, ανεξάρτητα από την Mdm2 (Xia et al., 2009).

Πρόσφατα, η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της αντίστροφης μεταγραφάσης της τελομεράσης TERT από το ογκογονίδιο του NF-κB, v-Rel, σχετίστηκε με την καταστολή της απόπτωσης σε v-Rel μετασχηματισμένα λεμφοειδή κύτταρα καθώς επίσης και με το εναλλακτικό μάτισμα για τη δημιουργία ποικίλων ματισμένων μορφών TERT, που κωδικοποιούσαν την ενεργό μορφή του ενζύμου (Hrdlickova et al., 2006; Dutta et al., 2006). Αυτά τα ευρήματα μαζί με τις μελέτες που δείχνουν πως ο NF-κB μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή εναλλακτικά ματισμένων προϊόντων των γονιδίων Bcl-X_L, τις πρωτεΐνες Bcl-X_L και Bcl-X_S, ενισχύουν την πιθανότητα, ότι η ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος συνιστά ένα νέο πεδίο έρευνας για τη ρύθμιση της απόπτωσης από τον NF-κB.

1.11 Μηχανισμοί που εμπλέκονται στην προ-αποπτωτική δραστηριότητα του NF-κB

Παρά τα αδιαφιλονίκητα στοιχεία που δείχνουν ότι ο NF-κB αναστέλλει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, είναι φανερό πως κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, η ενεργοποίηση του NF-κB σχετίζεται ή απαιτείται

για την επαγωγή της απόπτωσης (Ryan et al., 2000; Kucharczak et al., 2003; Ryan et al., 2006). Μερικά προ-αποπτωτικά γονίδια, που είναι μεταγραφικοί στόχοι του NF-κΒ, εμπλέκονται στο φαινόμενο αυτό. Αυτά περιλαμβάνουν τους υποδοχείς θανάτου Fas(CD95), τους υποδοχείς TRAIL DR4, DR5 και DR6, τα προσδετικά μόρια επαγωγής θανάτου FasL, TNFα και TRAIL, την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη της οικογένειας Bcl-2, Bax, και την εναλλακτικά ματισμένη προ-αποπτωτική μορφή της Bcl-X_L την Bcl-X_S (Dutta et al., 2006; Grimm et al., 2005; Kucharczak et al., 2003). Ένα παράδειγμα της προαποπτωτικής δραστηριότητας του NF-κΒ είναι η απόπτωση των νευρώνων του φλοιού, η οποία προκύπτει έπειτα από την απομάκρυνση του ορού από το θρεπτικό υλικό στο οποίο αναπτύσσονται και την απώλεια των διαύλων K⁺, δύο γεγονότων που σχετίζονται με τα αυξημένα επίπεδα του NF-κΒ και της επακόλουθης αυξορύθμισης της Bcl-X_S (Tao et al., 2006; Dutta et al., 2006). Η εξαρτώμενη από τον NF-κΒ μεταγραφική ενεργοποίηση του προαγωγέα του Bcl-X σε συνάρτηση με τη συσσώρευση των εναλλακτικά ματισμένων μεταγράφων της Bcl-X_S υποδηλώνει πως ο ρόλος του NF-κΒ στο εναλλακτικό μάτισμα είναι ένας νέος τρόπος για να καθοριστεί η τύχη του κυττάρου.

Δυο σηματοδοτικές πορείες, που απορρέουν από το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου ER (endoplasmic reticulum), έχουν αναδείξει έναν σημαντικό ρόλο του NF-κΒ στην απόπτωση που επάγεται από ER στρες. Μελέτες έχουν δείξει πως το ER στρες προάγει την εξαρτώμενη από τον NF-κΒ ενεργοποίηση της έκφρασης του TNFα, μέσω της συσχέτισης των IKK με τους αισθητήρες ER στρες IRE1a και TRAF2, ενώ ταυτόχρονη μειορύθμιση του TRAF2 προκαλεί τη μειωμένη ενεργοποίηση του NF-κΒ και της JNK [c-Jun N-terminal kinase (c-Jun αμινοτελική κινάση)] ενισχύοντας την επαγωγή της απόπτωσης από τον TNFα (Hu et al., 2006; Dutta et al., 2006).

Ένας άλλος τρόπος, με τον οποίο ο NF-κΒ μπορεί να επαυξήσει την απόπτωση, είναι μέσω της αυξορύθμισης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης CYLD (Familial cylindromatosis tumor suppressor gene), η οποία δρα ως από-ουβικιτινάση για να απομακρύνει τις K63 αλυσίδες πολυ-ουβικιτίνης από τα μόρια TRAF2/6 και NEMO, προκαλώντας έτσι την αποδόμηση του συμπλόκου των IKK, τον τερματισμό της σηματοδότησης του NF-κΒ και την ενίσχυση της επαγωγής της απόπτωσης (Brummelkamp et al., 2003; Dutta et

al., 2006). Επίσης, η CYLD από-ουβικιτινώνει τον συν-ενεργοποιητή των p50 και p52, Bcl-3, για να αναστείλει την ενεργοποίηση γονιδίων, που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αύξηση των όγκων (Ikeda and Dikic, 2006; Massoumi et al., 2006).

Η προ-αποπτωτική δράση του NF-κB, έχει, ακόμα, συνδεθεί με την αυξημένη έκφραση, του προ-αποπτωτικού παράγοντα B7-H1, ο οποίος επάγει απόπτωση στα T λεμφοκύτταρα (Lee et al., 2005) και της κασπάσης-11, η οποία μπορεί να ενεργοποιήσει την κασπάση-3 (Kang et al., 2000; Dutta et al., 2006). Επί πρόσθετα, ο NF-κB δρα και έμμεσα για να ενεργοποιήσει γονίδια που ρυθμίζουν την απόπτωση, μέσω της αυξορρύθμισης άλλων μεταγραφικών παραγόντων όπως των p53 και IRF-1 (Denk et al., 2000; Dutta et al., 2006).

1.12 Απόπτωση επαγόμενη από οξειδωτικό στρες

Πρώιμα στην εξέλιξη, το οξυγόνο και οι δραστικοί μεταβολίτες του αποτελούσαν μια κύρια απειλή για το πρωτόγονο ευκαρυωτικό κύτταρο. Η δραστική φύση των μορφών οξυγόνου έθετε ως ανάγκη την ανάπτυξη αμυντικών μηχανισμών για την προστασία των κυτταρικών μακρομορίων. Με τον έλεγχο της επικίνδυνης δράσης του οξυγόνου, το μοριακό οξυγόνο μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να περαιωθούν διάφορες απαραίτητες βιοχημικές αντιδράσεις, ανάμεσά τους και η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Ωστόσο, κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες οπότε και ευνοείται ο σχηματισμός δραστικών μορφών οξυγόνου (ΔΜΟ) ή reactive oxygen species (ROS), μπορεί να προκληθεί βλάβη στη λειτουργία των μιτοχονδρίων και να επηρεαστεί η βιωσιμότητα των κυττάρων. Τέτοιες ΔΜΟ είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), το ανιόν σουπεροξειδίου (O_2^-) και η ρίζα του υδροξυλίου (OH^-). Η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα είναι η κύρια πηγή παραγωγής των ενδοκυττάρων ΔΜΟ και ταυτόχρονα ένας σημαντικός στόχος των καταστροφικών επιπτώσεων αυτών. Ο κυτταρικός μεταβολισμός εξαρτάται από τη συνεχή παροχή ATP από τα μιτοχόνδρια, έτσι οποιαδήποτε καταστροφή που επηρεάζει τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας μπορεί να έχει επιπτώσεις και στη βιωσιμότητα του κυττάρου. Για να προστατευθούν τα κύτταρα από τις ΔΜΟ, τα μιτοχόνδρια έχουν αναπτύξει περίτεχνους

αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, όπως τις δισμουτάσες του σουπεροξειδίου (SOD-1, -2 και-3), που μετατρέπουν το $O^{\cdot -}$ σε H_2O_2 και ένζυμα, που αποδομούν το H_2O_2 , όπως καταλάσες, υπεροξειδάσες γλουταθειόνης και υπεροξει-αναγωγάσες (peroxiredoxins). Όταν, όμως, το επίπεδο της παραγωγής των ΔΜΟ είναι πολύ υψηλό και υπερβαίνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του κυττάρου, τότε το κύτταρο εισέρχεται σε μια κατάσταση οξειδωτικού στρες (Bartosz, 2009).

Ανάλογα με το επίπεδο της συγκέντρωσης των ΔΜΟ, το κύτταρο είτε μπορεί να επιδιορθώσει τη βλάβη ή να ενεργοποιήσει τις πορείες που οδηγούν στην απόπτωση (Bartosz, 2009). Αν η συγκέντρωση των ΔΜΟ είναι χαμηλή, τότε αυτές δρουν ως δευτεροταγείς μεταγωγείς σήματος σε σηματοδοτικές πορείες, που οδηγούν στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων σε διάφορους κυτταρικούς τύπους αλλά και κάτω από διάφορες βιολογικές συνθήκες, όπως μετά τη χορήγηση κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων και ορμονών, στη μεταφορά ιόντων, στη μεταγραφή, στη νευρορύθμιση και στην απόπτωση (Adler et al., 1999; Hensley et al., 2000; Tonks, 2005; Bartosz, 2009; Janssen-Heininger et al., 2009). Στους ανθρώπους το οξειδωτικό στρες έχει ενοχοποιηθεί για διάφορες παθολογικές καταστάσεις, ανάμεσα στις οποίες είναι ο καρκίνος, ο διαβήτης τύπου 2, η αρτηριοσκλήρωση, οι διαδικασίες χρόνιων φλεγμονών και διάφορες νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Droge, 2002; Ott et al., 2007).

1.13 Οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες στο κύτταρο

Οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες στο κύτταρο αφορούν κυρίως τέσσερις τομείς, την καταστροφή του DNA, την καταστροφή πρωτεϊνών, την καταστροφή λιπιδίων και την επαγωγή της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος-c (Goetz and Luch, 2008).

Η οξειδωτική καταστροφή του DNA, λόγω της συνάθροισης ΔΜΟ, προκαλεί μετατροπές στις βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης, της ραχοκοκκαλιάς δηλαδή της δεοξυριβόζης, μονόκλωνες [DNA single strand breaks (SSBs)] και δίκλωνες [DNA double strand breaks (DSBs)] σχάσεις των αλυσίδων του DNA καθώς και αλληλοσυνδέσεις με άλλα μόρια (Li et al., 2008). Επί πρόσθετα DSBs μπορεί να δημιουργηθούν ως επακόλουθο κοντινών και παράλληλων

(closely aligned) SSBs στις συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA και ενδιάμεσων προϊόντων της επιδιόρθωσης του DNA. Επιπλέον δείχθηκε ότι το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει SSBs στο τελομερικό DNA (von Zglinicki et al., 2000), οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν στην απάλειψη τελομερικών αλληλουχιών (Baird et al., 2003). Οι μετατροπές αυτές στο DNA είναι εν δυνάμει αιτίες μετάλλαξης, συμβάλλοντας στην καρκινογένεση, την πρόωμη γήρανση και σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Bohr, 2002; Ott et al., 2007; Li et al., 2008; D'Errico et al., 2008). Εξίσου σημαντικός στόχος των ΔΜΟ είναι το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA), το οποίο κωδικοποιεί πολυπεπτίδια και μόρια RNA, τα οποία είναι απαραίτητα για την μεταφορά ηλεκτρονίων και την παραγωγή ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Anderson et al., 1981; Ott et al., 2007). Λόγω της σημασίας του mtDNA για την περαίωση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, η καταστροφή του από τις ΔΜΟ μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο σε μη αναστρέψιμες βλάβες. Επιπλέον, λόγω του ότι έγκειται κοντά στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, τον κύριο παραγωγό ελευθέρων ριζών, και την έλλειψη προστατευτικών ιστόνων, το mtDNA είναι πολύ ευάλωτο στις ΔΜΟ.

Ένας σημαντικός μηχανισμός τοξικότητας των ΔΜΟ και κυρίως του ανιόντος σουπεροξειδίου είναι η άμεση οξείδωση και απενεργοποίηση των πρωτεϊνών σιδήρου-θείου (Fe-S), όπως οι ακονιτάσες και η σχετιζόμενη απελευθέρωση σιδήρου (Fridovich, 1997; Ott et al., 2007). Η απενεργοποίηση των ακονιτασών μπορεί να έχει δύο κύριες συνέπειες. Πρώτον, το σχηματισμό ενός ανενεργού συμπλέγματος $[3\text{Fe-4S}]^+$, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα την ταυτόχρονη απελευθέρωση Fe^{2+} και H_2O_2 . Στην πραγματικότητα η απενεργοποίηση των ενζύμων που περιέχουν Fe-S, μέσω του O_2^- μπορεί να εμποδίσει ένα σημαντικό οξειδωτικό φορτίο, γιατί παρέχει ισομοριακές ποσότητες H_2O_2 για κάθε μόριο O_2^- (Liochev and Fridovich, 1999; Ott et al., 2007). Ωστόσο, η απελευθέρωση των Fe^{2+} και H_2O_2 μπορεί να οδηγήσει και στην παραγωγή ριζών υδροξυλίου, οι οποίες έχουν την ικανότητα να οξειδώσουν μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, DNA και λιπίδια μεγεθύνοντας την αρχική οξειδωτική καταστροφή που είχε προκληθεί από το O_2^- . Ακόμα, η μιτοχονδριακή ακονιτάση παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον κύκλο του Krebs. Η αναστολή της, ακόμα και η μερική, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία του κύκλου του Krebs με σημαντικές επιπτώσεις στην

παραγωγή ενέργειας και τη βιωσιμότητα του κυττάρου. Οι ΔΜΟ μπορούν να απενεργοποιήσουν και άλλες παρόμοιες πρωτεΐνες, όπως η NADH αφυδρογονάση του συμπλέγματος-1. Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες αναγνωρίζονται από πρωτεάσες και αποδομούνται (Cadenas and Davies, 2000; Ott et al., 2007).

Ο σχηματισμός ΔΜΟ και η επακόλουθη υπεροξειδωση των μιτοχονδριακών λιπιδίων, μπορεί να οδηγήσει στην καταστολή του μιτοχονδριακού μεταβολισμού. Τα υπεροξειδία των λιπιδίων επηρεάζουν ζωτικές λειτουργίες των μιτοχονδρίων, όπως η αναπνοή και η οξειδωτική φωσφορυλίωση, οι ιδιότητες φραγμού της εσωτερικής μεμβράνης, η διατήρηση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και η μιτοχονδριακή ικανότητα διαλυτοποίησης των Ca^{2+} (Zhang et al., 1990; Albano et al., 1991; Bacon et al., 1993; Ott et al., 2007). Τα προϊόντα της υπεροξειδωσης των μιτοχονδριακών λιπιδίων μπορεί να προκαλέσουν βλάβες στη λειτουργία φραγμού της μεμβράνης είτε μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασής τους με τις πρωτεΐνες ή/και έμμεσα μέσω των λιπιδίων της μεμβράνης (Chen et al., 1995; Ott et al., 2007).

1.14 Απόπτωση επαγόμενη από H_2O_2

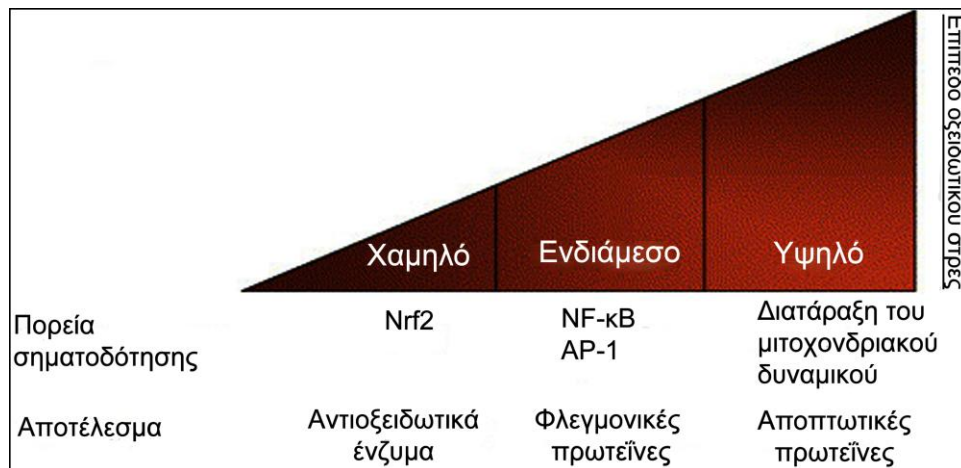
Παρότι το H_2O_2 θεωρείται ως ένα αδύναμο, σχετικά, οξειδωτικό μέσο συγκρινόμενο με άλλες ΔΜΟ, όπως η ρίζα (OH^\cdot), έχει αναδειχθεί ως ένα σημαντικό σηματοδοτικό μόριο, εξαιτίας των μοναδικών βιοχημικών του ιδιοτήτων. Το H_2O_2 βρίσκεται παντού στα βιολογικά συστήματα, έχοντας σχετικά μεγάλη διάρκεια ημίσειας ζωής και κυρίως είναι διαλυτό τόσο σε υδρόφιλα όσο και σε υδρόφοβα μέσα, συνεπώς πολύ εύκολα διαχέεται μέσω των κυτταρικών μεμβρανών προς τους κυτταρικούς στόχους του (Droge, 2002; Ryter et al., 2007). Μελέτες δείχνουν, πως η σηματοδότηση της απόπτωσης μπορεί να μεταχθεί εξωκυττάρια μέσω διαλυτών παραγόντων, και κύτταρα που διεγείρονται με κυτταροκίνες μεταδίδουν το αποπτωτικό σήμα σε γειτονικά κύτταρα μέσω ενός ανασταλτικού παράγοντα καταλασών, προτείνοντας πως το H_2O_2 μπορεί να δρά ως ένας παρακρινικός διαμεσολαβητής της απόπτωσης (Pletjushkina et al., 2006; Ryter et al., 2007)

Το H_2O_2 χρησιμοποιείται ευρέως ως μοντέλο επαγωγής εξωγενούς οξειδωτικού στρες, ενώ συστατικά όπως η μεναδιόνη, που παράγει ενδοκυττάρια H_2O_2 και O_2 χρησιμοποιούνται ως μοντέλα ενδογενούς παραγωγής ΔΜΟ. Μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης έχουν παρατηρηθεί σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, ύστερα από τη χορήγηση H_2O_2 , μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και μετρήσεων TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) (Cook et al., 1999; Kazzaz et al., 1996; Lee et al., 2002; Ryter et al., 2007). Συγκεκριμένα το H_2O_2 επήγαγε αποπτωτικό θάνατο σε καρδιομυοκύτταρα, αφού μετά τη χορήγησή του παρατηρήθηκε σε αυτά μιτοχονδριακή μετατόπιση των Bax/Bad, αύξηση της έκφρασης της p53, απελευθέρωση του κυτοχρώματος-c από τα μιτοχόνδρια, ενεργοποίηση της κασπάσης-3, διάσπαση της PARP και θραυσματοποίηση του DNA (Cook et al., 1999; Ryter et al., 2007). Παρότι, τα συμπτώματα της επαγόμενης από το H_2O_2 απόπτωσης είναι σταθερά, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ποικιλομορφία, όσον αφορά τη συμπεριφορά των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Όπως και στα υπόλοιπα συστηματοποιημένα μοντέλα επαγωγής της απόπτωσης, η τεχνητή ρύθμιση των πρωτεϊνών Bcl-2, επηρεάζει το αποτέλεσμα της επαγόμενης από οξειδωτικό στρες απόπτωσης (Hockenbery et al., 1993; Paul and Arrigo, 2000; Ryter et al., 2007). Για παράδειγμα, η έκφραση της Bcl-2 ανέστειλε την παραγωγή ΔΜΟ σε ινοβλάστες ποντικού (Paul and Arrigo, 2000) ενώ παραδόξως, η υπερέκφραση της Bcl-2 ή της Bcl-X_L αύξησε την παραγωγή H_2O_2 από τα μιτοχόνδρια (Kowaltowski et al., 2004). Για το συγκεκριμένο ζήτημα έχει προταθεί, πως η σχέση μεταξύ των αυξημένων επιπέδων συγκέντρωσης ΔΜΟ στο μιτοχόνδριο και της αντι-αποπτωτικής δράσης των πρωτεϊνών αυτών, εμπεριέχει κάποια συνθήκη χρόνιας επίδρασης. Επιπλέον της αναστολής της απόπτωσης, έχει δειχθεί πως η υπερέκφραση των Bcl-2 και Bcl-X_L προωθεί την εξαρτώμενη από το H_2O_2 μετάλλαξη, με συνέπεια την αυξημένη επιβίωση των κυττάρων και την καταστολή της απόπτωσης (Cherbonnel–Lasserre and Dosanjh, 1997; Ryter et al., 2007), αλλά και αλλάζει την αναλογία μεταξύ απόπτωσης και νέκρωσης, όταν χορηγούνται στα κύτταρα θανατηφόρες συγκεντρώσεις H_2O_2 (Du et al., 2006; Ryter et al., 2007). Επίσης, έχει δειχθεί πως η μείο-ρύθμιση της Smac/Diablo από

ολιγονουκλεοτίδια σε κύτταρα C2C12 είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της επαγόμενης από H_2O_2 απόπτωσης (Jiang et al., 2005; Ryter et al., 2007). Εξ ορισμού τα αντι-οξειδωτικά ή η έκφραση αντι-οξειδωτικών παραγόντων αναστέλλει την επαγόμενη από ΔΜΟ απόπτωση, όπως για παράδειγμα η εξειδικευμένη υπερέκφραση της καταλάσης στα μιτοχόνδρια, η οποία προστατεύει τα κύτταρα (Arita et al., 2006; Ryter et al., 2007)

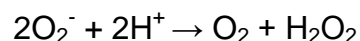
1.15 Ο ρόλος του NF-κΒ στο οξειδωτικό στρες που επάγεται από H_2O_2

Οι ΔΜΟ, όπως έχει περιγραφεί και νωρίτερα εμπλέκονται σε πορείες επαγωγής σήματος και επάγουν οξειδωτικό στρες. Πλέον, είναι καλά τεκμηριωμένο, πως το H_2O_2 είναι η κύρια ΔΜΟ, που εμπλέκεται στις κυτταρικές πορείες σηματοδότησης, εξαιτίας της ικανότητας του να αναστέλλει τις φωσφατάσες τυροσίνης, μέσω της οξείδωσης των καταλοίπων κυστεΐνης στις καταλυτικές περιοχές τους, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των κινασών τυροσίνης και της καθοδικής σηματοδότησης (Aslan and Ozben, 2003; Tonks, 2005; Gloire et al., 2006). Με βάση το επίπεδο της συγκέντρωσης των ΔΜΟ που παράγονται, ενεργοποιούνται διαφορετικοί μεταγραφικοί παράγοντες, που συντονίζουν διαφορετικές βιολογικές διαδικασίες. Ένα χαμηλό επίπεδο συγκέντρωσης ΔΜΟ επάγει τον Nrf2, ένα μεταγραφικό παράγοντα, που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα (Halliwell and Gutteridge, 1999; Gloire et al., 2006). Ένα ενδιάμεσο επίπεδο συγκέντρωσης ΔΜΟ πυροδοτεί μια απόκριση σε φλεγμονή, μέσω του NF-κΒ και του AP-1 (activator protein 1) και ένα υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης ΔΜΟ μπορεί να προκαλέσει ισχυρές βλάβες στην πορεία αναπνοής του κυττάρου και να το οδηγήσει στην απόπτωση ή και τη νέκρωση (Halliwell and Gutteridge, 1999; Gloire et al., 2006) (Εικ. 5).



Εικόνα 5: Ιεραρχικό μοντέλο οξειδωτικού στρες. Ένα χαμηλό επίπεδο οξειδωτικού στρες επάγει τον Nrf2, ένα μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της μεταγραφής αντιοξειδωτικών ενζύμων. Ένα ενδιάμεσο επίπεδο ΔΜΟ προκαλεί φλεγμονική απόκριση, μέσω της ενεργοποίησης των NF-κΒ και AP-1. Ένα υψηλό επίπεδο οξειδωτικού στρες προκαλεί διαταραχή στη μεταφορά ηλεκτρονίων και βλάβες στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, προκαλώντας απόπτωση και νέκρωση (Tonks, 2005; Gloire et al., 2006).

Στην πλειονότητα των μελετών, που αφορούν την ενεργοποίηση του NF-κΒ από το οξειδωτικό στρες, έχει χρησιμοποιηθεί το H₂O₂ ως άμεση πηγή ΔΜΟ. Μετά την παραγωγή του στα μιτοχόνδρια ή μέσω εξειδικευμένων ενζύμων, το ανιόν του σουπεροξειδίου (O₂⁻) μεταβολίζεται άμεσα σε H₂O₂ μέσω της ακόλουθης αντίδρασης, που είτε συμβαίνει αυθόρμητα ή καταλύεται από τις δισμουτάσες του σουπεροξειδίου (SOD) (Gloire et al., 2006):



Το H₂O₂ είναι ένα ήπιο οξειδωτικό μέσο, του οποίου οι συνέπειες είτε επάγονται από το ίδιο ή από τη μεταβολή του σε ρίζες (OH[·]) παρουσία Fe²⁺ διαμέσου της αντίδρασης Fenton (Haddad, 2004) ωστόσο, το ποιά από τις δυο μορφές επάγει την ενεργοποίηση του NF-κΒ, είναι υπό διερεύνηση. Το 1991 η ομάδα των Schreck et al. ήταν οι πρώτοι που παρουσίασαν ότι η άμεση χορήγηση H₂O₂ στο θρεπτικό καλλιέργειας ενός κλώνου κυττάρων Jurkat, μπορούσε να ενεργοποιήσει τον NF-κΒ (Schreck et al., 1991; Gloire et al., 2006). Από την ανακάλυψη αυτή και μετά διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν καταβάλει πολύ σημαντικές προσπάθειες, για να αποκαλύψουν το μοριακό μηχανισμό αυτής της ενεργοποίησης. Τα αποτελέσματα των μελετών

αυτών προτείνουν πως η ενεργοποίηση του NF-κB από το H₂O₂ εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο και περιλαμβάνει πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς (Li and Karin, 1999; Gloire et al., 2006).

Ο NF-κB ενεργοποιείται από δραστικές μορφές οξυγόνου (ΔΜΟ) (Gloire et al., 2006) με κυτταρο-ειδικό τρόπο όπου εμπλέκονται διαφορετικοί μηχανισμοί (Li and Karin, 1999; Gloire et al., 2006). Διάφορες ομάδες έδειξαν ότι το H₂O₂ (Schoonbroodt et al., 2000; Takada et al., 2003; 2001) ή το υπερβαναδικό (Imbert et al., 1996; Livolsi et al., 2001), ενεργοποιούν τον NF-κB σε T-κύτταρα διαμέσου της φωσφορυλίωσης της IκBa στην τυροσίνη⁴² που οδηγεί στην αποδόμηση της διαμέσου της καλπεΐνης (Schoonbroodt et al., 2000; Takada et al., 2003) ή στο διαχωρισμό της από τα ετροδιμερή p50/p65 (Gloire et al., 2006; Imbert et al., 1996), ενώ άλλες έδειξαν ότι το H₂O₂ επήγαγε την ενεργοποίηση των IKK σ' αυτά τα κύτταρα οδηγώντας στην κλασσική φωσφορυλίωση της IκBa(σερίνες^{32/36}), που βασίζεται στη SHIP-1, και στην αποδόμηση της από το πρωτεόσωμα (Gloire et al., 2006). Σε ανθρώπινα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα (Gloire et al., 2006; Enesa et al., 2008) και ινοβλάστες (Taylor et al., 2004), το H₂O₂ επάγει την IKKβ-διαμεσολαβούμενη φωσφορυλίωση της IκBa (σερίνες^{32/36}) και τη μεταγραφική ενεργότητα του NF-κB (Εργαστήριο Φυσιολογίας, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Επομένως ο NF-κB δρα ως ένας ευαίσθητος παράγοντας οξειδο-αναγωγικών μεταβολών; και μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση H₂O₂ σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα διέγειρε την πυρηνική μετατόπιση της IKKα, αλλά όχι της IKKβ, που οδήγησε στην αλληλεπίδραση με και τη φωσφορυλίωση της p53 στη σερίνη²⁰, και τη σταθεροποίηση της p53, χωρίς να συμβάλλει στην ενεργοποίηση του NF-κB (Yamaguchi et al., 2007; Yamaguchi et al., 2007). Πέραν όμως απ' αυτές τις μελέτες, οι επιδράσεις της αποσιώπησης της IKKα στην κυτταρική φυσιολογία δεν έχουν διερευνηθεί. Όμως, το H₂O₂ μπορεί να ενεργοποιήσει την κανονική πορεία του NF-κB και να επάγει την πυρηνική μετατόπιση της IKKα με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της p53 στη σερίνη¹⁵, σε ινοβλάστες και επιθηλιακά κύτταρα (Yamaguchi et al., 2007; Yamaguchi et al., 2007). Αυτά τα ευρήματα δείχνουν έναν νέο μηχανισμό με τον οποίο η IKKα συμβάλλει στην ενεργοποίηση της p53 που προκαλείται από ΔΜΟ.

1.16 Χημειοθεραπευτικοί παράγοντες και οξειδωτικό στρες

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση χημειοθεραπευτικών παραγόντων σε κύτταρα προκαλεί την ενδογενή συνάθροιση ΔΜΟ (Pelicano et al., 2004; Laurent et al., 2005) οι οποίες συμβάλλουν στην πρόκληση βλαβών στο DNA (Norbury and Hickson, 2001; Potter and Rabinovitch, 2005; Michod and Widmann, 2007). Μεταξύ αυτών των χημειοθεραπευτικών παραγόντων είναι και το ετοποσιδίιο/VP16 το οποίο είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα χημειοθεραπευτικά για την αντιμετώπιση ενός μεγάλου εύρους καρκίνων. Το ετοποσιδίιο-VP16 ανήκει στις επιποδοφυλλοτοξίνες (Hande, 1998; Montecucco and Biamonti, 2006). Μελέτες *in vitro* έδειξαν πως το ετοποσιδίιο αυξάνει τη συχνότητα ρήξεων της αλυσίδας του DNA μέσω της τοποισομεράσης-II, κυρίως μέσω της ικανότητας του ενζύμου να συνενώνει ματισμένα μόρια νουκλεϊκού οξέος (Burden et al., 1996; Montecucco and Biamonti, 2006). Ο σχηματισμός ενός τριαδικού συμπλόκου αποτελούμενο από τοποισομεράση II-VP16-DNA, φαίνεται πως είναι πολύ κρίσιμος για το μάτισμα του νουκλεϊκού οξέος. Το χημειοθεραπευτικό εισέρχεται στο σύμπλοκο μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με το προσδεδεδέμενο σε ATP μονομερές του ενζύμου, με τέτοιον τρόπο ώστε κάθε μόριο χημειοθεραπευτικού φαρμάκου να σταθεροποιεί μόνο μια μονόκλωνη ρήξη DNA (Bromberg et al., 2003; Vilain et al., 2003; Montecucco and Biamonti, 2006). Έτσι, ανάλογα με τη μοριακή αναλογία μεταξύ ετοποσιδίου και τοποισομεράσης-II, προκαλούνται είτε μονόκλωνες ή αμφίκλωνες ρήξεις στο DNA, με το ένζυμο να συνδέεται ομοιοπολικά στο 5'-άκρο του DNA μέσω ενός δεσμού φωσφοτυροσίνης.

Τα περισσότερα χημειοθεραπευτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του ετοποσιδίου, επάγουν την απόπτωση κυρίως μέσω της πορείας κυτόχρωμα-c/Araf-1/κασπάση-9. Ωστόσο, πρόσφατα δείχθηκε πως στην απόπτωση, που επάγεται από το ετοποσιδίιο, συμβάλλει και η πορεία θανάτου μέσω Fas (Kaufmann and Earnshaw, 2000; Wang et al., 2006; Montecucco and Biamonti, 2006). Διάφορες μελέτες έχουν διερευνήσει την ικανότητα του ετοποσιδίου να επάγει κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης (Kaufmann, 1998; Montecucco and Biamonti, 2006). Μετά τη χορήγηση ετοποσιδίου σε κύτταρα HL60 ο αριθμός

των αποπτωτικών κυττάρων αυξάνει ραγδαία μετά από 3 με 4 ώρες έκθεσης των κυττάρων στο ετοποσίδιο, παρουσιάζοντας θραυσματοποίηση του DNA και πρωτεόλυση του ενζύμου PARP, δυο γεγονότων που είναι βιοχημικοί μάρτυρες της απόπτωσης (Rossi et al., 2002; Negri et al., 1997; Montecucco and Biamonti, 2006).

Παρόλο που το ετοποσίδιο προκαλεί το θάνατο των κυττάρων σε οποιαδήποτε φάση του κυτταρικού κύκλου, διάφορα δεδομένα υποδεικνύουν μια μεγαλύτερη ευαισθητοποίηση των κυττάρων κατά τη φάση S-G2. Κάτι τέτοιο αποδείχτηκε από την μελέτη της επίδρασης του ετοποσιδίου στην τύχη απομονωμένων κυττάρων (Stacey et al., 2000; Montecucco and Biamonti, 2006). Σύμφωνα με αυτή την προσέγγιση, πιθανότατα, χρωμοσωμικά προβλήματα, που προκύπτουν κατά τη σύνθεση του DNA παρουσία ετοποσιδίου, είναι η κύρια αιτία έναρξης της απόπτωσης. Παραδόξως, όμως, το ετοποσίδιο μπορεί να ρυθμίσει και αρνητικά την απόπτωση μειορρυθμίζοντας την έκφραση διάφορων κασπασών και πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 (Wotawa et al., 2002; Montecucco and Biamonti, 2006).

Επιπλέον των αναγνωρισμένων επιδράσεων του ετοποσιδίου στην τοποισομεράση-II, το ετοποσίδιο μπορεί προκαλέσει τον κυτταρικό θάνατο και μέσω σχηματισμού ελευθέρων ριζών και οξειδωτικού στρες (Look and Musch, 1994; Wolge et al., 1994; Siitonen et al., 1999). Το ετοποσίδιο αποτελεί παράγωγο φαινολών και έχει προταθεί πως λειτουργεί είτε αντιοξειδωτικά (Stoyanovsky et al., 1993; Tyurina et al., 1995) ή οξειδωτικά μιας και οι φαινόξυ-ρίζες μεταβολίτες του (Stoyanovski et al., 1993) μπορεί να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες (Ritov et al., 1995) και παραγωγή ΔΜΟ (Gorman et al., 1997; Mans et al., 1992). Οι μεταβολίτες αυτοί, που μπορούν να αλληλεπιδρούν με τις κυτταρικές θειόλες, μπορεί να συμβάλλουν στην κύτταρο-τοξικότητα του ετοποσιδίου (Stoyanovski et al., 1993; Kagan et al., 1994).

Επί πρόσθετα, πολύ μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο συσχετισμός του ετοποσιδίου με τον NF-κΒ. Πολλές μελέτες έχουν δείξει πως η χορήγηση ετοποσιδίου σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων, ενεργοποιεί τον NF-κΒ (Morotti et al., 2006; Strozyk et al., 2006; Habraken and Piette, 2006; Janssens and Tschopp, 2006; Wu and Miyamoto, 2007), αλλά και σύμφωνα με τις μελέτες, κάτι τέτοιο έχει ως συνέπεια την αύξηση της ανθεκτικότητας

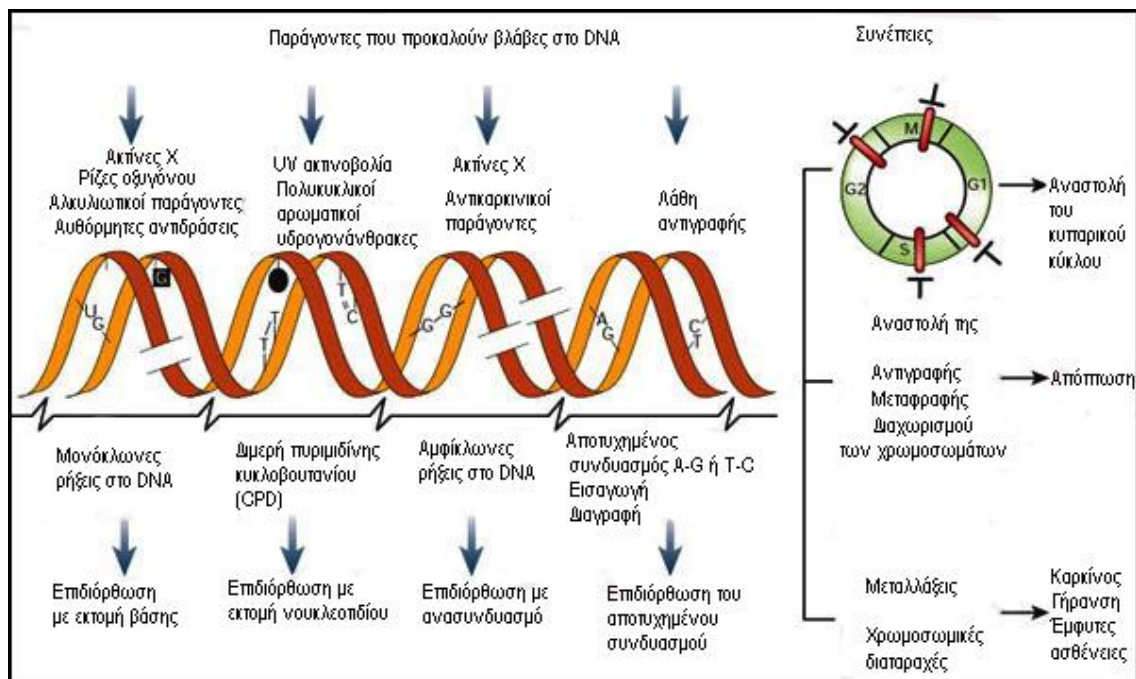
των κυττάρων έναντι στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Bottero et al., 2001; Lagadec et al., 2008) συμπεριλαμβανομένου του ετοποσιδίου (Habraken and Piette, 2006; Janssens and Tschopp, 2006; Wu and Miyamoto, 2007).

1.17 Πορείες απόκρισης σε βλάβες του DNA (DNA Damage Responses)

Η διατήρηση της ακεραιότητας και της πιστότητας του γονιδιώματος είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη φυσιολογική λειτουργία και την επιβίωση των οργανισμών. Ωστόσο, η διαφύλαξη του DNA είναι μια δύσκολη υπόθεση μιας και αυτό βρίσκεται συνεχώς κάτω από μια κατάσταση απειλής, ακόμα και στα φυσιολογικά κύτταρα. Οι βλάβες του DNA μπορεί να οφείλονται σε γονοτοξικούς εξωγενείς παράγοντες, όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία, και ενδογενείς παράγοντες, όπως οι ΔΜΟ, σε τυχαία λάθη κατά την αντιγραφή και τον ανασχηματισμό και στη βιοχημική αστάθεια του ίδιου του μορίου (Norbury and Zhivotovnsky, 2004; Hammond et al., 2007). Η αδυναμία επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της αντιγραφής και της μεταγραφής, τη μεταλλαξιγένεση και/ή την κυτταρική τοξικότητα. Στον άνθρωπο, οι βλάβες στο DNA εμπλέκονται σε διάφορες κληρονομικές ασθένειες, στην κυτταρική γήρανση και στην καρκινογένεση (Finkel and Holbrook, 2000; Ljungman, 2005).

Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει μια ποικιλόμορφη απόκριση για να αντιμετωπίσουν τις εν δυνάμει καταστροφικές συνέπειες των βλαβών του DNA και να προστατέψουν το γενετικό τους υλικό, έτσι ώστε αυτό να διατηρηθεί, να αντιγραφεί και να διαχωριστεί με πιστότητα. Μόλις το κύτταρο ανιχνεύσει βλάβες ή διακοπές στην αντιγραφή του DNA, ενεργοποιούνται οι πορείες ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και διακόπτουν την πρόοδο του, έτσι ώστε να του δοθεί χρόνος για να επιδιορθώσει αυτές τις βλάβες ή λάθη κατά την αντιγραφή προτού μεταβιβαστούν στα θυγατρικά κύτταρα. Επιπλέον, οι πορείες απόκρισης σε βλάβες στο DNA (DNA damage checkpoint responses) έχουν ως αποτέλεσμα την επαγωγή προγραμμάτων μεταγραφής, τη διέγερση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA, και όταν το επίπεδο των βλαβών είναι οξύ, την έναρξη της απόπτωσης (Zhou and Elledge, 2000; Kastan & Bartek, 2004; Harper and Elledge 2007). Οι πορείες αυτές είναι πορείες

μεταγωγής σήματος και συντελούνται από τριών ειδών πρωτεΐνες, τις αισθητήρες, τις μετατροπείς και τις τελεστές. Σε περίπτωση απουσίας ή ανεπάρκειας των αποκρίσεων σε βλάβες στο DNA το κύτταρο γίνεται πιο επιρρεπές στο νεοπλασματικό μετασχηματισμό (Norbury et al., 2004; Harper and Elledge, 2007).



Εικόνα 6: Βλάβες στο DNA, Απόκριση στις βλάβες του DNA, Συνέπειες των βλαβών του DNA (Hoeijmakers, 2001).

1.18 Έλεγχος του κυτταρικού κύκλου και αποκρίσεις σε βλάβες στο DNA

Οι κύριοι ρυθμιστές των πορειών των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου στις αποκρίσεις σε βλάβες στο DNA είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες ATM (ataxia telangiectasia, mutated) και ATR (ATM και Rad3-related), οι οποίες ανήκουν στη μοναδική οικογένεια των κινασών σερίνης/θρεονίνης, που χαρακτηρίζονται από μια καταλυτική περιοχή στο καρβόξυ-τελικό άκρο και περιέχουν μια υπο-περιοχή κινάσης φωσφο-ινοσιτόλης-3 (PI3 kinase) (Abraham, 2007; Bakkenist and Kastan, 2004; Kastan and Bartek 2004; Shiloh, 2006; Matsuoka et al., 2007). Παρότι οι ATM και ATR φαίνεται ότι φωσφορυλιώνουν πολλά από ίδια υποστρώματα (Matsuoka et al., 2007) γενικά αποκρίνονται σε διαφορετικές μορφές βλαβών στο DNA (Harper and Elledge, 2007). Η ATM είναι ο κύριος διαμεσολαβητής των αποκρίσεων σε αμφίκλωνες ρήξεις του DNA (DNA double strand breaks; DSBs), οι οποίες είναι το αποτέλεσμα της έκθεσης σε ιονίζουσα ακτινοβολία (IR). Αντίθετα, η ATR έχει υποστηρικτικό ρόλο στις DSBs, αλλά κατευθύνει την κύρια κυτταρική απόκριση σε βλάβες που είναι συνέπεια της έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) ή λαθών, που οδηγούν σε διακοπές κατά την αντιγραφή του DNA (Kastan and Bartek, 2004; Ljungman, 2005; Lukas et al, 2006; Harper and Elledge, 2007).

Η ενεργοποίηση της ATM είναι άμεση απόκριση των κυττάρων που εκτίθενται σε γονοτοξικούς παράγοντες και είναι μέγιστη μέσα σε λίγα λεπτά μετά την έκθεση, ακόμα και σε χαμηλές δόσεις IR, ενώ η ενεργοποίησή της ανιχνεύεται μέσω της αυτο-φωσφορυλίωσής της στη θέση σερίνη1981 (Bakkenist and Kastan, 2003). Περίπου 18 DSBs απαιτούνται για την ενεργοποίηση πάνω του 50% των μορίων της ATM σε χρονικό διάστημα μικρότερο των πέντε λεπτών, μετά την έκθεση σε IR, κάτι που δείχνει ότι η ATM δε χρειάζεται να προσδεθεί στις DSBs για να ενεργοποιηθεί. Μάλιστα, μελέτες έδειξαν ότι η αυτο-φωσφορυλίωση της ATM μπορεί να υφίσταται λόγω των μεταβολών στην υψηλή οργάνωση της χρωματίνης που προκαλούνται από τις DSBs. Ο συνδετικός κρίκος ανάμεσα στις DSBs και την ATM, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, είναι το σύμπλοκο MRN (Mre11/Rad50/NBS1). Το MRN δρα ως αισθητήρας των DSBs, ανεξάρτητα από την ATM, ωστόσο, είναι ένας ουσιαστικός διαμεσολαβητής της

στρατολόγησης και ενεργοποίησης της τελευταίας, διευκολύνοντας την να φωσφορυλιώσει υποστρώματα στις θέσεις των DSBs, ενώ σε μικρότερο βαθμό επηρεάζει την αρχική ενεργοποίησή της (Lee and Paull, 2004; Bakkenist and Kastan, 2004; Abraham and Tibbets, 2005; Paull and Lee, 2005). Τα ενεργοποιημένα μόρια της ATM είτε παραμένουν στις θέσεις των DSBs, όπου φωσφορυλιώνουν υποστρώματα με τα οποία συνεντοπίζονται, όπως η οικογένεια των πρωτεϊνών BRCT, Chk2 (checkpoint homologue kinase 2) και SMC1 (structural maintenance of chromosomes 1) ή διαχέονται από αυτές τις θέσεις για να φωσφορυλιώσουν πυρηνικά υποστρώματα, όπως η p53 και η CREB (cAMP response element binding protein). Η οικογένεια των πρωτεϊνών BRCT (BRCA1, carboxy-terminal repeat family of proteins) αποτελείται από τις πρωτεΐνες BRCA1, 53BP1 και MDC1. Οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση του γονιδιώματος και ειδικότερα οι 53BP1 και MDC1 λειτουργούν ως προσαρμοστικές πρωτεΐνες διευκολύνοντας τη στρατολόγηση υποστρωμάτων της ATM αλλά και τον κατάλληλο εντοπισμό της (Bakkenist and Kastan, 2004; Abraham and Tibbets, 2005; Lou et al., 2006). Τα ενεργά μόρια της ATM στις θέσεις των DSBs φωσφορυλιώνουν, επίσης, την ιστόνη H2AX και η φώσφο-μορφή της η γ-H2AX, απαντάται στις εστίες των DSBs και εντοπίζεται μαζί με το σύμπλοκο MRN και την ενεργό ATM (Harper and Elledge, 2007; Clingen et al., 2008; Ayoub et al., 2009). Αυτή η πορεία της ATM ενεργοποιεί τις πορείες των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.

1.19 Κυτταρικός κύκλος και σημεία ελέγχου

Ο κυτταρικός κύκλος ή ο κύκλος της κυτταρικής διαίρεσης (CDC) είναι μια σειρά σταδίων ενός ευκαρυωτικού κυττάρου μεταξύ μιας κυτταρικής διαίρεσης και της επόμενης. Επομένως, είναι η διαδικασία με την οποία ένα γονιμοποιημένο ωάριο αναπτύσσεται σε έναν ώριμο οργανισμό και η διαδικασία με την οποία αναπαράγονται τα κύτταρα και οι ιστοί. Μια εξειδικευμένη μορφή κυτταρικής διαίρεσης είναι επίσης υπεύθυνη για την κυτταρική διαφοροποίηση κατά την εμβρυογένεση και τη μορφογένεση, καθώς επίσης και για τη διατήρηση των βλαστικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της ζωής. Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από τέσσερις χαρακτηριστικές φάσεις:

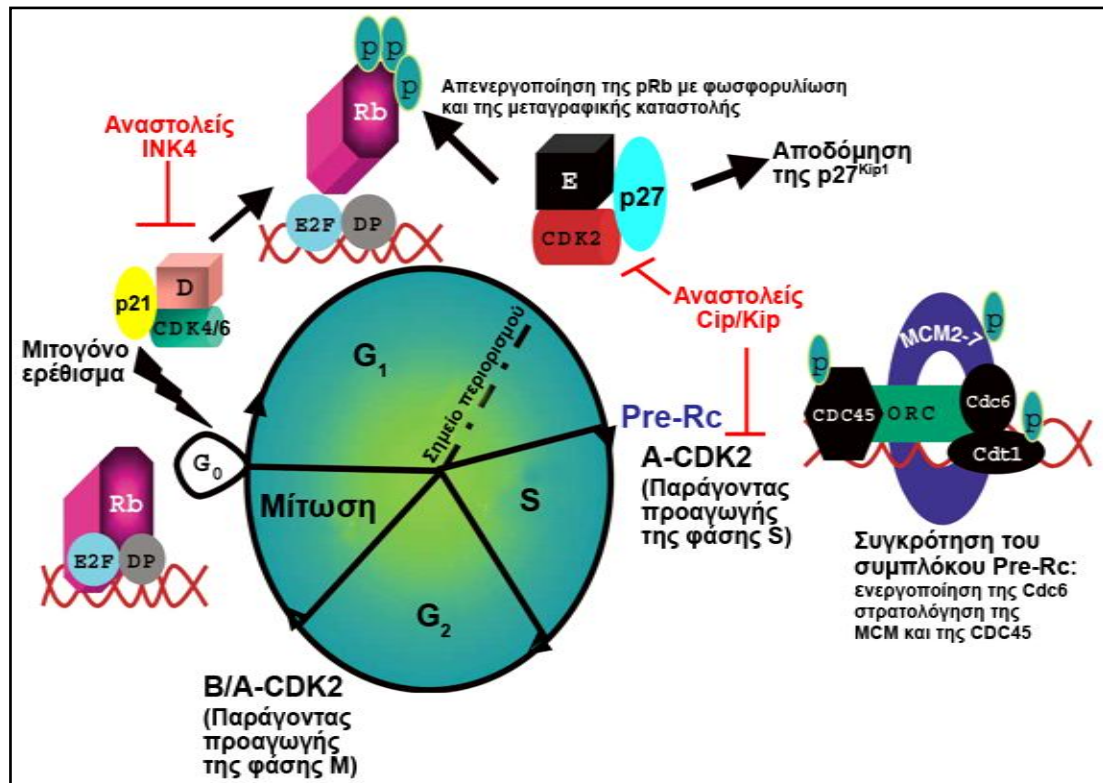
τη φάση G₁, S, G₂ (που συνολικά απαρτίζουν τη μεσόφαση) και τη φάση M. Η φάση M αποτελείται από δύο συζευγμένες διαδικασίες: τη *μίτωση*, κατά την οποία διαιρούνται τα χρωμοσώματα μεταξύ δύο θυγατρικών κυττάρων, και η *κυττοκινησία* (ή *κυτταροκινησία*), κατά την οποία διαιρείται το κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Τα μοριακά στάδια που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο είναι οργανωμένα σε μια κατεύθυνση, που σημαίνει ότι διεξάγονται διαδοχικά και είναι αδύνατον να αντιστραφεί ο κύκλος. Υπάρχουν δύο σημαντικές κατηγορίες ρυθμιστικών μορίων που καθορίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου: Οι *κυκλίνες* (τύπου D, E, A και B) και οι *κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες* (*Cyclin-Dependent Kinases*; CDKs) (CDK2, CDK4 και CDK6). Οι Leland H. Hartwell, R. Timothy Hunt και Paul N. Nurse τιμήθηκαν με το Βραβείο Nobel στη Φυσιολογία ή Ιατρική για την ανακάλυψη αυτών των κεντρικών μορίων που είναι από τα σημαντικότερα μόρια στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου διαμέσου της φάσης G₁ και της έναρξης της σύνθεσης του DNA (φάση S) διεγείρεται από μιτογόνα ερεθίσματα και ελέγχεται συνεργιακά από τη δράση διαφόρων CDKs, των οποίων οι λειτουργίες περιορίζονται στη συνέχεια από αναστολείς, τις CKIs (*Cyclin-dependent Kinase Inhibitors*). Οι CKIs που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου ανήκουν, με βάση τη δομή και τα υποστρώματα-στόχους τους, σε δύο οικογένειες. Η πρώτη οικογένεια περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες INK4 (αναστολείς της CDK4), που αναστέλλουν τη δράση των καταλυτικών υπομονάδων των CDK4 και CDK6. Υπάρχουν τέσσερις τέτοιες πρωτεΐνες p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} και p19^{INK4D}. Σε αντίθεση οι πρωτεϊνικοί αναστολείς της οικογένειας Cip/Kip, εμφανίζουν μια ευρύτερου φάσματος δράσης από ότι οι αναστολείς INK4, και επηρεάζουν την ενεργότητα των κινασών των κυκλινών D, E και A. Η οικογένεια των Cip/Kip περιλαμβάνει τους αναστολείς p21^{Cip1/Waf1}, p27^{Kip1} και p57^{Kip2}, οι οποίοι δεσμεύονται τόσο στις κυκλίνες όσο και στις υπομονάδες των CDKs. Οι CKIs της οικογένειας Cip/Kip αναστέλλουν της κινάση CDK2 των κυκλινών E και A, και δρουν ως θετικοί ρυθμιστές των κινασών των κυκλινών D.

Ο κυτταρικός κύκλος διαθέτει ένα σύστημα επιτήρησης, το οποίο ελέγχει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και την παρεμποδίζει ή τη διακόπτει αν ανιχνεύσει εκτεταμένες βλάβες στο DNA ή αν ανιχνεύσει ελαττώματα στην αντιγραφή του DNA, στη σύνδεση ενός χρωμοσώματος στη μιτωτική άτρακτο.

Το σύστημα επιτήρησης διασφαλίζει την ποιότητα του κυτταρικού κύκλου και απαρτίζεται από τέσσερα σημεία ελέγχου. Αυτά τα σημεία ελέγχου διασφαλίζουν την κυτταρική διαίρεση μόνον αν έχουν ολοκληρωθεί οι προ-απαιτούμενες μοριακές μεταβολές για το σχηματισμό δύο βιώσιμων θυγατρικών κυττάρων. Η μετάβαση από ένα σημείο ελέγχου διασφαλίζει ότι το κύτταρο μπορεί να διέλθει από τη μια φάση του κυτταρικού κύκλου στην επόμενη.

Υπάρχουν τέσσερα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Το πρώτο εντοπίζεται κοντά στο τέλος της φάσης G_1 και ονομάζεται *σημείο περιορισμού* ή *σημείο-R* (Restriction point; R-point) ή σημείο ελέγχου της G_1 . Το σημείο-R ελέγχει τη μετάβαση G_1 -S και καθορίζει αν ένα κύτταρο θα πρέπει να διαιρεθεί, να καθυστερήσει η κυτταρική διαίρεση του ή να εισέλθει στη φάση ηρεμίας, G_0 . Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, κύτταρα διακόπτουν τον κυτταρικό τους κύκλο στο σημείο-R και συνήθως εισέρχονται στη φάση G_0 . Ένα δεύτερο σημείο ελέγχου εντοπίζεται στο τέλος της φάσης G_2 , το σημείο ελέγχου της G_2 και διεγείρει την έναρξη της μίτωσης. Δύο ακόμη σημεία ελέγχου εντοπίζονται στη μιτωτική φάση (φάση M): το σημείο ελέγχου της ατράκτου, το οποίο ελέγχει τη μετάβαση από τη μετάφαση στην ανάφαση επιτηρώντας τη σύνδεση της ατράκτου στα χρωμοσώματα, και το *σημείο* ελέγχου διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων που επιτηρεί τη μετάβαση από την ανάφαση στην τελόφαση, όπου αποδομούνται οι μιτωτικές κυκλίνες και διασφαλίζει την ορθή μετακίνηση των χρωμοσωμάτων στους πόλους της μιτωτικής ατράκτου. Σε περίπτωση ανίχνευσης ελαττώματος, αυτά τα σημεία ελέγχου της φάσης M διακόπτουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου πριν την έναρξη της κυττοκινησίας.

Το πλήρες σύστημα επιτήρησης του κυτταρικού κύκλου διαθέτει, επίσης και σημεία ελέγχου βλαβών στο DNA, τα οποία ανιχνεύουν μη-επιδιορθωμένες βλάβες στο DNA, αλλά και την επιτυχή αντιγραφή του DNA. Υπάρχουν τέσσερα σημεία ελέγχου βλαβών στο DNA τα οποία ρυθμίζονται κυρίως από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53: ένα στη φάση G_1 , ένα κατά την είσοδο στη φάση S, ένα κοντά στο τέλος της φάσης S, και ένα στην είσοδο της φάσης M, το οποίο διασφαλίζει την επιτυχή και ολοκληρωμένη αντιγραφή του DNA.



Εικόνα 7: Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Μιτογόνα ερεθίσματα προάγουν τη συγκρότηση ενός ενεργού τριμερούς συμπλόκου κυκλίνης D-CDK4 (ή CDK6)-Cip/Kip. Η δέσμευση της p21^{Cip1/Waf1} ή p27^{Kip1} αφήνει ελεύθερο το ετεροδιμερές κυκλίνης E-CDK2. Τα σύμπλοκα της κυκλίνης D-CDK4/6 και της κυκλίνης E-CDK2 συμβάλλουν στη φωσφορυλίωση της pRb μειώνοντας την ικανότητα της να καταστείλει τα μέλη της οικογένειας του μεταγραφικού παράγοντα E2F τα οποία ενεργοποιούν γονίδια που απαιτούνται για τη μετάβαση στη φάση S. Μεταξύ των γονιδίων-στόχων των E2F είναι οι κυκλίνες E και A, οι οποίες προσδένουν και ενεργοποιούν τη CDK2 διευκολύνοντας την είσοδο και την πρόοδο στη φάση S. Η ενεργότητα της κυκλίνης E-CDK2 είναι υψηλή κατά τη μετάβαση G₁-S, μετά την οποία η κυκλίνη E αποδομείται και αντικαθίσταται από την κυκλίνη A. Επίσης η υψηλή ενεργότητα της κυκλίνης E-CDK2 ενεργοποιεί τη θέση έναρξης της αντιγραφής του DNA, με τη δέσμευση στη θέση αυτή του συμπλόκου *προ-αντιγραφής του DNA*, Pre-Rc, που αποτελείται από διάφορες πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων το σύμπλοκο αναγνώρισης της θέσης έναρξης της αντιγραφής του DNA, orc, οι παράγοντες αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA, CDC6 και Cdt1, η MCM2-7 και η CDC45. Η δράση των συμπλόκων κυκλινών D-CDK4/6 αναστέλλεται από τις πρωτεΐνες INK4, ενώ των κυκλινών E- ή A-CDK2 από τις πρωτεΐνες Cip/Kip.

1.20 Σημεία ελέγχου βλαβών στο DNA

(A) Σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1

Στη φάση G1 και μετά την επαγωγή βλαβών στο DNA, επάγεται η ATM, η οποία ενεργοποιεί την καθοδική κινάση Chk2 φωσφορυλιώνοντας την στη θέση θρεονίνη68 και η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει το κατάλοιπο σερίνης20 της p53. Η φωσφορυλίωση της p53 στη θέση σερίνη20 παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση της με την MDM2 (mouse double minute 2, human homolog of p53-binding protein), η οποία είναι αρνητικός ρυθμιστής της p53, έχοντας ως συνέπεια τη συνάθροιση της p53. Η ATM ασκεί και δεύτερο έλεγχο στη σταθερότητα της p53 φωσφορυλιώνοντας την MDM2 στη σερίνη395, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η αλληλεπίδραση p53 και MDM2, αλλά να παρεμποδίζεται η εξαγωγή της p53 από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου φυσιολογικά αποδομείται. Ο ρόλος της ATR στη φωσφορυλίωση της p53 δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, αλλά μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι η p53 φωσφορυλιώνεται στη θέση σερίνη20 από την ATR-εξαρτώμενη κινάση Chk1.

Ανάλογα με το ερέθισμα της απόκρισης οι ATM και ATR φωσφορυλιώνουν την p53 και στο κατάλοιπο σερίνης15, κάτι που είναι κρίσιμο για την επαύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας της p53. Η ενεργοποιημένη p53 ρυθμίζει αυξητικά την έκφραση διαφόρων γονιδίων-στόχων της, πολλά από τα οποία εμπλέκονται στις αποκρίσεις σε βλάβες στο DNA (MDM2, GADD45a και p21^{Cip1/Waf1}). Η συνάθροιση της p21^{Cip1/Waf1}, ενός αναστολέα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών, καταστέλλει την ενεργότητα του συμπλόκου της κυκλίνης E/Cdk2 και οδηγεί στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 (Zhou and Elledge, 2000; Kastan and Bartek, 2004; Ljungman, 2005; Bartkova et al., 2005; Bartkova et al., 2006; Lukas et al., 2006; Bartek and Lukas, 2007; Harper and Elledge, 2007).

(B) Σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου στη φάση S

Το σημείο ελέγχου της φάσης S ανιχνεύει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και μειώνει το ρυθμό σύνθεσης του DNA μετά την επαγωγή βλαβών σε αυτό. Σύμφωνα με μελέτες, κύτταρα από άτομα, που πάσχουν από τα σύνδρομα ataxia telangiectasia (AT) ή Nijmegen breakage (NBS), έχουν χάσει την ικανότητα να μειορρυθμίζουν το ρυθμό σύνθεσης του DNA μετά την έκθεση τους σε IR, ένα φαινόμενο γνωστό ως ράδιο-ανθεκτική σύνθεση (radio-resistant synthesis; RDS). Επίσης, μελέτες έχουν δείξει πως οι βλάβες από IR ενεργοποιούν την πορεία του σημείου ελέγχου της φάσης S, διαμέσου, τουλάχιστον, δυο κλάδων, που ρυθμίζονται από την ATM (Kastan and Bartek, 2004; Ljungman, 2005; Andreassen et al., 2006; Zhou et al., 2006; Ben-Yehoyada et al., 2007; Harper and Elledge, 2007).

Στον πρώτο κλάδο, οι βλάβες στο DNA, που προκαλούνται από IR, επάγουν την ενεργοποίηση της κινάσης Chk2 μέσω φωσφορυλίωσης στη θέση θρεονίνη68 από την ATM. Η ενεργοποιημένη Chk2 φωσφορυλιώνει τη φωσφατάση Cdc25A στη θέση σερίνη123, αποσταθεροποιώντας την και παρεμποδίζοντάς την, να αποτρέψει ανασταλτικές φωσφορυλιώσεις από την CDK2. Τα σύμπλοκα των CDK2/κυκλίνηςE και CDK2/κυκλίνηςA παραμένον ανενεργά με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η ολοκλήρωση της σύνθεσης του DNA.

Στο δεύτερο κλάδο απαιτείται η ενεργότητα των ATM και NBS1. Μετά την επαγωγή βλαβών στο DNA από την IR, η ATM φωσφορυλιώνει έναν αριθμό καθοδικών υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων της πρωτεΐνης NBS1, του προϊόντος του γονιδίου ευαισθησίας στον καρκίνο μαστού-1 BRCA-1 (breast cancer susceptibility gene-1) και της πρωτεΐνης διατήρησης της δομής του χρωμοσώματος-1, SMC1. Η απώλεια οποιασδήποτε από αυτές τις πρωτεΐνες ή η μετάλλαξη των θέσεων φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών οδηγεί σε μειωμένη ενεργοποίηση της πορείας του σημείου ελέγχου της φάσης S. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες ATM, NBS1 και BRCA1 αποτελούν μέρη ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου γνωστού ως BASC (BRCA1-associated genome surveillance complex) ή σύμπλοκο BRCA1-συναφές με την επιτήρηση του γονιδιώματος, το οποίο περιέχει έναν αριθμό παραγόντων επιδιόρθωσης και αντιγραφής του DNA. Είναι πιθανό, σύμφωνα με όσα έχουν δείξει οι μελέτες,

πως ο σχηματισμός του συμπλόκου αυτού είναι απαραίτητος, ώστε η ATM να μπορέσει να φωσφορυλιώσει την SMC1. (Lukas et al., 2006; Bartek and Lukas, 2007).

Η εμπλοκή της ATR στην πορεία του σημείου ελέγχου της φάσης S δεν έχει αποσαφηνιστεί με ακρίβεια. Η ATR εμπλέκεται στη βραδεία IR-επαγόμενη ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου της φάσης S, διαμέσου της φωσφορυλίωσης της κινάσης τελεστή Chk1, η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει τη Cdc25A και την καθιστά στόχο αποδόμησης από το πρωτεόσωμα. Επίσης, η απόκριση της ATR σε βλάβες που προκαλούνται από έκθεση σε UV και σε διακοπές της αντιγραφής δείχνουν, χωρίς να έχουν επιβεβαιωθεί πειραματικά, ότι η ATR είναι πιθανώς υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση της SMC1 κάτω από αυτές τις συνθήκες (Buchmann et al., 2004; Ljungman et al., 2005; Harper and Elledge, 2007).

(Γ) Σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2

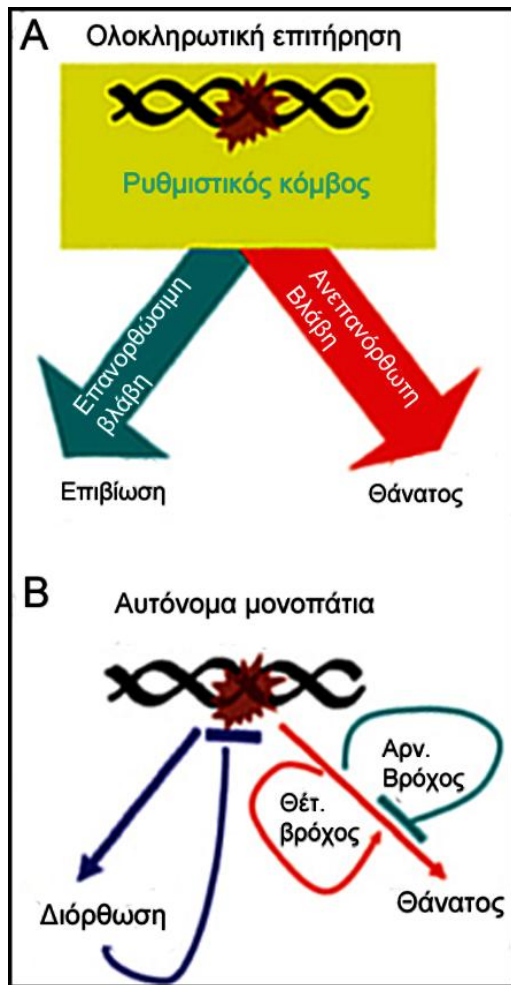
Η πορεία του σημείου ελέγχου της φάσης G2 επιτρέπει την αναστολή του κυτταρικού κύκλου πριν το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Η είσοδος στη μίτωση ρυθμίζεται από την ανασταλτική φωσφορυλίωση της κύκλινο-εξαρτώμενης κινάσης Cdc2/Cdk1, της οποίας η αποφωσφορυλίωση είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της πορείας του σημείου ελέγχου της G2. Οι ATM και ATR ελέγχουν έμμεσα την ενεργοποίηση ή μη της Cdc2, ενώ, σε αντίθεση με τα άλλα σημεία ελέγχου, η ATR είναι αυτή που αποτελεί την κύρια απόκριση, ανεξαρτήτως του είδους της βλάβης του DNA. Η αποφωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της Cdc2 καταλύεται από τη φωσφατάση Cdc25, της οποίας η ενεργοποίηση ελέγχεται από τις Chk1 και Chk2 ως απόκριση σε βλάβες στο DNA και αναλόγως ο κυτταρικός κύκλος είτε διακόπτεται στη φάση G2 ή συνεχίζει (Zhou and Elledge, 2000; Kastan and Bartek, 2004; Harper and Elledge, 2007).

1.21 Βλάβες στο DNA και απόπτωση

Η απόπτωση ως απόκριση στις βλάβες του DNA είτε εξαρτώμενη από κασπάσες μέσω ενεργοποίησής τους από την p53 ή ανεξάρτητη από κασπάσες μέσω κυρίως του παράγοντα AIF, είναι απλώς άλλο ένα βιολογικό αποτέλεσμα, που μπορεί να προκύψει από την κυτταρική έκθεση σε γονοτοξικούς παράγοντες. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι βιολογικές αποκρίσεις σε βλάβες του DNA ρυθμίζονται με τέτοιον τρόπο, ώστε να ανασταλεί ο κυτταρικός κύκλος και να επιδιορθωθεί το DNA. Η επιτυχής εκτέλεση των μονοπατιών αυτών προστατεύει το κύτταρο, που έχει υποστεί βλάβες και του δίνει τη δυνατότητα να ανακάμψει και να συνεχίσει να πολλαπλασιάζεται. Η απόπτωση ως απόκριση σε βλάβες στο DNA είναι μια καθυστερημένη απόκριση, η οποία έχει ως συνέπεια την καταστροφή του κυττάρου. Οι κυτταρικές αποκρίσεις σε βλάβες του DNA είτε προστατευτικές ή καταστρεπτικές, είναι καθοδικές ενός κοινού μεταβιβαστικού δικτύου σηματοδότησης (Blank and Shiloh, 2007; Roos and Kaina, 2006; Hurley and Bunz, 2007; Borges et al., 2008). Παρότι οι περισσότερες πρωτεΐνες αυτού του σηματοδοτικού δικτύου έχουν ταυτοποιηθεί, η σύγχρονη γνώση δεν εξηγεί πότε και γιατί ένα κύτταρο, που έχει υποστεί βλάβες στο DNA θα επιλέξει την πορεία του κυτταρικού θανάτου.

Πρόσφατα, προτάθηκαν δύο νέα μοντέλα για την κατανόηση του συντονισμού μεταξύ επιδιόρθωσης του DNA, αναστολής του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης, ως αποκρίσεις σε βλάβες στο DNA. Το πρώτο μοντέλο, το οποίο ορίζεται ως «ολοκληρωτική επιτήρηση», προτείνει, πως το σηματοδοτικό δίκτυο βλαβών στο DNA λειτουργεί ως ένας ρυθμιστικός κόμβος, που επιτηρεί την ακεραιότητα του DNA και ελέγχει την απόφαση μεταξύ αναστολής του κυτταρικού κύκλου και κυτταρικού θανάτου. Το μοντέλο αυτό στηρίζει ουσιαστικά τη θεωρία, πως τα κύτταρα πεθαίνουν όταν οι βλάβες είναι μη αναστρέψιμες, ωστόσο, δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα άμεσες αποδείξεις κάποιας ανεπανόρθωτης βλάβης στο DNA, ούτε και κάποιος γνωστός βιοχημικός μηχανισμός του σηματοδοτικού δικτύου βλαβών στο DNA, που να διαχωρίζει μεταξύ επανορθώσιμων και ανεπανόρθωτων βλαβών.

Στο δεύτερο μοντέλο, το οποίο ονομάζεται «*αυτόνομες πορείες*», αντίθετα με το πρώτο, προτείνεται πως οι σηματοδοτικές πορείες θανάτου έχουν σχεδιαστεί με έναν ενδογενή μηχανισμό καθυστέρησης. Η σηματοδότηση βλαβών στο DNA ενεργοποιεί την επιδιόρθωση του DNA και τον κυτταρικό θάνατο ταυτόχρονα και αυτόματα, κάτι που είναι συμβατό με τις υπάρχοντες μελέτες (Blank and Shiloh, 2007; Roos and Kaina, 2006; Ben-Porath and Weinberg, 2005; Hurley and Bunz, 2007). Η βραδεία εκδήλωση του κυτταρικού θανάτου μπορεί να οφείλεται, στην απαίτηση για την έκφραση νέων γονιδίων, στη συσσώρευση μεταγράφων RNA και τη μετάφραση τους, η οποία απαιτεί χρόνο, και σε ενσωματωμένους βρόχους ανάδρασης στις πορείες απόκρισης θανάτου, τέτοιους που ο θάνατος να μπορεί να προκύψει μόνον όταν η αρνητική ανάδραση υποσκελισθεί από αντίστοιχους θετικούς βρόχους προωθητικής δράσης, ώστε τα σήματα θανάτου να ξεπεράσουν την ουδό των ήδη υπάρχοντων σημάτων επιβίωσης. Στο μοντέλο αυτό η συνεχής και επαναλαμβανόμενη ενεργοποίηση των σηματοδοτικών πορειών θανάτου, ως απόκριση στη συνεχή πρόκληση βλαβών στο DNA, είναι απαραίτητη είτε για να διεγείρει τους θετικούς βρόχους προωθητικής δράσης ή για να αμβλύνει τους αρνητικούς βρόχους ανάδρασης και για το λόγο αυτό ο κυτταρικός θάνατος αποτελεί μια καθυστερημένη απόκριση εξαρτώμενη από το μέγεθος βλαβών στο DNA (Borges et al., 2008).



Εικόνα 5: Μοντέλα συντονισμού μεταξύ επιδιόρθωσης του DNA και του κυτταρικού θανάτου.

(A) Το μοντέλο της ολοκληρωτικής επιτήρησης: Το δίκτυο σηματοδότησης των βλαβών στο DNA δρα ως ένας ρυθμιστικός κόμβος που παίρνει υπολογισμένες αποφάσεις, βασισμένες στο επίπεδο της επιδιόρθωσης του DNA και το είδος της βλάβης του, ώστε να επιλέξει ανάμεσα στη ζωή και το θάνατο.

(B) Το μοντέλο των αυτόνομων μονοπατιών: Οι βλάβες στο DNA ενεργοποιούν τις πορείες επιδιόρθωσης του DNA και του κυτταρικού θανάτου ανεξάρτητα και αυτόματα. Η πορεία επιδιόρθωσης ξεχωρίζει τη σηματοδότηση της βλάβης. Οι πορείες θανάτου περιλαμβάνουν ενδογενείς αρνητικούς βρόχους ανάδρασης και θετικούς βρόχους προωθητικής δράσης (Borges et al., 2008).

1.22 Ο ρόλος του NF-κΒ στις αποκρίσεις σε βλάβες στο DNA

Η πρώτη σύνδεση του NF-κΒ με τις αποκρίσεις σε βλάβες του DNA έγινε το 1995, όταν και κλωνοποιήθηκε το γονίδιο της ATM. Οι πρώτες μελέτες ήταν διφορούμενες, με τις πρωταρχικές να υποστηρίζουν πως η ATM δεν ήταν απαραίτητη για την επαγόμενη από IR ενεργοποίηση του NF-κΒ (Jung et al., 1995; Savitsky et al., 1995; Jung and Dritschilo, 1996). Ωστόσο, επόμενες μελέτες, τόσο σε κυτταρικά συστήματα όσο και σε οργανισμούς, κατέδειξαν πως η παρουσία της ATM είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του NF-κΒ από IR αλλά και πως η ενεργοποίηση του NF-κΒ εξαρτάται, τουλάχιστον *in vivo*, από τον κυτταρικό τύπο και είναι δόσο-εξαρτώμενη (Lee et al., 1998; Chan et al., 1998; Zhou et al., 1999; Raju et al., 2000; Li et al., 2001; Huang et al., 2003; Wang et al., 2004; Wu et al., 2006; Wu and Miyamoto, 2007; Brzóska and Szumiel, 2009). Το κατά πόσο η διαφορετική ευαισθησία των ιστών στην ενεργοποίηση του NF-κΒ από IR προέρχεται από τη διαφορετική απαίτηση των ιστών σε ATM είναι άγνωστο.

Η πορεία ενεργοποίησης του NF-κΒ ως απόκριση σε βλάβες στο DNA είναι πολύ πολύπλοκη και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το είδος και την ποσότητα του παράγοντα που προκαλεί βλάβες στο DNA, το είδος των βλαβών στο DNA και το κυτταρικό σύστημα ή τον ιστό που επάγονται αυτές οι βλάβες (Wu and Miyamoto, 2007). Παρόλα αυτά, υπάρχουν πλέον στοιχεία πως η ενεργοποίηση του NF-κΒ, εξαιτίας διαφόρων παραγόντων, που προκαλούν αμφίκλωνες ρήξεις στο DNA (DBS; double strand breaks), γίνεται μέσω μιας συγκεκριμένης πορείας, η οποία απαιτεί τη σύγκλιση της επαγόμενης από βλάβες στο DNA ενεργοποίησης της ATM, με μια παράλληλη πορεία επαγόμενη από στρες, που προκαλεί την τροποποίηση της NEMO από την πρωτεΐνη SUMO-1 (small ubiquitin-like modifier-1), ώστε να επιτραπεί η ενεργοποίηση του NF-κΒ (Janssens and Tschopp, 2006; Habraken and Piette, 2006; Sebban et al., 2006; Wu and Miyamoto 2007; Salminen et al., 2008; Brzóska and Szumiel, 2009).

Η μετατροπή της NEMO από την SUMO-1, η οποία είναι μια πρωτεΐνη που βρίσκεται συνήθως στο κυτταρόπλασμα ως μέλος ενός συμπλόκου με τις IKKα και IKKβ, είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του NF-κΒ από βλάβες στο DNA. Ωστόσο, η SUMO-1 στοχεύει την πυρηνική NEMO, ενώ η

πρόσδεση της NEMO με την IKKβ αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα της τροποποίησής της (Huang et al., 2003; Wu and Miyamoto, 2007; Mabb and Miyamoto, 2007). Για να επιτευχθεί η τροποποίηση της NEMO απαιτούνται και δυο άλλες πρωτεΐνες η PIDD (p53-induced protein with a death domain) και η RIP1 (receptor interacting protein 1), οι οποίες ενεργοποιούνται από την πρόκληση βλαβών στο DNA και μέσω ενός άγνωστου σήματος μετατοπίζονται στον πυρήνα (Janssens and Tschopp, 2006; Brzóska and Szumiel, 2009). Οι δυο αυτές πρωτεΐνες σχηματίζουν ένα σύμπλοκο με την πυρηνική NEMO και είτε προωθούν την επεξεργασία της από τη SUMO-1 ή προστατεύουν την ήδη επεξεργασμένη NEMO (Hur et al., 2003; Janssens et al., 2005; Wu and Miyamoto, 2007; Mabb and Miyamoto, 2007).

Παρά το ότι η επαγόμενη από βλάβες στο DNA ενεργοποίηση της ATM είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του NF-κΒ, η τροποποίηση της NEMO από τη SUMO-1 δεν προϋποθέτει την ενεργοποίηση της ATM (Huang et al., 2003; Mabb et al., 2006; Wu and Miyamoto, 2007). Αυτό συμβαίνει, γιατί η ATM δρά καθοδικά της τροποποίησης της NEMO από την SUMO-1, για την ακρίβεια η ενεργοποιημένη ATM σχηματίζει ένα σύμπλοκο με την NEMO και τη φωσφορυλιώνει στο κατάλοιπο σερίνης85 (Wu and Miyamoto, 2007; Mabb and Miyamoto, 2007). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν, πως η NEMO, εκτός από την τροποποίηση που δέχεται από τη SUMO-1, τροποποιείται και μέσω ουβικιτίνωσης, μια διαδικασία που προϋποθέτει την ύπαρξη της ATM (Huang et al., 2003) και γίνεται αφού φωσφορυλιωθεί στο κατάλοιπο σερίνης85. Επιπλέον, μελέτες έδειξαν πως η ATM είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του NF-κΒ και για έναν άλλο λόγο. Ύστερα από τη διέγερση των κυττάρων με ετοποσίδιο/VP16, η ATM εντοπίστηκε να σχηματίζει ένα κυτταροπλασματικό συσσωμάτωμα με το σύμπλοκο των IKK, το οποίο είναι απαραίτητο για τη φωσφορυλίωση της IκΒα στα κατάλοιπα σερίνης32 και 36 και άρα για την ενεργοποίηση του NF-κΒ (Jung et al., 1997; Lee et al., 1998; Wu et al., 2006; Wu and Miyamoto, 2007).

1.23 Ο Ρόλος του NF-κΒ στον καρκίνο και ως θεραπευτικός στόχος

Ο NF-κΒ έχει εμπλακεί στην καρκινογένεση, εξαιτίας της σημασίας που έχει η λειτουργία του στην κυτταρική επιβίωση, την κυτταρική προσκόλληση, τη φλεγμονή, τη διαφοροποίηση και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Shishodia and Aggarwal, 2002; Karin and Greten, 2005; Basseres and Baldwin, 2006; Courtois and Gilmore, 2006; Pacifico & Leonardi, 2006; Chariot, 2009).

Πολλά σημαντικά γονίδια για την προώθηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ρυθμίζονται από τον NF-κΒ. Σε αυτά περιλαμβάνονται, αυξητικοί παράγοντες, όπως οι TNF-α, IL-1β και IL-6 (ιντερλευκίνη-6) (Ahn and Aggarwal, 2005), αλλά και πρωτεΐνες, που ρυθμίζουν την προώθηση του κυτταρικού κύκλου, όπως η κυκλίνη D1, που είναι απαραίτητη για να προχωρήσει ο κυτταρικός κύκλος από την G1 στην S φάση (Guttridge et al., 1999; Hinz et al., 1999; Joyce et al., 1999; Eto, 2000; Westerheide et al., 2001; Mukhopadhyay et al., 2002; Albanese et al., 2003; Kwak et al., 2005; Ouyang et al., 2005; Tu et al., 2006; Klein et al., 2007; Sethi et al., 2008; Toualbi-Abed et al., 2008) και η p21^{Cip1/Waf1} (Javelaud et al., 2000; Basile et al., 2003; Poole et al., 2004; Savickiene et al., 2005; Wuerzberger-Davis et al., 2005; Chang and Miyamoto, 2006) που δρα ως θετικός ή αρνητικός ρυθμιστής της προόδου του κυτταρικού κύκλου.

Επίσης, η ενεργοποίηση του NF-κΒ προωθεί την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων που ελέγχουν την κυτταρική απόπτωση (Kucharczak et al., 2003; Luo et al., 2005).

Ακόμα, ο NF-κΒ προωθεί τη διείσδυση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Basseres and Baldwin, 2006; Aggarwal et al., 2006; Naugler and Karin, 2008). Έχει παρατηρηθεί πως διάφορες πρωτεάσες, που επηρεάζουν τη διεισδυτικότητα των όγκων, όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες του matrix και η πρωτεάση σερίνης uPA (urokinase type plasminogen activator) ρυθμίζονται από τον NF-κΒ (Sethi et al., 2008). Επιπλέον, ο NF-κΒ εμπλέκεται στη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Η μετάσταση του καρκίνου απαιτεί τη μετανάστευση καρκινικών κυττάρων μέσα και έξω από τα τοιχώματα των αγγείων, που τα μεταφέρουν σε άλλα μέρη του σώματος. Η ικανότητά τους να διεισδύουν μέσα από τα τοιχώματα των αγγείων καθορίζεται από συγκεκριμένα μόρια, που εκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των

αιμοφόρων αγγείων, ως απόκριση σε έναν αριθμό σηματοδοτικών πορειών από φλεγμονικά και καρκινικά κύτταρα. Τέτοια μόρια είναι τα ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1), ELAM-1 (endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1) και VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), όλα εκ των οποίων εκφράζονται ως απόκριση στην ενεργοποίηση του NF-κB (van de Stolpe et al., 1994; Sethi et al., 2008). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η IKKα εμπλέκεται στην ογκογένεση. Η IKKα φαίνεται ότι δρα ως ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη σε επιδερμικά SCC (Descargues et al., 2008;), αλλά και ως προαγωγέας της ογκογένεσης σε καρκινικά κύτταρα μαστού (Cao et al., 2007) και προστάτη διαμέσου της πυρηνικής μετατόπισης της και της καταστολής της μασπίνης που εμπλέκεται στη μετάσταση (Luo et al., 2007). Σε SCC κεφαλής και τραχήλου, ο ρόλος της IKKα είναι αμφισβητήσιμος καθώς φαίνεται ότι δρα ως ογκοκαταστολέας (Maeda et al., 2007) και ως προαγωγέας (Nakayama et al., 2001).

Άλλη μια διαδικασία, η οποία πλέον αναγνωρίζεται ως ιδιαίτερα σημαντική για την πρόοδο των όγκων και ρυθμίζεται από τον NF-κB, είναι η αγγειογένεση. Η λειτουργία αυτή εξαρτάται από χημειοκίνες και αυξητικούς παράγοντες, η παραγωγή των οποίων ρυθμίζεται από την ενεργοποίηση του NF-κB (De Martin et al., 2000; Aggarwal et al., 2006; Tabruyn and Griffioen, 2008; Ono, 2008). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν επίσης ότι η IKKα ρυθμίζει την κινητικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση των όγκων (DeBusk et al., 2008).

Ως ιδιοσυστατική ενεργοποίηση του NF-κB αναφέρεται η συνεχής παραμονή των υπομονάδων του NF-κB στον πυρήνα των κυττάρων. Υπάρχουν πλέον πολύ σοβαρά στοιχεία, πως η παρατεινόμενη ή ιδιοστατική ενεργοποίηση του NF-κB επικρατεί στις κυτταρικές σειρές και συμβάλλει στην πρόοδο κακοηθειών και στην ανθεκτικότητα έναντι των θεραπειών των κύριων καρκίνων στον άνθρωπο. Ο NF-κB είναι ιδιοσυστατικά ενεργός σε ανθρώπινα λεμφώματα και σε καρκινώματα μαστού, του προστάτη του πνεύμονα, του εντέρου, του παγκρέατος, του κεφαλιού, του λαιμού και του οισοφάγου. Ο ακριβής ρόλος της ιδιοσυστατικής ενεργοποίησης του NF-κB δεν είναι ακόμα γνωστός, αλλά έχει συνδεθεί με την ανθεκτικότητα έναντι της απόπτωσης σε διάφορους τύπους καρκίνου και καρκινικών κυτταρικών σειρών (Karin and Greten, 2005; Luo et al., 2007; Basseres and Baldwin,

2006; Pacifico and Leonardi, 2006; Naugler and Karin, 2008; Sethi et al., 2008; Giri and Aggarwal, 2008; Chariot, 2009). Παρότι είναι δελεαστικό να ισχύει ένας παρόμοιος μηχανισμός για την πρόοδο όλων των όγκων, που ιδιοσυστατικά εκφράζουν τον NF-κΒ, κάτι τέτοιο δεν έχει ακόμα αποδειχτεί.

Έχουν ταυτοποιηθεί πολλά ερεθίσματα που ενεργοποιούν τον NF-κΒ ωστόσο, το ερέθισμα, που είναι υπεύθυνο, για την ιδιοσυστατική ενεργοποίησή του δεν έχει γίνει ακόμα κατανοητό. Τα κύτταρα που εκφράζουν ιδιοσυστατικά ενεργό NF-κΒ είναι ανθεκτικά σε διάφορους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες και σε θεραπεία με ακτινοβολία, ενώ οι ακριβείς μηχανισμοί, που οδηγούν στην επαγωγή αυτής της ανθεκτικότητας δεν είναι ξεκάθαροι.

Ο καθοριστικός ρόλος του NF-κΒ στην αναστολή της απόπτωσης, στην πρόοδο και ανάπτυξη των όγκων και η παρατήρηση της ιδιοσυστατικής ενεργοποίησης του NF-κΒ σε καρκινικά κύτταρα, υποδηλώνουν πως οι αναστολείς ενεργοποίησης του NF-κΒ θα είναι πολύ χρήσιμοι για τη θεραπεία του καρκίνου. Οι στρατηγικές για την αναστολή του NF-κΒ περιλαμβάνουν μια ανοδική και μια στοχευμένη στρατηγική. Στην ανοδική στρατηγική, η πορεία ενεργοποίησης του NF-κΒ αναστέλλεται μέσω πρωτεοσωμικών αναστολέων, όπως οι PS-341, MG132, αναστολέων των IKK, όπως ο NSAIDs, η σουλφαζίνη, το αρσενικό τριοξείδιο, η κουρκουμίνη και η θαλιδομίδη, πεπτιδία που διαπερνούν τις μεμβράνες, όπως το SN-50, αντί-οξειδωτικά και υπερέκφραση του γονιδίου IκΒα μέσω ανασυνδυασμένων ρετροϊών.

Από την άλλη η στοχευμένη στρατηγική περιλαμβάνει, την παρεμπόδιση της πρόσδεσης του NF-κΒ στο DNA, μέσω ομοιωμάτων ολιγοδεοξυνουκλεοτιδίων (ODNs), την παρεμπόδιση της ενεργοποίησης γονιδίων που επηρεάζει ο NF-κΒ μέσω γλυκοκορτικοϊδών ή μέσω ανάμιξης με NF-κΒ mRNA που περιέχει αντί-νοηματικά ολιγονουκλεοτίδια NF-κΒ (ASO) (Lee et al., 2007). Η ανάπτυξη αναστολέων του NF-κΒ είναι πολλά υποσχόμενη και ελπιδοφόρα όσον αφορά την ανάπτυξη νέων θεραπειών για τον καρκίνο (Karin et al., 2004; Tergaonkar, 2006; Van Waes, 2007).

Πειραματικός Σχεδιασμός - Σκοπός

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB είναι κύριος ρυθμιστής της έκφρασης γονιδίων, που εμπλέκονται στις αποκρίσεις των κυττάρων, όταν αυτά υπόκεινται σε διάφορες μορφές στρες (Hayden and Ghosh, 2004; Karin and Greten, 2005; Perkins, 2007). Ο NF-κB προσδένεται στο DNA με τη μορφή όμο-διμερών ή έτερο-διμερών, τα οποία σχηματίζονται από 5 πιθανές υπομονάδες (RelA/p65, c-Rel, RelB, p50 και p52). Όλα τα μέλη της οικογένειας του NF-κB περιέχουν μια N-τελική Rel ομόλογη περιοχή, η οποία προάγει την πρόσδεση στο DNA και το διμερισμό των πρωτεϊνών. Επίσης, τα μέλη της Rel υποοικογένειας περιέχουν και μια C-τελική περιοχή ενεργοποίησης, ενώ οι p50 και p52 προέρχονται, μέσω διαδικασιών, από μεγαλύτερα πρόδρομα μόρια τα p105 (NF-κB1) και p100 (NF-κB2), αντίστοιχα, τα οποία στερούνται περιοχών μεταγραφικής ενεργοποίησης. Τα ετεροδιμερή p50/p65, που εμπλέκονται στην κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB, δεσμεύονται στις IκBs (αναστολείς του NF-κB), οι οποίες και συγκρατούν τα ετεροδιμερή στο κυτταρόπλασμα των περισσότερων κυττάρων, αν αυτά δεν υπόκεινται σε κάποια μορφή στρες. Οι ενεργοποιητές του NF-κB προωθούν την εξειδικευμένη φωσφορυλίωση δυο αμινο-τελικών σερινών σε κάθε IκB (σερίνες32 και 36 στην IκBa), κάτι που καθιστά τις γειτονικές λυσίνες στόχους ουβικιτίνωσης, με αποτέλεσμα την αποδόμηση της IκB από το πρωτεόσωμα 26S. Τότε, ο NF-κB είναι ελεύθερος να μετατοπιστεί στον πυρήνα και να προσδεθεί στο DNA, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή γονιδίων στόχων του. Η φωσφορυλίωση των IκBs συντελείται από ένα μεγάλο μοριακού βάρους σύμπλοκο, που αποτελείται από δυο τουλάχιστον άμεσες IκB κινάσες, τις IKKα και IKKβ και από μια ρυθμιστική προσδένουσα πρωτεΐνη τη NEMO. Θεωρείται πως δυο μόρια της NEMO είναι απαραίτητα για να ενορχηστρώσουν τη συγκρότηση των δυο IKKs σε ένα υψηλού μοριακού βάρους σύμπλοκο σηματοδότησης. Επίσης, μπορεί να διευκολύνει τη στρατολόγηση της IκBa από το σύμπλοκο IKK. Οι IKKα και IKKβ είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης, οι οποίες περιέχουν μια αμινο-τελική καταλυτική περιοχή και δυο διαδραστικές αλληλουχίες (μοτίβα) πλησίον του καρβόξυ-τελικού άκρου, που είναι παρόμοιες με περιοχές φερμουάρ λευκίνης και έλικας-βρόγχου-έλικας. Οι IKKα και IKKβ σχηματίζουν τόσο όμο-διμερή όσο

και έτερο-διμερή *in vivo* μέσω των περιοχών τους φερμουάρ λευκίνης. Η ενεργοποίηση της IKKβ εξαρτάται από την επαγόμενη μέσω σηματοδότησης φωσφορυλίωση της στις σερίνες 177 και 181 του T-βρόγχου ενεργοποίησης της. Η κινάση NIK (NF-κB-inducing kinase) αλληλεπιδρά φυσιολογικά με την IKKα και την ενεργοποιεί εξειδικευμένα, φωσφορυλιώνοντας την στις σερίνες 176 και 180 *in vitro* και *in vivo*. Ο NF-κB ενεργοποιείται μέσω τριών διαφορετικών πορειών ενεργοποίησης: την *κανονική IKK-εξαρτώμενη πορεία ενεργοποίησης*, η οποία έχει ως συνέπεια τη μετατόπιση των έτερο-διμερών p50/p65 στον πυρήνα, τη *μη-κανονική ή εναλλακτική πορεία ενεργοποίησης*, η οποία περιλαμβάνει την ενεργοποίηση ομοδιμερών της IKKα, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση των έτερο-διμερών RelB/p52 στον πυρήνα και ενός μέρους των έτερο-διμερών p50/p65 (Basak et al., 2007) και την *άτυπη ανεξάρτητη των IKKs πορεία ενεργοποίησης*, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση και πυρηνική μετατόπιση των έτερο-διμερών p50/p65 (Hayden and Ghosh, 2004; Karin and Greten, 2005; Scheidereit, 2006; Perkins, 2006; Tergaonkar, 2006; Perkins, 2007).

Ο NF-κB ενεργοποιείται από ένα ενδιάμεσο επίπεδο συγκέντρωσης ΔΜΟ, όπως το H₂O₂ (Li and Karin, 1999; Gloire et al., 2006), καθώς επίσης και από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες οι οποίοι προκαλούν την ενδογενή συνάθροιση ΔΜΟ (Pelicano et al., 2004; Laurent et al., 2005) οι οποίες συμβάλλουν στην πρόκληση βλαβών στο DNA (Norbury and Hickson, 2001; Potter and Rabinovitch, 2005; Michod and Widmann, 2007). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν πως ως απόκριση σε αμφίκλωνες ρήξεις στο DNA (DSBs), η ATM είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των IKK (Li et al., 2001) και η NEMO/IKKγ φαίνεται να σχετίζεται με την ATM μετά την επαγωγή DSBs, ώστε να προκληθεί η ενεργοποίηση της IKKβ (Wu et al., 2006), προτείνοντας πως η ενεργοποίηση του NF-κB ως απόκριση στις βλάβες στο DNA είναι απαραίτητη για την επιβίωση του κυττάρου (Habraken and Piette, 2006; Janssens and Tschopp, 2006; Wu and Miyamoto, 2007; Perkins, 2007).

Με βάση ότι: (α) η χορήγηση H₂O₂ και χημειοθεραπευτικών παραγόντων σε κύτταρα στην καλλιέργεια οδηγούν στη ενδογενή συσσώρευση ΔΜΟ οι οποίες προκαλούν βλάβες στο DNA και (β) ο NF-κB επάγεται από τις ΔΜΟ και εμπλέκεται στις αποκρίσεις των κυττάρων σε βλάβες στο DNA, μελετήσαμε το ρόλο του NF-κB και των κύριων ενεργοποιητικών κινασών του,

IKKα και IKKβ, στις αποκρίσεις, κυρίως, ανθρωπίνων καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα, A549, αλλά και τελομερισμένων (δυσνητικά αθανатоποιημένων) ανθρωπίνων ινοβλαστών πνεύμονα, MRC-5 TERT (Bartkova et al., 2006) στο H₂O₂ και στο χημειοθεραπευτικό παράγοντα ετοποσιδίο/VP16.

Αυτές οι, προφανώς, αντιφατικές παρατηρήσεις και το γεγονός πως ο ρόλος του NF-κB και των κύριων ενεργοποιητικών κινασών του IKKα και IKKβ στον κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549, που επάγεται από το H₂O₂, παραμένει αδιευκρίνιστος, μας παρακίνησαν να διερευνήσουμε τις επιδράσεις της καταστολής της πορείας του NF-κB στον κυτταρικό θάνατο των κυττάρων A549, που επάγεται από το H₂O₂ αλλά και από τη χορήγηση χημειοθεραπευτικών παραγόντων, οι οποίοι θεωρούνται υπεύθυνοι αύξησης των ενδογενών επιπέδων ΔΜΟ στα κύτταρα άρα και πρόκλησης οξειδωτικού στρες, όπως το ετοποσιδίο/VP16. Για το σκοπό αυτό: (1) καταστείλαμε την ενεργοποίηση του NF-κB με χρήση του υπέρ-καταστολέα του IκBaSR, και (2) χειρισθήκαμε γενετικά τις δύο πορείες ενεργοποίησης του NF-κB, την κανονική ή κλασσική πορεία και τη μη-κανονική ή εναλλακτική πορεία, με την αποσιώπηση των ενεργοποιητικών κινασών των δύο πορειών, της IKKα ή της IKKβ, αντίστοιχα, με παρεμβολή RNA (shRNA), και (3) μελετήσαμε τις αποκρίσεις των μη-τροποποιημένων και NF-κB-τροποποιημένων κυττάρων στο H₂O₂ και στο ετοποσιδίο/VP16, σε σχέση με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση τους αλλά και γονιδίων-στόχων του NF-κB που ρυθμίζουν αυτές τις δύο κυτταρικές διαδικασίες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

Παρατίθεται παρακάτω μια λίστα (Πίνακας 1) με τα σημαντικότερα αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μελέτης.

Πίνακας 1 Υλικά	
Υλικό	Εταιρεία
DMEM	Biochrom KG, Germany
Ορός εμβρύου μόσχου (FCS)	Biochrom KG, Germany (Seromed)
Πενικιλίνη/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.
Αντιβιοτικά	Sigma Chemical Co.
Θρυπτόνη (Bacto-tryptone)	Sigma Chemical Co.
Εκχύλισμα ζύμης (Bacto-yeast extract)	Sigma Chemical Co.
Άγαρ	Sigma Chemical Co.
Διμέθυλο-σουλφοξειδίο (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 <ul style="list-style-type: none">• Kaleidoscope Prestained Standards• Pre-stained molecular weight markers	BIORad Laboratories, USA Fermentas
Kits απομόνωσης πλασμιδιακού DNA <ul style="list-style-type: none">• Qiagen kit	Qiagen, Germany

• Nucleobond kit	Nucleobond, Germany
Senescent Cells Staining Kit για την ανίχνευση της β-γαλακτοσιδάσης	Sigma Chemical Co., Germany
Μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (Πρωτεΐνες)	Schleicher and Schnell, OPTITRAN BA-S 85 Reinforced NC
SuperSignal West Pico Chemiluminescent kit	Pierce, USA
ECL kit	Amersham International
Αντισώματα	SantaCruz Biotech, USA BD Transduction Laboratories, USA Oncogene Science, DAKO Bioscience Systems, Calbiochem Upstate, Cell Signal
Διάφορα στερεά χημικά (SDS, EDTA, NaCl, NaOH, Tris, βορικό οξύ, βρωμοφαινόλη, κρυσταλλικό ιώδες, οξικό νάτριο, γλυκίνη, βρωμιούχο αιθίδιο, φαινόλη, ακρυλαμίδιο, δις-ακρυλαμίδιο)	Riedel, Germany ή Sigma Chemical Co.
Διάφορα υγρά χημικά (Αιθανόλη, χλωροφόρμιο, ισοπροπανόλη, οξικό οξύ, HCl, γλυκερόλη, 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

ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2 Βακτηριακές Τεχνικές

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

Η παρασκευή των τρυβλίων 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).

(B) 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 επόμενη 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 μέχρι η OD₆₀₀ να φτάσει 0.3. Κατά τη διάρκεια της επώασης των βακτηρίων παρασκευάστηκαν τα διαλύματα A και B, 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 A. Στη συνέχεια προστέθηκαν άλλα 9 ml διαλύματος A 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 B. Αφού προστέθηκε άλλα 9 ml διαλύματος B, 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 B που περιείχε 10% γλυκερόλη (Riedel, Germany) και δείγματα των 50-100 μl βακτηρίων τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένους σωλήνες erpendorff 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

(Γ) 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 υπερκείμενου. Τέλος με την υγρή αυτή καλλιέργεια εμβολιάσθηκαν τρυβλία L-άγαρ συν 100 μg/ml αμπικιλίνης 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. αμπικιλίνη).

(Δ) 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 αμπικιλίνης 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 καλλιέργειών βακτηρίων γινόταν με ανάμιξη 0.5 ml ανεπτυγμένης καλλιέργειας βακτηρίων σε 5 ml L-Broth και 100 µg/ml αμπικιλίνης 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 αμπικιλίνης με 5 ml της ολονύχτιας ανεπτυγμένης βακτηριακής καλλιέργειας και επώαση σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C για όλη τη νύχτα.

(Ε) Παρασκευή βακτηριακών αποθεμάτων γλυκερόλης

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

(ΣΤ) 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 erpendorff 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 ανάμειξη και το εναιώρημα αφέθηκε στον πάγο για 10 λεπτά (η χρήση οξικού νατρίου pH5.2 υποβοηθεί στη καθίζηση πρωτεϊνών, RNA και χρωμοσωμικού DNA).

Μετά από φυγοκέντρωση για 15 λεπτά, στις 13000 στροφές στους 4°C, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε έναν καθαρό αποστειρωμένο σωλήνα erpendorff και προστέθηκαν 0.6 όγκοι ισοπροπανόλης (Riedel, Germany). Το πλασμιδιακό DNA αφέθηκε να κατακρημνιστεί για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και συλλέχθηκε με φυγοκέντρωση 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 αγαρόζης (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

(Z) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλους όγκους (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 errendorff 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 ενδονουκλεάσες περιορισμού (παρ. 2.22) και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (παρ. 2.20).

2.3 Κυτταρική Καλλιέργεια

(A) Κυτταρικές σειρές και καλλιέργεια

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν (Πίνακας 2):

Πίνακας 2 Περιγραφή κυτταρικών σειρών		
Κυτταρική σειρά	Περιγραφή	Βιβλιογραφική αναφορά
MRC-5-TERT	Αθανατοποιημένο στέλεχος φυσιολογικών ανθρώπινων εμβρυϊκών ινοβλαστών	Bartek et al. (2004)
A549	Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα (κακοήθη επιθηλιακά)	Smith (1977)
ΦNX (Phoenix)	Αμφοτροπική κυτταρική σειρά πακεταρίσματος ρετροϊών	Κατασκευάστηκε από τον Dr. Garry Nolan, Πανεπιστήμιο του Stanford, USA, και χορηγήθηκε από τον Professor K. B. Marcu, State University of New York at Stony Brook, USA
UT-SCC-60A	Ανθρώπινα πλακώδη καρκινικά κύτταρα πρωτογενούς όγκου αμυγδαλής	(Takebayashi et al., 2004) University of Turku (UT)

UT-SCC-60B	Ανθρώπινα μεταστατικά πλακώδη καρκινικά κύτταρα από λεμφαδένα τραχήλου	(Takebayashi et al., 2004) University of Turku (UT)
------------	---	--

Κύτταρα A549, MRC-5 και η αμφοτροπική κυτταρική σειρά πακεταρίσματος ρετροϊών Phoenix (ΦNX) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό μόσχου (Foetal Calf Serum) (Seromed), 100 IU/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη και 1.4 mM L-γλουταμίνη στους 37°C, 5%CO₂. Όλα τα υλικά της κυτταροκαλλιέργειας ήταν από τη Biochrom KG, Germany.

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων 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) σε αναλογία 1:4, 1:8 ή 1:16 (παρ. 2.9). Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων διεξάγονταν στην εστία κυτταροκαλλιέργειας κάθετης νοηματικής ροής (Tissue culture hood).

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 DMEM: Σε 440 ml Dulbecco's MEM (DMEM) που περιείχε 3.7g/l NaHCO₃ και 1.0g/l D-γλυκόζης προστέθηκαν 50 ml ορός 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 δισ-αποσταγμένου 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.

(B) Ανακαλλιέργεια κυττάρων

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

Αρχικά επιλέχθηκαν τρυβλία των 90 mm, με κύτταρα σε πλήρες ταπήτιο (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 (Ca^{2+}) και μαγνησίου (Mg^{2+}). 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 1:2, 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.

(Γ) Ανάπτυξη, διατήρηση και αποθήκευση κυτταρικών σειρών

Διατήρηση των κυττάρων - Πάγωμα κυττάρων

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

Για τη διατήρηση και τη βαθιά κατάψυξη των κυττάρων, 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 στον 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.) και τα κύτταρα εναιωρήθηκαν με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης πλαστικής πιπέτας. Να σημειωθεί ότι το διμέθυλο-σουλφοξειδίο κάνει τις μεμβράνες ημιδιαπερατές, ενώ ταυτόχρονα ελαχιστοποιεί τον μεταβολισμό των κυττάρων. 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 επόμενη ημέρα μεταφέρθηκαν στο υγρό άζωτο για μακροπρόθεσμη διατήρηση.

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

Ανασύσταση κυττάρων - Ξεπάγωμα 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. Τα κύτταρα ανακινήθηκαν ελαφρά και τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C , $5\%\text{CO}_2$.

Την επόμενη ημέρα, αφού τα κύτταρα 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 σύμφωνα με την περιγραφή στη ενότητα παραπάνω (παρ. 2.9).

(Δ) Καταμέτρηση κυττάρων με το αιμοκυτταρόμετρο

Μετά τη θρυψινοποίηση των κυττάρων και την αποκόλληση τους από τις φλάσκες ή τα τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας, 10 μl εναιωρήματος κυττάρων σε PBS 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 x 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.

(Ε) Προσδιορισμός επιβίωσης κυττάρων

Κύτταρα A549 καλλιεργήθηκαν σε πολυτρυβλία 6 πηγαδιών (250 κύτταρα ανά πηγάδι) in duplicates και επωάστηκαν όλο το βράδυ στους 37°C, και 5% CO₂. Στα κύτταρα χορηγήθηκε H₂O₂, όπως περιγράφεται παρακάτω. Ύστερα, τα κύτταρα επωάστηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM στους 37°C, και 5% CO₂ για 14 μέρες. Οι αποικίες σταθεροποιήθηκαν με μεθανόλη:οξικό οξύ (3:1) και υπέστησαν χρώση με 0,5 mg/ml κρυσταλλικό ιώδες. Η επιβίωση υπολογίστηκε ως ποσοστό με τη χρήση της εξίσωσης $N_T/N_U \times 100$, όπου N_T είναι ο αριθμός των αποικιών στα πηγαδάκια όπου χορηγήθηκε H₂O₂ και N_U είναι ο αριθμός των αποικιών στα πηγαδάκια όπου δεν χορηγήθηκε H₂O₂. Τα δεδομένα είναι μέσος όρος \pm σφάλμα μέσου όρου τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

2.4 Προσδιορισμός του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής

Για την ανίχνευση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου χρησιμοποιήθηκε το cycle test™ plus DNA reagent kit της Becton Dickinson.

Συλλέχθηκαν με θρυψινοποίηση, κύτταρα A549 , που εκφράζανε διαφορετικά γονίδια από τρυβλία διαμέτρου 100 mm και προστέθηκαν 9 ml PBS ανά τρυβλίο. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε το εναιώρημα των κυττάρων σε στείρους σωλήνες falcon των 15 ml και φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 1600 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια επαναιωρήθηκαν τα κύτταρα σε 0.5 ml ψυχρού PBS και προστέθηκαν 9.5 ml ψυχρής αιθανόλης 75%.

Μεταφέρθηκε σε ειδικά σωληνάρια, το εναιώρημα των κυττάρων και προστέθηκε 2ml ρυθμιστικού διαλύματος. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 3000 rpm και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Προστέθηκαν 100 μl διαλύματος A, ακολούθησε ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min έτσι ώστε να μη δημιουργηθούν συσσωματώματα. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 100 μl διαλύματος B, ακολούθησε ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Τέλος, προστέθηκαν 100 μl διαλύματος C, ακολούθησε ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Το δείγμα κυτταρομετρήθηκε για την μελέτη των φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Οι ιδιότητες των παραπάνω διαλυμάτων για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου είναι οι εξής :

- ▶ Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution): περιέχει κιτρικό νάτριο, σουκρόζη και διμέθυλο σουλφαμίδιο (DMSO) για τη συλλογή και/ή τήξη των κυτταρικών εναιωρημάτων.
- ▶ Διάλυμα A: ενζυματικός διαχωρισμός συμπαγών τμημάτων ιστού και «πέψη» κυτταρικών μεμβρανών και του κυτταροσκελετού.
- ▶ Διάλυμα B: περιέχει αναστολέα θρυψίνης και ριβονουκλεάση A σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού με τετραυδροχλωρίδιο σπερμίνης για την αναστολή της θρυψίνης και τη «πέψη» του RNA.
- ▶ Διάλυμα C: περιέχει ιωδιούχο προπίδιο και τετραυδροχλωρική σπερμιδίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού. Το ιωδιούχο προπίδιο προσδένεται στοιχειομετρικά στο DNA.

2.5 Προσδιορισμός αποπτωτικών και δευτερευόντως νεκρωτικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής

Για την ανίχνευση των αποπτωτικών και των δευτερευόντως νεκρωτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το Annexin V-FITC kit της assay designs.

Συλλέχθηκαν με θρυψινοποίηση κύτταρα A549, που εκφράζανε διαφορετικά γονίδια, από πολυτροβλία διαμέτρου ,στα οποία προστέθηκε 1ml PBS. Το εναιώρημα των κυττάρων συλλέχθηκε σε στείρους σωλήνες erpendorff και φυγοκεντρήθηκε για 4 λεπτά στις 1500 στροφές και στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 1ml διαλύματος PBS. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 4 λεπτά στις 1500 στροφές, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 400μl διαλύματος πρόσδεσης. 96μl από το εναιώρημα κάθε δείγματος μεταφέρθηκε σε ειδικό σωλήνα και επώαστηκε στο σκοτάδι και σε 4°C με 1μl αννεξίνης-V και 2,5 μl ιωδιούχου προπιδίου. Έπειτα, στα δείγματα προστέθηκαν 750μl PBS και κυτταρομετρήθηκαν.

Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης η δομή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των κυττάρων μεταβάλλεται. Μια τέτοια δομική μεταβολή είναι η εμφάνιση της φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Η αννεξίνη-V είναι μια πρωτεΐνη, που προσδένεται σε φωσφολιπίδια παρουσιάζοντας μεγάλη συνάφεια με τη φωσφατιδυλοσερίνη. Η ιδιότητα της αυτή καθιστά την αννεξίνη-V ένα πολύ ισχυρό μέσο ανίχνευσης της απόπτωσης από τα πρώιμα στάδιά της.

2.6 Χορήγηση H₂O₂ σε κύτταρα A549

Σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα A549 χορηγήθηκε H₂O₂ σε συγκεντρώσεις 100, 200, 500, και 1000μM. Αρχικά έγινε σπορά κυττάρων A549 που εκφράζανε διάφορα γονίδια σε τρυβλία 100mM και σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM. Ύστερα από 24 ώρες έγινε αλλαγή θρεπτικού και χορήγηση H₂O₂ στις παραπάνω συγκεντρώσεις και για 2 ώρες. Μετά από 2 ώρες έγινε αλλαγή θρεπτικού υλικού και τα κύτταρα ανέρρωσαν για 24 ώρες. Στη συνέχεια συλλέχθηκαν από αυτά τα κατάλληλα εκχυλίσματα.

Το διάλυμα H₂O₂ που χορηγήθηκε στα κύτταρα προερχόταν από την εταιρεία Sigma-Aldrich σε αρχική συγκέντρωση 9,8M και προστέθηκε στα κύτταρα ύστερα από διάλυσή του σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM.

2.7 Χορήγηση ετοποσιδίου/VP- 16 σε κύτταρα A549 και MRC5-TERT

Σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα A549 χορηγήθηκε ετοποσίδιο VP-16 σε συγκεντρώσεις 25 και 50μM. Αρχικά έγινε σπορά κυττάρων A549 που εκφράζανε διάφορα γονίδια σε τρυβλία 100mM και σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM. Ύστερα από 24 ώρες έγινε αλλαγή θρεπτικού και χορήγηση ετοποσιδίου VP-16 στις παραπάνω συγκεντρώσεις και για 24 ώρες. Μετά από 24 ώρες συλλέχθηκαν από αυτά τα κατάλληλα εκχυλίσματα.

Το ετοποσίδιο VP-16 ήταν της εταιρείας Bristol-Myers Squibb κατάλληλο για ενδοφλέβια χρήση και σε αρχική συγκέντρωση 34mM.

2.8 Χορήγηση κυκοεξαμίδιου (CHX) σε κύτταρα A549

Σε κύτταρα A549 GL2, A549 IKKα^{KD} και A549 IKKβ^{KD} που καλλιεργήθηκαν σε πληρότητα περίπου 60% και σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM, χορηγήθηκαν 25 μM κυκλοεξαμίδιου και τα κύτταρα επωάστηκαν για χρονικά διαστήματα από 0-120 min στους 37°C και σε 5% CO₂. Στη συνέχεια ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τα κύτταρα αναλύθηκαν για την έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών.

2.9 Χορήγηση TNFα σε κύτταρα A549

Σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα A549 χορηγήθηκε TNFα σε συγκεντρώσεις 100 και 200 μg/ml. Αρχικά έγινε σπορά κυττάρων A549 σε τρυβλία 100mM και σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM. Ύστερα από 24 ώρες έγινε αλλαγή θρεπτικού και χορήγηση TNFα στις παραπάνω συγκεντρώσεις και για 24 ώρες. Μετά από 24 ώρες συλλέχθηκαν από αυτά τα κατάλληλα εκχυλίσματα.

2.10 Προσδιορισμός των ενδογενών επιπέδων ΔΜΟ σε κύτταρα A549 και MRC5-TERT.

Κύτταρα A549 ή MRC5-TERT καλλιεργήθηκαν με πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM σε πολυτρυβλία 12 πηγαδιών. Στη συνέχεια χορηγήθηκαν 5 μM ουσίας C2935 (6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, di(acetoxymethyl ester) (invitrogen molecular probes), διαλυμένης σε DMSO, και τα κύτταρα επώαστηκαν με την ουσία στους 37°C και σε 5% CO₂ για 45min. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε η ουσία C2935 και χορηγήθηκε στα κύτταρα H₂O₂ ή VP16, όπως περιγράφεται παραπάνω. Έπειτα, τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν, επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα PBS 0.1% αλβουμίνη και 1% HEPES 1M και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα ΔΜΟ αμέσως με τη χρήση FACSCalibur με ρυθμίσεις διέγερσης και εκπομπής 488 και 525-550 nm (FL1), αντίστοιχα.

2.11 Ανάλυση με γονίδιο αναφοράς NF-κB λουσιφεράσης

Για την ανάλυση με γονίδιο αναφοράς NF-κB λουσιφεράσης έγινε σπορά των κυττάρων A549 σε πολυτρυβλία 24άρων πηγαδιών και σε πληρότητα 60%. Τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με αντιδραστήριο polyfect σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Qiagen, Germany). Τα κύτταρα επιμολύνθηκαν παροδικά με 1 μg /πηγαδάκι NFκ-B εξαρτώμενο πλασμίδιο αναφοράς λουσιφεράσης 5κκB και 0.2 μg από pRSV-LacZ (pCMV-LacZ). 24 ώρες μετά την επιμόλυνση χορηγήθηκαν στα κύτταρα 0 - 1000 μM H₂O₂ ή 0-50 μM VP16, όπως περιγράφεται παραπάνω. Η δραστηριότητα της λουσιφεράσης αναλύθηκε αμέσως μετά τη χορήγηση με τη χρήση ενός αναλυτικού kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Promega Corporation, Madison, WI, USA) και ομαλοποιήθηκαν στη δραστηριότητα β-γαλακτοσιδάσης κάθε δείγματος. Οι σχετικές δραστηριότητες της λουσιφεράσης εκφράζονται ως πολλαπλάσια της ενεργοποίησης υψηλότερα από τη δραστηριότητα του NF-κB-εξαρτώμενου πλασμιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης και υπολογίστηκαν διαιρώντας τις τιμές δραστηριότητας της λουσιφεράσης με τις τιμές δραστηριότητας της β-γαλακτοσιδάσης. Όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές και σε κάθε σχήμα δείχνεται ο μέσος όρος του.

2.12 Έμμεσος ανοσοφθορισμός και συνεστιακή μικροσκοπία

Κύτταρα A549 καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες σε πλήρες θρεπτικό υλικό για ένα ολόκληρο βράδυ, έτσι ώστε να επικολληθούν πάνω σε αυτές. Στα κύτταρα χορηγήθηκε H₂O₂ ή VP16 όπως περιγράφεται παραπάνω. Ύστερα, τα κύτταρα πλύθηκαν με παγωμένο PBS που περιείχε Ca²⁺ και Mg²⁺ (το οποίο αναφέρεται ως, από εδώ και στο εξής), σταθεροποιήθηκαν σε 4% παραφορμαλδεΰδη για 20 min και έγιναν διαπερατά με 0.1% Triton X-100 σε PBS για 3-4. Στη συνέχεια τα κύτταρα πλύθηκαν προσεκτικά 3X με PBS και φράχτηκαν γενετικά με 10% FCS/PBS για 30 min. Τα κύτταρα πλύθηκαν προσεκτικά 3X με PBS, και τα πρώτα αντισώματα προστέθηκαν σε διάλυμα 1:50 για 1 h. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού για NF-κB p65 (sc-372), φωσφο-p65 (σερίνη 536) (93H1, #3033; Cell Signaling, USA) και γ-H2AX (μια ευγενική δωρεά του Δρ. Θ. Τζαβάρα) και μονοκλωνικό αντίσωμα μύος για την IKKα (sc-7606). Στη συνέχεια τα κύτταρα πλύθηκαν προσεκτικά 3X με PBS και προστέθηκαν κατάλληλα FITC-συζευγμένα δευτερεύοντα αντισώματα σε διάλυμα 1:200 για 1 h.

Για να οπτικοποιήσουμε τους πυρήνες, στα κύτταρα που είχαν υποστεί χρώση χορηγήσαμε RNase A (1μg/ml) για 30 min, πλύναμε με PBS προσθέσαμε ιωδιούχο προπίδιο και επώασαμε τα κύτταρα για 10 min. Στη συνέχεια, πλύναμε με PBS και τοποθετήσαμε τα κύτταρα σε γυάλινες πλάκες. Η διέγερση του FITC και του ιωδιούχου προπιδίου επιτεύχθηκε σε μήκη κύματος 488 και 530 nm, αντίστοιχα. Οι εικόνες συλλέχθηκαν σε Leica TCS-SP scanning confocal microscope, εξοπλισμένο με αργόν/κρυπτόν laser και λογισμικό Leica TCS.

2.13 Απομόνωση και Ανάλυση Νουκλεϊκών οξέων

(A) Απομόνωση χαμηλού μοριακού βάρους γενωμικού DNA

Χαμηλού μοριακού βάρους γενωμικό DNA απομονώθηκε από επικολλημένα και επιπλέοντα στο θρεπτικό υλικό κύτταρα όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Sugiki et al. 2000; Kolettas et al. 2006).

Περιληπτικά, επιπλέοντα κύτταρα A549 που έφεραν διαφορετικά γονίδια στο θρεπτικό υλικό συλλέχθηκαν σε 15 ml σωλήνα Falcon και διατηρήθηκαν σε πάγο. Τα επικολλημένα κύτταρα εκπλύθηκαν 2 φορές με PBS-1mM EDTA pH8.0 και τα ξεπλύματα προστέθηκαν στον σωλήνα Falcon. Τα επικολλημένα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν, συλλέχθηκαν στον σωλήνα Falcon μαζί με τα επιπλέοντα κύτταρα και φυγοκεντρήθηκαν στις 2000 rpm στους 4°C. Το κυτταρικό ίζημα εναιωρήθηκε σε 1 ml PBS-1 mM EDTA pH8.0, μεταφέρθηκε σε σωλήνες errendorff και ξαναφυγοκεντρήθηκε σε μικρο-φυγόκεντρο στις 6500 rpm στους 4°C. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 μl ψυχρού ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης DNA (DNA lysis buffer), αφέθηκε για 5 λεπτά στον πάγο και φυγοκεντρήθηκε για 20 λεπτά στις 13000 rpm στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε ένα καθαρό αποστειρωμένο σωλήνα errendorff και επώασθηκε διαδοχικά με 2 mg/ml RNάση A για 2 ώρες στους 37°C και με 250 μg/ml πρωτεΐνάση K 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 για την κατακρήμνιση του 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% πηκτή αγαρόζης που περιείχε 0.5 μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης DNA 0.5XTBE σε τάση 70V για 3 ώρες. Το DNA ανιχνεύθηκε κάτω από λάμπα υν και φωτογραφήθηκε (παρ. 2.20).

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

(B) Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA σε πηκτή αγαρόζης πραγματοποιήθηκε:

Για να γίνει έλεγχος των πλασμιδιακών και των ρετροϊικών 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.

Η ηλεκτροφόρηση του DNA γίνεται σε πηκτή αγαρόζης 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 αγαρόζης. Η κινητικότητα μορίων DNA σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από τις εξής παραμέτρους: α) από το μέγεθός τους β) τη μορφή τους (ευθύγραμμο, κυκλικά υπερελικωμένα, κυκλικά με εγκοπές) και γ) από την περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οριζόντιες πηκτές αγαρόζης 1% σε 0.5XTBE για την ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού ή ρετροϊικού DNA. Η στερεά αγαρόζη σε 0.5XTBE θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι βρασμού και αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία ~60°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 πηκτική αгарόζης 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 πηκτικής αгарόζης με γάντια.

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

10XΔιάλυμα φόρτωσης δειγμάτων (Sample loading buffer): 50% γλυκερόλη, (αποστειρωμένη σε δις-αποσταγμένο νερό), 1 mM EDTA pH 8.0, 0.4% κυανού της βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue), 0.4% xylene cyanol FF 10 mg/ml Βρωμιούχο αιθίδιο σε αποστειρωμένο δις-αποσταγμένο νερό.

(Γ) 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*, *XhoI* και *XbaI*, *SnaB1*, *EcoRI* 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).

2.14 Απομόνωση και Ανάλυση Πρωτεϊνών

(A) Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων για την ανάλυση πρωτεϊνών

Η απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων από τις ανθρώπινες ινοβλάστες, έγιναν σύμφωνα με προηγούμενες μεθόδους που έχουν περιγραφεί (Lane and Harlow, 1989; Sambrook et al., 1989).

Περίληπτικά, τρυβλία των 10 cm εκπλύθηκαν αρχικά δύο φορές με 5 ml ψυχρής PBS-1mM EDTA pH8.0 και στη συνέχεια προστέθηκε 1.0 ml ψυχρής PBS-1mM EDTA pH 8.0 και τα κύτταρα συλλέχθηκαν με ειδικό σιλικονούχο υλικό (rubber policeman) σε σωλήνα erpendorff. Το ελαιώδη φυγοκεντρήθηκε στις 6500 rpm για 2' στο ψυχρό θάλαμο (cold room) και το υπερκείμενο αφαιρέθηκε. Κατόπιν προστέθηκαν 100 – 150 μl 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 erpendorff 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 μl και προστέθηκε ¼ του όγκου 4Xδιάλυμα 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 μg/ml απροτινίνη (aprotinin), 1 μg/ml πεψιστατίνη (pepstatin), 1 μg/ml λευπεψίνη (leupeptin), 1 mM PMSF και 1 mM ορθοβαναδικό άλας του νατρίου (Na₃VO₄).

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

(B) Απομόνωση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων

Κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα

Κύτταρα A549 που έφεραν διαφορετικούς φορείς έκφρασης και γονίδια τα οποία καλλιεργήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων, σύμφωνα με προηγούμενες μεθόδους που έχουν περιγραφεί (Dimri et al. 1994).

Περιληπτικά, τρυβλία των 10 cm εκπλύθηκαν αρχικά μία φορά με 5 ml ψυχρής PBS-1mM EDTA pH8.0 και στη συνέχεια προστέθηκε 1.5 ml ψυχρής PBS-1mM EDTA pH 8.0 και τα κύτταρα συλλέχθηκαν με ειδικό σιλικονούχο υλικό (rubber policeman) σε σωλήνα erpendorff. Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στις 6500 rpm για 2' στο ψυχρό θάλαμο (cold room) και το υπερκείμενο αφαιρέθηκε. Κατόπιν τα κύτταρα εκπλύθηκαν μία φορά με 1.5 ml υποτονικού διαλύματος και φυγοκεντρήθηκαν στις 6500 rpm για 2' στο ψυχρό θάλαμο (cold room) και το υπερκείμενο αφαιρέθηκε. Στη συνέχεια τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 100 ml υποτονικού διαλύματος το οποίο περιείχε 0.1% NP-40 (12 ml από 10% NP-40) και το μίγμα παρέμενε στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολούθησε ανάδευση με δίνη (vortex) για περίπου 20 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό, αποστειρωμένο σωλήνα erpendorff και μικρή ποσότητα των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τα αντιδραστήρια της BioRad. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε μικρότερα (aliquots) των 25 μl και προστέθηκε ¼ του όγκου 4Χδιάλυμα πρωτεϊνικού δείγματος (Protein Loading buffer) και τα εκχυλίσματα διατηρήθηκαν στους -40°C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

Πυρηνικά εκχυλίσματα

Μετά την απομόνωση των κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων στο ίζημα προστέθηκε 1 ml ψυχρό υποτονικό διάλυμα (χωρίς NP-40) και φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm στους 4°C για 10 λεπτά. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 50 μl διάλυμα απομόνωσης με υψηλή συγκέντρωση άλατος το οποίο προστέθηκε σταγόνα-σταγόνα και στη συνέχεια το μίγμα ομογενοποιήθηκε με δίνη (vortex) και τοποθετήθηκαν σε πλατφόρμα

ανακίνησης για 30 λεπτά στους 4°C. Οι πυρηνικές πρωτεΐνες απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C.

Υποτονικό διάλυμα

10 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 5 mM KCl

Διάλυμα απομόνωσης με υψηλή συγκέντρωση άλατος

20 mM HEPES pH 7.9, 25% Glycerol, 450 mM KCl, 1 mM EDTA

Στα διαλύματα προστέθηκαν ακριβώς πριν τη χρήση τους τα εξής: 1 mM PMSF, 1mM Na₃VO₄, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 1 μg/ml απροτινίνη (aprotinin), 1 μg/ml πεψιστατίνη (pepstatin) και 1 μg/ml λευπεψίνη (leupeptin).

(Γ) Απομόνωση πυρήνων (nuclei)

Περιληπτικά, τρυβλία των 10 cm εκπλύθηκαν αρχικά δύο φορές με 5 ml ψυχρής PBS-1mM EDTA pH8.0 και στη συνέχεια προστέθηκε 1.0 ml ψυχρής PBS-1mM EDTA pH 8.0 και τα κύτταρα συλλέχθηκαν με ειδικό σιλικονούχο υλικό (rubber policeman) σε σωλήνα erpendorff. Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στις 6500 rpm για 2' στο ψυχρό θάλαμο (cold room) και το υπερκείμενο αφαιρέθηκε. Στη συνέχεια διαλύθηκε το ίζημα σε 300 μl TITE buffer, αφήθηκε για 5 λεπτά στον πάγο και το μίγμα ομογενοποιήθηκε με δίνη (vortex). Κατόπιν το περιεχόμενο μεταφέρθηκε σε ένα σωλήνα erpendorff που περιείχε 120 μl 10% sucrose σε TITE buffer. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 1000 g και αφαίρεση του υπερκείμενου. Στο ίζημα προστέθηκαν 20 μl TITE buffer, ομογενοποιήθηκε με δίνη (vortex) για 1 λεπτό περίπου, αφήθηκε στον πάγο για 10 λεπτά και αποθηκεύτηκε στους -70 °C.

Ρυθμιστικό διάλυμα TITE (TITE buffer): 20 mM Tris-Cl pH7.4, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.02% Triton X-1001 και οι αναστολείς πρωτεασών – 1 μg/ml απροτινίνη (aprotinin), 1 μg/ml πεψιστατίνη (pepstatin) και 1 μg/ml λευπεψίνη (leupeptin). Keep at 4°C.

Ρυθμιστικό διάλυμα TITE (TITE buffer)/10% Σουκρόζη: 5 g sucrose in TITE buffer: Make up to 50 ml. Keep at 4°C.

(Δ) 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 επιστίβαξης 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 επιστίβαξης είναι ~5:1.

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν 10%, 12% και 15% πηκτές SDS-PAGE (Πίνακας 3): 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).

Πίνακας 3 Πηκτές SDS-Πολυακρυλαμιδίου ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών			
Όγκοι πηκτών επιστίβαξης (για δύο πηκτές: 20 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	(Για 2 πηκτές)	
Όγκοι πηκτών διαχωρισμού (για δύο πηκτές: 20 ml)			
Πηκτή	Διάλυμα	Όγκος (ml)	Τελική συγκέντρωση
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	
12%	Αποστειρωμένο ddH ₂ O	6.6	
	30% μίγμα ακρυλαμιδίου (29.2% ακρυλαμίδιο, 0.8% Δις-ακρυλαμίδιο)	8.0	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 σε 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: μιοσίνη 199 kDa (μπλε), β-γαλακτοσιδάση 133 kDa (πορφυρό), λευκωματίνη ορού μόσχου 87 kDa (πράσινο), ανθρακική ανυδράση 40.1 kDa (βιολετί), αναστολέας θρυψίνης από σόγια 31.6 kDa (πορτοκαλί), λυσοζύμη 18.5 kDa (κόκκινο) και απροτινίνη 7.1 kDa (μπλε).

FERMENTAS MOL MARKERS

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

(E) Χρώση της πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου

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-αποσταγμένου νερού για 60 λεπτά – όλη τη νύχτα

(ΣΤ) Ανάλυση πρωτεϊνών με άνοσο-αποτύπωμα κατά Western (Western blot)

Η προσπάθεια διαχωρισμού και ανίχνευσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση σε SDS-πηκτή πολυακρυλαμιδίου, μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανίχνευση με τη χρήση αντισωμάτων (άνοσο-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 (Sambrook 1989).

Μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών, οι μεμβράνες επώαστηκαν 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 επώαστηκαν με το πρώτο αντίσωμα σε 5% blocking solution 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 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) ή το ECL (Amersham Int.), σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών, 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

Πίνακας 4 Αντίσωμα	Εταιρεία
Anti hTERT rabbit polyclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti β-actin mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti p53 (DO1) mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti ATM mouse monoclonal	Cell Signaling
Anti p-ATM rabbit polyclonal	Cell Signaling
Anti Cyc-D1 mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti E2F1 mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti p21^{CIP/WAF1} mouse monoclonal	BD Transduction Laboratories, USA
Anti Cdc-6 mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti γ-H2AX mouse monoclonal	Upstate
Anti H2A rabbit polyclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti Chk2-pT68 rabbit polyclonal	Cell Signaling
Anti Chk-2 rabbit polyclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti p-p53 (Ser20) rabbit polyclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti p-p53 (Ser15) rabbit polyclonal	
Anti PARP-1 mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti Bcl-2 mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti IKKβ goat polyclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti IKKα mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti IκBα goat polyclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti p-IκBα mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA

Anti NF-κB p50 goat polyclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti NF-κB p65 rabbit polyclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti p-p65 goat polyclonal	ABCAM Ltd, Cambridge, UK
Anti Bax Rabbit monoclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti p-27 Rabbit polyclonal	Georgatos Lab
Anti Caspase-3	
Anti p52	

2.15 Απομόνωση ολικού RNA

Ολικά κυτταρικά RNAs απομονώθηκαν από κύτταρα A549 Neo και A549 IKKβca και από κύτταρα A549, στα οποία χορηγήσαμε 100 ng/ml TNFα για 2 h χρησιμοποιώντας τη μέθοδο LiCl-urea [Auffray C and Rougenon O. (1980). Eur J Biochem 107, 303]. Εν συντομία, τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν, συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και πλύθηκαν με κρύο PBS. Κάθε κυτταρικό ίζημα διαλύθηκε σε 5 ml κρύας και αποστειρωμένης 3 M LiCl - 6 M ουρίας, στροβιλίστηκε για 2 min και επωάστηκε όλο το βράδυ στον ψυχρό θάλαμο στους 4°C. Στη συνέχεια, τα διαλύματα φυγοκεντρήθηκαν στις 6.000 rpm για 25 min στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και 3 ml ψυχρής και αποστειρωμένης 3 M LiCl - 6 M ουρίας προστέθηκαν σε κάθε ίζημα, στροβιλίστηκε για 2 min και φυγοκεντρήθηκε αμέσως όπως παραπάνω. Τα υπερκείμενα αφαιρέθηκαν και κάθε ίζημα διαλύθηκε με στροβιλισμό σε 3 ml διαλύματος, που περιείχε 10 mM Tris pH 7.6, 1 mM EDTA pH 8.0 και 0.5% SDS. Ένας ίσος όγκος εξισορροπημένης φαινόλης και ένας ίσος όγκος από χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (24:1) προστέθηκαν σε κάθε ένα από τα διαλυμένα ιζήματα, στροβιλίστηκαν και εκχυλίστηκαν για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση. Τα διαλύματα φυγοκεντρήθηκαν στις 3.500 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και τα υπερκείμενα μεταφέρθηκαν σε καθαρούς, αποστειρωμένους σωλήνες falcon των 15 ml και στη συνέχεια εκχυλίστηκαν άλλη μια φορά όπως παραπάνω. Τα υπερκείμενα μεταφέρθηκαν σε καθαρούς, αποστειρωμένους σωλήνες falcon των 15 ml και

1/10 του όγκου τους από 3M οξικού νατρίου pH5.2 και 2 όγκοι παγωμένης 100% αιθανόλης προστέθηκαν και τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C για όλο το βράδυ, έτσι ώστε να καθιζάνουν τα ολικά κυτταρικά RNAs. Τα RNAs συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm για 30 min στους 4°C. Τα ιζήματα των RNA πλύθηκαν με 75% ψυχρή αιθανόλη και ύστερα από φυγοκέντρηση όπως παραπάνω, διαλύθηκαν σε αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό, το οποίο είχε επεξεργαστεί με διαίθυλο-πυροκαρβόνιο (DEPC) και η συγκέντρωσή τους υπολογίστηκε φασματοφωτομετρικά στα 280 nm. Η καθαρότητα και η ποιότητα των δειγμάτων RNA υπολογίστηκε από την αναλογία των απορροφήσεων του στα 260 και 280 nm, το οποίο θα έπρεπε να είναι ανάμεσα στο 1.7 - 2.0, και ηλεκτροφορώντας τα δείγματα σε 1% πηκτή αγαρόζης.

2.16 Αντίδραση αντίστροφης τρανσκριπτάσης/πολυμεράσης [Reverse transcriptase/polymerase chain reaction (RTPCR)]

Κάθε ολικό RNA μετατράπηκε σε cDNAs με τη Superscript-III αντίστροφη τρανσκριπτάση (Invitrogen). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή σε όγκο 20 µl, ο οποίος περιείχε 1 µg ολικού RNA, 2XRT διάλυμα αντίδρασης (2.5 µM όλιγο-dT₂₀, 2.5 ng/µl τυχαία εξαμερή 10 mM MgCl₂ and dNTPs), 2 µl μίγμα ενζύμων (Superscript-III RT και RNaseOUT) και αποστειρωμένο, αποσταγμένο νερό επεξεργασμένο με DEPC. Οι σωλήνες επώαστηκαν σε Hybaid Combi (TR2) θερμικό αντιδραστήρα στους 25°C για 10 min και στη συνέχεια στους 50°C για 30 min. Η αντίδραση έλαβε τέλος ύστερα από επώαση στους 85°C για 5 min και οι σωλήνες εναποτέθηκαν σε πάγο. 1 µl (2 U) από *E. coli* RNάση Η προστέθηκε στους 37°C για 20 min και τα δείγματα cDNA αποθηκεύτηκαν στους -20°C για όλο το βράδυ.

Ύστερα από μια θερμική απενεργοποίηση για 5 min στους 95°C, τα cDNAs ενισχύθηκαν σε ένα διάλυμα αντίδρασης όγκου 100 µl. Το διάλυμα αντίδρασης περιείχε 100 ng cDNA, 1 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 0.5 µl *Taq* Πολυμεράσης (Promega UK), 1 µM εμπρόσθιων και 1 µM αντίστροφων εκκινήτριων σε 1X διάλυμα αντίδρασης. Οι αντιδράσεις PCR

πραγματοποιήθηκαν σε ένα θερμικό αντιδραστήρα Hybaid Combi (TR2) ως ακολούθως: ένας κύκλος στους 95°C (2 min) και 72°C (2 min), 35 κύκλοι στους 95°C (1 min), 55°C (1 min) και 72°C (1.5 min) ακολουθούμενος από έναν κύκλο στους 72°C για 5 min. Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1.2% και σημάνθηκαν με βρωμιούχο αιθίδιο.

Οι αλληλουχίες των PCR εκκινήσεων για κάθε mRNA ήταν οι ακόλουθοι:

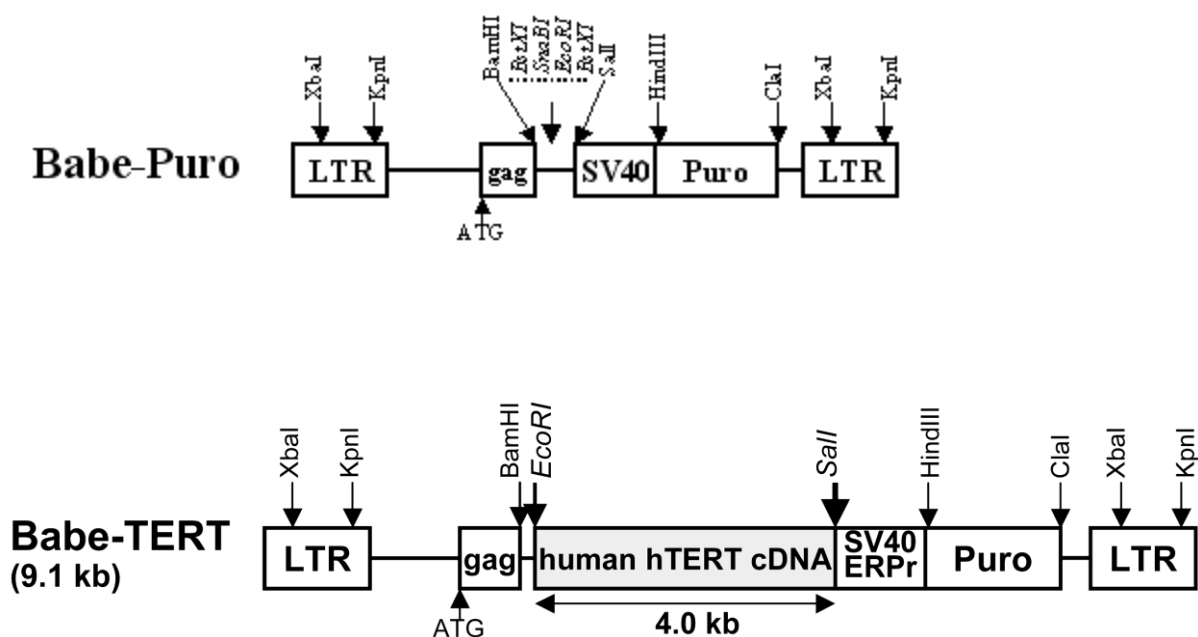
Ανθρώπινη IκΒα:F (5'-GCTGAAGAAGGAGCGGCTA-3') και R (5'-CTGGCTGGTTGGTGATCA-3'); Ανθρώπινη IL-6: F (5'-GCCACTCACCTCTTCAGAA-3') και R (5'-GTACTCATCTGCACAGCTCT-3'); Ανθρώπινη MCP-1/CCL2: F (5'-GCATGAAAGTCTCTGCCG-3') και R (5'-GAGTGTTCAAGTCTTCGGA-3') και ανθρώπινη GAPDH (μάρτυρας/ομαλοποιητής): F (5'-TGGTATCGTGGAAGGACTCA-3') και R (5'-GCAGGGATGATGTTCTGGA-3').

2.17 Εισαγωγή γονιδίων σε κύτταρα θηλαστικών

(A) Ρετροϊικοί φορείς (Retroviral vectors)

Φυσιολογικές ανθρώπινες ινοβλάστες MRC-5, ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα A549 και δυο κυτταρικές σειρές πλακωδών καρκινικών κυττάρων κεφαλής και λαιμού UT-SCC-60A and UT-SCC-60B, επιμολύνθηκαν με αμοτροπικούς ρετροϊικού φορείς έκφρασης, όπως περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω (παρ. 2.6). Φυσιολογικές ανθρώπινες ινοβλάστες MRC-5 επιμολύνθηκαν με αμοτροπικούς ρετροϊικούς φορείς έκφρασης που έφεραν την καταλυτική υπομονάδα της ανθρώπινης τελομεράσης *hTERT* (Babe-Puro/*hTERT*; ευγενική προσφορά της J. Campisi, Lawrence Berkley National Laboratory, California) Αντίστοιχα, κατά τον ίδιο τρόπο κατασκευάστηκαν και οι κυτταρικές σειρές ανθρώπινου πνεύμονα A549 BIN, A549 IBIN, A549 GL2, A549 IKK α ^{KD}, A549 IKK β ^{KD}, A549 GFP, A549 IKK β _{ca} και οι κυτταρικές σειρές καρκινικών κυττάρων κεφαλής και λαιμού UT-SCC-60A GL2, UT-SCC-60A IKK α ^{KD}, UT-SCC-60B GL2 και UT-SCC-60B IKK α ^{KD}.

Οι ρετροϊικοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:



Εικόνα 9. Ρετροϊικοί φορείς έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης τελομεράσης. Στον ρετροϊό ελέγχου Babe-Puro κλωνοποιήθηκε στη θέση EcoRI το ανθρώπινο cDNA της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης για την κατασκευή του ρετροϊικού φορέα Babe-TERT.

pCLXSN: Είναι ένας πρότυπος ρετροϊικός φορέας έκφρασης που φέρει τα γονίδια *EGFP* (*Renilla* Enhanced Green Fluorescent Protein; πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη) και της φωσφομεταφοράσης της νεομυκίνης (*Neo*) (*E. coli* Tn5 Neomycin Phosphotransferase) που επιφέρει ανθεκτικότητα στο συνθετικό αντιβιοτικό G418, ως μάρτυρες επιλογής των επιμολυσμένων κυττάρων, κάτω από τον μεταγραφικό έλεγχο του προαγωγέα pIRES (Internal Ribosome Entry Segment) του ιού της εγκεφαλομυοκαρδίτιδας (encephalomyocarditis virus; ECMV). Το συνθετικό αντιβιοτικό G418 παρεμποδίζει την πρωτεϊνοσύνθεση και φονεύει κύτταρα θηλαστικών. Το γονίδιο *Neo* φωσφορυλιώνει το G418 και το απενεργοποιεί επιτρέποντας έτσι σε κύτταρα θηλαστικών που φέρουν το *Neo* να επιβιώνουν παρουσία του G418. Επιπλέον φέρει την αλληλουχία Flag για την αναγνώριση της έκφρασης

του προϊόντος ενός γονιδίου που μπορεί να κλωνοποιηθεί μετά απ' αυτήν την αλληλουχία στη θέση κλωνοποίησης *EcoRI*. Το κλωνοποιημένο γονίδιο θα εκφράζεται από την 5' μακριά επαναλαμβανομένη αλληλουχία (5' Long Terminal Repeat; LTR) του ρετροϊού του σαρκώματος του ποντικού (Murine Sarcoma Virus; MSCV) (Εικόνα 10).

pCLXSN-IKKβT: Βασίζεται στον πρότυπο ρετροϊκό φορέα CLXSN και φέρει, επιπλέον των *EGFP* και *Neo*, μια μεταλλαγμένη μορφή της ΙΚΚβ στο βρόγχο ενεργοποίησης-Τ της καταλυτικής περιοχής της κινάσης (Σχήμα 6.1Γ) που εκφράζεται από την 5' LTR του ρετροϊού του MSCV. Ειδικότερα, οι σερίνες S177 και S181 έχουν αντικατασταθεί από αλανίνες (Delhase et al., 1999) με αποτέλεσμα η ΙΚΚβΤ να εμφανίζει ιδιοσυστατική ενεργότητα. Η εισαγωγή του γονιδίου *IKKβT* στα κύτταρα θα οδηγήσει στην ενεργοποίηση του NF-κΒ ακόμη και απουσία εξωγενούς σήματος (Εικόνα 10).

pIBIN: Φέρει, επιπλέον του γονιδίου *Neo*, μια μεταλλαγμένη μορφή της ανθρώπινης πρωτεΐνης IκΒα στις σερίνες 32 και 36 που δεν φωσφορυλιώνεται και δεν αποικοδομείται. Η εισαγωγή του υπερκαταστολέα *IκΒαSR* στα κύτταρα θα καταστείλει τον NF-κΒ ακόμη και παρουσία εξωγενούς σήματος (Εικόνα 10).

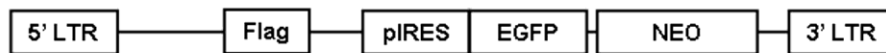
GL2: Βασίζεται στον πρότυπο ρετροϊκό φορέα pSuper.Retro-Puro (pSR-Puro) της Oligoengine και χρησιμοποιείται ευρέως για την κλωνοποίηση μικρών ολιγονουκλεοτιδίων [small hairpin (sh) loop oligonucleotides] προκειμένου να μειορρυθμιστεί η έκφραση ενός ενδογενούς γονιδίου σε κύτταρα θηλαστικών. Ο pSR-Puro αυτό-απενεργοποιείται σε σχέση με την αντιγραφή του λόγω της απάλειψης στη 3' LTR, και εκφράζει το ολιγονουκλεοτίδιο από τον προαγωγέα H1, ενώ το γονίδιο της πουρομυκίνης (*Puro*) από τον προαγωγέα της PGK. Ο ρετροϊκός φορέας GL2 φέρει ένα sh ολιγονουκλεοτίδιο για τη λουσιφεράση (sh Luciferase; sh Luc) (Olivotto et al., 2008) (Εικόνα 11).

A1836 (#IKKα): Βασίζεται στον πρότυπο ρετροϊκό φορέα pSR-Puro και φέρει ένα sh ολιγονουκλεοτίδιο για το ανθρώπινο γονίδιο της *IKKα* (sh IKKα) (Olivotto et al., 2008) (Εικόνα 11).

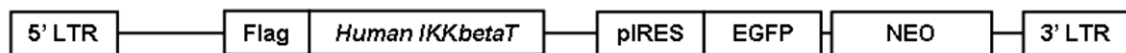
P1 (#IKKβ): Βασίζεται στον πρότυπο ρετροϊκό φορέα pSR-Puro και φέρει ένα sh ολιγονουκλεοτίδιο για το ανθρώπινο γονίδιο της *IKKβ* (sh IKKβ) (Olivotto et al., 2008) (Εικόνα 11).

Όλοι οι ρετροϊικοί φορείς, CLXSN, CLXSN-IKKbetaT, IBIN, pSR-Puro, GL2, A1836 (#IKKα) και P1 (#IKKβ) ήταν ευγενική προσφορά του Καθηγητή Κυτταρικής Βιολογίας και Βιοχημείας Kenneth B. Marcu του Πολιτειακού Πανεπιστημίου της Νέας Υόρκης στο Stony Brook, USA και του Κέντρου Βιοϊατρικής Έρευνας του Πανεπιστημίου της Μπολόνια, Ιταλία.

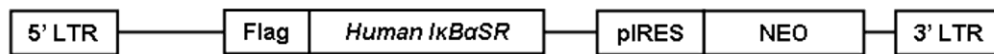
pCLXSN



pCLXSN-IKKbetaT

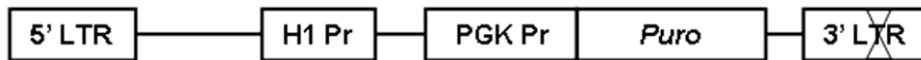


pIBIN



Εικόνα 10: Σχηματική παράσταση των ρετροϊικών φορέων έκφρασης για την ενεργοποίηση (IKKβT) ή απενεργοποίηση (IκBαSR) του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Το γονίδιο NEO κωδικοποιεί τη φωσφομεταφορά της νεομυκίνης που επιφέρει ανθεκτικότητα στο συνθετικό αντιβιοτικό G418.

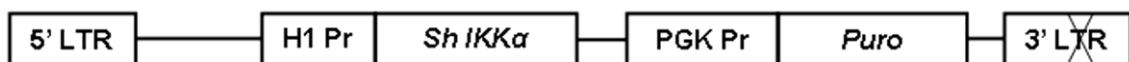
pSuper.Retro-Puro



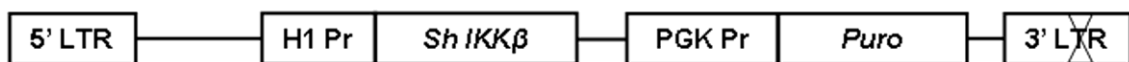
GL2



A1836 (#IKKα)



P1 (#IKKβ)



Εικόνα 11: Σχηματική παράσταση των ρετροϊκών φορέων έκφρασης για τη μειορρύθμιση της IKKα ή IKKβ. IKKα και IKKβ είναι δύο ενεργοποιητές του NF-κB, που κωδικοποιούν κινάσες σερίνης/θρεονίνης ή ο πρότυπος ρετροϊκός φορέας που φέρει shRNAi για τη λουσιφεράση (GL2). Για την κλωνοποίηση των Sh ολιγονουκλεοτιδίων (small hairpin loop oligonucleotides) χρησιμοποιήθηκε ο πρότυπος φορέας pSuper.Retro-Puro της Oligoengine. Το γονίδιο Puro επιφέρει ανθεκτικότητα στην πουρομυκίνη (Olivotto et al., 2008).

(B) Κατασκευή ανθρωπίνων επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα A549 που εκφράζουν τα επιθυμητά γονίδια

Παραγωγή ρετροϊών με διαμόλυνση DNA

Για την παραγωγή ρετροϊών χρησιμοποιήθηκε η αμοτροπική κυτταρική σειρά πακεταρίσματος ρετροϊών Phoenix (ΦNX) η οποία διαμολύνθηκε με τους επιθυμητούς ρετροϊκούς φορείς με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου (Gonos et al., 1994; Kolettas et al., 1994). Τα ρετροϊκά σωματίδια που προέκυψαν μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων ΦNX χρησιμοποιήθηκαν

για την επιμόλυνση των κυττάρων A549 (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. Περιληπτικά, έγινε σπορά 3×10^6 κύτταρα ΦΝΧ ανά 6 cm τρυβλίο και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C, 5%CO₂. 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 ρετροϊικούς φορείς. Στη συνέχεια αναμίχθηκαν με δίνη (vortex) 15 μg ρετροϊικού DNA σε 1XTE pH8.0 με 31 μl 2M CaCl₂ και αποστειρωμένο δις-αποσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 250 μl. Το μίγμα προστέθηκε στάγδην και υπό χαμηλή συνεχή ανάδευση, σε 250 μl αποστειρωμένου διαλύματος 2X HBS pH7.12. Το καθαρό (διαφώτιστο; translucent) ίζημα συμπλεγμάτων DNA-CaPO₄ που σχηματίσθηκε (όγκος 500 μl) προστέθηκε αμέσως στάγδην στα κύτταρα που τοποθετήθηκαν αμέσως στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5%CO₂, 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 5 ml DMEM που περιείχε αντιβιοτικά και L-γλουταμίνη χωρίς ορό. Μετά τη προσθήκη 4 ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM, τα διαμολυσμένα κύτταρα ΦΝΧ επώαστηκαν στους 37°C, 5%CO₂ για 24 - 48 ώρες πριν τη συλλογή των ρετροϊικών σωματιδίων για την επιμόλυνση των κυττάρων MRC-5 και IMR-90.

2XHBS, pH 7.12: 50mM Hepes, 280mM NaCl, 15mM Na₂HPO₄, pH 7.12

10 mg/ml πολυβρίνη σε αποστειρωμένο δις-αποσταγμένο νερό

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

Επιμόλυνση των κυττάρων A549 με τους ρετροϊούς

Οι ανασυνδυασμένοι ρετροϊοί ελαττωματικής αντιγραφής (replication-defective recombinant retroviruses) που παράχθηκαν με τη διαμόλυνση των κυττάρων ΦNX με τους ρετροϊικούς φορείς χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση των κυττάρων A549 όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Kolettas and Rosenberger 1998).

Περίληπτικά η διαδικασία πραγματοποιείται σε δύο βασικά στάδια:

- (i) Το θρεπτικό υλικό των διαμολυσμένων κυττάρων ΦNX που περιείχε τα ρετροϊικά σωματίδια συλλέχθηκε μετά από 24 ώρες και φιλτραρίστηκε διαμέσου ενός μικροφίλτρου 0.45μm (Sartorius). Στα 4 ml του διηθήματος προστέθηκε πολυβρίνη σε τελική συγκέντρωση 8 μg/ml, τα οποία στη συνέχεια προστέθηκαν στα κύτταρα A549 (βλέπε ii).
- (ii) Έγινε σπορά 5×10^5 κυττάρων A549 σε φλάσκες 25cm² και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C, 5%CO₂. Μετά την επώαση το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με το διήθημα (4 ml) από τα διαμολυσμένα κύτταρα ΦNX (βλέπε i) και η επώαση στους 37°C, 5%CO₂ συνεχίστηκε για 8 ώρες. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό με τους ρετροϊούς αντικαταστάθηκε και προστέθηκαν στα κύτταρα 5 ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM και η επώαση συνεχίστηκε στους 37°C, 5%CO₂ για 2-3 επιπλέον ημέρες.

Μετά την επώαση το θρεπτικό υλικό ανανεώθηκε πάλι με 5 ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM που περιείχε το αντιβιοτικό επιλογής των επιμολυσμένων κυττάρων A549 και η επώαση συνεχίστηκε στους 37°C, 5%CO₂ για 10-14 ημέρες για την επιλογή σταθερών κυτταρικών πληθυσμών. Η επιλογή των επιμολυσμένων κυττάρων A549 έγινε σε 1 μg/ml πουρομυκίνη για 14 ημέρες, σε 150 μg/ml G418 ή 25 - 50 μg/ml Hygro B για 21 ημέρες. Το

θρεπτικό υλικό με το αντιβιοτικό επιλογής ανανεώνονταν κάθε 3 - 4 ημέρες καθ' όλη τη διάρκεια της επιλογής των επιμολυσμένων κυττάρων.

(Γ) Κυτταρικοί πληθυσμοί ανθρώπινων επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549 που κατασκευάστηκαν

Κατασκευάστηκαν οι κυτταρικοί πληθυσμοί ανθρώπινων κυττάρων, που αναφέρονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5 Κατασκευή κυτταρικών πληθυσμών ανθρώπινων επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549 που εκφράζανε διαφορετικά γονίδια		
Κύτταρα	Ρετροϊκός Φορέας	Κατασκευή
A549	CLXSN-GFP-Neo	A549 Neo
A549	IBIN	A549 IκBaSR
A549	GL2	A549 #Luc
A549	A1836	A549 #IKKα
A549	P1	A549 #IKKβ
A549	CLXSN-GFP-Neo	A549 Neo
A549	CLXSN-IKKbetaT	A549 IKKβT
MRC-5	Babe-Puro/hTERT	MRC-5 TERT
UT-SCC-60A	GL2	UT-SCC-60A #Luc
UT-SCC-60A	A1836	UT-SCC-60A #IKKα
UT-SCC-60B	GL2	UT-SCC-60B #Luc
UT-SCC-60B	A1836	UT-SCC-60B #IKKα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

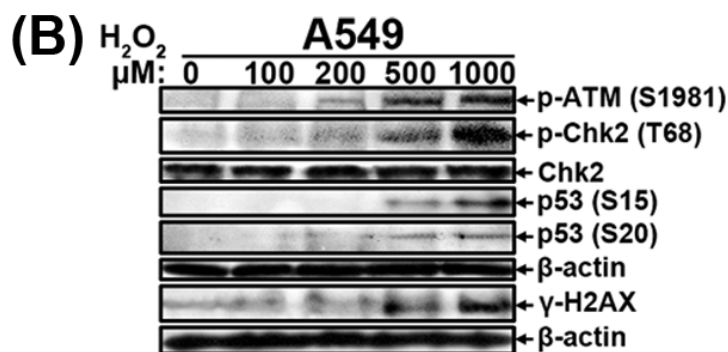
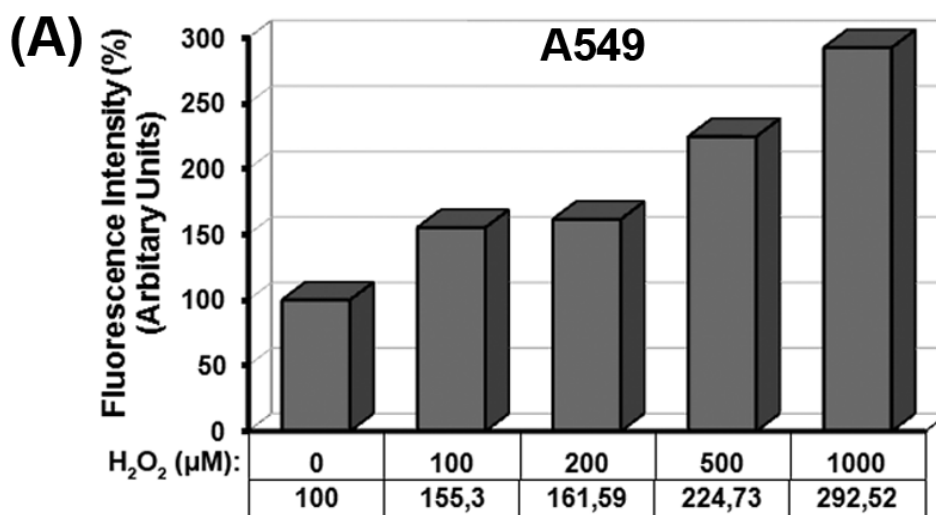
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

**Ο ρόλος του NF-κΒ στις αποκρίσεις των κυττάρων στο
οξειδωτικό στρες που επάγεται από το H₂O₂**

3.1 Η χορήγηση H₂O₂ είχε ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση των ενδογενών επιπέδων ΔΜΟ και εκκίνησε μια απόκριση σε βλάβες στο DNA

Αρχικά αναλύσαμε της επιδράσεις της χορήγησης H₂O₂ στη συσσώρευση των ενδογενών ΔΜΟ. Τα επίπεδα των ενδογενών ΔΜΟ προσδιορίστηκαν όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι, ύστερα από τη χορήγηση H₂O₂ σε συγκεντρώσεις 0 - 1000 μM H₂O₂ για 2 h (Σχ. 1Α). Τα ενδογενή επίπεδα ΔΜΟ συσσωρεύτηκαν στα κύτταρα A549 με ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο ως απόκριση στις αυξανόμενες δόσεις H₂O₂.

Στη συνέχεια, διερευνήσαμε το κατά πόσο τα αυξημένα επίπεδα των ενδογενών ΔΜΟ, ως απόκριση στη χορήγηση H₂O₂, εκκίνησαν μια απόκριση σε βλάβες στο DNA (DDR). Για το σκοπό αυτό, αναλύσαμε την έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στην DDR (Σχ. 1Α). Το H₂O₂ επήγαγε τη φωσφορυλίωση των ATM (σερίνη1981), Chk2 (θρεονίνη68), p53 κυρίως στη σερίνη15 και σε λιγότερο βαθμό στη σερίνη20 και γ-H2AX σε συγκέντρωση 500 μM H₂O₂ ένα φαινόμενο που ήταν ισχυρότερο ύστερα από τη χορήγηση 1000 μM H₂O₂. Επομένως, η συσσώρευση των ΔΜΟ ενεργοποίησε μια πορεία απόκρισης σε βλάβες στο DNA (DDR) στα κύτταρα A549.



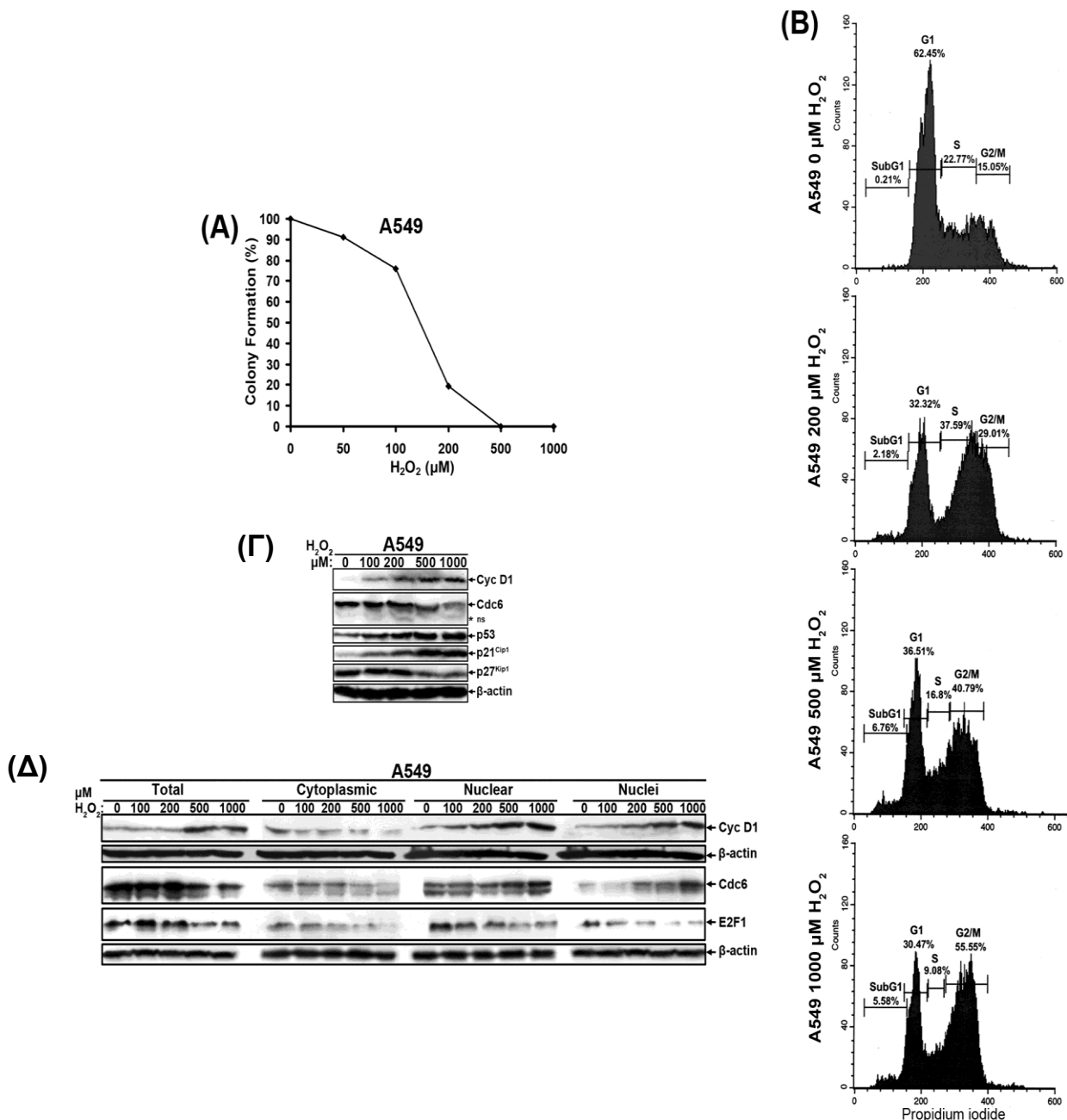
Σχήμα 1. Το H₂O₂ επήγαγε τη συσσώρευση των ΔΜΟ και την απόκριση σε βλάβες στο DNA. **(A)** Στα κύτταρα A549 χορηγήθηκε H₂O₂ σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0 - 1000 μM) και υπολογίστηκαν τα ενδογενή επίπεδα ΔΜΟ στα ύστερα από τη χορήγηση H₂O₂ με τη χρήση της ουσίας C2938. **(B)** Πραγματοποιήθηκε ανάλυση με άνοσο-αποτύπωμα κατά western για τον έλεγχο της έκφρασης επιλεγμένων πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στις αποκρίσεις των κυττάρων σε βλάβες στο DNA, όπως ATM, φώσφο-ATM (Ser1981), Chk2, φώσφο-Chk2 (T68), φώσφο-p53 (Ser15 & Ser20) και γ-H2AX ή β-ακτίνη.

3.2 Η χορήγηση H₂O₂ ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επήγαγε τη συσσώρευση των κυττάρων A549 στη G2-M φάση του κυτταρικού κύκλου

Στη συνέχεια καθορίσαμε τις μακροχρόνιες επιδράσεις της χορήγησης H₂O₂ στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων A549, πραγματοποιώντας προσδιορισμό ανάπτυξης αποικιών (clonogenic survival assay). Κύτταρα A549 καλλιεργήθηκαν σε χαμηλή πυκνότητα και τους χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις H₂O₂ που κυμαίνονταν από 0 - 1000 μM για 2 h. Το H₂O₂ αφαιρέθηκε και τα κύτταρα αφέθηκαν να αναπτυχθούν για ένα χρονικό διάστημα 14άρων ημερών με τακτικές αλλαγές πλήρους θρεπτικού υλικού ανάμεσα (κάθε 2-3 μέρες). Οι αποικίες που σχηματίστηκαν σταθεροποιήθηκαν, υπέστησαν χρώση και καταμετρήθηκαν. Η χορήγηση H₂O₂ στα κύτταρα A549 μείωσε το σχηματισμό των αποικιών με ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (Σχ. 2A), υποδηλώνοντας πως το H₂O₂ ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Εν συνεχεία, καθορίσαμε τις επιδράσεις του H₂O₂ στον κυτταρικό κύκλο των κυττάρων A549 στα οποία χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0 - 1000 μM) H₂O₂ για 2 h. Ανάλυση των κυττάρων A549 24 h μετά τη χορήγηση H₂O₂, με κυτταρομετρία ροής ιωδιούχου προπιδίου, έδειξε πως το H₂O₂ επήγαγε τη συσσώρευση των κυττάρων A549 στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου, παράγοντας ταυτόχρονα ενδείξεις απόπτωσης, με ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (Σχ. 2B).

Στη συνέχεια, αναλύσαμε με άνοσο-αποτύπωμα κατά western την έκφραση επιλεγμένων ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης, σε κυτταρικά εκχυλίσματα των κυττάρων A549, τα οποία απομονώθηκαν 24 h μετά τη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων (0 - 1000 μM) H₂O₂ για 2 h (Σχ. 2Γ). Ενώ η έκφραση της κυκλίνης D1 αυξορρυθμίστηκε στα κύτταρα A549 μετά τη χορήγηση H₂O₂ με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, η έκφραση της Cdc6 παρουσίασε μια μικρή μειορρύθμιση, στις θανατηφόρες, υψηλές συγκεντρώσεις H₂O₂ των 500 και 1000 μM (Σχ. 2Γ). Ακόμα, το H₂O₂ επήγαγε δόσο-εξαρτώμενα την έκφραση της p53 και της πρωτεΐνης-στόχου της p21^{Cip/Waf1}, ενώ η έκφραση της p27^{Kip1} παρουσίασε μείωση (Σχ. 2Γ). Καθώς πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως η p53 ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση της Cdc6 (Druusma and Agami, 2005), τα παραπάνω

στοιχεία υποδήλωσαν πως η μειορρύθμιση της Cdc6 δεν συσχετιζόταν άμεσα με την αυξορρύθμιση της έκφρασης της p53 από το H₂O₂. Για την περαιτέρω μελέτη των επιδράσεων του H₂O₂ στην έκφραση των επιλεγμένων ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου, αναλύθηκαν ολικά, κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα και ολικές πρωτεΐνες από απομονωμένους πυρήνες, έτσι ώστε να διερευνηθεί τόσο η έκφραση όσο και η υπό-κυτταρική κατανομή της κυκλίνης D1 και της Cdc6, καθώς και του μεταγραφικού παράγοντα E2F1, καθώς το γονίδιο της Cdc6 αποτελεί μεταγραφικό στόχο του E2F1 (Hateboer et al., 1998; Ohtani et al., 1998; Yan et al., 1998). Αρχικά, επαληθεύσαμε πως η χορήγηση H₂O₂ σε συγκεντρώσεις 500 και 1000 μM επήγαγε την έκφραση της κυκλίνης D1 και τη μικρή μειορρύθμιση της Cdc6 σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα (Σχ. 2Δ). Ωστόσο, η υπό-κυτταρική κλασματοποίηση των κυτάρων A549 αποκάλυψε ότι το H₂O₂ επήγαγε την πυρηνική συσσώρευση των πρωτεϊνών κυκλίνης D1 και Cdc6 με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (Σχ. 2Δ). Παρά το ότι η μειορρύθμιση της έκφρασης της E2F1 από το H₂O₂ συμφωνούσε με τη μειορρύθμιση της έκφρασης της Cdc6 στα ολικά και κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα, ένα αντίθετο φαινόμενο ανιχνεύθηκε στα πυρηνικά εκχυλίσματα όπου η μειορρύθμιση της έκφρασης της E2F1 συσχετιζόταν με την πυρηνική συσσώρευση της Cdc6, ως απόκριση στη χορήγηση H₂O₂ (Σχ. 2Δ). Επομένως, η κατανομή της έκφρασης των p53 και E2F1 δε συσχετιζόταν με το προφίλ της έκφρασης της Cdc6 υποδηλώνοντας, πως επιπλέον της θετικής ρύθμισης της έκφρασης της Cdc6 από τον E2F1 (Hateboer et al. 1998; Ohtani et al., 1998; Yan et al., 1998) και της αρνητικής ρύθμισης της από την p53 (Druusma and Agami, 2005), επιπρόσθετοι παράγοντες ή μηχανισμοί λειτουργούν, έτσι ώστε να ρυθμίσουν την έκφραση της Cdc6 ως απόκριση στο H₂O₂. Συνολικά, τα δεδομένα αυτά έδειξαν, πως η χορήγηση H₂O₂ οδήγησε στη συσσώρευση των ενδογενών επιπέδων ΔΜΟ και στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, προάγοντας τη συσσώρευση των κυτάρων A549 στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου.



Σχήμα 2. Αποκρίσεις των κυττάρων A549 στο H_2O_2 . (A) Προσδιορισμός ανάπτυξης αποικιών (clonogenic survival assay), για να καθοριστούν οι επιδράσεις των αυξανόμενων συγκεντρώσεων H_2O_2 στο σχηματισμό αποικιών, σε ένα διάστημα 14ων ημερών. (B) Στα κύτταρα A549 χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις H_2O_2 (0 - 1000 μM) και υποβλήθηκαν σε ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής με τη χρήση χρώσης PI, έτσι ώστε να διερευνηθούν οι επιδράσεις του H_2O_2 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. (C) Ανάλυση με ανοσο-αποτύπωμα κατά western επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου (κυκλίνη D1, Cdc6, p53 και p21^{Cip1/Waf1} ή β -ακτίνης) σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα A549 μετά τη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων (0 - 1000 μM) H_2O_2 . (D) Ανάλυση με ανοσο-αποτύπωμα κατά western της έκφρασης της κυκλίνης D1, Cdc6, και E2F1 ή β -ακτίνης σε ολικά, κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα και σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από απομονωμένους πυρήνες των κυττάρων A549 μετά την έκθεσή τους σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0 - 1000 μM) H_2O_2 .

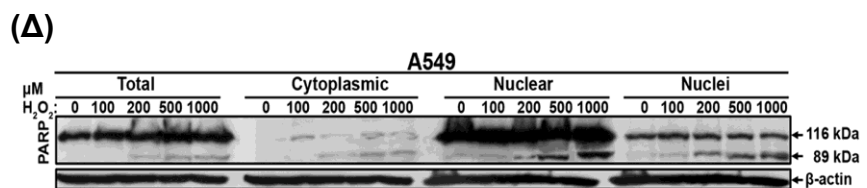
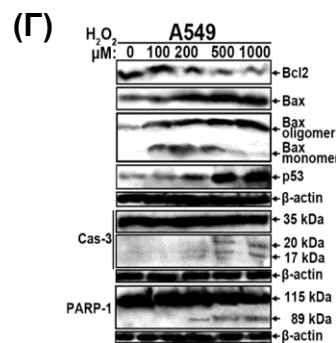
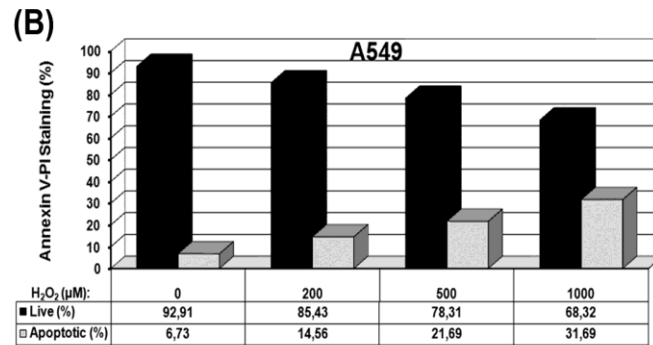
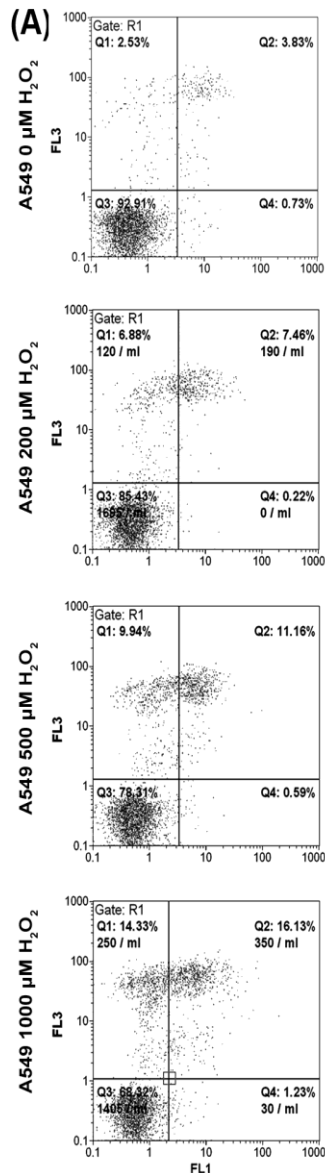
3.3 Η χορήγηση H₂O₂ επήγαγε την απόπτωση στα κύτταρα A549

Επειδή η πρόκληση βλαβών στο DNA μπορεί να οδηγήσει είτε στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή στην επαγωγή της απόπτωσης ή και στα δυο (Harper and Elledge, 2007) και λόγω του ότι η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου αποκάλυψε μια αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων A549 στη φάση sub-G1, ως απόκριση στη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων H₂O₂ (Σχ. 2B), διερευνήσαμε το κατά πόσο το H₂O₂ επήγαγε την απόπτωση στα κύτταρα A549 χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής με αννεξίνη V/PI (Σχ. 3A). Η ανάλυση έδειξε πως υπήρχε μια προοδευτική αύξηση των αποπτωτικών κυττάρων, τόσο των πρώιμα όσο και των όψιμα αποπτωτικών κυττάρων, από 6,73% στα κύτταρα, στα οποία δεν είχε χορηγηθεί H₂O₂ σε 14,56%, 21,69% και 31,69% στα κύτταρα A549, στα οποία χορηγήθηκαν 200, 500 και 1000 μM H₂O₂, αντίστοιχα (Σχ. 3A και B). Επιπλέον, δείχτηκε, πως η αύξηση των αποπτωτικών κυττάρων οφειλόταν στην αύξηση των όψιμα αποπτωτικών-νεκρωτικών κυττάρων (αννεξίνη V⁺/PI⁺ κύτταρα; πάνω δεξιά τεταρτημόριο) και των νεκρωτικών κυττάρων (αννεξίνη V⁻/PI⁺ κύτταρα; πάνω αριστερά τεταρτημόριο), ανάλογα με τις αυξανόμενες συγκεντρώσεις H₂O₂ (Σχ. 3A & B).

Σε μια προσπάθεια να συσχετίσουμε τα δεδομένα της κυτταρομετρίας ροής αννεξίνης-V/ιωδιούχου προπιδίου με μοριακές μεταβολές, μελετήθηκε η έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης, σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα των κυττάρων A549, που απομονώθηκαν 24 h μετά την έκθεσή τους σε 0 - 1000 μM H₂O₂ για 2 h (Σχ. 3Γ). Η χορήγηση H₂O₂ στα κύτταρα A549 είχε ως αποτέλεσμα τη μειορρύθμιση της έκφρασης της Bcl-2, την αυξορρύθμιση της έκφρασης της ολικής Bax (γονιδίου-στόχου της p53) και την επαγωγή του ολιγομερισμού της που συσχετιζόταν με τη σύγχρονη μείωση της έκφρασης της μονομερούς Bax, με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (Σχ. 3Γ). Επομένως, η χορήγηση H₂O₂ μετέβαλε την αναλογία των αντί-αποπτωτικών έναντι των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2, προς όφελος των δεύτερων. Επιπλέον, η χορήγηση H₂O₂ επήγαγε την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP-1, η οποία αποτελεί υπόστρωμα της κασπάσης-3, με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (Σχ. 3Γ). Η πρωτεολυτική διάσπαση

της PARP-1 επιβεβαιώθηκε, επίσης, σε ολικά, κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα και σε ολικές πρωτεΐνες από απομονωμένους πυρήνες των κυττάρων A549 μετά τη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων H_2O_2 . Στα ολικά εκχυλίσματα των κυττάρων A549, που είχε χορηγηθεί H_2O_2 ανιχνεύθηκαν η ανέπαφη 116 kDa μορφή της PARP-1 αλλά και η πρωτεολυτικά διασπασμένη 89 kDa μορφή της, σε σύγκριση με τα κύτταρα, τα οποία δεν είχαν εκτεθεί στο H_2O_2 και στα οποία ανιχνεύθηκε μόνον η 116 kDa μορφή της PARP-1 (Σχ. 3Δ). Ωστόσο, μεγαλύτερη έκφραση και των δύο μορφών της PARP-1 ανιχνεύθηκε στα πυρηνικά εκχυλίσματα των κυττάρων A549 στα οποία είχε χορηγηθεί H_2O_2 και ελάχιστη έκφραση στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων (Σχ. 3Δ). Η πρωτεολυτική διάσπαση της PARP-1 ήταν εμφανής στα 200 μM και έγινε πιο έντονη ιδιαίτερα στα 500 και 1000 μM H_2O_2 (Σχ. 3Δ).

Συμπερασματικά, τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν πως η χορήγηση H_2O_2 , που οδήγησε στη συσσώρευση ΔΜΟ, επήγαγε την απόπτωση των κυττάρων A549 με ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο.



Σχήμα 3. Επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων A549 από το H_2O_2 . (A), (B) Στα κύτταρα A549 χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις H_2O_2 (0 - 1000 μM) και υποβλήθηκαν σε ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής αννεξίνης V/PI, έτσι ώστε να επιτευχθεί η ποσοτικοποίηση της απόπτωσης στη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων H_2O_2 . (Gamma) Ανάλυση με ανοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών (Bcl-2, Bax, p53, Caspase-3, και PARP-1 ή β -ακτίνης) που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιώντας εξειδικευμένα αντισώματα, ως απόκριση στη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων H_2O_2 . (Delta) Ανάλυση με ανοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση της PARP-1 ή β -ακτίνης ως μάρτυρα, σε ολικά, κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα και σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από απομονωμένους πυρήνες ως απόκριση στη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων H_2O_2 .

3.4 Η κατάσταση του NF-κB στα κύτταρα A549 ως απόκριση στη χορήγηση H₂O₂

Ο NF-κB είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ευαίσθητος στην οξειδοαναγωγή, ο οποίος ενεργοποιείται από τυχόν οξειδωτική προσβολή και η ενεργοποίησή του προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση (Gloire et al., 2006a). Για να καθορίσουμε την κατάσταση του NF-κB στα κύτταρα A549 παρουσία / απουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων H₂O₂, διερευνήθηκε με άνοσο-αποτύπωμα κατά western σε ολικά κυτταρικά, κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα και ολικές πρωτεΐνες από απομονωμένους πυρήνες, η έκφραση διαφόρων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στις πορείες ενεργοποίησης/σηματοδότησης του NF-κB (Σχ. 4A).

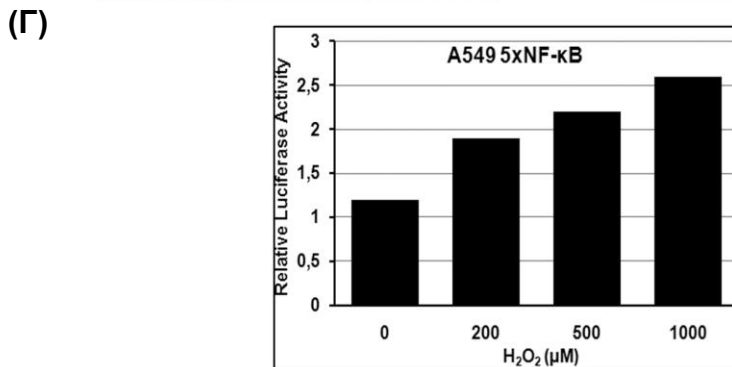
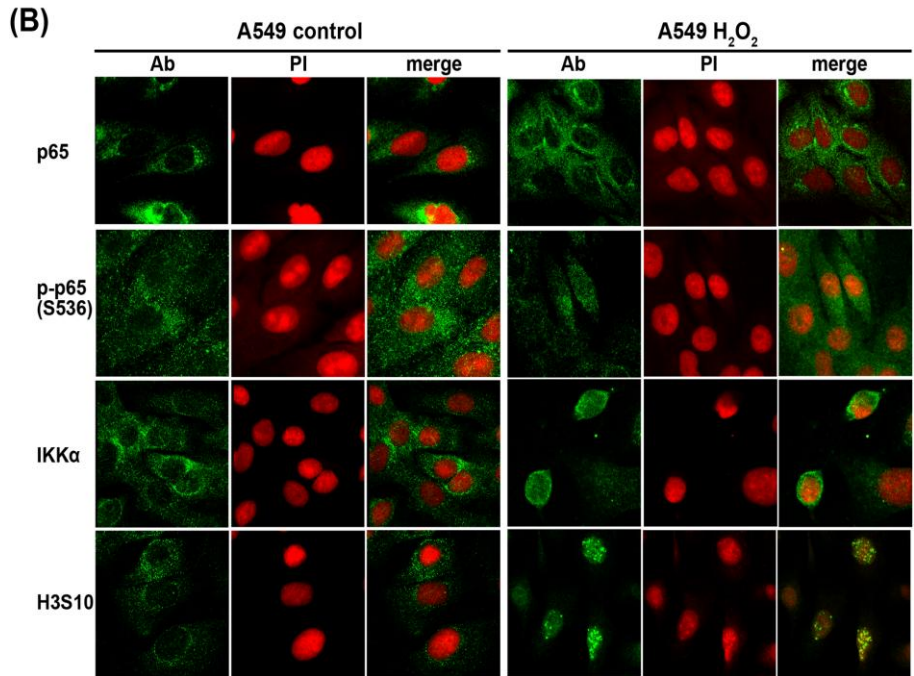
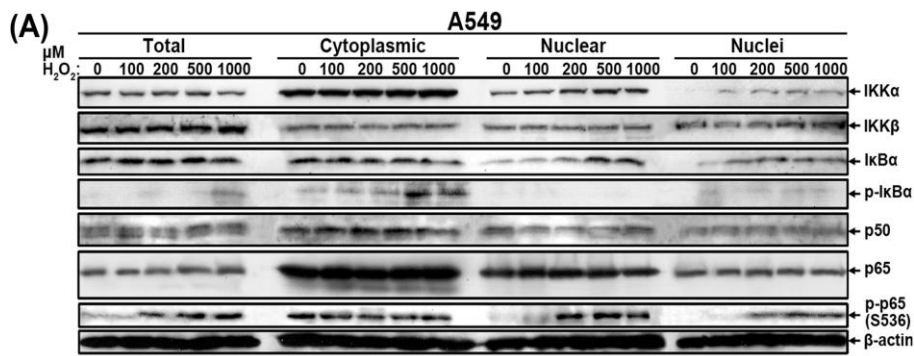
Η έκφραση των IKKα και IKKβ παρατηρήθηκε τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα των κυττάρων A549. Αρχικά, η χορήγηση H₂O₂ δεν επηρέασε τα ολικά επίπεδα έκφρασης είτε της IKKα ή της IKKβ, εκτός από μια ελάχιστη μείωση της έκφρασης της IKKα, που ανιχνεύθηκε ύστερα από τη χορήγηση 1000 μM H₂O₂. Στα εκχυλίσματα ελέγχου, τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της IKKα ήταν υψηλότερα στο κυτταρόπλασμα, ενώ τα επίπεδα έκφρασης της IKKβ ήταν παρόμοια τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Ωστόσο, ως απόκριση στη χορήγηση H₂O₂, η IKKα επέδειξε μια διαφορετική ενδοκυττάρια κατανομή από αυτήν της IKKβ. Ενώ, η χορήγηση H₂O₂ είχε ως αποτέλεσμα μια δόσο-εξαρτώμενη συσσώρευση της IKKα στον πυρήνα, δεν ανιχνεύθηκαν αντίστοιχα σημαντικές μεταβολές στα πυρηνικά επίπεδα έκφρασης της IKKβ (Σχ. 4A). Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν πως η χορήγηση H₂O₂ επήγαγε την πυρηνική συσσώρευση της IKKα με έναν δόσο-εξαρτώμενο τρόπο και υπέδειξαν πως η IKKα μπορεί να έχει έναν επιπρόσθετο πυρηνικό ρόλο στην ανεξάρτητη από τον NF-κB έκφραση γονιδίων, επιπλέον από το ρόλο που έχει στην εξαρτώμενη από τον NF-κB έκφραση γονιδίων (Gloire et al., 2006b).

Στη συνέχεια, μελετήσαμε τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της IκBa και της φωσφορυλιωμένης της μορφής στις σερίνες32/36, ως ένδειξη της ενεργοποίησης της κανονικής πορείας του NF-κB. Μετά τη χορήγηση H₂O₂ σε κύτταρα A549, τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της IκBa μειώθηκαν ελάχιστα μόνο στην υψηλή συγκέντρωση 1000 μM H₂O₂ σε ολικά και κυρίως

στα κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα (Σχ. 4A). Ωστόσο, τα πυρηνικά πρωτεϊνικά επίπεδα της IκBα παρουσίασαν μια δόσο-εξαρτώμενη αύξηση, υποδεικνύοντας πως η χορήγηση H₂O₂ προήγαγε την πυρηνική μετατόπιση και συσσώρευση της IκBα (Birbach et al., 2000; Renard et al., 2000; Enesa et al., 2008). Αυτό το εύρημα είναι ένδειξη της ενεργοποίησης του NF-κB, καθώς η IκBα αποτελεί μεταγραφικό στόχο του NF-κB, και η νέο-συντιθέμενη IκBα μετατοπίζεται στον πυρήνα (Kanarek et al., 2009). Παρόλα αυτά, η φωσφορυλιωμένη μορφή της IκBα (σερίνη 32/36) παρουσίασε μια διαφορετική υπό-κυτταρική κατανομή. Η χορήγηση H₂O₂ προήγαγε τη φωσφορυλίωση της IκBα σε συγκεντρώσεις 500 και 1000 μM, κάτι που παρατηρήθηκε σε ολικά και κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα, αλλά όχι και σε πυρηνικά εκχυλίσματα (Σχ. 4A). Έτσι, παρότι η IκBα παρουσίασε μια συσσώρευση στον πυρήνα με ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο ως απόκριση στη χορήγηση H₂O₂, η φωσφορυλιωμένη της μορφή ανιχνεύθηκε μόνο στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων A549, στα οποία είχε χορηγηθεί H₂O₂. Ενώ η μετατόπιση της IκBα στον πυρήνα μπορεί να ρυθμίζει τη δυναμική και την ένταση της ενεργοποίησης του NF-κB (Birbach et al., 2000; Renard et al., 2000; Enesa et al., 2008; Kanarek et al., 2009), είναι γνωστό ότι η φωσφορυλίωση της IκBα στο κυτταρόπλασμα είναι ένδειξη της ενεργοποίησης του NF-κB (Hayden and Ghosh, 2004).

Στη συνέχεια μελετήσαμε την έκφραση και την ενδοκυττάρια κατανομή των υπομονάδων του NF-κB, p50 και p65, οι οποίες ενεργοποιούνται κυρίως μέσω κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κB. Καταρχάς, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές τόσο στην έκφραση όσο και στην ενδοκυττάρια κατανομή των p50 και p65, ως απόκριση στη χορήγηση H₂O₂. Οι p50 και p65 ανιχνεύθηκαν τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων A549 ανεξάρτητα από την παρουσία του H₂O₂, με τα επίπεδα της έκφρασης τους να είναι υψηλότερα στο κυτταρόπλασμα (Σχ. 4A). Συνοπτικά, ενώ η χορήγηση H₂O₂ δεν επηρέασε τα επίπεδα έκφρασης ούτε και επήγαγε την μετατόπιση στον πυρήνα καμιάς εκ των υπομονάδων του NF-κB p50 ή p65 και οι δυο υπομονάδες ήταν παρούσες τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Ωστόσο, η ανάλυση μέσω ανοσο-αποτυπώματος κατά western έδειξε πως η χορήγηση H₂O₂ επήγαγε τη

φωσφορυλίωση της p65, φώσφο-p65, στη σερίνη536 (p-p65 S536) και τη μετατόπιση της φωσφορυλιωμένης μορφής της στον πυρήνα (Σχ. 4A).



Σχήμα 4. Έλεγχος της έκφρασης των πρωτεϊνών σηματοδότησης των πορειών ενεργοποίησης του NF-κB και της ενεργοποίησης του NF-κB μετά την έκθεση των κυττάρων A549 στο H₂O₂. **(A)** Ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα κατά western για τον έλεγχο της έκφρασης των μορίων που εμπλέκονται στις πορείες σηματοδότησης του NF-κB: IKKα, IKKβ, IκBα, φώσφο-IκBα (Ser32/36), p50, p65 και φώσφο-p65 (Ser536) ή β-ακτίνης ως μάρτυρα, σε ολικά, κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα και σε ολικά πυρηνικά εκχυλίσματα από απομονωμένους πυρήνες, ως απόκριση στη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων H₂O₂. **(B)** Ανοσοφθορισμός και ανίχνευση με συνεστιακή μικροσκοπία με λείζερ για την έκφραση και τον ενδοκυττάριο εντοπισμό των p65, φώσφο-p65 (Ser536), IKKα και H3S10 σε κύτταρα A549 παρουσία / απουσία 200 μM H₂O₂. **(Γ)** Ανάλυση της ενεργότητας του NF-κB μετά τη διαμόλυνση πλασμιδίου που έφερε 5XκB ρυθμιστικά στοιχεία συνδεδεμένα με το γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης στα κύτταρα A549 μετά τη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων (0 - 1000 μM) H₂O₂.

Για να επαληθεύσουμε τις μεταβολές, που επήγαγε το H_2O_2 , χρησιμοποιήσαμε συνεστιακή μικροσκοπία λέιζερ με έμμεσο ανοσοφθορισμό, έτσι ώστε να οπτικοποιήσουμε την ενδοκυττάρια κατανομή των p65, p-p65 S536, IKKα και της φωσφορυλιωμένης μορφής της ιστόνης 3 στη σερίνη 10 (H3S10), η οποία εντοπίζεται στον πυρήνα και αποτελεί υπόστρωμα της IKKα (Σχ. 4B).

Ενώ η χορήγηση H_2O_2 δεν επήγαγε την μετατόπιση της p65 στον πυρήνα, επήγαγε την πυρηνική μετατόπιση της φωσφορυλιωμένης μορφής p-p65 (σερίνη536), η οποία συσχετιζόταν με την πυρηνική συσσώρευση της IKKα και τη φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 στη σερίνη10 (H3S10) στον πυρήνα κυττάρων A549, στα οποία είχε χορηγηθεί H_2O_2 , σε αντίθεση με κύτταρα A549, τα οποία δεν είχαν εκτεθεί στο H_2O_2 (Σχ. 4B).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η ενεργοποίηση του NF-κB από το H_2O_2 , αναλύοντας την ενεργότητα του με τον προσδιορισμό της ενεργότητας της λουσιφεράσης σε εκχυλίσματα από κύτταρα A549 μετά την έκθεση τους σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0 - 1000 μ M) H_2O_2 . Μετά από την παροδική διαμόλυνση των κυττάρων A549 με ένα φορέα που έφερε 5XκB ρυθμιστικά στοιχεία συνδεδεμένα με το γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0 - 1000 μ M) H_2O_2 και αναλύθηκε η ενεργότητα της λουσιφεράσης, η οποία αντιπροσώπευε τη μεταγραφική ενεργότητα του NF-κB (Σχ. 4Γ). Παρότι η ενεργότητα του NF-κB επάχθηκε στα κύτταρα A549 από το H_2O_2 , όσο-εξαρτώμενα, η επαγωγή ήταν μόλις ~2 - 2.5-φορές (Σχ. 4Γ), πιθανά επειδή, όπως πρόσφατα αναφέρθηκε, τα κύτταρα A549 παρουσιάζουν υψηλή ενεργότητα NF-κB συγκρινόμενα με άλλες ανθρώπινες καρκινικές σειρές (Sun et al., 2007), εύρημα το οποίο συνηγορεί με τα αποτελέσματα μας καθώς ανιχνεύθηκαν σχετικά υψηλά επίπεδα των υπομονάδων του NF-κB, p50 και p65 στον πυρήνα των κυττάρων A549 (Σχ. 4A).

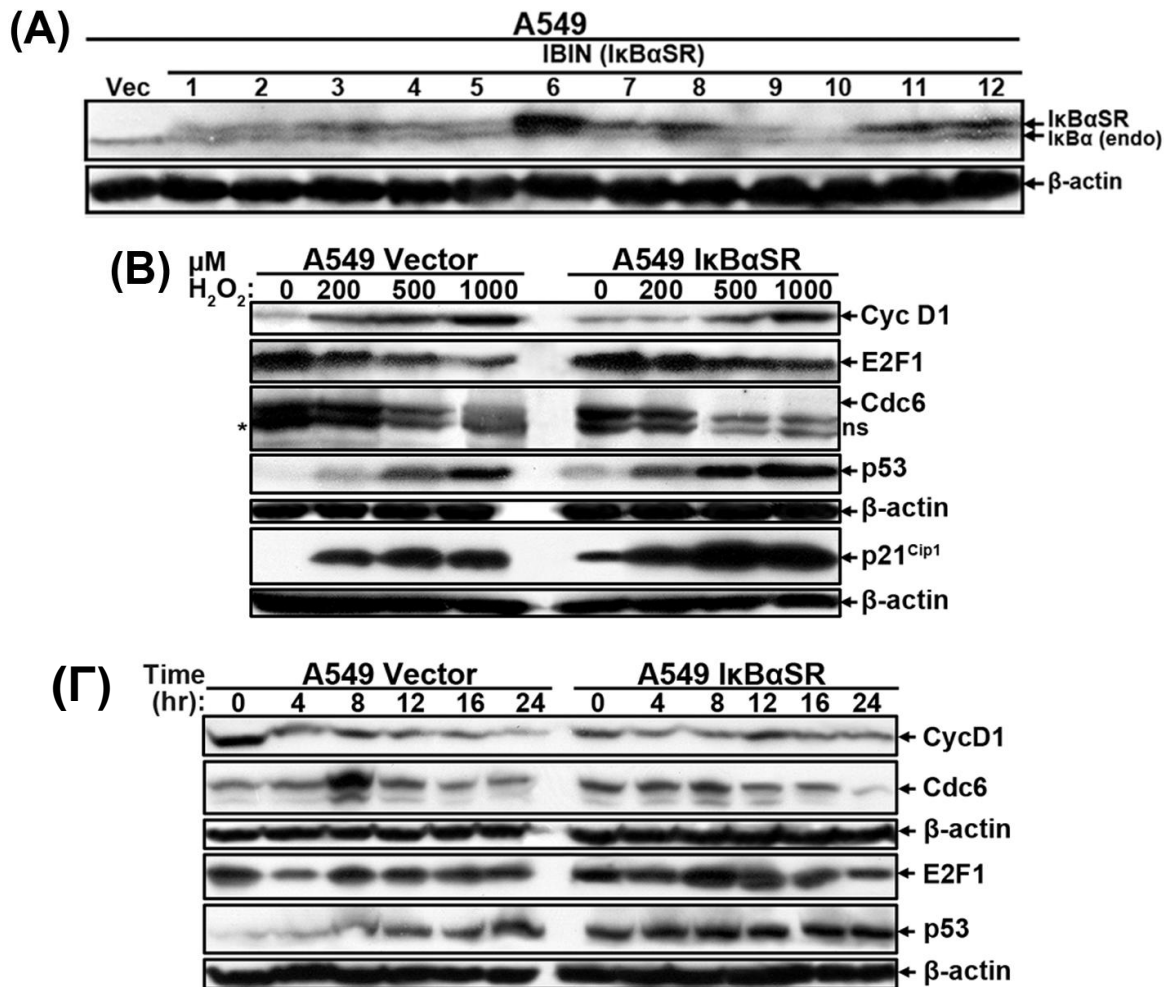
Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα έδειξαν, πως το H_2O_2 επήγαγε την πυρηνική μετατόπιση της IKKα και κατ' ακολουθία την IKKα-εξαρτώμενη ή ανεξάρτητη φωσφορυλίωση της p65 (φώσφο-p65 σερίνη536) με αποτέλεσμα την υψηλότερη μεταγραφική ενεργότητα του NF-κB.

3.5 Η υπερέκφραση ενός υπερκαταστολέα του NF-κB, IκBaSR, επηρέασε την έκφραση των πρωτεϊνών που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο

Στη συνέχεια διερευνήσαμε το ρόλο της κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κB σε σχέση με τις επιδράσεις του H₂O₂ στα κύτταρα A549. Για το σκοπό αυτό, αρχικά καταστείλαμε την κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB, χρησιμοποιώντας έναν υπερκαταστολέα του, τη μεταλλαγμένη μορφή της IκBa, IκBaSR, που εισήχθη σταθερά σε κύτταρα A549 μέσω επιμόλυνσης με ρετροϊούς και την επιλογή των κυττάρων στο συνθετικό αντιβιοτικό G418. Λόγω του ότι η έκφραση των εξωγενών γονιδίων ποικίλει στα καρκινικά κύτταρα και για να διασφαλισθεί πως τα επιμολυσμένα κύτταρα A549 εκφράζανε την εξωγενώς εισαχθείσα πρωτεΐνη IκBaSR, τυχαία επιλέχθηκαν και απομονώθηκαν 12 κλώνοι, οι οποίοι αναλύθηκαν για την έκφραση της IκBa σε αντιδιαστολή με κύτταρα A549, που έφεραν έναν πρότυπο φορέα ελέγχου (A549 Vec) (Σχ. 5A). Η ανάλυση με άνοσο-αποτύπωμα κατά western έδειξε ένα διπλό σήμα έκφρασης, με τη χαμηλότερου μοριακού βάρους ζώνη να αντιπροσωπεύει την ενδογενή πρωτεΐνη IκBa, ενώ η υψηλότερου μοριακού βάρους ζώνη να αντιπροσωπεύει την εξωγενή πρωτεΐνη IκBaSR. Οι κλώνοι 6, 8, 11 και 12 εκφράζανε την IκBaSR σε υψηλότερα επίπεδα, και ο κλώνος 6 επιλέχθηκε για τη διεξαγωγή των επόμενων πειραμάτων (Σχ. 5A).

Με σκοπό να μελετηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός με τον οποίο η IκBaSR επηρέασε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων A549 ως απόκριση στο H₂O₂, αναλύθηκε η έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα A549 IκBaSR και A549 Vec (που έφεραν ένα φορέα ελέγχου), παρουσία /απουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων (0 - 1000 μM) H₂O₂ (Σχ. 5B). Η χορήγηση H₂O₂ είχε ως αποτέλεσμα τη δόσο-εξαρτώμενη αυξορρύθμιση της έκφρασης της κυκλίνης D1 στα κύτταρα A549 Vec, η επαγωγή της κυκλίνης D1 από το H₂O₂ ήταν εμφανής μόνο στις υψηλότερες συγκεντρώσεις H₂O₂ στα κύτταρα A549 IκBaSR, σε συμφωνία με το ρόλο του NF-κB ως θετικού ρυθμιστή της έκφρασης της κυκλίνης D1 (Perkins, 2007). Αντίθετα, η έκφραση της E2F1 μειώθηκε σε παρόμοια επίπεδα και στους δυο κυτταρικούς τύπους. Η ανάλυση της Cdc6, ενός παράγοντα αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA

(licensing factor), ρυθμιζόμενου από την E2F1, έδειξε πως η χορήγηση H₂O₂ μειορρύθμισε την έκφραση της Cdc6 και στους δύο κυτταρικούς τύπους με οριακά χαμηλότερα επίπεδα στα κύτταρα A549 IκBaSR σε σύγκριση με τα A549 Vec (Σχ. 5B).



Σχήμα 5. Η καταστολή της κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κB στα κύτταρα A549 μετέβαλε την έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου μετά την έκθεση των κυττάρων A549 στο H₂O₂. **(A)** Κατασκευή κυττάρων A549 που εκφράζουν τον υπερκαταστολέα IkBaSR. Κύτταρα A549 επιμολύνθηκαν σταθερά με ρετροϊούς που έφεραν είτε έναν πρότυπο ρετροϊικό φορέα ή το γονίδιο της IkBaSR και επιλέχθηκαν σε G418. 12 ανθεκτικοί κλώνοι στο G418 επιλέχθηκαν τυχαία, απομονώθηκαν και αναλύθηκαν για την έκφραση της IkBa ή της β-ακτίνης ως μάρτυρα, με ανοσο-αποτύπωμα κατά western. **(B)** Ανάλυση με ανοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου (κυκλίνη D1, E2F1, Cdc6, p53 και p21^{Cip1/Waf1} ή β-ακτίνη) ως απόκριση στη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων H₂O₂. **(Γ)** Ανάλυση της χρόνο-εξαρτώμενης έκφρασης των κυκλίνης D1, Cdc6, E2F1 και p53 ή β-ακτίνης σε αραιά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα A549 Vec και A549 IkBaSR μετά τη διέγερση τους με ορό για 0 - 24 h.

Επιπλέον, η χορήγηση H_2O_2 επήγαγε με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο την έκφραση της p53 και της πρωτεΐνης-στόχου της p53, της p21^{Cip1/Waf1}, μια επίδραση που ήταν εντονότερη στα κύτταρα A549 IκBaSR σε σύγκριση με τα κύτταρα A549 Vec (Σχ. 5B).

Για να διερευνηθούν περαιτέρω οι επιδράσεις του υπερκαταστολέα IκBaSR στην έκφραση επιλεγμένων ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου διεξήχθη μια χρόνο-εξαρτώμενη ανάλυση τους μετά τη διέγερση με ορό των κυττάρων A549 vec και A549 IκBaSR, που βρίσκονταν στην καλλιέργεια σε χαμηλή πυκνότητα, για χρονικό διάστημα 0 - 24 h (Σχ. 5Γ). Η ανάλυση των ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των παραπάνω A549 κυττάρων με άνοσο-αποτύπωμα κατά western έδειξε πως τα βασικά επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1 ήταν χαμηλότερα στα κύτταρα A549 IκBaSR σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης στα κύτταρα A549 vec και πως ο υπερκαταστολέας IκBaSR καθυστέρησε την επαγωγή της κυκλίνης D1 μετά τη διέγερση των κυττάρων με ορό. Συγκεκριμένα, η έκφραση της κυκλίνης D1 επάχθηκε μετά από 8 h από τη διέγερση των κυττάρων A549 vec με ορό, ενώ μετά από 12 h στα κύτταρα A549 IκBaSR. Όσον αφορά τα βασικά επίπεδα έκφρασης της Cdc6, αυτά ήταν οριακά υψηλότερα στα κύτταρα A549 IκBaSR από ότι στα A549 Vec. Όμως, ενώ στα κύτταρα A549 Vec έφτασαν στα υψηλότερα επίπεδα τους 8 h μετά τη διέγερση τους με ορό, στα κύτταρα A549 IκBaSR ανιχνεύθηκε μια οριακή αύξηση των επιπέδων της Cdc6, 8 h μετά τη διέγερση τους με ορό, η οποία ήταν χαμηλότερη απ' αυτήν που παρατηρήθηκε στα κύτταρα A549 Vec, και σχεδόν εξαφανίσθηκε μετά από 24 h στα κύτταρα που έφεραν τον υπερκαταστολέα σε σύγκριση με τα κύτταρα A549 Vec. Η έκφραση του E2F1 ήταν στο υψηλότερο επίπεδο της 8 h μετά τη διέγερση με ορό και στους δύο κυτταρικούς τύπους και δεν ανιχνεύθηκε κάποια εμφανής διαφορά στην έκφραση της ανάμεσα στους δυο κυτταρικούς τύπους ωστόσο, παρατηρήθηκε πως η έκφραση της E2F1 ήταν οριακά υψηλότερη στα κύτταρα A549 IκBaSR. Επίσης, ενώ στα κύτταρα A549 Vec ανιχνεύθηκε μια χρόνο-εξαρτώμενη αύξηση των επιπέδων έκφρασης της p53, πιθανά λόγω της αύξησης της πυκνότητας των κυττάρων στο τριβλίο με το χρόνο, στα κύτταρα A549 IκBaSR η έκφραση της p53 ήταν πολύ υψηλότερη και επέδειξε ελάχιστη με το χρόνο αυξορρύθμιση σε σύγκριση με το προφίλ έκφρασης της στα κύτταρα A549 Vec. Τα ευρήματα αυτά

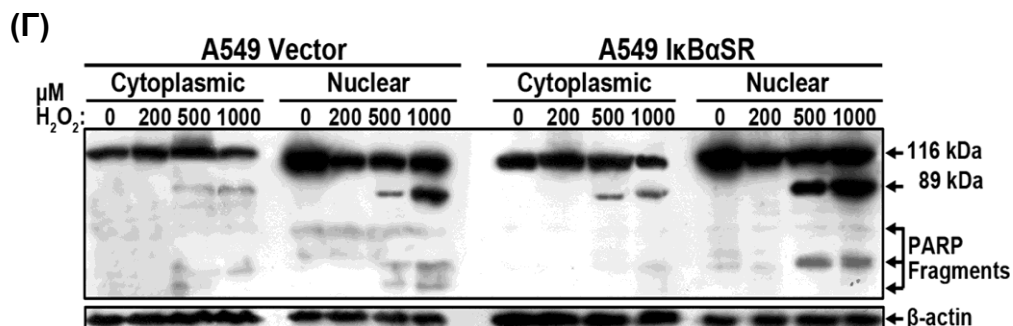
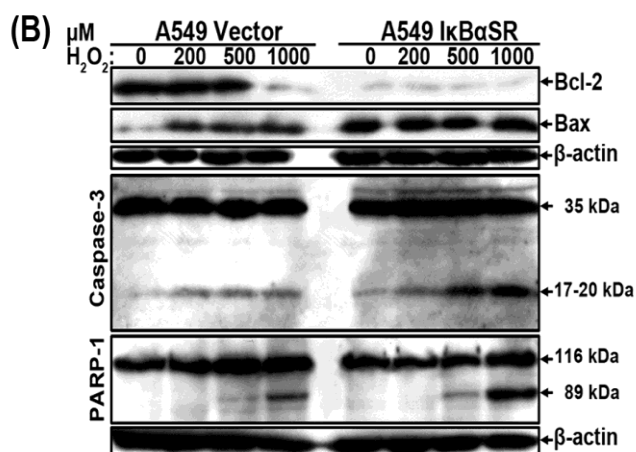
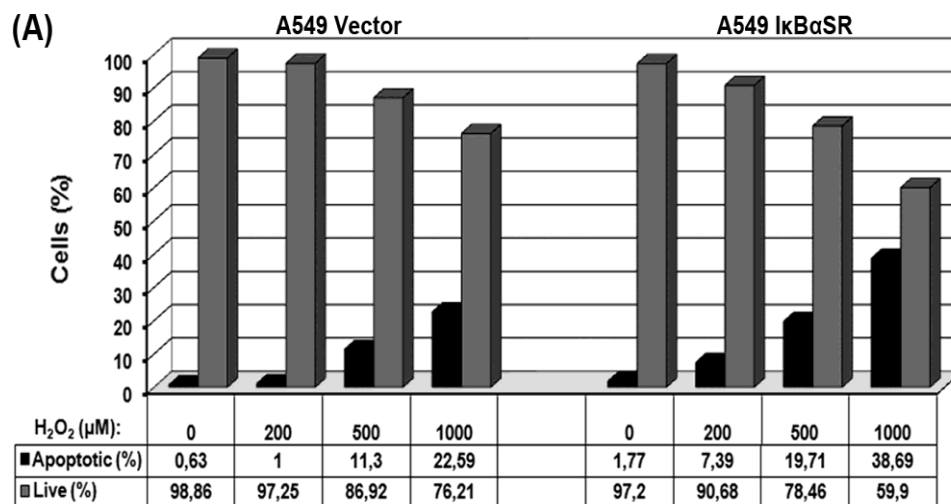
υποδηλώσαν ότι πιθανά η κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης της p53. Έτσι, η χορήγηση H₂O₂ είχε ως συνέπεια την εντονότερη μειορρύθμιση των E2F1 και Cdc6 και την αυξορρύθμιση της κυκλίνης D1 και του άξονα p53-p21^{Cip1/Waf1} στα κύτταρα A549 IκBaSR σε σύγκριση με τα κύτταρα A549 Vec.

3.6 Η υπερέκφραση ενός υπερκαταστολέα του NF-κB, IκBaSR, ευαισθητοποίησε τα κύτταρα A549 στην επαγόμενη από το H₂O₂ απόπτωση

Η ενεργοποίηση του NF-κB έχει εμπλακεί στην ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων στο οξειδωτικό στρες (Gloire et al., 2006a). Για να διερευνηθούν οι επιδράσεις της επιβαλλόμενης υπερέκφρασης της IκBaSR στην απόπτωση των κυττάρων A549 μετά από τη χορήγηση H₂O₂ διεξήχθη ανάλυση κυτταρομετρίας ροής (Σχ. 6A). Η χορήγηση H₂O₂ επήγαγε την απόπτωση τόσο των κυττάρων A549 Vec όσο και των κυττάρων A549 IκBaSR με ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Ωστόσο, η υπερέκφραση της IκBaSR ευαισθητοποίησε περισσότερο τα κύτταρα A549 στην απόπτωση μετά την έκθεση τους στο H₂O₂ (Σχ. 6A).

Στη συνέχεια, αναλύθηκε με άνοσο-αποτύπωμα κατά western η έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης στα κύτταρα A549 Vec και στα A549 IκBaSR, παρουσία / απουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων (0 - 1000 μM) H₂O₂ (Σχ. 6B). Η ανάλυση έδειξε, πως ενώ η χορήγηση H₂O₂ μειορρύθμισε την έκφραση της Bcl-2 στα κύτταρα A549 Vec μόνο στις υψηλές συγκεντρώσεις 500 και 1000 μM H₂O₂, τα κύτταρα A549 IκBaSR εκφράζανε την Bcl-2 σε χαμηλά επίπεδα, τα οποία δεν παρουσίασαν καμιά μεταβολή ως απόκριση στο H₂O₂ (Σχ. 6B). Αντίθετα, η έκφραση της Bax στα κύτταρα A549 Vec παρουσίασε αυξητική ρύθμιση ως απόκριση στο H₂O₂, αλλά στα κύτταρα A549 IκBaSR η έκφραση της ήταν σε υψηλότερο επίπεδο, ακόμα και στα κύτταρα A549 IκBaSR, στα οποία δεν είχε χορηγηθεί H₂O₂ και δεν ανιχνεύθηκε καμιά σημαντική μεταβολή της έκφρασής της ως απόκριση στο H₂O₂ (Σχ. 6B). Συμπερασματικά, η παρουσία του υπερκαταστολέα IκBaSR μετέβαλε την αναλογία των αντί-αποπτωτικών έναντι των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2, προς όφελος των δεύτερων.

Επίσης, το H_2O_2 ενεργοποίησε την κασπάση-3 και επήγαγε την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP-1 και στους δύο κυτταρικούς τύπους A549 Vec και A549 IκBaSR. Ωστόσο, η έκφραση της ενεργοποιημένης μορφής της κασπάσης-3, 17-20 kDa, η οποία προηγείται της πρωτεολυτικής διάσπασης της PARP-1, και η έκφραση της 89 kDa μορφής της PARP-1 ήταν ισχυρότερη στα κύτταρα A549 IκBaSR ως απόκριση στο H_2O_2 (Σχ. 6B).



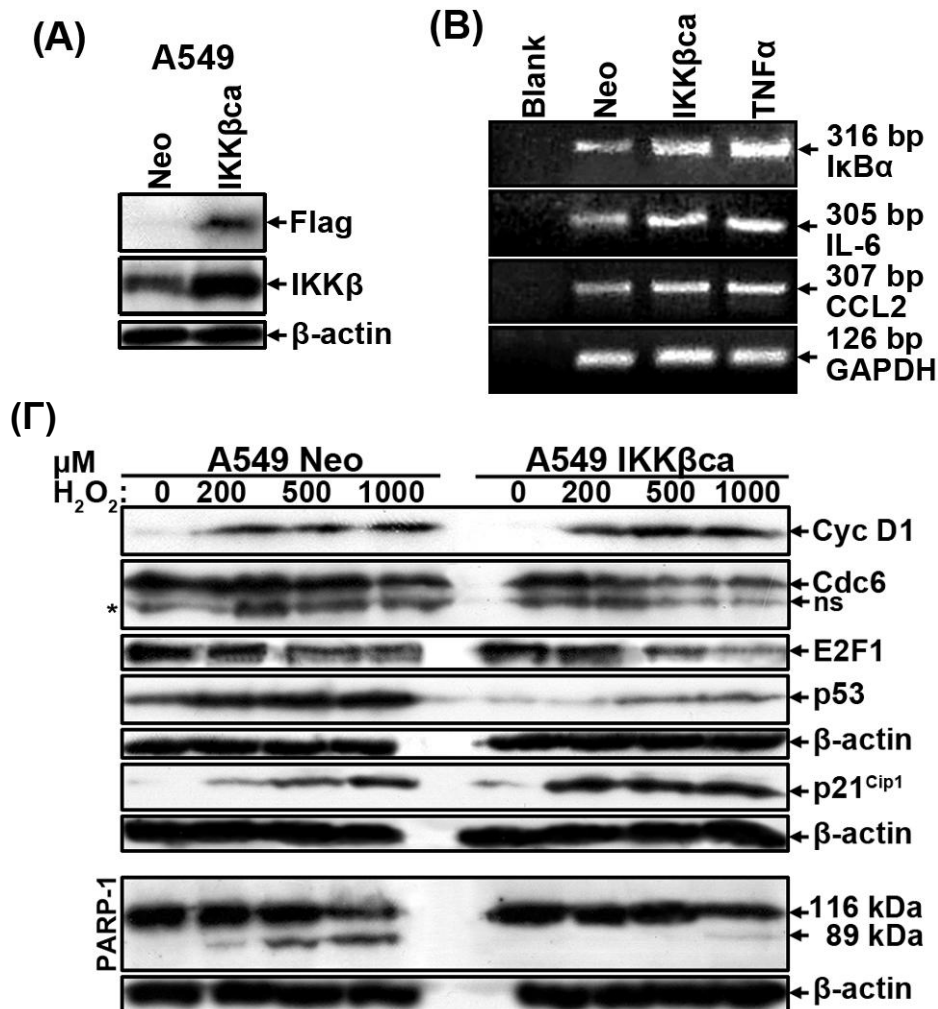
Σχήμα 6. Η καταστολή της κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κB ευαισθητοποίησε τα κύτταρα A549 στην απόπτωση επαγόμενη από το H₂O₂. (A) Στα κύτταρα A549 Vec και στα A549 IκBαSR χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις H₂O₂ (0 - 1000 μM) και υποβλήθηκαν σε ανάλυση κυτταρομετρίας ροής με Αννεξίνη-V/PI, έτσι ώστε να επιτευχθεί η ποσοτικοποίηση της απόπτωσης στη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων H₂O₂. **(B)** Ανάλυση με ανοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης (Bcl-2, Bax, κασπάση-3 και PARP-1), σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα ως απόκριση στη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων H₂O₂. **(Γ)** Ανάλυση με ανοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση της PARP-1 ή της β-ακτίνης ως μάρτυρα σε κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα, που απομονώθηκαν από κύτταρα A549 Vec και A549 IκBαSR παρουσία / απουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων (0 - 1000 μM) H₂O₂.

Για να εξακριβωθούν οι επιπτώσεις του υπερκαταστολέα IκBaSR στην πρωτεολυτική διάσπαση της PARP-1 ως απόκριση στη χορήγηση H₂O₂, απομονώθηκαν κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα από κύτταρα A549 Vec και κύτταρα A549 IκBaSR παρουσία / απουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων (0 - 1000 μM) H₂O₂ και αναλύθηκαν για την έκφραση της PARP-1 (Σχ. 6Γ). Το H₂O₂ επήγαγε την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP-1 στις συγκεντρώσεις 500 και 1000 μM και στους δυο κυτταρικούς τύπους αν και το φαινόμενο αυτό ήταν εμφανώς πιο έντονο στα κύτταρα A549 IκBaSR. Επίσης, η κολοβωμένη 89 kDa μορφή της PARP-1 εντοπίστηκε σε μεγαλύτερη ποσότητα στον πυρήνα σε σύγκριση με το κυτταρόπλασμα και στους δυο κυτταρικούς τύπους, αν και ανιχνεύθηκε σε υψηλότερα επίπεδα στους πυρήνες των κυττάρων A549 IκBaSR σε σύγκριση με αυτά των A549 Vec (Σχ. 6Γ). Επιπρόσθετα, ανιχνεύθηκαν πιο αργά μεταναστευτικά (slower migrating) θραύσματα της PARP-1, ιδιαίτερα αυτά στο μοριακό βάρος των ~50 kDa, μετά τη χορήγηση H₂O₂, τα οποία παρουσίασαν ισχυρότερη έκφραση στα κύτταρα A549 IκBaSR συγκριτικά με τα κύτταρα A549 Vec (Σχ. 6Γ). Επομένως, η παρουσία της IκBaSR, και επομένως η καταστολή της κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κB, ευαισθητοποίησε τα κύτταρα A549 στην επαγόμενη από το H₂O₂ απόπτωση.

3.7 Η ιδιοσυστατικά ενεργός μορφή της IKKβ, IKKβca, κατέστειλε την επαγόμενη από το H₂O₂ απόπτωση

Προκειμένου να μελετηθεί επιπλέον ο ρόλος της κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κB στην απόπτωση των κυττάρων A549, που επάγεται από το H₂O₂, κατασκευάσθηκαν κύτταρα A549, τα οποία εκφράζανε είτε ένα πρότυπο φορέα ελέγχου Neo ή μια ιδιοσυστατικά ενεργό μεταλλαγμένη μορφή στο βρόγχο-T της IKKβ, την IKKβca, έτσι ώστε να διερευνηθεί και να επιβεβαιωθεί αν όντως η κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB επηρεάζει την αποπτωτική πορεία των κυττάρων A549 ως απόκριση στο H₂O₂ (Σχ. 7). Ανάλυση με άνοσο-αποτύπωμα, κατά western χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα αντί-flag (Σχ. 7A, πάνω διάζωμα) ή ένα αντίσωμα αντί-IKKβ (Σχ. 7A, κάτω διάζωμα) έδειξε, πως τα σταθερά επιμολυσμένα κύτταρα A549 IKKβca εκφράζανε την εξωγενή, μεταλλαγμένη

μορφή της ΙΚΚβ, την ΙΚΚβca, σε υψηλότερα επίπεδα από τα αντίστοιχα κύτταρα A549 Neo (Σχ. 7Α).



Σχήμα 7. Η ενεργοποίηση της κανονικής πορείας του NF-κB διαμέσου της υπερέκφρασης της ιδιοσυστατικά ενεργής μορφής IKKβca στα κύτταρα A549 μετέβαλε τις αποκρίσεις τους στο H₂O₂ και κατέστειλε την επαγόμενη απόπτωση από το H₂O₂. **(Α)** Κατασκευή κυττάρων A549 Neo και A549 IKKβca. Τα κύτταρα A549 επιμολύνθηκαν σταθερά με ρετροϊούς φέροντας είτε έναν πρότυπο φορέα ελέγχου (Neo) ως μάρτυρα ή την IKKβca, επιλέχθηκαν σε G418 και αναλύθηκαν για την έκφραση της IKKβ ή της β-ακτίνης ως μάρτυρα με άνοσο-αποτύπωμα κατά western. Επειδή η IKKβca φέρει στο άμινο-τελικό άκρο της ένα πεπτιδίο flag, χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα ενάντια στο flag και στην IKKβ. **(Β)** Ανάλυση με RT-PCR επιλεγμένων γονιδίων στόχων της κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κB (IkBα, IL-6 και CCL2 ή GAPDH ως μάρτυρα) σε κύτταρα A549 Neo, A549 IKKβca ή κύτταρα A549, στα οποία χορηγήθηκαν 100 ng/ml TNFα για 3 h. Ολικό RNA που απομονώθηκε μετατράπηκε σε cDNA και το οποίο χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), προκειμένου να ανιχνευθεί αν η IKKβca ενεργοποίησε γονίδια-στόχους της κανονικής πορείας του NF-κB **(Γ)** Ανάλυση, με άνοσο-αποτύπωμα κατά western, της έκφρασης επιλεγμένων πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου (κυκλίνη D1, Cdc6, E2F1, p53 και p21^{Cip1/Waf1} ή β-ακτίνη) ή της πρωτεολυτικής διάσπασης της PARP-1 ως απόκριση στη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων (0 - 1000 μM) H₂O₂.

Για να διερευνηθεί αν η υπερέκφραση της IKKβca ενεργοποίησε την κανονική πορεία του NF-κB, απομονώθηκε ολικό RNA από κύτταρα A549 Neo και A549 IKKβca και από κύτταρα A549, στα οποία χορηγήθηκε TNFα σε συγκέντρωση 100 ng/ml, για 3 h. Το RNA υποβλήθηκε σε RT-PCR, ώστε να μελετηθεί η έκφραση της IκBα, της IL-6 και της MCP-1/CCL2, γονίδια-στόχοι της κανονικής πορείας του NF-κB, ή της GAPDH ως γονίδιο ελέγχου. Η υπερέκφραση της IKKβca επήγαγε την έκφραση όλων των διερευνούμενων γονιδίων-στόχων της κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κB σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά που επήγαγε η χορήγηση TNF-α στα κύτταρα A549 (Σχ. 7B). Άρα, συμπεράναμε πως η IKKβca ενεργοποίησε την κανονικά πορεία ενεργοποίησης του NF-κB.

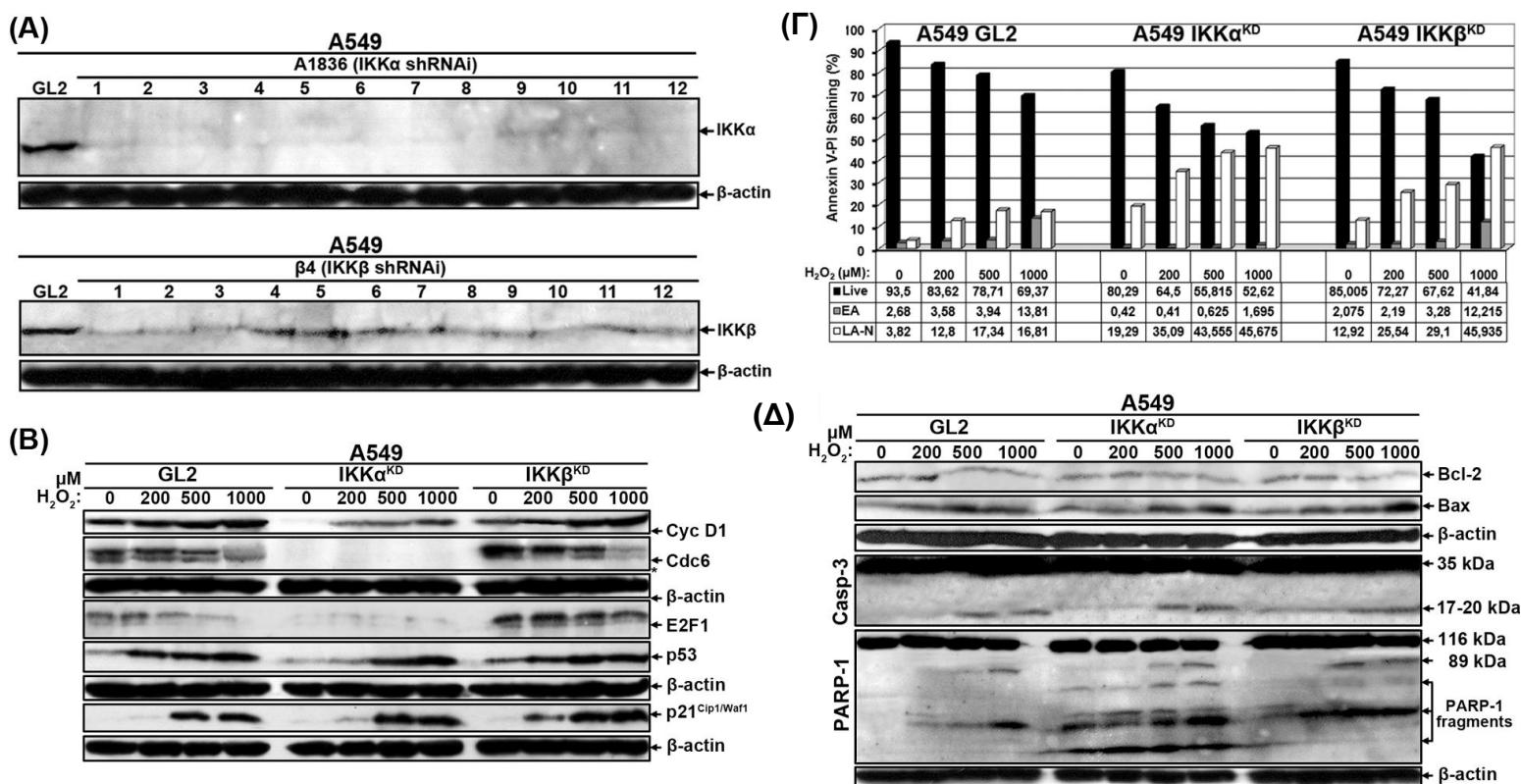
Στη συνέχεια, μελετήθηκαν οι επιδράσεις της IKKβca στην έκφραση επιλεγμένων ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης ως απόκριση στο H₂O₂. Η χορήγηση H₂O₂ σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις σε κύτταρα A549 Neo και κύτταρα A549 IKKβca έδειξε πως τα κύτταρα A549 IKKβca εξέφραζαν οριακά υψηλότερα, τόσο βασικά όσο και επαγόμενα από τη χορήγηση H₂O₂, επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1 στα κύτταρα ελέγχου, A549 Neo. Ακόμα, η χορήγηση H₂O₂ σε συγκεντρώσεις 500 και 1000 μM μείωσε τα επίπεδα έκφρασης των Cdc6 και E2F1 και στον ίδιο βαθμό, τόσο στα κύτταρα A549 Neo όσο και στα A549 IKKβca. Αντίθετα, η IKKβca κατέστειλε τόσο τα βασικά όσο και τα επαγόμενα από το H₂O₂, επίπεδα έκφρασης της p53, αλλά αυξορρύθμισε τόσο τα βασικά όσο και τα επαγόμενα από το H₂O₂, επίπεδα έκφρασης της p21^{Cip1/Waf1}, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών στα κύτταρα A549 Neo (Σχ. 7Γ). Επομένως, ενώ η καταστολή της κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κB έχει ως αποτέλεσμα την αυξορρύθμιση της έκφρασης της p53, η ενεργοποίηση της κανονικής πορείας του NF-κB κατέστειλε την έκφραση της p53, υποδηλώνοντας πως η κανονική πορεία του NF-κB δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της p53. Επιπλέον, η έκφραση της p21^{Cip1/Waf1} που επάχθηκε και στις δυο περιπτώσεις, υποδηλώνει πως η ρύθμιση της έκφρασης της p21^{Cip1/Waf1} ελέγχεται και από το μεταγραφικό παράγοντα p53 αλλά και από την κανονική πορεία του NF-κB, σε συμφωνία με πρόσφατες μελέτες (Penzo et al., 2008; Xia et al., 2009; Batsi et al., 2009).

Επειδή η p53 και p21^{Cip1/Waf1} καθορίζουν την τύχη των κυττάρων, που υφίστανται βλάβες στο DNA, με αποτέλεσμα είτε στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή την επαγωγή της απόπτωσης, μελετήθηκε η έκφραση της PARP-1, ενός δείκτη της κυτταρικής απόπτωσης, σε κύτταρα A549 Neo και A549 IKKβca, παρουσία / απουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων (0 - 1000 μM) H₂O₂. Ενώ το H₂O₂ επήγαγε την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP-1, παράγοντας τόσο την ανέπαφη (116 kDa) όσο και την κολοβωμένη μορφή της (89 kDa) στα κύτταρα A549 Neo με ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, η 89 kDa κολοβωμένη μορφή της PARP-1 ανιχνεύθηκε σε ελάχιστα ως μη-ανιχνεύσιμα επίπεδα στα κύτταρα A549 IKKβca και μόνο ύστερα από τη χορήγηση H₂O₂ σε συγκέντρωση 1000 μM (Σχ. 7Γ). Σύμφωνα με αυτό το αποτέλεσμα συμπεράναμε πως η IKKβca προστάτευσε τα κύτταρα A549 από την επαγόμενη από H₂O₂ απόπτωση.

3.8 Διαφορετικές αποκρίσεις στο H₂O₂ των κυττάρων A549 στα οποία αποσιωπήθηκε η έκφραση είτε της IKKα ή της IKKβ

Στη συνέχεια και λόγω του ότι η IKKα και όχι η IKKβ συσσωρεύτηκε στον πυρήνα ως απόκριση στο H₂O₂, αλλά και επειδή η καταστολή της κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κB ευαισθητοποίησε τα κύτταρα A549 στην επαγόμενη από το H₂O₂ απόπτωση, μελετήθηκε ο ρόλος των IKKα και IKKβ στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση των κυττάρων A549. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν σταθεροί κυτταρικοί κλώνοι A549 που έφεραν είτε έναν πρότυπο ρετροϊικό φορέα αρνητικού ελέγχου GL2 (έφερε shRNA ενάντια στη λουσιφεράση) ή παρεμβατικά shRNAs είτε για την IKKα (shIKKα1836) ή για την IKKβ (shIKKβ4) (τα οποία αναφέρονται ως A549 IKKα^{KD} και A549 IKKβ^{KD} αντίστοιχα). Μετά την επιμόλυνση των κυττάρων A549 με τους αντίστοιχους ρετροϊούς και την επιλογή τους σε πουρομυκίνη, επιλέχθηκαν τυχαία 12 κλώνοι και απομονώθηκαν είτε από τα κύτταρα A549 IKKα^{KD} (Σχ. 8A) ή τα A549 IKKβ^{KD} (Σχ. 8B), οι οποίοι αναπτύχθηκαν και αναλύθηκαν με άνοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση των IKKα και IKKβ, αντίστοιχα. Η σταθερή εισαγωγή του shIKKα1836, αλλά όχι του GL2, είχε ως αποτέλεσμα την ολοκληρωτική απώλεια της έκφρασης της ενδογενούς IKKα σε όλους, σχεδόν, τους κυτταρικούς κλώνους που

αναλύθηκαν και ο κλώνος 2 από τα A549 IKK α ^{KD} επιλέχθηκε για τη διεξαγωγή των περαιτέρω πειραμάτων (Σχ. 8A). Παρομοίως, η σταθερή εισαγωγή του shIKK β 4 είχε ως αποτέλεσμα την πολύ ισχυρή μειορρύθμιση της έκφρασης της ενδογενούς IKK β , στους περισσότερους από τους 12 κλώνους που αναλύθηκαν, συγκριτικά με την έκφραση της ενδογενούς IKK β στα κύτταρα ελέγχου A549 GL2 και ο κλώνος 1 των κυττάρων A549 IKK β ^{KD} επιλέχθηκε για τη διεξαγωγή των περαιτέρω πειραμάτων (Σχ. 8A κάτω διάζωμα).



Σχήμα 8. Η αποσιώπηση των IKK α ή IKK β ρύθμιζε διαφορετικά την έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση. **(A)** Κατασκευή κυττάρων A549 στα οποία αποσιωπήθηκε είτε η IKK α (πάνω διάζωμα) ή η IKK β (κάτω διάζωμα). Κύτταρα A549 επιμολύνθηκαν σταθερά με ρετροϊούς που έφεραν είτε τον φορέα ελέγχου GL2 ή shRNAs είτε για την IKK α ή την IKK β , επιλέχθηκαν σε πουρομυκίνη (Puro) και 12 ανθεκτικοί κλώνοι στην Puro επιλέχθηκαν τυχαία και απομονώθηκαν είτε από τα κύτταρα A549 IKK α^{KD} ή από τα A549 IKK β^{KD} και αναλύθηκαν για την έκφραση είτε της IKK α (πάνω διάζωμα) ή της IKK β (κάτω διάζωμα) ή της β -ακτίνης ως μάρτυρα με ανοσο-αποτύπωμα κατά western. **(B)** Ανάλυση με ανοσο-αποτύπωμα κατά western της έκφρασης επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου (κυκλίνη D1, Cdc6, E2F1, p53 και p21^{Cip1/Waf1} ή β -ακτίνη) σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα των A549 GL2, A549 IKK α^{KD} και A549 IKK β^{KD} ως απόκριση στη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων H_2O_2 . **(C)** Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής με αννεξίνη V/PI για την ποσοτικοποίηση της απόπτωσης σε κύτταρα A549 GL2, A549 IKK α^{KD} και A549 IKK β^{KD} ως απόκριση στη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων H_2O_2 . **(D)** Ανάλυση με ανοσο-αποτύπωμα κατά western της έκφρασης επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης (Bcl-2, Bax, κασπάση-3 και PARP-1 ή β -ακτίνη) σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα κυττάρων A549 GL2, A549 IKK α^{KD} και A549 IKK β^{KD} ως απόκριση στη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων H_2O_2 .

Στη συνέχεια, αναλύθηκαν οι επιδράσεις της αποσιώπησης της IKKα ή της IKKβ στην έκφραση επιλεγμένων ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση στη χορήγηση H₂O₂, με άνοσο-αποτύπωμα κατά western (Σχ. 8B). Το H₂O₂ επήγαγε την έκφραση της κυκλίνης D1 με ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο στα κύτταρα A549 GL2, αλλά η επαγωγή της έκφρασης της στα A549 IKKβ^{KD} εντοπίστηκε μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις (500 και 1000 μM) H₂O₂. Αντίθετα, στα κύτταρα A549 IKKα^{KD}, τα βασικά και από το H₂O₂ επαγμένα, επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1 ήταν χαμηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα που ανιχνεύθηκαν είτε στα κύτταρα A549 GL2 ή στα κύτταρα A549 IKKβ^{KD} (Σχ. 8B). Η ανάλυση για την έκφραση της Cdc6 έδειξε, πως το H₂O₂ μειορρύθμισε τα επίπεδα έκφρασης της Cdc6 τόσο στα κύτταρα A549 GL2 όσον και στα κύτταρα A549 IKKβ^{KD} σε συγκεντρώσεις 500 και 1000 μM H₂O₂, ωστόσο τα επίπεδα έκφρασης της Cdc6 ήταν οριακά υψηλότερα στο δεύτερο κυτταρικό τύπο (Σχ. 8B). Τα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 ακολουθούν το ίδιο πρότυπο με τα επίπεδα έκφρασης της Cdc6 στα κύτταρα A549 GL2 και A549 IKKβ^{KD} παρουσία ή απουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων H₂O₂ (Σχ. 8B). Αντίθετα, η αποσιώπηση της IKKα είχε ως αποτέλεσμα τη, σχεδόν, ολοκληρωτική απώλεια της έκφρασης της Cdc6, τόσο σε κύτταρα που είχε χορηγηθεί H₂O₂ όσο και σε κύτταρα που δεν είχε χορηγηθεί H₂O₂, κάτι που ήταν σε άμεση συσχέτιση με τη, σχεδόν, ολοκληρωτική απώλεια της έκφρασης του E2F1, στα ίδια κύτταρα και κάτω από τις ίδιες συνθήκες (Σχ. 8B), υποδηλώνοντας πως η IKKα δρα ανοδικά του E2F1. Επιπλέον, το H₂O₂ επήγαγε την έκφραση της p53, σε παρόμοια έκταση, τόσο στα A549 GL2 κύτταρα όσο και στα A549 IKKβ^{KD} κύτταρα, η οποία ακολουθήθηκε από την επαγωγή των επιπέδων έκφρασης της p21^{Cip1/Waf1} και στους δυο κυτταρικούς τύπους, αλλά σε υψηλότερο επίπεδο στα κύτταρα A549 IKKβ^{KD}. Ωστόσο, στα κύτταρα A549 IKKα^{KD} η επαγωγή της έκφρασης της p53, ύστερα από τη χορήγηση H₂O₂, ήταν λιγότερη, συγκρινόμενη με αυτή στα κύτταρα A549 GL2 και A549 IKKβ^{KD} και παρατηρούνταν μόνο μετά τη χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων H₂O₂ (500 και 1000 μM), υποδηλώνοντας πως η απώλεια της IKKα είχε, πιθανώς, ως αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση της p53 ως απόκριση στο H₂O₂, όπως έχει πρόσφατα αναφερθεί (Yamaguchi et al. 2007a, b). Ωστόσο, η επαγωγή της έκφρασης της p21^{Cip1/Waf1} μετά τη χορήγηση H₂O₂ στα κύτταρα

A549 IKK α ^{KD} ήταν παρόμοια με αυτήν που παρατηρήθηκε στα κύτταρα A549 GL2 και A549 IKK β ^{KD} (Σχ. 8B).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επαγωγή της απόπτωσης από το H₂O₂, σε κύτταρα A549 GL2, A549 IKK α ^{KD} και A549 IKK β ^{KD} με ανάλυση με κυτταρομετρία ροής ανεξίνης-V/PI (Σχ. 8Γ). Η χορήγηση H₂O₂ επήγαγε τόσο την πρόωμη όσο και την όψιμη απόπτωση και τη νέκρωση στα κύτταρα A549 GL2 και A549 IKK β ^{KD} κατά ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, αλλά η όψιμη απόπτωση-νέκρωση εντοπίστηκε πιο έντονα στα κύτταρα A549 IKK β ^{KD}, παρουσιάζοντας, σε σχέση με τα κύτταρα A549 GL2, αύξηση κατά τρεις φορές. Αντίθετα, στα κύτταρα A549 IKK α ^{KD} εντοπίστηκε μόνον η επαγωγή του όψιμου αποπτωτικού-νεκρωτικού θανάτου, ακόμη και σε κύτταρα που δεν είχε χορηγηθεί H₂O₂, αυξανόμενη δόσο-εξαρτώμενα, ανάλογα με τις χορηγούμενες συγκεντρώσεις H₂O₂ (Σχ. 8Γ).

Στη συνέχεια, διερευνήθηκαν οι μεταβολές στην έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης σε κύτταρα A549 GL2, A549 IKK α ^{KD} και A549 IKK β ^{KD} μετά από τη χορήγηση H₂O₂. Το H₂O₂ μειορρύθμισε την έκφραση της Bcl2, αλλά αυξορρύθμισε την έκφραση της ολικής Bax, σε ίδια επίπεδα και στους τρεις διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, υποδηλώνοντας πως μετέβαλε την αναλογία των αντί-αποπτωτικών προς τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl2 (Σχ. 8Δ). Επιπλέον, η χορήγηση H₂O₂ επήγαγε τη σχάση και άρα την ενεργοποίηση, της κασπάσης-3, όπως γίνεται φανερό από τη 17-20 kDa πρωτεολυτικά διασπασμένη μορφή της 35 kDa προ-κασπάσης-3 και στους τρεις διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Επιπρόσθετα, το H₂O₂ επήγαγε την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP-1, ενός υποστρώματος της κασπάσης-3, ωστόσο το προφίλ πρωτεολυτικής διάσπασης της PARP-1 ήταν διαφορετικό στους τρεις κυτταρικούς τύπους. Επιπλέον της 116 kDa μη-κολοβωμένης μορφής της PARP-1 και της 89 kDa κολοβωμένης μορφής του ενζύμου, που εντοπίστηκαν και στους τρεις κυτταρικούς τύπους, εντοπίστηκε και ένας αριθμός άλλων μικρότερων θραυσμάτων της PARP-1 με ένα θραύσμα ~50 kDa να εμφανίζεται πιο έντονα και στους τρεις κυτταρικούς τύπους μετά τη χορήγηση H₂O₂ και ειδικότερα στα κύτταρα A549, στα οποία είχε αποσιωπηθεί η IKK α ή η IKK β , σε σύγκριση με τα κύτταρα A549 GL2. Επιπλέον, τα μικρότερα θραύσματα της PARP-1 παρουσίασαν ισχυρότερη

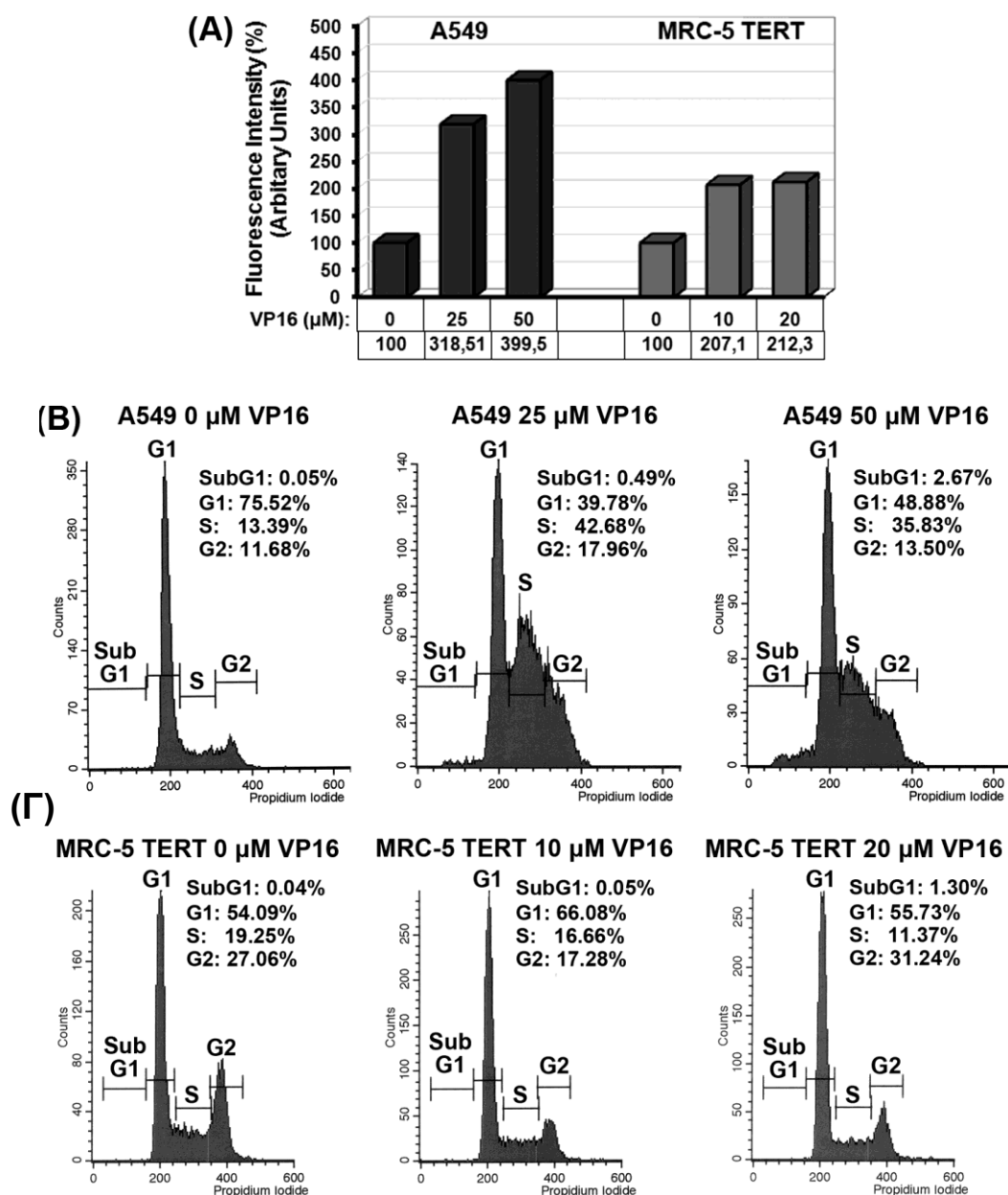
έκφραση στα κύτταρα A549 IKKα^{KD} συγκριτικά, είτε με τα κύτταρα ελέγχου A549 GL2 ή με τα κύτταρα A549 IKKβ^{KD} (Σχ. 8Δ). Τα μικρότερα θραύσματα της PARP-1 και ειδικότερα αυτό των ~50 kDa, έχουν περιγραφεί πρόσφατα και έχει δειχθεί να σχετίζονται με το νεκρωτικό θάνατο, συμπεριλαμβανομένου αυτού που επάγεται από τη χορήγηση H₂O₂ (Gobeil et al., 2001; Nozawa et al., 2002; Soldani and Scovassi, 2002; Lu et al., 2006) και με τη μείωση της ενεργότητας του NF-κB (Bottino et al., 2004). Μια άμεση σύγκριση έδειξε πως η εμφάνιση των μικρότερων θραυσμάτων της PARP-1, που εντοπίστηκαν (Σχ. 8Δ), ήταν σε άμεσο συσχετισμό με την εκδήλωση της όψιμης απόπτωσης-νέκρωσης, η οποία ήταν περισσότερο έντονη στα κύτταρα A549, στα οποία είτε είχε αποσιωπηθεί η IKKα ή η IKKβ και ειδικότερα στα κύτταρα A549 IKKα^{KD} (Σχ. 8Γ), προτείνοντας πως η IKKα μπορεί να ρυθμίζει το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

Ο ρόλος του NF-κΒ στις αποκρίσεις των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες που επάγεται από το ετοποσίδιο/VP16

3.9 Το ετοποσίδιο/VP16 επήγαγε τη συσσώρευση των ενδογενών ΔΜΟ και ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες επάγουν τη συσσώρευση των ενδογενών ΔΜΟ (Pelicano et al., 2004; Laurent et al., 2005), οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις επαγόμενες, από τους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, βλάβες στο DNA (Norbury and Hickson, 2001; Potter and Rabinovitch, 2005; Michod and Widmann, 2007). Για το λόγο αυτό αρχικά, διερευνήθηκε το κατά πόσο η χορήγηση VP16 είχε ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση των ενδογενών ΔΜΟ. Σε κύτταρα A549 και MRC-5 TERT χορηγήθηκαν αυξανόμενες δόσεις VP16, όπως υποδεικνύεται, για 24 h και ύστερα υπολογίστηκαν τα ενδογενή επίπεδα ΔΜΟ, όπως περιγράφεται στα υλικά και μέθοδοι. Η χορήγηση VP16 είχε ως συνέπεια τη δόσο-εξαρτώμενη αύξηση των επιπέδων των ενδογενών ΔΜΟ τόσο στα κύτταρα A549 όσο και στα κύτταρα MRC-5 TERT (Σχ. 9Α). Στη συνέχεια, διερευνήθηκαν οι αποκρίσεις και των δυο κυτταρικών τύπων A549 και MRC-5 TERT στη χορήγηση VP16 με κυτταρομετρία ροής. Η ανάλυση των κυττάρων A549 στα οποία χορηγήθηκε VP16 σε συγκεντρώσεις 0 - 50 μM ή των κυττάρων MRC-5 TERT, στα οποία χορηγήθηκε VP16 σε συγκεντρώσεις 0 - 20 μM έδειξε, πως το VP16 επήγαγε τη συσσώρευση των κυττάρων A549 στη φάση G1-S του κυτταρικού κύκλου (Σχ. 9B) και των κυττάρων MRC-5 TERT στις φάσεις G1-S και G2-M, ανάλογα με τις αυξανόμενη συγκέντρωση του VP16 (Σχ. 9Γ), χωρίς κάποιο σημαντικό ποσοστό των κυττάρων να οδηγείται σε απόπτωση.



Σχήμα 9. Συσώρευση των ΔΜΟ και μεταβολές στον κυτταρικό κύκλο λόγω της χορήγησης VP16. (Α) Σε κύτταρα A549 χορηγήθηκε VP16 σε συγκεντρώσεις 0 - 50 μM και σε κύτταρα MRC5-TERT χορηγήθηκε VP16 σε συγκεντρώσεις 0 - 20 μM για 24 h και στη συνέχεια προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των ενδογενών ΔΜΟ με τη χρήση της φθορίζουσας ουσίας C2938. (Β) Σε κύτταρα A549 και (Γ) MRC5-TERT, μελετήθηκαν οι επιδράσεις του VP16 με κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο cycle test™ plus DNA reagent kit (Becton-Dickinson, USA)

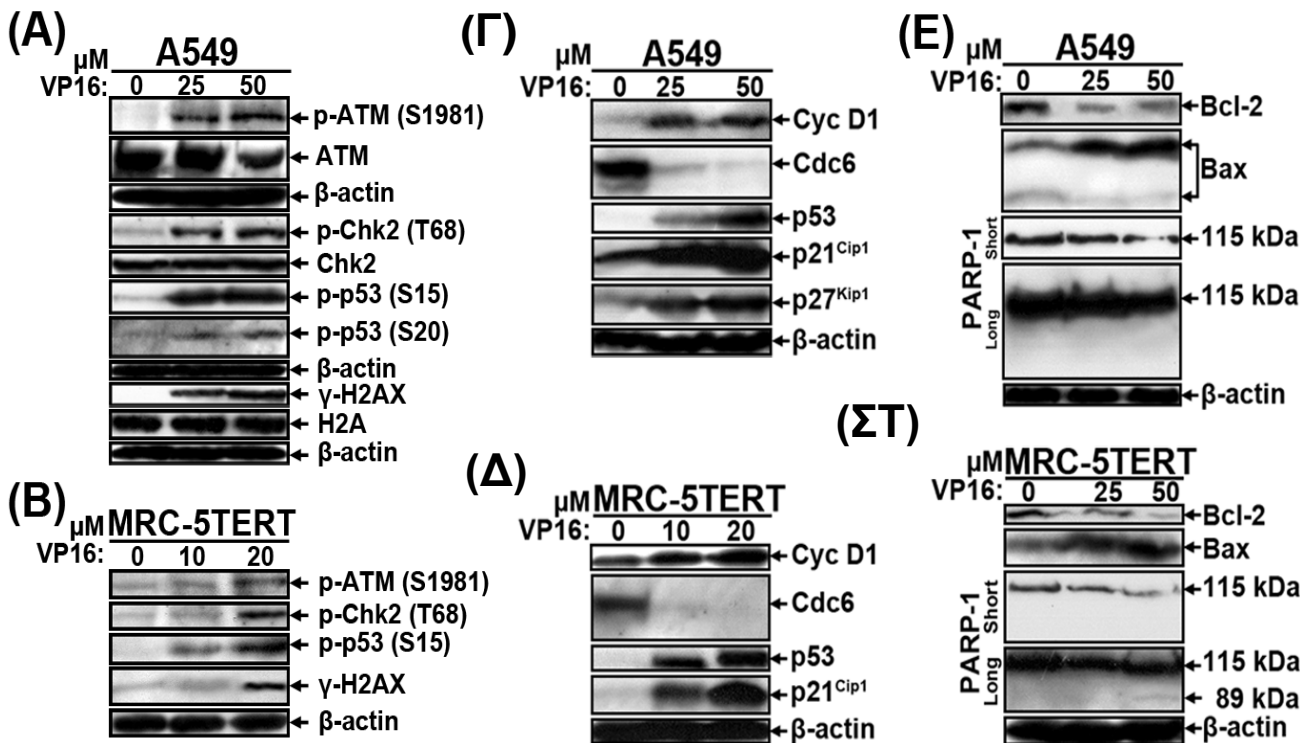
3.10 Το ετοποσίδιο/VP16 επήγαγε την πρόκληση βλαβών στο DNA, οδηγώντας στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των ανθρωπίνων κυττάρων

Οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες επάγουν την ενεργοποίηση μιας απόκρισης σε βλάβες στο DNA (DDR), οδηγώντας είτε στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου ή στην απόπτωση (Harper and Elledge, 2007). Για το λόγο αυτό, διερευνήθηκε το κατά πόσο η χορήγηση VP16 ενεργοποιεί την πορεία της DDR αναλύοντας την έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην DDR, με άνοσο-αποτύπωμα κατά western (Σχ. 10A και B). Το VP16 επήγαγε τη φωσφορυλίωση των ATM (σερίνη1981), Chk2 (θρεονίνη68), p53 και γ-H2AX δόσο-εξαρτώμενα τόσο στα κύτταρα A549 (Σχ. 10A) όσο και στα κύτταρα MRC-5 TERT (Σχ. 10B). Επομένως, η χορήγηση VP16 ενεργοποίησε την DDR οδηγώντας στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου, χωρίς ωστόσο να υπάρχουν αποδείξεις για επαγωγή απόπτωσης (Σχ. 9), τόσο στα ανθρώπινα καρκινικά πνευμονικά κύτταρα A549 όσο και στις δυνητικά αθανатоποιημένες MRC-5 TERT ινοβλάστες.

Στη συνέχεια αναλύθηκε η έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και στους δυο κυτταρικούς τύπους A549 και MRC-5 TERT με άνοσο-αποτύπωμα κατά western (Σχ. 10Γ και Δ, αντίστοιχα). Το VP16 επήγαγε τη συσσώρευση της κυκλίνης D1, αλλά μειορρύθμισε δραματικά την έκφραση της Cdc6, ενός αδειοδοτικού παράγοντα της αντιγραφής του DNA (DNA licensing factor), και στους δυο κυτταρικούς τύπους. Επιπρόσθετα, το VP16 επήγαγε την αύξηση της έκφρασης της p53 και της ανασταλτικής κύκλινο-εξαρτώμενης κινάσης στόχου της, της p21^{Cip1/Waf1}, και στους δυο κυτταρικούς τύπους, καθώς και της p27^{Kip1}, τουλάχιστον στα κύτταρα A549, με ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο.

Για να επαληθευθεί η έλλειψη της αποπτωτικής απόκρισης των κυττάρων στο VP16, αναλύθηκε η έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην απόπτωση και στους δυο κυτταρικούς τύπους, A549 και MRC-5 TERT, με άνοσο-αποτύπωμα κατά western (Σχ. 10E και ΣΤ, αντίστοιχα). Η χορήγηση VP16 μειορρύθμισε την έκφραση της Bcl-2 και αυξορρύθμισε την έκφραση της Bax, αλλά ανιχνεύθηκε μόνο η 116 kDa μορφή της PARP-1, ενός υποστρώματος της κασπάσης-3, χωρίς να ανιχνευθεί η πρωτεολυτικά

διασπασμένη 89 kDa μορφή της, υποδηλώνοντας, πως μολονότι το VP16 μπορεί να ευαισθητοποιήσει τα κύτταρα ως προς την απόπτωση, δεν επαρκεί για να επάγει μια αποπτωτική απόκριση.



Σχήμα 10. Η χορήγηση VP16 επήγαγε βλάβες στο DNA και μεταβολή των επιπέδων έκφρασης επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, χωρίς να επάγει την απόπτωση των κυττάρων. **(A)** Σε κύτταρα A549 και **(B)** MRC5-TERT χορηγήθηκε VP16 και αναλύθηκε η έκφραση πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στις αποκρίσεις σε βλάβες στο DNA (ATM, φώσφο-ATM Ser1981, Chk2, φώσφο-Chk2 Thr68, φώσφο-p53 Ser15 & Ser20, γ -H2AX και H2A ή β -ακτίνη). **(Γ)** Σε κύτταρα A549 και **(Δ)** MRC5-TERT χορηγήθηκε VP16 και αναλύθηκε η έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (κυκλίνη D1, Cdc6, p53 και p21^{Cip1/Waf1}, p27^{Kip1} ή β -ακτίνη). **(E)** Σε κύτταρα A549 και **(ΣΤ)** MRC5-TERT χορηγήθηκε VP16 και αναλύθηκε η έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης (Bcl-2, Bax, PARP-1 ή β -ακτίνη).

3.11 Η χορήγηση VP16 ενεργοποίησε τον NF-κB στα κύτταρα A549

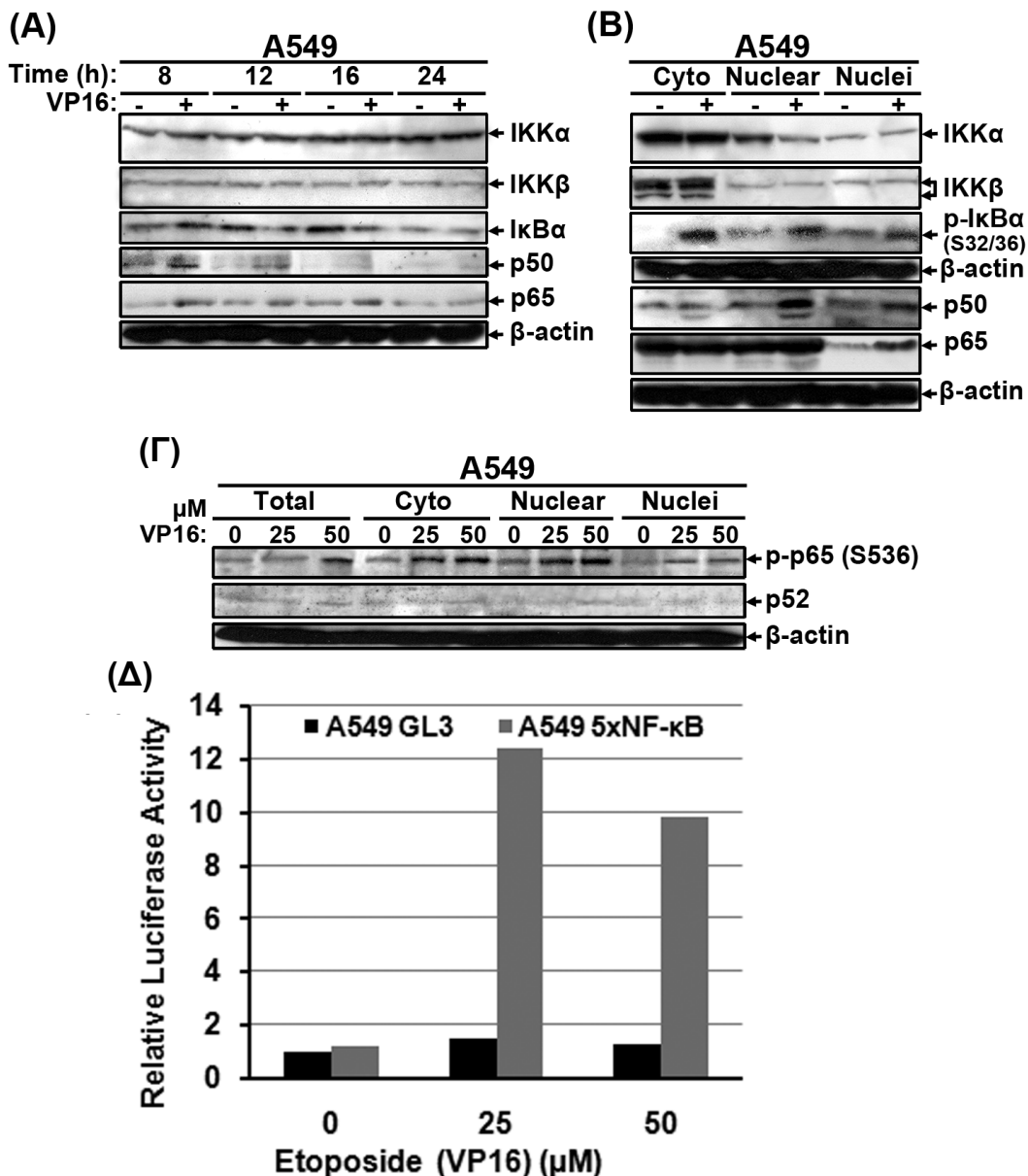
Οι βλάβες στο DNA ενεργοποιούν τόσο τον μεταγραφικό παράγοντα p53 (Ding et al., 2003; Kastan & Bartek, 2004; Braithwaite et al., 2005; Vousden and Lane, 2007; Harper and Elledge, 2007; Riley et al., 2008) όσο και την κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB (Wu et al., 2006; Janssens and Tschopp, 2006; Habraken & Piette, 2006; Wu and Miyamoto, 2007; Brzóska and Szumiel, 2009).

Για το λόγο αυτό, αναλύθηκε η χρόνο-εξαρτώμενη έκφραση διάφορων πρωτεϊνών των πορειών μεταγωγής σήματος του NF-κB σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από ασύγχρονες καλλιέργειες κυττάρων A549 παρουσία / απουσία VP16 (Σχ. 11A) και σε κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα και σε ολικά εκχυλίσματα από απομονωμένους πυρήνες κυττάρων A549, παρουσία / απουσία VP16 (Σχ. 11B), με άνοσο-αποτύπωμα κατά western. Πρώτον, και οι δυο ενεργοποιητικές κινάσες IKK, η IKKα και η IKKβ, εντοπίστηκαν τόσο στα κύτταρα, στα οποία δεν είχε χορηγηθεί VP16, όσο και στα κύτταρα που είχε χορηγηθεί VP16, αλλά δεν παρατηρήθηκαν προφανείς αλλαγές στην έκφραση τους με την πάροδο του χρόνου, ανεξάρτητα από την χορήγηση ή μη VP-16 (Σχ. 11A).

Η έκφραση της IκBa επάχθηκε 8 h μετά από τη χορήγηση VP16 στα κύτταρα και η έκφραση της μειώθηκε ύστερα από 12 h και 16 h από τη χορήγηση VP16. Στις 24 h, η έκφραση της IκBa ήταν χαμηλή και δεν υπήρχε αλλαγή στην έκφραση της μετά από τη χορήγηση VP16, συγκριτικά με το αντίστοιχο δείγμα ελέγχου. Η χορήγηση VP16 είχε ως αποτέλεσμα την αυξορρύθμιση της έκφρασης των p50 και p65, αλλά παρουσίασε ένα μερικώς διαφορετικό προφίλ. Η αυξορρύθμιση και των δυο υπομονάδων του NF-κB, p50 και p65, ανιχνεύθηκε στις 8 h, αλλά η έκφραση της p50 παρέμεινε υψηλή ως τις 12 h και της p65 ως τις 16 h, ύστερα από τη χορήγηση VP16 (Σχ. 11A). Τα δεδομένα αυτά προτείνουν πως η αρχική επαγωγή της έκφρασης της IκBa από το VP16 οφειλόταν στην ενεργοποίηση του NF-κB, καθώς η IκBa είναι γονίδιο-στόχος του NF-κB, και η προοδευτική αποδόμηση της μετά από τη χορήγηση VP16 οδήγησε στην παρατεταμένη επαγωγή της έκφρασης των υπομονάδων της κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κB, p50/p65.

Για να διερευνηθούν πιο διεξοδικά οι επιδράσεις του VP16 στην έκφραση των πρωτεϊνών σηματοδότησης του NF-κB, αναλύθηκε στη συνέχεια η ενδοκυττάρια έκφραση και ο υπό-κυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών σηματοδότησης του NF-κB μετά από τη χορήγηση 25 μM VP16 για 24 h στα κύτταρα A549 (Σχ. 11B). Ενώ στα κύτταρα A549, στα οποία δεν είχε χορηγηθεί VP16, οι IKKα και IKKβ εντοπίζονταν τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα, παρουσιάζοντας υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στο κυτταρόπλασμα, η χορήγηση VP16 δεν επηρέασε τον ενδοκυττάριο εντοπισμό τους (Σχ. 11B). Το γεγονός αυτό πιστοποιήθηκε τόσο σε πυρηνικά εκχυλίσματα όσο και σε εκχυλίσματα ολικών πρωτεϊνών από απομονωμένους πυρήνες (Σχ. 11B). Αυτό ήταν αντίθετο από τη μετατόπιση της IKKα, αλλά όχι της IKKβ, στον πυρήνα, ύστερα από τη χορήγηση H₂O₂ (Σχ. 4 Yamaguchi et al., 2007). Ωστόσο, ανιχνεύθηκαν διάφορες ζώνες (μπάντες) της IKKβ στα κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα κυττάρων A549 παρουσία / απουσία VP16 (Σχ. 11A), οι οποίες μπορεί να αντιστοιχούν στη φωσφορυλιωμένη μορφή της, όπως παρουσίασαν πρόσφατες μελέτες, σύμφωνα με τις οποίες, η μεταγραφική ικανότητα του NF-κB ήταν αυξημένη στα κύτταρα A549, συγκριτικά με άλλους ανθρώπινους καρκινικούς κυτταρικούς τύπους (Sun et al., 2007). Επίσης, αναλύσαμε την έκφραση της φώσφο-IκBa (σερίνες32/36). Η ανάλυση με άνοσο-αποτύπωμα κατά western έδειξε, πως η χορήγηση VP16 επήγαγε τη φωσφορυλίωση της IκBa (σερίνες32/36), η οποία εντοπίστηκε τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα (Σχ. 11B), σε συμφωνία με την παλινδρομική της κίνηση μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος (Renard et al., 2000; Birbach et al., 2002; Viatour et al., 2003; Kanarek et al., 2009). Στη συνέχεια αναλύθηκε η έκφραση και ο υπό-κυτταρικός εντοπισμός των υπομονάδων του NF-κB, p50 και p65 σε κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα και σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από απομονωμένους πυρήνες κυττάρων A549, παρουσία / απουσία VP16, με άνοσο-αποτύπωμα κατά western (Σχ. 11B). Το VP16 επήγαγε τη μετατόπιση και των δυο υπομονάδων του NF-κB, p50 και p65, στον πυρήνα, συγκριτικά με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου, στα οποία δεν χορηγήθηκε VP16, κάτι που ήταν πιο εμφανές στα εκχυλίσματα ολικών πρωτεϊνών από απομονωμένους πυρήνες (Σχ. 11B). Παρομοίως, αναλύθηκε η έκφραση της φώσφο-p65 (σερίνη536) στα κύτταρα A549 παρουσία /

απουσία VP16 (Σχ. 11Γ). Το VP16 αύξησε τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της p65 στη σερίνη536 υποδεικνύοντας αυξημένη ενεργότητα της p65, και κατ' ακολουθία αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα του NF-κΒ. Διερευνήθηκε επίσης, η έκφραση της p52, ωστόσο, τα επίπεδα έκφρασης της ήταν πολύ χαμηλά έως μη ανιχνεύσιμα ανεξαρτήτως της χορήγησης VP16 στα κύτταρα A549 (Σχ. 11Γ).



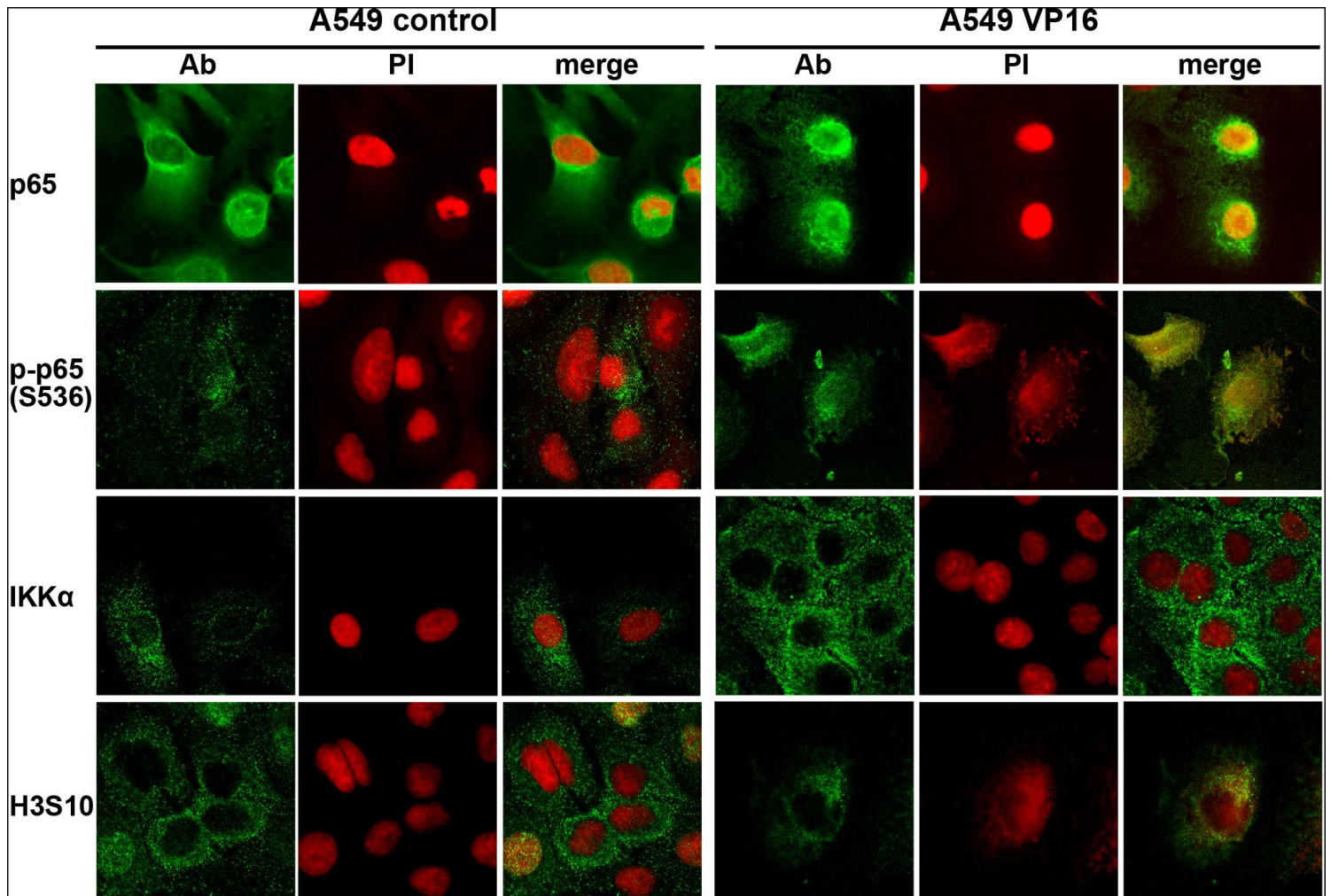
Σχήμα 11. Ενεργοποίηση του NF-κB στα κύτταρα A549 από το ετοποσίδιο/VP16. (A) Ανάλυση με άνοσο-αποτύπωμα κατά western της χρόνο-εξαρτώμενης έκφρασης των πρωτεϊνών των πορειών ενεργοποίησης του NF-κB σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κύτταρων A549 μετά την έκθεση τους σε 0 - 50 μM VP16 για 24 h. **(B)** Ανάλυση με άνοσο-αποτύπωμα κατά western της χρόνο-εξαρτώμενης έκφρασης των πρωτεϊνών των πορειών ενεργοποίησης του NF-κB σε κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα και σε ολικές πρωτεΐνες από απομονωμένους πυρήνες κυττάρων A549, μετά την έκθεση τους σε 0 ή 25 μM VP16 για 24 h. **(Γ)** Σε κύτταρα A549 χορηγήθηκε VP16 σε συγκεντρώσεις 0 - 50 μM και αναλύθηκε, με άνοσο-αποτύπωμα κατά western, η έκφραση των πρωτεϊνών φώσφο-p65 (σερίνη536) (p-p65 S536) και p52 σε ολικά, κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα και σε ολικές πρωτεΐνες από απομονωμένους πυρήνες. **(Δ)** Ανάλυση της ενεργότητας του NF-κB μετά τη διαμόλυνση πλασμιδίου που έφερε 5XκB ρυθμιστικά στοιχεία συνδεδεμένα με το γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης στα κύτταρα A549 μετά τη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων (0 - 25 μM) VP16.

Επομένως, το VP16 ενεργοποίησε την κανονική πορεία του NF-κΒ, όπως καταγράφηκε από τη φωσφορυλίωση της IκΒα στις σερίνες32/36, τη μετατόπιση στον πυρήνα των p50 και p65 και τη φωσφορυλίωση της p65 (p-p65 S536).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ενεργοποίηση του NF-κΒ από το VP16, αναλύοντας την ενεργότητα του με τον προσδιορισμό της ενεργότητας της λουσιφεράσης σε εκχυλίσματα από κύτταρα A549, μετά την έκθεση τους σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0 - 50 μM) VP16. Μετά από την παροδική διαμόλυνση των κυττάρων A549 με ένα φορέα που έφερε 5ΧκΒ ρυθμιστικά στοιχεία συνδεδεμένα με το γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης παρουσία / απουσία VP16 και αναλύθηκε η ενεργότητα της λουσιφεράσης, η οποία αντιπροσώπευε τη μεταγραφική ενεργότητα του NF-κΒ (Σχ. 11Δ). Η χορήγηση VP16 στα κύτταρα A549 επήγαγε τη μεταγραφική ενεργότητα του NF-κΒ με ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, όπως καταγράφηκε από την αυξημένη δραστηριότητα της λουσιφεράσης (Σχ. 11Δ).

Για να αναλυθεί περαιτέρω η ενεργοποίηση της κανονικής πορείας μεταγωγής σήματος του NF-κΒ ως απόκριση στο VP16, χρησιμοποιήθηκε ανοσοφθορισμός και συνεστιακή μικροσκοπία με λέιζερ για να ανιχνευθεί ο υπό-κυτταρικός εντοπισμός των p65, φώσφο-p65 στη σερίνη536 (p-p65 S536), IKKα και τη φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 στη σερίνη10 (H3S10) (Σχ. 12). Η χορήγηση VP16 στα κύτταρα A549 επήγαγε τη μετατόπιση της p65 και της φωσφορυλιωμένης μορφής της (p-p65 S536) στον πυρήνα, αλλά όχι της IKKα ή τη φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 στη σερίνη10.

Συνοπτικά, τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν πως το VP16 ενεργοποίησε την κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κΒ στα κύτταρα A549.

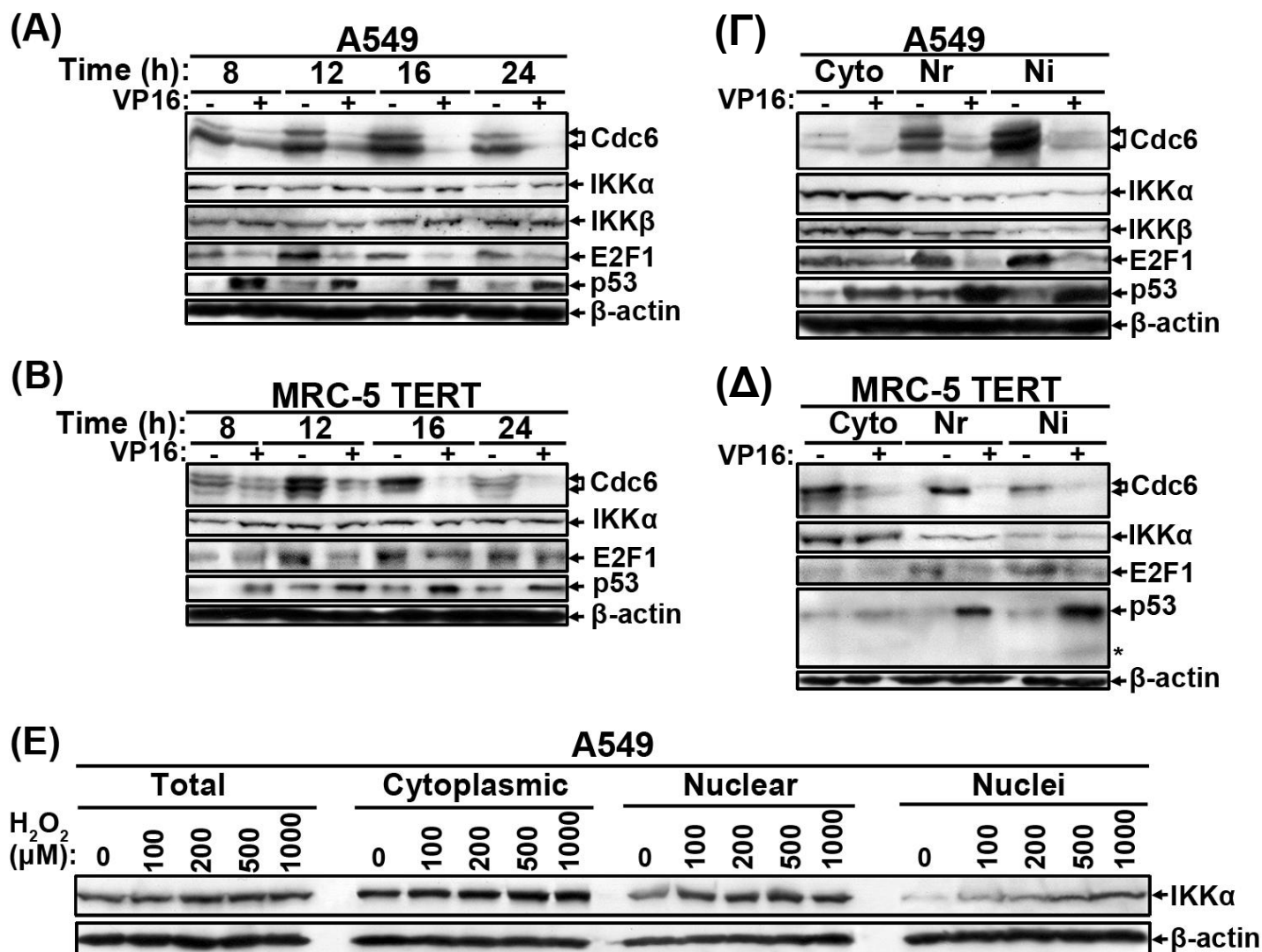


Σχήμα 12. Υπό-κυτταρικός εντοπισμός των p65, φώσφο-p65 στη σερίνη 536 (p-p65 S536), IKKα και της φωσφορυλιωμένης μορφής της ιστόνης 3 στη σερίνη 10 (H3S10) μετά την έκθεση των κυττάρων σε VP16. Η χορήγηση VP16 ενεργοποίησε τον NF-κΒ στα κύτταρα A549. Κύτταρα A549 εμβολιάσθηκαν σε καλυπτρίδες σε πολυτρυβλία των 6 πηγαδιών, σταθεροποιήθηκαν και επωάστηκαν με κατάλληλα αντισώματα για τον υπό-κυτταρικό εντοπισμό των p65, φώσφο-p65 στη σερίνη 536 (p-p65 S536), IKKα και της φωσφορυλιωμένης μορφής της ιστόνης 3 στη σερίνη 10 (H3S10), παρουσία / απουσία 25 μM VP16 για 24 h. Η ανίχνευση των μορίων έγινε με ανοσοφθορισμό και συνεστιακή μικροσκοπία με λέιζερ.

3.12 Η μειορρυθμίσση της έκφρασης της Cdc6 ως απόκριση στο VP16 και ο συσχετισμός της με την έκφραση του E2F1

Μια από τις δραματικές αλλαγές, που επάχθηκε από τη χορήγηση VP16 και η οποία οδήγησε στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου, ήταν η αξιοσημείωτη μειορρυθμίσση της έκφρασης της Cdc6, ενός E2F-ελεγχόμενου γονιδίου (Σχ. 10), επιπλέον της επαγωγής του άξονα p53 - p21^{Cip1/Waf1} (Σχ. 10) και της ενεργοποίησης της κανονικής πορείας του NF-κB (Σχ. 11 και 12). Παρότι πρόσφατες μελέτες έδειξαν, πως η p53 ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση της Cdc6 (Duursma and Agami, 2005), οι επιδράσεις των πορειών μεταγωγής σήματος του NF-κB στην έκφραση των γονιδίων-στόχων των E2Fs επισημάνθηκαν μόλις πρόσφατα (Massa et al., 2005; Tu et al., 2006; Araki et al., 2008; Penzo et al., 2009; Batsi et al., 2009; Shaw et al., 2009). Το γεγονός αυτό μας παρακίνησε να διερευνήσουμε την πιθανή σύνδεση ανάμεσα στον NF-κB και τη Cdc6, μετά από τη χορήγηση VP16 σε κύτταρα A549 και MRC-5 TERT, στα οποία η έκφραση της Cdc6 μειώθηκε αξιοσημείωτα μετά τη χορήγηση VP16 (Σχ. 10). Για να διερευνηθεί αν η έκφραση και ο υπό-κυτταρικός εντοπισμός της Cdc6 μεταβάλλεται, ως απόκριση στο VP16, και το αν τέτοιες μεταβολές συσχετίζονταν με την έκφραση των IKKα ή IKKβ, αναλύσαμε την έκφραση της Cdc6 σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων A549 και MRC-5 TERT, στα οποία χορηγήθηκε VP16 για 8, 12, 16 και 24 h (Σχ. 13A και B, αντίστοιχα). Ανάλυση με άνοσο-αποτύπωμα κατά western έδειξε, πως η έκφραση της Cdc6 επάχθηκε στα κύτταρα A549 και MRC-5 TERT μετά από διέγερση τους με ορό, ύστερα από 12 h, διατηρήθηκε σε υψηλά επίπεδα ως τις 16 h και σταδιακά μειώθηκε έως το χρονικό διάστημα των 24 h. Ωστόσο, παρουσία VP16 δεν υπήρξε επαγωγή στην έκφραση της Cdc6 και αντίθετα η έκφραση της κατεστάλη από το VP16 (Σχ. 13A και B). Η ανάλυση με άνοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση των IKKα και IKKβ έδειξε πως το VP16 δεν επηρέασε την έκφραση καμιάς εκ των δυο κινασών στα κύτταρα A549 (Σχ. 12A) ή της IKKα στα κύτταρα MRC-5 TERT (Σχ. 13B). Στη συνέχεια, αναλύθηκε η χρόνο-εξαρτώμενη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα E2F1, καθώς ρυθμίζει θετικά την έκφραση της Cdc6 (Hatoboer et al., 1998; Ohtani et al., 1998; Yan et al., 1998), σε κύτταρα A549, παρουσία /

απουσία 25 μ M VP16 (Σχ. 13A και B). Η έκφραση του E2F1 επάχθηκε στις 12 h, ύστερα από διέγερση με ορό, διατηρήθηκε σε υψηλά επίπεδα έως τις 16 h και μειώθηκε σταδιακά ως το διάστημα των 24 h.



Σχήμα 13. Μειορρύθμιση της έκφρασης της Cdc6 από το ετοποσίδιο/VP16. (A) και (B) Ανάλυση, με άνοσο-αποτύπωμα κατά western, της χρόνο-εξαρτώμενης έκφρασης των E2F1, p53, IKKα, IKKβ, Cdc6 και β-ακτίνης ως μάρτυρα, σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων A549 και MRC5-TERT, παρουσία / απουσία 26 μM VP16 για 8, 12, 16 και 24 h. (Γ) και (Δ) Ανάλυση με άνοσο-αποτύπωμα κατά western της έκφρασης των E2F1, p53, IKKα, IKKβ, Cdc6 και β-ακτίνης ως μάρτυρα σε κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα και σε ολικές πρωτεΐνες από απομονωμένους πυρήνες των κυττάρων A549 και MRC5-TERT απουσία ή παρουσία 25 μM VP16 για 24 h. (E) Ανάλυση με άνοσο-αποτύπωμα κατά western της έκφρασης της IKKα σε ολικά, κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα και σε ολικές πρωτεΐνες από απομονωμένους πυρήνες κυττάρων A549, ως απόκριση στη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων (0 - 1000 μM) H₂O₂.

Σε αντίθεση, το VP-16 μειορρύθμισε την έκφραση του E2F1 και απέτρεψε την επαγωγή της έκφρασης του από τον ορό. Επομένως, το προφίλ έκφρασης του E2F1 συσχετιζόταν με αυτό της έκφρασης της Cdc6, με την απώλεια της έκφρασης του E2F1 να συσχετίζεται με τη επακόλουθη απώλεια της έκφρασης της Cdc6 παρουσία VP16 (Σχ. 13A και B). Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η χρόνο-εξαρτώμενη έκφραση της p53 σε κύτταρα A549 και MRC-5 TERT παρουσία / απουσία 25 μ M VP16 (Σχ. 13A και B). Η έκφραση της p53 επάχθηκε ισχυρά 8 h μετά τη χορήγηση VP16 και αυξήθηκε σε υψηλότερα επίπεδα παρουσία VP16, από ότι στα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου, για ένα χρονικό διάστημα 24 h (Σχ. 13A και B). Επομένως, η επαγωγή της έκφρασης της p53 από το VP16 συσχετιζόταν με την απώλεια έκφρασης της Cdc6 τόσο στα κύτταρα A549 όσο και στα κύτταρα MRC-5 TERT.

Για να επαληθευθούν οι επιδράσεις του VP16 στην έκφραση των Cdc6, IKKs, E2F1 και p53, καθώς επίσης και στον υπό-κυτταρικό εντοπισμό τους, διερευνήθηκε η έκφραση τους σε κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα και σε εκχυλίσματα ολικών πρωτεϊνών από απομονωμένους πυρήνες, απουσία ή παρουσία 25 μ M VP16 για 24 h (Σχ. 13Γ και Δ). Η ανάλυση με άνοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση της Cdc6 σε κύτταρα A549 και MRC-5 TERT, απουσία ή παρουσία 25 μ M VP16 για 24 h, έδειξε, πως η Cdc6 εντοπιζόταν κυρίως στον πυρήνα και πως η χορήγηση VP16 κατέστειλε δραματικά την έκφραση της. Μια παρόμοια ανάλυση με άνοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση των IKK α και IKK β , έδειξε πως η χορήγηση VP16 δεν επηρέασε την έκφραση ή τον πυρηνικό εντοπισμό καμιάς εκ των δυο IKK κινασών στα κύτταρα A549 (Σχ. 13Γ) ή της IKK α στα κύτταρα MRC-5 TERT (Σχ. 13Δ). Η ανάλυση με άνοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση του E2F1 σε κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα και σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από απομονωμένους πυρήνες κυττάρων A549 και MRC-5 TERT, απουσία ή παρουσία 25 μ M VP16 για 24 h έδειξε, πως ο E2F1 εκφραζόταν κυρίως στον πυρήνα, αλλά η έκφραση του μειορρυθμίστηκε από το VP16, μια μεταβολή που συσχετιζόταν με τη μειορρύθμιση της έκφρασης της Cdc6. Μια παρόμοια ανάλυση για την έκφραση της p53 απουσία ή παρουσία 25 μ M VP16 για 24 h σε κύτταρα A549 και MRC-5 TERT έδειξε, πως το VP16 επήγαγε τα πυρηνικά επίπεδα

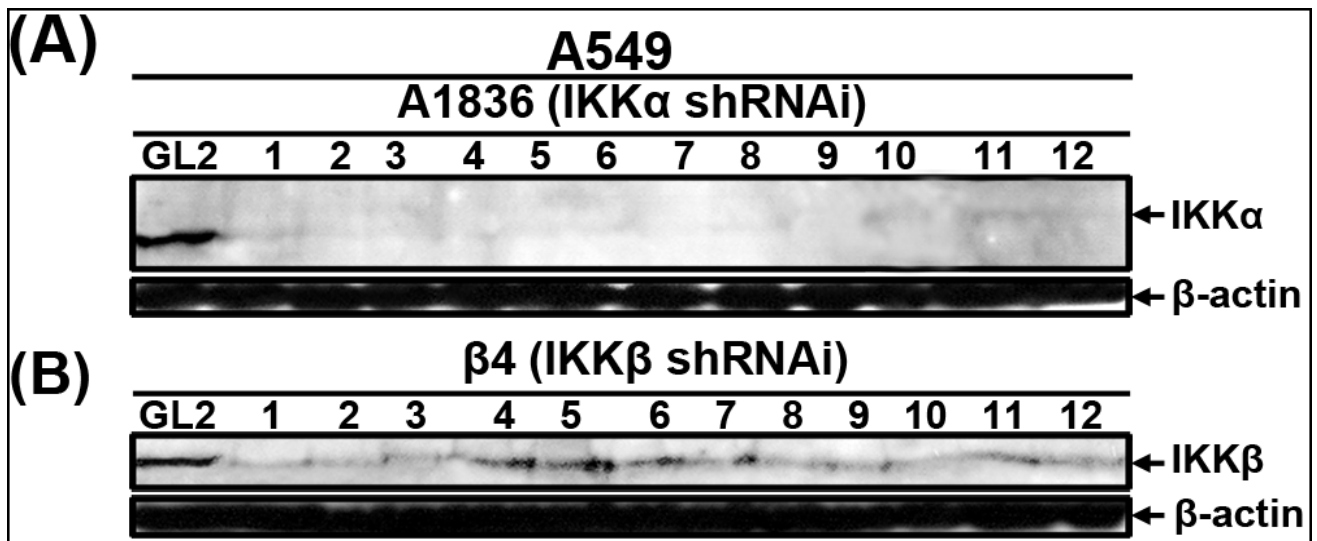
έκφρασης της p53 και στους δυο κυτταρικούς τύπους (Σχ. 13Γ και Δ). Συνολικά, τα δεδομένα αυτά έδειξαν, πως η μειορρύθμιση της έκφρασης της Cdc6 συσχετιζόταν άμεσα με τη μείωση της πυρηνικής έκφρασης του E2F1, την αυξορρύθμιση της έκφρασης της πυρηνικής p53 (Σχ. 13) και την ενεργοποίηση του NF-κB (Σχ. 11).

Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως η χορήγηση TNFα (Anest et al., 2003; Yamamoto et al., 2003) και H₂O₂ (Yamaguchi et al 2007a, b), τα οποία και τα δυο προκαλούν την παραγωγή ενδογενών ΔΜΟ, διέγειραν τη μετατόπιση της ΙΚΚα στον πυρήνα, αλλά όχι της ΙΚΚβ. Για το λόγο αυτό και για να επαληθευθούν προηγούμενα αποτελέσματα (Σχ. 4Α και Β), προσδιορίστηκε η έκφραση της ΙΚΚα σε ολικά, κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα και σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από απομονωμένους πυρήνες κυττάρων A549, στα οποία χορηγήθηκε H₂O₂ σε συγκεντρώσεις 0 - 1000 μΜ. Η ανάλυση με άνοσο-αποτύπωμα κατά western έδειξε, πως το H₂O₂ διέγειρε τη συσσώρευση της ΙΚΚα στον πυρήνα με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, κάτι που ήταν πιο φανερό στην ανάλυση ολικών πρωτεϊνών από απομονωμένους πυρήνες των κυττάρων (Σχ. 13Ε). Επομένως, παρά τη συσσώρευση των ενδογενών ΔΜΟ ως απόκριση στη χορήγηση VP16 (Σχ. 9Α), η έκφραση ή ο υπό-κυτταρικός εντοπισμός της ΙΚΚα δεν επηρεάστηκε (Σχ. 12 και 13), κάτι που συνέβη μετά από τη έκθεση των κυττάρων H₂O₂.

3.13 Αποσιώπηση της ΙΚΚα ή της ΙΚΚβ στα κύτταρα A549

Ο προαγωγέας του γονιδίου της ανθρώπινης πρωτεΐνης Cdc6 περιέχει τρεις λειτουργικές E2F συναινετικές (συγκαταβατικές) αλληλουχίες και έχει πολύ καλά τεκμηριωθεί ότι ρυθμίζεται από τον E2F1 (Hateboer et al., 1998; Ohtani et al., 1998; Yan et al., 1998). Ωστόσο, παρατηρήσαμε πως περιέχει, επίσης, NF-κB συναινετικές αλληλουχίες (Hateboer et al., 1998). Στην προσπάθεια μας να μελετήσουμε τη ρύθμιση της Cdc6 από τον NF-κB, κατασκευάσαμε σταθερές κυτταρικές σειρές A549, με ρετροϊικούς φορείς παρεμβολής RNA ενάντια στη λουσιφεράση (GL2), ως αρνητικό πρότυπο φορέα ελέγχου, είτε στην ΙΚΚα (shIKKα1836) ή την ΙΚΚβ (shIKKβ4) (που αναφέρονται ως ΙΚΚα^{KD} ή ΙΚΚβ^{KD}, αντίστοιχα), μέσω επιμόλυνσης με ρετροϊούς, όπως περιγράφεται

στα υλικά και μέθοδοι. Επιλέχθηκαν τυχαία δώδεκα κλώνοι και απομονώθηκαν είτε από τα κύτταρα A549 IKKα^{KD} (Σχ. 14A) ή από τα κύτταρα A549 IKKβ^{KD} (Σχ. 14B), οι οποίοι καλλιεργήθηκαν και αναλύθηκαν με άνοσο-αποτύπωμα κατά western για τη έκφραση της IKKα ή της IKKβ, αντίστοιχα. Σταθερή εισαγωγή του shIKKα1836, αλλά όχι του GL2 είχε ως αποτέλεσμα την ολοκληρωτική απώλεια της ενδογενούς έκφρασης της IKKα, σε όλους σχεδόν τους κυτταρικούς κλώνους, που αναλύθηκαν, και ο κλώνος-2, ο οποίος ορίζεται ως A549 IKKα-2^{KD}, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω αναλύσεις (Σχ. 14A).



Σχήμα 14. Κατασκευή κυττάρων A549 GL2, A549 IKKα^{KD} και A549 IKKβ^{KD}. (A) Ανάλυση της έκφρασης της IKKα με άνοσο-αποτύπωμα κατά western ολικών πρωτεϊνών των κυττάρων A549 GL2 που έφεραν ένα ρετροϊικό φορέα ενάντια στη λουσιφεράση ως πρότυπο αρνητικό φορέα ελέγχου και 12 κλώνων που απομονώθηκαν από τα κύτταρα A549 στα οποία είχε εισαχθεί σταθερά με επιμόλυνση ο ρετροϊικός φορέας shIKKα1836 (IKKα). (B) Ανάλυση της έκφρασης της IKKβ με άνοσο-αποτύπωμα κατά western ολικών πρωτεϊνών των κυττάρων A549 GL2 και 12 κλώνων που απομονώθηκαν από τα κύτταρα A549 στα οποία είχε εισαχθεί σταθερά με επιμόλυνση ο ρετροϊικός φορέας shIKKβ4 (IKKβ).

Παρόμοια, η σταθερή εισαγωγή του shIKKβ4 είχε ως αποτέλεσμα την πολύ ισχυρή μειορρύθμιση της ενδογενούς έκφρασης της IKKβ στους 7 από τους 12 κλώνους, που αναλύθηκαν, συγκριτικά με την έκφραση της IKKβ στα κύτταρα A549 GL2 και ο κλώνος-1, επιδεικνύοντας τη χαμηλότερη έκφραση της IKKβ, ορίστηκε ως A549 IKKβ-1^{KD}, και επιλέχθηκε για περαιτέρω αναλύσεις (Σχ. 14B).

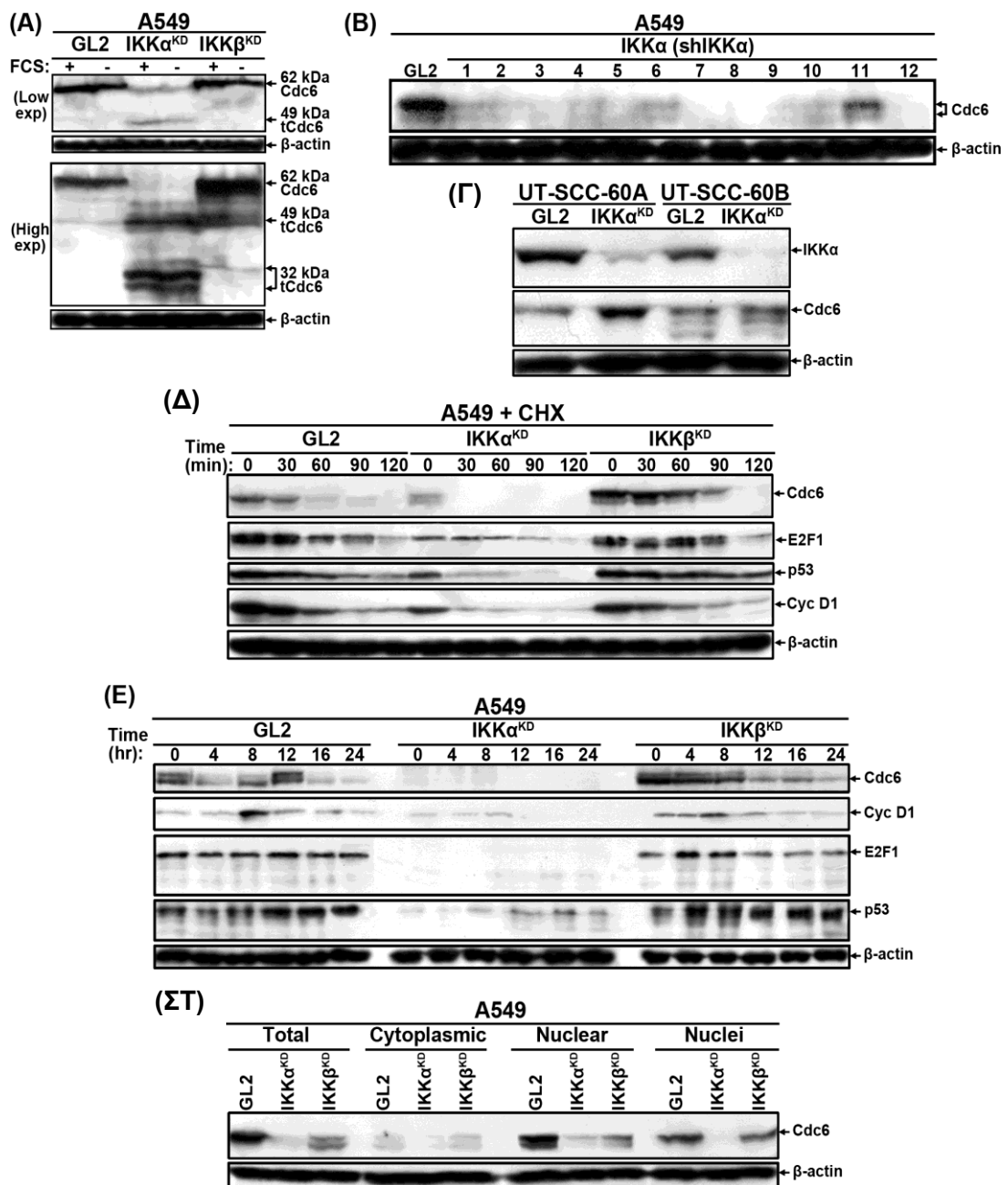
3.14 Η αποσιώπηση της IKKα, αλλά όχι της IKKβ, είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια της έκφρασης της Cdc6

Για να διερευνηθεί περαιτέρω η σύνδεση μεταξύ της απώλειας της Cdc6 και του NF-κB, αναλύθηκε στη συνέχεια πιο λεπτομερώς η έκφραση της Cdc6 σε κύτταρα A549 GL2, A549 IKKα^{KD} και A549 IKKβ^{KD} (Σχ. 14). Καταρχάς, η ανάλυση με άνοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση της Cdc6 σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και των τριών κυτταρικών τύπων, τα οποία καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία ορού για 24 h, έδειξε πώς η έκφραση της Cdc6 ήταν εξαρτώμενη από την διέγερση με ορό ή από την παρουσία μιτογόνων ερεθισμάτων. Δεύτερον, η αποσιώπηση της IKKα, αλλά όχι της IKKβ, είχε ως αποτέλεσμα την αξιοσημείωτη μειορρύθμιση της Cdc6 αλλά και την εμφάνιση μιας χαμηλότερου μοριακού βάρους ~50 kDa πρωτεϊνικού τμήματος, το οποίο πιθανά αντιπροσώπευε την κολοβωμένη μορφή της Cdc6 (tCdc6) (Yim et al., 2003; Yim et al., 2006). Αντίστοιχα, φάνηκε πως τα κύτταρα A549 IKKβ^{KD} εκφράζανε την Cdc6 σε υψηλότερα επίπεδα από τα πρότυπα κύτταρα ελέγχου A549 GL2 (Σχ. 15A). Παρόμοια ανάλυση με άνοσο-αποτύπωμα κατά western, όπου η μεμβράνη εκτέθηκε για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, επιβεβαίωσε αυτά τα ευρήματα και αποκάλυψε ακόμα πως η αποσιώπηση της IKKα είχε ως αποτέλεσμα τη, σχεδόν, ολοκληρωτική απώλεια της έκφρασης της 62 kDa Cdc6 και την εμφάνιση δυο, ισχυρά εκφραζόμενων, μικρότερων πρωτεϊνικών θραυσμάτων, τα οποία, πιθανότατα, αντιπροσώπευαν τις κολοβωμένες μορφές της Cdc6, την 49 kDa tCdc6 και την 32 kDa tCdc6 (Yim et al., 2003; Yim et al., 2006), ανεξάρτητα από την παρουσία ή απουσία του ορού στην καλλιέργεια (Σχ. 15A). Αντίθετα, στα κύτταρα A549 IKKβ^{KD}, η άθικτη 62 kDa Cdc6 ανιχνεύθηκε σε υψηλότερα επίπεδα από ότι στα αντίστοιχα πρότυπα κύτταρα ελέγχου A549 GL2 και

επίσης, η 49 kDa tCdc6 και, σε μικρότερο βαθμό, η 32 kDa tCdc6, εκφράζονταν ισχυρά μόνο στα διεγερμένα με ορό κύτταρα A549 IKKβ^{KD} (Σχ. 15A). Στα κύτταρα ελέγχου A549 GL2 η άθικτη 62 kDa Cdc6 εκφραζόταν ισχυρά, μαζί με μια χαμηλού επιπέδου έκφραση της 49 kDa tCdc6 (Σχ. 15A). Άρα, η αποσιώπηση της IKKα, αλλά όχι της IKKβ, είχε ως συνέπεια τη σημαντική μειορρύθμιση της άθικτης 62 kDa Cdc6 πρωτεΐνης και την εμφάνιση δυο κολοβωμένων μορφών της πρωτεΐνης Cdc6 49 kDa και 32 kDa tCdc6. Επειδή η έκφραση της Cdc6 διερευνήθηκε μόνο σε κύτταρα A549 IKKα^{KD} του κλώνου 2, αναλύσαμε, επίσης, την έκφραση της Cdc6 και στους 12 κλώνους που είχαν επιλεγθεί και απομονωθεί (Σχ. 14A) με άνοσο-αποτύπωμα κατά western (Σχ. 15B). Η ανάλυση της έκφρασης της Cdc6 σε όλους τους κλώνους A549 IKKα^{KD} έδειξε πως η απώλεια της έκφρασης της IKKα είχε ως αποτέλεσμα τη μειορρύθμιση της Cdc6 σε όλους τους υπό διερεύνηση κλώνους (Σχ. 14B).

Για να διερευνηθεί αν η απώλεια της έκφρασης της Cdc6 λόγω της απώλειας έκφρασης της IKKα ήταν εξειδικευμένη στα ανθρώπινα κύτταρα πνεύμονα, χρησιμοποιήσαμε ένα ζεύγος καρκινικών κυττάρων, τα οποία απομονώθηκαν από έναν πρωτογενή όγκο αμυγδαλής (UT-SCC-60A) και από τη μετάσταση του σε ένα λεμφαδένα στον τράχηλο (UT-SCC-60B), στα οποία εισήχθηκε σταθερά με επιμόλυνση ο ρετροϊικός φορέας shIKKα1836/IKKα^{KD} ή ο GL2. Ανάλυση με άνοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση της IKKα και της Cdc6 έδειξε πως ο μεταστατικός κλώνος εξέφραζε σε χαμηλότερα επίπεδα την κινάση IKKα και δεύτερον πως τα ενδογενή επίπεδα έκφρασης της IKKα είχαν μειορρυθμιστεί, σχεδόν ολοκληρωτικά, ύστερα από την εισαγωγή του ρετροϊικού φορέα shIKKα1836/IKKα^{KD}, και στους δυο κυτταρικούς τύπους (Σχ. 15Γ). Η ανάλυση για την έκφραση της Cdc6 αποκάλυψε πως η απώλεια έκφρασης της IKKα είχε ως αποτέλεσμα την αυξορρύθμιση των επιπέδων έκφρασης της Cdc6 στα κύτταρα UT-SCC-60A και σε μικρότερο βαθμό στα κύτταρα UT-SCC-60B, υποδηλώνοντας πως η επίδραση της αποσιώπησης της IKKα στην έκφραση της Cdc6: (α) δεν περιορίζεται μόνο στα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα αλλά ενέχεται και σε άλλους καρκινικούς επιθηλιακούς κυτταρικούς τύπους, και (β) η έκφραση της Cdc6 από την IKKα εξαρτάται από τον καρκινικό τύπο, καθώς η αποσιώπηση της IKKα σε ορισμένους καρκινικούς τύπους μειορρυθμίζει την

έκφραση της Cdc6 (π.χ. κύτταρα πνεύμονα), ενώ σε άλλους την αυξορρυθμίζει (π.χ. κύτταρα κεφαλής και τραχήλου). Σε κάθε περίπτωση, φαίνεται ότι η έκφραση της IKKα επηρεάζει την έκφραση της Cdc6 και οι διαφορετικές επιδράσεις της IKKα στην έκφραση της Cdc6 πιθανά συνάδει με το ρόλο της IKKα στην ογκογένεση όπου δρα ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας ή ως προαγωγέας της καρκινογένεσης (Nakayama et al. 2001; Cao et al., 2007; Luo et al., 2007; Maeda et al., 2007; Descargues et al., 2008; Liu et al., 2008).



Σχήμα 15. Ρύθμιση της έκφρασης της Cdc6 από τις IKKα και IKKβ. (A) Ανάλυση με ανοσο-αποτύπωμα κατά western ολικών πρωτεϊνών των κυττάρων A549 GL2, A549 IKKα^{KD} και A549 IKKβ^{KD} για την έκφραση της Cdc6, παρουσία ή απουσία ορού. (B) Ανάλυση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από όλους τους απομονωμένους κλώνους κυττάρων A549 IKKα^{KD} για την έκφραση της Cdc6. (Γ) Ανάλυση ολικών πρωτεϊνών, με ανοσο-αποτύπωμα κατά western, των κυττάρων UT-SCC-60A και UT-SCC-60B, στα οποία εισήχθηκε σταθερά ο ρετροϊικός φορέας shIKKα1836/IKKα^{KD} ή ο πρότυπος φορέας ελέγχου, GL2, για την έκφραση της IKKα και Cdc6 ή της β-ακτίνης. (Δ) Ανάλυση, με ανοσο-αποτύπωμα κατά western, ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των κυττάρων A549 GL2, A549 IKKα^{KD} και A549 IKKβ^{KD} στα οποία χορηγήθηκαν 25 μg/ml κυκλοεξαμιδίου (CHX) για χρονικά διαστήματα από 0 - 120 min για την έκφραση της Cdc6. (E) Ανάλυση της χρόνο-εξαρτώμενης έκφρασης των κυκλίνης D1, Cdc6, p53 και E2F1 ή β-ακτίνης, με ανοσο-αποτύπωμα κατά western, σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων A549 GL2, A549 IKKα^{KD} και A549 IKKβ^{KD}. (ΣΤ) Ανάλυση, με ανοσο-αποτύπωμα κατά western, ολικών, κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων και ολικών πρωτεϊνών από απομονωμένους πυρήνες των κυττάρων A549 GL2, A549 IKKα^{KD} και A549 IKKβ^{KD} για την έκφραση της Cdc6 ή β-ακτίνης.

3.15 Διαφορετικές επιδράσεις της αποσιώπησης των IKKα και IKKβ στη σταθερότητα της πρωτεΐνης Cdc6

Για να αξιολογηθεί περαιτέρω ο ρόλος της αποσιώπησης της IKKα ή IKKβ στην έκφραση της Cdc6, διερευνήθηκαν οι επιδράσεις τους στην πρωτεϊνική σταθερότητα της Cdc6, χορηγώντας στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους κυκλοξαμίδιο (Σχ. 15Δ). Ενώ στα κύτταρα A549 GL2 ο χρόνος ημίσειας ζωής της Cdc6 ήταν ~30-45 min, στα κύτταρα A549 IKKα^{KD} ο χρόνος ημίσειας ζωής της Cdc6 μειώθηκε δραματικά ακόμα και σε χρόνο t=0 min (Σχ. 15Δ). Ωστόσο και προς έκπληξη μας, η αποσιώπηση της IKKβ είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ημίσειας ζωής της Cdc6 στα ~90 min συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου A549 GL2 (Σχ. 15Δ). Έτσι, ενώ η έκφραση της Cdc6 μειορρυθμίστηκε ισχυρά στα κύτταρα A549 IKKα^{KD}, η αποσιώπηση της IKKβ στα κύτταρα A549 φάνηκε να έχει την αντίθετη επίδραση, συγκρινόμενη και με τα κύτταρα ελέγχου A549 GL2, στο μικρό χρονικό διάστημα, που έγινε η ανάλυση των 2 h. Επειδή η Cdc6 είναι γονίδιο στόχος του E2F1 (Hatoboer et al., 1998; Ohtani et al., 1998; Yan et al., 1998) και επιπλέον, η έκφραση της ρυθμίζεται αρνητικά από τον p53 σε μέτα-μεταγραφικό επίπεδο (Duursma and Agami, 2005), εξετάστηκε, στη συνέχεια η έκφραση των E2F1 και p53 στα κύτταρα A549 GL2, A549 IKKα^{KD} και A549 IKKβ^{KD}, στα οποία χορηγήθηκε κυκλοξαμίδιο (Σχ. 15Δ). Ο χρόνος ημίσειας ζωής του E2F1 στα κύτταρα A549 GL2 και A549 IKKα^{KD} ήταν ~60 min ωστόσο, η έκφραση του ήταν ~2-φορές χαμηλότερη στο δεύτερο κυτταρικό τύπο (Σχ. 15Δ). Αντίθετα, ο χρόνος ημίσειας ζωής του E2F1 στα κύτταρα A549 IKKβ^{KD} ήταν μεγαλύτερος ~90 min και η έκφραση του E2F1 ήταν υψηλότερη συγκρινόμενη με τα κύτταρα ελέγχου A549 GL2 (Σχ. 15Δ). Ένα παρόμοιο άνοσο-αποτύπωμα κατά western έδειξε πως ο χρόνος ημίσειας ζωής της p53 στα κύτταρα A549 GL2 ήταν ~60 min, ενώ στα κύτταρα A549 IKKα^{KD} μειώθηκε σε λιγότερο από 30 min και στα κύτταρα A549 IKKβ^{KD} αυξήθηκε σε ~75 min (Σχ. 15Δ). Επομένως, η έκφραση των E2F1 και p53 δε συσχετιζόταν με την έκφραση της Cdc6 σε όλους τους κυτταρικούς τύπους A549, στους οποίους χορηγήθηκε κυκλοξαμίδιο, υποδηλώνοντας πως ο E2F1 και η p53 δεν ήταν οι μοναδικοί παράγοντες υπεύθυνοι για τη μειορρύθμιση της Cdc6. Ανάλυση με άνοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση της κυκλίνης D1, μιας πρωτεΐνης-

στόχου του NF-κB, η οποία επάγεται από βλάβες στο DNA (Σχ. 10), έδειξε, πως ο χρόνος ημίσειας ζωής της κυκλίνης D1 ήταν ~60 min στα κύτταρα A549 GL2 και A549 IKKβ^{KD}, αλλά μειώθηκε αξιοσημείωτα σε λιγότερο από ~30 min στα κύτταρα A549 IKKα^{KD} και ακολούθησε ένα παρόμοιο πρότυπο έκφρασης με αυτό της έκφρασης της πρωτεΐνης Cdc6 (Σχ. 15Δ). Συνολικά, τα δεδομένα αυτά υποδήλωσαν, πως ενώ η αποσιώπηση της IKKα μείωσε τη σταθερότητα της πρωτεΐνης Cdc6, η αποσιώπηση της IKKβ προφανώς την αύξησε και πως οι IKKs μπορεί να ρυθμίζουν την έκφραση του E2F1 (Massa et al., 2005; Tu et al., 2006; Araki et al., 2008; Penzo et al., 2009) όσο και της p53 (Batsi et al., 2009; Xia et al., 2009).

3.16 Διαφορετικές επιδράσεις της αποσιώπησης της IKKα ή IKKβ στη διεγερμένη με ορό έκφραση της Cdc6

Με σκοπό να εκτιμηθούν περαιτέρω οι επιδράσεις της αποσιώπησης της IKKα ή IKKβ στην έκφραση της Cdc6 και των γνωστών ρυθμιστών της έκφρασης της, όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες E2F1 και p53, καθώς επίσης και στην έκφραση της κυκλίνης D1, κύτταρα A549 GL2, A549 IKKα^{KD} και A549 IKKβ^{KD} καλλιεργήθηκαν σε χαμηλή πυκνότητα (40 - 50% πληρότητα), διεγέρθηκαν με ορό για ένα διάστημα 24 h και ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν μετά από 4, 8, 12 16 και 24 h, και υποβλήθηκαν σε ανάλυση με ανοσο-αποτύπωμα κατά western (Σχ. 15E). Ενώ η έκφραση της Cdc6 επάχθηκε στις 8 h και έφτασε στην κορύφωση της στις 12 h, ύστερα από τη διέγερση των κυττάρων A549 GL2 με ορό, ήταν, σχεδόν εντελώς, απύουσα από τα κύτταρα A549 IKKα^{KD} (Σχ. 15E). Αντίθετα, στα κύτταρα A549 IKKβ^{KD} αναδείχθηκε ένα διαφορετικό πρότυπο έκφρασης: τα βασικά επίπεδα έκφρασης της Cdc6 ήταν υψηλότερα σε αυτά τα κύτταρα, συγκριτικά με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου A549 GL2 και η έκφραση της άρχισε να ελαττώνεται σταδιακά μετά από 8 h διέγερσης με ορό για να εξαφανιστεί, σχεδόν εντελώς, ύστερα από ένα χρονικό διάστημα 24 h επώασης με ορό. Ενδιαφέρον ήταν πως η αποσιώπηση της IKKβ, είχε ως αποτέλεσμα την απουσία επαγωγής της έκφρασης της Cdc6 από τον ορό, όπως παρατηρήθηκε στα κύτταρα ελέγχου A549 GL2 (Σχ. 15E). Ανάλυση της έκφρασης της κυκλίνης D1 έδειξε, πως η έκφραση της κυκλίνης D1 έφτανε

στην κορύφωση της 8 h μετά τη διέγερση με ορό των κυττάρων A549 GL2 και στη συνέχεια τα επίπεδα έκφρασης της μειώνονταν σταδιακά στο χρονικό διάστημα των 24 h (Σχ. 15E). Η έκφραση της κυκλίνης D1 και στους δυο κυτταρικούς τύπους με τις αποσιωπηθέντες ΙΚΚ, επάχθηκε στις 8 h, ύστερα από τη διέγερση των κυττάρων A549 ΙΚΚα^{KD} και A549 ΙΚΚβ^{KD} με ορό, αλλά η επαγωγή της μειώθηκε πολύ σημαντικά στα κύτταρα A549 ΙΚΚβ^{KD} και ακόμα πιο έντονο ήταν το φαινόμενο στα κύτταρα A549 ΙΚΚα^{KD}, στα οποία και άρχιζε να εξαφανίζεται στις 12 h και χάθηκε εντελώς, ύστερα από 24 h διέγερσης με ορό (Σχ. 15E). Επομένως, ενώ η έκφραση της κυκλίνης D1 μειώθηκε στα κύτταρα A549 ΙΚΚα^{KD} και κατά μικρότερο βαθμό στα κύτταρα A549 ΙΚΚβ^{KD}, η έκφραση της δεν ήταν παρόμοια με αυτήν της Cdc6, που ανιχνεύθηκε στα κύτταρα A549, στα οποία είχε αποσιωπηθεί μια εκ των δυο ΙΚΚ, υποδηλώνοντας ένα βαθμό εξειδίκευσης αλλά και πολύπλοκης ρύθμισης. Ανάλυση με άνοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση του E2F1 έδειξε, πως η έκφρασή του επάχθηκε στις 12 h, ύστερα από διέγερση με ορό, επιστρέφοντας προοδευτικά στα βασικά επίπεδα έκφρασης μετά από 24 h στα κύτταρα A549 GL2 (Σχ. 15E). Ενώ δεν ανιχνεύθηκε καθόλου η έκφραση του E2F1 στα κύτταρα A549 ΙΚΚα^{KD} αντίθετα, επάχθηκε στα κύτταρα A549 ΙΚΚβ^{KD} μετά από 4 h διέγερσης των κυττάρων με ορό και παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα έως τις 8 h, ύστερα από διέγερση με ορό, ωστόσο στη συνέχεια τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του E2F1 έπεσαν στα βασικά επίπεδα και παρέμειναν έτσι ως τις 24 h (Σχ. 15E). Μια παρόμοια ανάλυση με άνοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση της p53 έδειξε, πως η έκφραση της επάχθηκε μετά από 8 h και παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα έκφρασης μέχρι και μετά από 24 h διέγερσης με ορό στα κύτταρα A549 GL2. Αντίθετα, η έκφραση της p53, παρότι ακολούθησε το ίδιο πρότυπο με αυτή των κυττάρων A549 GL2, ήταν πολύ μειωμένη στα κύτταρα A549 ΙΚΚα^{KD} συγκριτικά με αυτή στα κύτταρα ελέγχου A549 GL2. Στα κύτταρα A549 ΙΚΚβ^{KD} η έκφραση της p53 επάχθηκε νωρίτερα από τις 4 h μετά τη διέγερση με ορό, ίσως εξαιτίας της ενισχυμένης σταθερότητας της (Xia et al., 2009) και στη συνέχεια, τα επίπεδα έκφρασης της μειώθηκαν σταδιακά για ένα χρονικό διάστημα επώασης 24 h (Σχ. 15E).

Στη συνέχεια, αναλύθηκε η έκφραση και ο υπό-κυτταρικός εντοπισμός της Cdc6 στα κύτταρα A549 GL2, A549 ΙΚΚα^{KD} και A549 ΙΚΚβ^{KD}, τα οποία είχαν

διεγερθεί με ορό και επωαστεί για 24 h (Σχ. 15ΣΤ). Ανάλυση με άνοσο-αποτύπωμα κατά western έδειξε, πως η Cdc6 εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα. Παρότι η αποσιώπηση της IKKα είχε ως αποτέλεσμα την ολοκληρωτική απώλεια της πυρηνικής Cdc6, η αποσιώπηση της IKKβ μειορρύθμισε αξιοσημείωτα την έκφραση της Cdc6 στα κύτταρα A549 (Σχ. 15ΣΤ).

Συνοψίζοντας, τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν, πως οι IKKs ρυθμίζουν την έκφραση της Cdc6 και πιθανώς δρουν ανοδικά των E2F1 και p53.

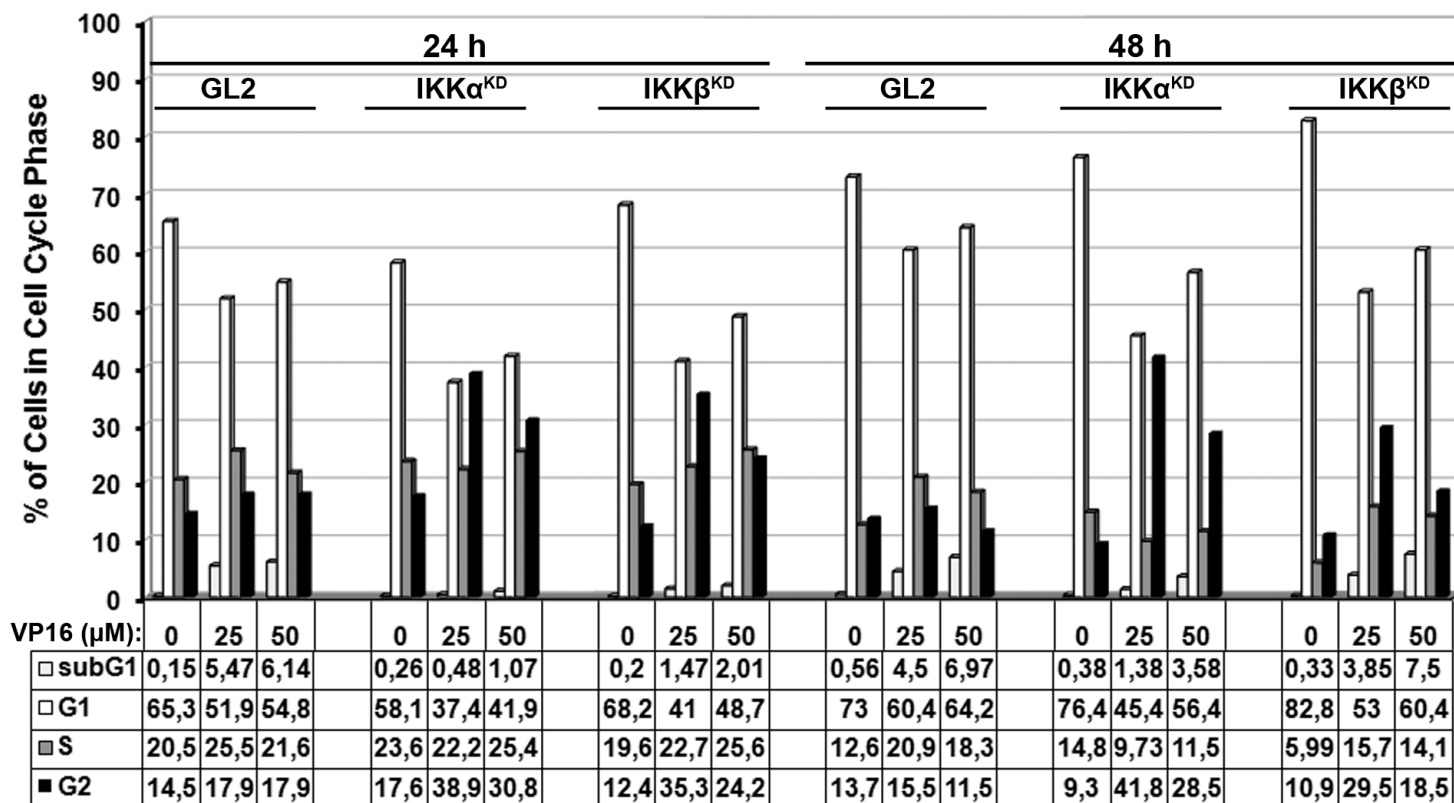
3.17 Η Αποσιώπηση της IKKα ή IKKβ επηρεάζει διαφορετικά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση στο VP16

Η διαφορετική ρύθμιση της έκφρασης της Cdc6 από τις IKKs (Σχ. 15) και η απώλεια έκφρασης της ως απόκριση στον παράγοντα πρόκλησης βλαβών στο DNA, VP16, (Σχ. 10), μας ώθησε να διερευνήσουμε της επιδράσεις του VP16 στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων A549 GL2, A549 IKKα^{KD} και A549 IKKβ^{KD}. Για το σκοπό αυτό χορηγήθηκαν 0 - 50 μM VP16 για 24 h και 48 h και στους τρεις κυτταρικούς τύπους, τα οποία στη συνέχεια υπέστησαν χρώση με PI και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής (Σχ. 16).

Ύστερα από επώαση 24 h, τα κύτταρα A549 IKKα^{KD} παρουσίασαν μια σημαντική μείωση του υπό-πληθυσμού τους στη φάση-G1 του κυτταρικού κύκλου (58.1% στα κύτταρα A549 IKKα^{KD} και 65.3% ή 68.2% στα κύτταρα A549 GL2 ή A549 IKKβ^{KD}, αντίστοιχα). Η μείωση του υπό-πληθυσμού των κυττάρων A549 IKKα^{KD} στη φάση G1 φάση συνοδεύτηκε από την αύξηση του στη φάση-S (23.6% στα κύτταρα A549 IKKα^{KD} και 20.5% ή 19.6% στα κύτταρα A549 GL2 ή A549 IKKβ^{KD}, αντίστοιχα) και στη φάση-G2 (17.6% στα κύτταρα A549 IKKα^{KD} και 14.5% ή 12.4% στα κύτταρα A549 GL2 ή A549 IKKβ^{KD}, αντίστοιχα) (Σχ. 16, αριστερό τμήμα).

Η χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων VP16 και στους τρεις διαφορετικούς τύπους για 24 h έδειξε αύξηση των υπό-πληθυσμών στις φάσεις S και G2 σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, με πιο σημαντική αύξηση αυτήν της φάσης G2 στα κύτταρα, που είχε αποσιωπηθεί η μια εκ των δυο IKK. Συγκεκριμένα, ύστερα από τη χορήγηση 25 μM VP16 για 24 h σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, τόσο τα κύτταρα A549 IKKα^{KD} όσο και τα κύτταρα

A549 ΙΚΚβ^{KD} παρουσίασαν σημαντική μείωση του υπό-πληθυσμού στη φάση-G2, και ειδικά ο πρώτος κυτταρικός τύπος, συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου (38.9% και 35.3% στα κύτταρα A549 ΙΚΚα^{KD} και A549 ΙΚΚβ^{KD}, αντίστοιχα, και 17.9% στα κύτταρα A549 GL2), ένα φαινόμενο που συνοδεύτηκε από τη μείωση του υπό-πληθυσμού στη φάση-G1 (37.4% και 41% στα κύτταρα A549 ΙΚΚα^{KD} και A549 ΙΚΚβ^{KD}, αντίστοιχα, και 51.9% στα κύτταρα A549 GL2), με μικρές μεταβολές στον υπό-πληθυσμό στη φάση-S (Σχ. 16, αριστερό τμήμα).



Σχήμα 16. Αριστερό τμήμα (24 h): Σε κύτταρα A549 GL2, A549 IKKα^{KD} και A549 IKKβ^{KD} μελετήθηκαν οι επιδράσεις του VP16 (0 - 50 μM) ύστερα από 24 h, με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιώντας ένα cycle testTM plus DNA reagent kit. **Δεξιό τμήμα (48 h):** Σε κύτταρα A549 GL2, A549 IKKα^{KD} και A549 IKKβ^{KD} μελετήθηκαν οι επιδράσεις του VP16 (0 - 50 μM) ύστερα από 48 h, με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιώντας ένα cycle testTM plus DNA reagent kit. Στον πίνακα στο κάτω μέρος του σχήματος απεικονίζονται τα ποσοστά των υπό-πληθυσμών των κυττάρων A549 GL2, A549 IKKα^{KD} και A549 IKKβ^{KD} στις διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου (sub-G1, G1, S και G2) παρουσία / απουσία 0 - 50 μM VP16 για 24 h και 48 h.

Η χορήγηση 50 μM VP16 για 24 h είχε ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση των κυττάρων A549 IKK α^{KD} και A549 IKK β^{KD} στη φάση-G2 του κυτταρικού κύκλου (παρότι παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση σε σχέση με τα κύτταρα, στα οποία χορηγήθηκαν 25 μM VP16), συγκριτικά με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου (30.8% και 24.2% στα κύτταρα A549 IKK α^{KD} A549 IKK β^{KD} , αντίστοιχα, και 17.9% στα κύτταρα A549 GL2), κάτι που συνοδεύτηκε από τη μείωση του υπό-πληθυσμού τους στη φάση-G1 (παρότι παρατηρήθηκε μια αύξηση σε σχέση με τα κύτταρα, στα οποία χορηγήθηκε 25 μM VP16) (41.9% και 48.7% στα κύτταρα A549 IKK α^{KD} και A549 IKK β^{KD} , αντίστοιχα, και 54.8% στα κύτταρα A549 GL2), και από μια μικρή αύξηση του υπό-πληθυσμού τους στη φάση-S (25.4% και 25.6% στα κύτταρα A549 IKK α^{KD} και A549 IKK β^{KD} , αντίστοιχα, και 21.6% στα κύτταρα A549 GL2) (Σχ. 16, αριστερό τμήμα).

Ύστερα από επώαση 48 h, τα κύτταρα A549 IKK α^{KD} και σε μεγαλύτερο βαθμό τα κύτταρα A549 IKK β^{KD} συσσωρεύτηκαν στη φάση-G1, συγκριτικά με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου A549 GL2. Η αύξηση του υπό-πληθυσμού τους στη φάση-G1 ήταν 76.4% και 82.8% στα κύτταρα A549 IKK α^{KD} και A549 IKK β^{KD} , αντίστοιχα, και 73% στα κύτταρα A549 GL2. Παρά το ότι τα κύτταρα A549 IKK α^{KD} παρουσίασαν μια μικρή αύξηση του υπό-πληθυσμού τους στη φάση-S (14.8% στα κύτταρα A549 IKK α^{KD} και 12.6% στα κύτταρα A549 GL2), τα κύτταρα A549 IKK β^{KD} παρουσίασαν μια σημαντική μείωση στην αντίστοιχη φάση (5.9%). Αυτές οι μεταβολές συνοδεύτηκαν από μια μείωση του υπό-πληθυσμού τους στη φάση-G2 (9.3% και 10.9% στα κύτταρα A549 IKK α^{KD} και A549 IKK β^{KD} , αντίστοιχα, και 13.7% στα κύτταρα A549 GL2) (Σχ. 16, δεξιά μεριά).

Η χορήγηση 25 μM VP16 για 48 h και στους τρεις κυτταρικούς τύπους έδειξε, πως τα κύτταρα A549 IKK α^{KD} και κατά ένα μικρότερο βαθμό τα κύτταρα A549 IKK β^{KD} παρουσίασαν μια αύξηση του υπό-πληθυσμού τους στη φάση-G2, συγκριτικά με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου A549 GL2 (41.8% και 29.5% στα κύτταρα A549 IKK α^{KD} και A549 IKK β^{KD} , αντίστοιχα, και 15.5% στα κύτταρα A549 GL2), ένα φαινόμενο που συνοδεύτηκε από τη μείωση του υπό-πληθυσμού τους στη φάση-G1 (45.4% και 53% στα κύτταρα A549 IKK α^{KD} και A549 IKK β^{KD} , αντίστοιχα, και 60.4% στα κύτταρα A549 GL2), με αύξηση του υπό-πληθυσμού τους στη φάση-S των κυττάρων A549 GL2 και A549 IKK β^{KD} (20.9% και 15.7%, αντίστοιχα), αλλά από μείωση του υπό-

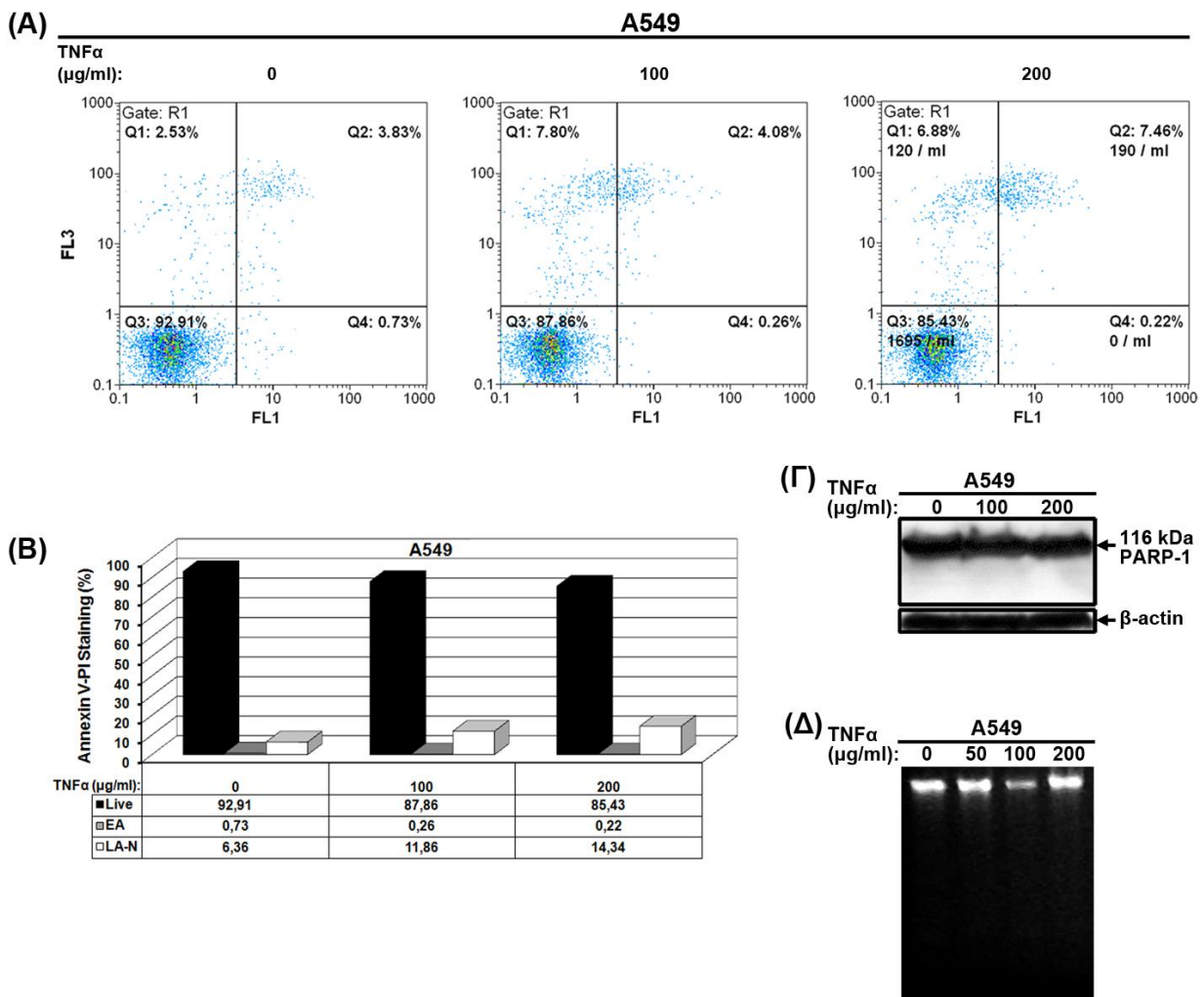
πληθυσμού των κυττάρων A549 IKK α ^{KD} (9.73%) (Σχ. 16, δεξιό τμήμα). Η χορήγηση 50 μ M VP16 για 48 h, είχε ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση των κυττάρων A549, στα οποία είχε αποσιωπηθεί μια εκ των IKK στη φάση-G2 του κυτταρικού κύκλου (κατά ένα μικρότερο ποσοστό, ωστόσο, συγκριτικά με την αντίστοιχη συσσώρευση ύστερα από τη χορήγηση 25 μ M VP16), συγκριτικά με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου A549 GL2 (28.5% και 29.5% στα κύτταρα A549 IKK α ^{KD} και A549 IKK β ^{KD}, αντίστοιχα, και 11.5% στα κύτταρα A549 GL2), κάτι που συνοδεύτηκε από μείωση του υπό-πληθυσμού τους στη φάση-G1, (σε μικρότερο βαθμό ωστόσο, συγκριτικά με ό, τι παρατηρήθηκε ύστερα από τη χορήγηση 25 μ M VP16) (56.4% και 60.4% στα κύτταρα A549 IKK α ^{KD} και A549 IKK β ^{KD}, αντίστοιχα, και 64.2% στα κύτταρα A549 GL2), και από μια μικρή αύξηση του υπό-πληθυσμού τους στη φάση-S (11.5% και 14.1% στα κύτταρα A549 IKK α ^{KD} και A549 IKK β ^{KD}, αντίστοιχα, και 18.3% στα A549 GL2) (Σχ. 16, δεξιά μεριά).

Συνολικά, τα δεδομένα αυτά έδειξαν, ότι ενώ η IKK α φαίνεται πως ρυθμίζει κυρίως την πρόοδο της φάσης-G1 και ιδιαίτερα κατά τα πρώιμα στάδια της φάσης-G1, που γίνεται πιο εμφανής μετά από πρόκληση βλαβών στο DNA, η IKK β εμπλέκεται στη ρύθμιση των όψιμων σταδίων της φάσης-G1, αλλά και εν μέρει της φάσης-S, που είναι εμφανής απουσία βλαβών στο DNA και γίνεται εντονότερη μετά την έκθεση των κυττάρων σε παράγοντες πρόκλησης βλαβών στο DNA, όπως στο ετοποσιδίιο/VP16 (Schneider et al., 2006; Tu et al., 2006; Prajapati et al., 2006; Zhu et al., 2007).

3.18 Η κυτταροκίνη TNF α δεν επήγαγε σημαντική απόπτωση στα κύτταρα A549

Ο TNF α (Tumor Necrosis Factor α) είναι μια κυτταροκίνη, οι κυτταρικές επιδράσεις της οποίας οφείλονται στην πρόσδεση της κυρίως στον υποδοχέα TNFR-1 (Tumor Necrosis Factor Receptor-1) και στην επακόλουθη ενεργοποίηση του, επάγοντας την κυτταρική απόπτωση αλλά και την κυτταρική επιβίωση. Ο συνδεδεμένος TNFR-1 στρατολογεί ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες σε σύμπλοκα μεταγωγής σήματος με διάφορες πιθανές λειτουργίες, όπως η ενεργοποίηση του NF- κ B και η έναρξη της απόπτωσης με την ενεργοποίηση των κασπασών-8/10. Για το λόγο αυτό, διερευνήθηκε το κατά πόσο η χορήγηση της κυτταροκίνης TNF α επήγαγε την απόπτωση στα κύτταρα A549.

Αρχικά, χορηγήσαμε σε κύτταρα A549 πολύ υψηλές συγκεντρώσεις TNF α 100 μ g/ml και 200 μ g/ml για 24 h και διερευνήσαμε το κατά πόσον η χορήγηση TNF α επήγαγε την απόπτωση στα κύτταρα A549 χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής με αννεξίνη V/PI (Σχ. 17A και B). Η ανάλυση έδειξε, πως υπήρχε μια αύξηση των αποπτωτικών κυττάρων, τόσο των πρώιμα αποπτωτικών όσο και των όψιμα αποπτωτικών κυττάρων, από 7,1% στα κύτταρα, στα οποία δεν είχε χορηγηθεί TNF α σε 12,32% και 14,56% στα κύτταρα A549, στα οποία χορηγήθηκαν 100 και 200 μ g/ml TNF α αντίστοιχα (Σχ. 17A και B). Για να διαπιστώσουμε το κατά πόσο η αύξηση των αποπτωτικών κυττάρων, ύστερα από τη χορήγηση TNF α , ήταν σημαντική ώστε να επάγει μοριακές μεταβολές, αναλύσαμε ολικά εκχυλίσματα κυττάρων A549, στα οποία χορηγήθηκαν 100 και 200 μ g/ml TNF α για 24 h, για την έκφραση της PARP-1, η διάσπαση της οποίας είναι μάρτυρας της απόπτωσης, ωστόσο δεν ανιχνεύθηκε η διασπασμένη μορφή της των 89 kD (Σχ. 17Γ). Στη συνέχεια και για να επαληθεύσουμε τα παραπάνω αποτελέσματα απομονώσαμε DNA από κύτταρα A549, στα οποία χορηγήσαμε 0, 50, 100 και 200 μ g/ml TNF α και το ηλεκτροφορήσαμε σε πηκτή αγαρόζης, ώστε να ελέγξουμε για πιθανή θραυσματοποίηση του, κάτι που αποτελεί μάρτυρα της απόπτωσης, ωστόσο δεν παρατηρήθηκε θραυσματοποίηση του DNA (Σχ. 17Δ).



Σχήμα 17. (A) και (B): Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής με αννεξίνη V/PI για την ποσοτικοποίηση της απόπτωσης σε κύτταρα A549 ως απόκριση στη χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων TNF α . **(Γ)** Ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα κατά western ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων κυττάρων A549, ύστερα από τη χορήγηση 100 και 200 $\mu\text{g/ml}$ TNF α , για την έκφραση της PARP-1. **(Δ)** Ηλεκτροφόρηση DNA για έλεγχο θραυσματοποίησης του DNA σε κύτταρα A549, ύστερα από τη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων TNF α

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB ανήκει σε μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων, που παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης, τα οποία ρυθμίζουν τις αποκρίσεις των κυττάρων στο στρες και στη γένεση της επίκτητης και της έμφυτης ανοσίας. Τα μέλη της οικογένειας του NF-κB δεσμεύονται στο DNA ως έτερο- ή όμο-διμερή, τα οποία προκύπτουν επιλεκτικά από πέντε πιθανές υπομονάδες: RelA/p65, c-Rel, RelB, p50 και p52. Οι υπομονάδες αυτές έχουν μια Rel ομόλογη περιοχή (RHD), η οποία παρουσιάζει ικανότητα δέσμευσης με το DNA.

Ο NF-κB ενεργοποιείται από ένα ενδιάμεσο επίπεδο ΔΜΟ, όπως το H₂O₂ με έναν εξειδικευμένο, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, τρόπο, όπου εμπλέκονται αρκετοί διαφορετικοί μηχανισμοί (Li and Karin, 1999), αν και πρόσφατες μελέτες προτείνουν πως το H₂O₂ ενεργοποιεί τον NF-κB κυρίως μέσω της κλασσικής IKK-εξαρτώμενης πορείας (Gloire et al., 2006). Επίσης ο NF-κB ενεργοποιείται από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Habraken and Piette, 2006; Janssens and Tschopp, 2006; Wu and Miyamoto, 2007; Brzoska and Szumiel, 2009). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν, ότι ως απόκριση σε αμφίκλωνες ρήξεις στο DNA (DSBs), όπως αυτές που επάγονται από το H₂O₂ και τους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, η ATM ήταν απαραίτητη για την ενεργοποίηση των IKK (Li et al., 2001) και δείχτηκε πως η NEMO/IKKγ σχετιζόταν με την ATM μετά την επαγωγή DSBs οδηγώντας στην ενεργοποίηση της IKKβ (Wu et al., 2006), προτείνοντας πως η επαγόμενη από τις βλάβες στο DNA απόκριση του NF-κB είναι απαραίτητη για την κυτταρική επιβίωση (Habraken and Piette, 2006; Janssens and Tschopp, 2006; Wu and Miyamoto, 2007; Perkins, 2007; Brzóska and Szumiel, 2009).

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή πρώτος στόχος ήταν να γίνει προσπάθεια, ώστε να διαλευκανθούν οι επιδράσεις της καταστολής των πορειών ενεργοποίησης του NF-κB στην απόπτωση των κυττάρων A549, η οποία επάγεται ύστερα από τη χορήγηση H₂O₂ αλλά και χημειοθεραπευτικών παραγόντων που ενοχοποιούνται για την αύξηση των ενδογενών επιπέδων ΔΜΟ, όπως το ετοποσίδιο/VP16.

4.1 Η χορήγηση H₂O₂ και ετοποσιδίου/VP16 προκαλούν τη συσσώρευση ενδογενών δραστικών μορφών οξυγόνου (ΔΜΟ) και οδηγούν στην ενεργοποίηση της πορείας απόκρισης σε βλάβες στο DNA

Η χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων H₂O₂ (Σχ. 1) ή ετοποσιδίου/VP16 (Σχ. 9) στα κύτταρα A549 και MRC-5 TERT οδήγησε στην παραγωγή και συσσώρευση ενδογενών δραστικών μορφών οξυγόνου (ΔΜΟ), με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η συσσώρευση των ενδογενών ΔΜΟ είναι υπεύθυνες για την πρόκληση βλαβών στο DNA (Norbury and Hickson, 2001; Pelicano et al., 2004; Laurent et al., 2005; Potter and Rabinovitch, 2005; Michod and Widmann, 2007; Goetz and Luch, 2008; Bartosz, 2009). Η συσσώρευση των ενδογενών ΔΜΟ μετά από τη χορήγησης H₂O₂ ή ετοποσιδίου/VP16 είχε ως αποτέλεσμα την έναρξη της πορείας απόκρισης σε βλάβες στο DNA ή DDR, όπως καθορίστηκε με την ανάλυση της έκφρασης επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην έναρξη της DDR (φωσφορυλίωση των ATM (S1981), Chk2 (T68), p53 στις σερίνες 15 και 20 και της γ-H2AX) (Σχ. 1 και 10). Να σημειωθεί ότι δεν υπάρχουν μελέτες σε σχέση με την ενεργοποίηση της DDR σε κύτταρα A549 ως απόκριση στο H₂O₂ ή το ετοποσιδίο/VP16, εκτός από μια που αναφέρεται στην επαγωγή και σταθερότητα της p53 (Ding et al. 2003), σε αντίθεση με μελέτες σε ανθρώπινες ινοβλάστες που εκτέθηκαν στο ετοποσιδίο/VP16 (Tang et al., 2002; Sengupta et al., 2005; Probin et al., 2006).

4.2 Η χορήγηση H₂O₂ και ετοποσιδίου/VP16 που προκαλούν την ενδογενή συσσώρευση των ΔΜΟ επηρεάζουν διαφορετικά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου

Αρχικά μελετήθηκαν οι επιδράσεις του H₂O₂ στον πολλαπλασιασμό των ανθρωπίνων καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα, A549, μέσω του προσδιορισμού της ικανότητας σχηματισμού αποικιών (clonogenic assay) για μια περίοδο 14άρων ημερών. Η χορήγηση H₂O₂ είχε ως αποτέλεσμα τη δόσο-εξαρτώμενη μείωση του σχηματισμού των αποικιών των κυττάρων A549 με

ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (Σχ. 1), κάτι που υποδήλωνε πως το H_2O_2 ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Στη συνέχεια, αναλύθηκε με κυτταρομετρίας ροής η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων A549 και MRC-5 TERT ως απόκριση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις H_2O_2 (Σχ. 2) ή ετοποσιδίου/VP16 (Σχ. 9). Το H_2O_2 επήγαγε τη συσσώρευση των κυττάρων A549 στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου κατά δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, με ενδείξεις επαγωγής της απόπτωσης (Σχ. 2), σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες τόσο σε κύτταρα A549 (Dandrea et al., 2004) όσον και σε άλλα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα (Chung et al., 2002). Σε αντίθεση, το ετοποσίδιο/VP16 επήγαγε τη συσσώρευση των κυττάρων A549 στη φάση G1-S του κυτταρικού κύκλου (Σχ. 9) και των κυττάρων MRC-5 TERT στις φάσεις G1-S (10 μ M) και G2-M φάση (20 μ M) του κυτταρικού κύκλου, ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης του ετοποσιδίου/VP16 (Σχ. 9). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε επαγωγή της απόπτωσης, σε σημαντικό ποσοστό τουλάχιστον, σε κανέναν από τους δυο κυτταρικούς τύπους. Η χορήγηση του ετοποσιδίου/VP16 μπορεί να επάγει τη διακοπή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών είτε στη φάση G1-S ή στη φάση G2-M (Sengupta et al., 2005; Darroudi et al., 2007) ή στη φάση G2-M (Tang et al., 2002; Zhou et al., 2005;).

Επομένως, μολονότι το H_2O_2 και ετοποσίδιο/VP16 προκαλούν την ενδογενή συσσώρευση των ΔΜΟ επηρεάζουν διαφορετικά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, υποδηλώνοντας ότι πιθανά επηρεάζουν διαφορετικές πορείες μεταγωγής σήματος και επομένως την έκφραση διαφορετικών πρωτεϊνών που ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.

Το H_2O_2 και το ετοποσίδιο/VP16 επηρεάζουν διαφορετικά την έκφραση των πρωτεϊνών που ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου

Ανάλυση της έκφρασης επιλεγμένων πρωτεϊνών που ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση στο H_2O_2 ή στο ετοποσίδιο/VP16 έδειξε ότι μολονότι και οι δύο παράγοντες προκάλεσαν τη συσσώρευση των ΔΜΟ, επηρέασαν διαφορετικά την έκφραση των πρωτεϊνών που ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Σχ. 2 και 10).

Ενώ η χορήγηση H_2O_2 ή ετοποσιδίου/VP16 οδήγησε στη δόσο-εξαρτώμενη επαγωγή της έκφρασης της (πυρηνικής) κυκλίνης D1 και του άξονα p53 - p21^{Cip1/Waf1} (Σχ. 2 και 10), αλλά και τη σταθερότητα της p53 διαμέσου της φωσφορυλίωσης της (Σχ. 2 και 10), οι επιδράσεις του H_2O_2 και του ετοποσιδίου/VP16 στην έκφραση της Cdc6, ενός παράγοντα αδειοδότησης (licensing factor) της αντιγραφής του DNA ήταν διαφορετικές. Ενώ το H_2O_2 επήγαγε μια φαινομενικά μικρή μειορρύθμιση της έκφρασης της Cdc6 και μόνον στις υψηλές, θανατηφόρες συγκεντρώσεις των 500 και 1000 μM H_2O_2 σε ολικά και κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα, προκάλεσε την αυξορρύθμιση της Cdc6 στον πυρήνα στις ίδιες συγκεντρώσεις. Όμως, συνολικά αυτά τα ευρήματα έδειξαν ότι μολονότι το H_2O_2 μειορρύθμιζε ελάχιστα την έκφραση της Cdc6, στην πραγματικότητα επήγαγε την πυρηνική μετατόπιση της (Σχ. 2). Αντίθετα, η χορήγηση ετοποσιδίου/VP16 οδήγησε στην ολική απώλεια της έκφρασης της Cdc6 (Σχ. 10 και 13). Η ανάλυση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 ο οποίος ελέγχει θετικά την έκφραση της Cdc6 έδειξε ότι η χορήγηση H_2O_2 επήγαγε τη μειορρύθμιση του τόσο στο κυτταρόπλασμα όσον και στον πυρήνα, και επομένως το πρότυπο (προφίλ) έκφρασης δεν συσχετίζεται με αυτό της Cdc6 ως απόκριση στο H_2O_2 (Σχ. 2). Σε αντίθεση, η απώλεια της Cdc6 και το πρότυπο έκφρασης της συσχετιζόνταν μ' αυτό του E2F1, ως απόκριση στο ετοποσίδιο/VP16 (Σχ. 13). Επιπρόσθετα, μολονότι έχει δειχθεί ότι ο μεταγραφικός παράγοντας p53 δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης της Cdc6 σε μέτα-μεταφραστικό επίπεδο (Druusma and Agami, 2005), η επαγωγή της p53 από το H_2O_2 και το ετοποσίδιο/VP16 δεν συσχετίζεται με το πρότυπο (προφίλ) έκφρασης της Cdc6 μετά την έκθεση των κυττάρων στους οξειδωτικούς παράγοντες. Να σημειωθεί επίσης ότι η Cdc6 εμπλέκεται στη ρύθμιση τόσο της φάσης G1-S όσο και της φάσης G2-M (Penzo et al., 2009).

Επομένως, οι διαφορετικές επιδράσεις του H_2O_2 και του ετοποσιδίου/VP16 στην έκφραση και τον υπό-κυτταρικό εντοπισμό της Cdc6 και του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 μπορεί, εν μέρει, να εξηγήσουν τις διαφορετικές επιδράσεις του H_2O_2 και του ετοποσιδίου/VP16 στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και τη διακοπή του σε διαφορετικές φάσεις, διαμέσου της επαγωγής του άξονα p53 - p21^{Cip1/Waf1}.

Τα παραπάνω ευρήματα έδειξαν ότι δεν υπάρχει απόλυτη ταύτιση του πρότυπου έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 που δρα ως θετικός μεταγραφικός ενεργοποιητής της Cdc6 (Hatoboer et al., 1998; Ohtani et al, 1998; Yan et al., 1998) ή της p53 που δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της Cdc6 (Druusma and Agami, 2005), ως απόκριση σε διαφορετικά ερεθίσματα, όπως το H₂O₂ και το ετοποσίδιο/VP16, που και τα δύο προκαλούν τη συσσώρευση ενδογενών ΔΜΟ. Επομένως, η έκφραση της Cdc6 θα πρέπει να ελέγχεται και από άλλους μεταγραφικούς παράγοντες ή άλλους μηχανισμούς.

4.3 Το H₂O₂ και το ετοποσίδιο/VP16 διαφέρουν ως προς τις επιδράσεις τους στην απόπτωση των κυττάρων

Οι αναλύσεις με κυτταρομετρία ροής με ιωδιούχο προπύδιο (PI) των κυττάρων A549 παρουσία / απουσία H₂O₂ (Σχ. 2) ή ετοποσιδίου/VP16 (Σχ. 9) για τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου τους, έδειξε μια μικρή αλλά ανοδική τάση του υπό-πληθυσμού των κυττάρων στη φάση sub-G1 μετά την έκθεση τους στο H₂O₂ (Σχ. 2), αλλά όχι στο ετοποσίδιο/VP16 (Σχ. 9). Για να διερευνηθούν καλύτερα οι επιδράσεις του H₂O₂ στην κυτταρική επιβίωση διεξήχθη ανάλυση με κυτταρομετρία ροής αννεξίνης-V/PI η οποία έδειξε μια προοδευτική αύξηση του ποσοστού των αποπτωτικών κυττάρων A549 σε αντιστοιχία με τις αυξανόμενες συγκεντρώσεις H₂O₂. Η αύξηση των αποπτωτικών κυττάρων οφειλόταν στην αύξηση των όψιμων αποπτωτικών/νεκρωτικών κυττάρων (Σχ. 3). Η επαγόμενη από το H₂O₂ απόπτωση επιβεβαιώθηκε με την ανάλυση της έκφρασης επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην απόπτωση μετά την έκθεση των κυττάρων A549 στο H₂O₂ (Σχ. 3). Παρατηρήθηκε μια δόσο-εξαρτώμενη μετατροπή του λόγου των αντί-αποπτωτικών (Bcl-2) έναντι των προ-αποπτωτικών (Bax) πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 προς όφελος των δευτέρων, με τη μεορρύθμιση της Bcl-2 και την αυξορρύθμιση και τον ολιγομερισμό της Bax. Αυτό το εύρημα ήταν σημαντικό καθώς τα μέλη της υπεροικογένειας της Bcl-2 είναι οι κύριοι ρυθμιστές της μιτοχονδριακής αποπτωτικής διαδικασίας. Τα αντί-αποπτωτικά (Bcl-2 και Bcl-X_L) και τα προ-αποπτωτικά (Bax και Bak) μέλη της υπεροικογένειας της Bcl-2 ρυθμίζουν την αποπτωτική διαδικασία, εν μέρει, ελέγχοντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα. Επομένως, ο

λόγος των προ- και των αντί-αποπτωτικών μελών της υπεροικογένειας της Bcl-2 καθορίζει την ευαισθησία ή την ανθεκτικότητα των κυττάρων σε αποπτωτικά ερεθίσματα (Hengartner 2000; Adams and Cory, 2007; Chipuk and Green, 2008). Σε συμφωνία με το παραπάνω, δείχτηκε ότι το H₂O₂ προήγαγε την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP-1, η οποία αποτελεί υπόστρωμα της κασπάσης-3, ιδιαίτερα στον πυρήνα των κυττάρων (Σχ. 3). Η επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων A549 συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες (Franek et al., 2001; Fujita et al., 2002; Nanavaty et al., 2002; Geiser et al., 2004; Upadhyay et al., 2004; Fisher et al., 2007).

Για να επαληθευθεί η απουσία αποπτωτικής απόκρισης, εξαιτίας της χορήγησης ετοποσιδίου/VP16 στα ανθρώπινα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα A549 και στις δυνητικά αθανατοποιημένες ανθρώπινες ινοβλάστες πνεύμονα MRC-5 TERT, αναλύθηκε η έκφραση των Bcl-2, Bax και PARP-1. Μολονότι η χορήγηση του ετοποσιδίου/VP16 οδήγησε στη μειορρύθμιση της έκφρασης της Bcl-2 και στην αυξορρύθμιση της έκφραση της Bax, δεν ανιχνεύθηκε σημαντική έκφραση της πρωτεολυτικά διασπασμένης 89 kDa μορφής της PARP-1, υποδηλώνοντας πως το ετοποσίδιο/VP16 μπορεί να ευαισθητοποιεί τα κύτταρα ως προς την απόπτωση, αλλά δεν επαρκεί για να επάγει μια αποπτωτική απόκριση (Σχ. 10). Ενώ υπάρχουν μελέτες σε σχέση με την πρόκληση βλαβών στο DNA όπως ρήξεις των αλυσίδων του DNA (Potter et al., 2005), δεν υπάρχουν μελέτες σχετικές με την επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων A549 από το ετοποσίδιο/VP16.

Συμπερασματικά, τα παραπάνω δεδομένα έδειξαν πως ενώ και το H₂O₂ και το ετοποσίδιο/VP16 ενεργοποίησαν την πορεία απόκρισης σε βλάβες στο DNA (DDR), το H₂O₂ ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στη φάση G2-M και επήγαγε την απόπτωση των κυττάρων με ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, ενώ το ετοποσίδιο/VP16 επήγαγε μόνον την αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου κυρίως στις φάσεις G1-S και G2-M.

4.4 Η κατάσταση ενεργοποίησης του NF-κB στα κύτταρα A549 ήταν διαφορετική ως απόκριση στο H₂O₂ ή ετοποσίδιο/VP16

Μοντέλο ενεργοποίησης του NF-κB από το H₂O₂

Ο NF-κB είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ευαίσθητος στην οξειδοαναγωγή, ο οποίος ενεργοποιείται από τυχόν οξειδωτική προσβολή προστατεύοντας τα κύτταρα από την απόπτωση (Gloire et al., 2006a). Διάφορες μελέτες έδειξαν πως το H₂O₂ δεν ενεργοποίησε τον NF-κB σε κύτταρα A549 (Li et al., 1997) ή επήγαγε τη φωσφορυλίωση και την αποδόμηση της IκBa (Lee et al., 2008), άλλες, ωστόσο, έδειξαν πως η χορήγηση H₂O₂ στα ίδια κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NF-κB (Rahman et al., 2002; Moodie et al., 2004; Hou et al., 2009). Επιπλέον, δείχτηκε πως παρόλο που το H₂O₂ αύξησε την ενεργότητα των IKK κινασών και τη φωσφορυλίωση της IκBa στη σερίνη 32 με ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, δεν υπήρξε ανιχνεύσιμη αποδόμηση της IκBa αλλά ούτε και πυρηνική μετατόπιση του NF-κB, επαγόμενη από το H₂O₂ (Jaspers et al., 2001).

Είναι λοιπόν φανερό ότι η ενεργοποίηση του NF-κB από το H₂O₂ στα κύτταρα A549 δεν έχει αποσαφηνιστεί, με βάση τις παραπάνω αντικρουόμενες μελέτες. Για να διερευνηθεί η κατάσταση του NF-κB στα κύτταρα A549 ως απόκριση στο H₂O₂, αναλύθηκε η έκφραση και ο υπό-κυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στις πορείες μεταγωγής σήματος του NF-κB σε ολικά κυτταρικά, κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα και ολικές πρωτεΐνες από απομονωμένους πυρήνες, με άνοσο-αποτύπωμα κατά western (Σχ. 4).

Η ανάλυση έδειξε πως οι ενεργοποιητικές κινάσες του NF-κB, IKKα και IKKβ εκφράζονται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα και ότι το H₂O₂ δεν επηρέασε τα ολικά επίπεδα έκφρασης των IKKs, εκτός από μια ελάχιστη μείωση της έκφρασης της IKKα, μετά από τη χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων H₂O₂ στα κύτταρα A549. Ωστόσο, η χορήγηση H₂O₂ προκάλεσε τη διαφορετική ενδοκυττάρια κατανομή της IKKα από την IKKβ. Συγκεκριμένα, το H₂O₂ επήγαγε τη δόσο-εξαρτώμενη πυρηνική συσσώρευση της IKKα αλλά όχι της IKKβ (Σχ. 4). Τα αποτελέσματα αυτά υπέδειξαν πως η IKKα μπορεί να έχει έναν επιπρόσθετο πυρηνικό ρόλο στην ανεξάρτητη από

τον NF-κB έκφραση γονιδίων, επιπλέον από το ρόλο που έχει στην εξαρτώμενη από τον NF-κB έκφραση γονιδίων (Anest et al., 2003; Yamamoto et al., 2003; Massa et al., 2005; Gloire et al., 2006b; Perkins, 2007).

Επίσης, η χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων H_2O_2 μειορρύθμισε την έκφραση της IκBa στα ολικά και κυρίως στα κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα και προήγαγε την πυρηνική μετατόπιση και συσσώρευση της (Birbach et al., 2000; Renard et al., 2000; Enesa et al., 2008; Kanarek et al., 2009). Αυτό το εύρημα οφείλεται τόσο στη συνεχή μετακίνησης από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και αντίστροφα (shuttling), αλλά και αποτελεί ένδειξη της ενεργοποίησης του NF-κB, καθώς η IκBa αποτελεί μεταγραφικό στόχο του NF-κB, και η νέο-συντιθέμενη IκBa μετατοπίζεται στον πυρήνα (Kanarek et al., 2009). Όμως, το H_2O_2 προήγαγε τη φωσφορυλίωση της IκBa στις σερίνες 32/36, κάτι που παρατηρήθηκε στα ολικά και κυτταροπλασματικά, και όχι στα πυρηνικά, εκχυλίσματα, σε συγκεντρώσεις 500 και 1000 μM H_2O_2 (Σχ. 4). Επομένως, η φωσφορυλιωμένη μορφή της IκBa (Ser32/36) παρουσίασε μια διαφορετική υπό-κυτταρική κατανομή από την IκBa. Ενώ η μετατόπιση της IκBa στον πυρήνα μπορεί να ρυθμίζει τη δυναμική και την ένταση της ενεργοποίησης του NF-κB (Birbach et al., 2000; Renard et al., 2000; Enesa et al., 2008; Kanarek et al., 2009), είναι γνωστό ότι η φωσφορυλίωση της IκBa στο κυτταρόπλασμα είναι ένδειξη της ενεργοποίησης του NF-κB (Hayden and Ghosh, 2004; Perkins, 2007; Kanarek et al., 2009).

Όσον αφορά την έκφραση και την ενδοκυττάρια κατανομή των υπομονάδων του NF-κB, p50 και p65, η χορήγηση H_2O_2 δεν επηρέασε τα επίπεδα έκφρασής τους, ούτε φαινομενικά επήγαγε τη μετατόπιση τους στον πυρήνα αν και οι δυο ανιχνεύθηκαν τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι τα κύτταρα A549 φέρουν μεταγραφικά ενεργό NF-κB σε υψηλότερα επίπεδα από ότι άλλες καρκινικές σειρές (Sun et al., 2007). Ωστόσο, η χορήγηση H_2O_2 επήγαγε τη φωσφορυλίωση της p65 στη σερίνη 536 (p-p65 S536) και τη μετατόπιση της στον πυρήνα (Σχ. 4).

Η πυρηνική μετατόπιση των IKKα και p-p65 S536 καθώς και της φωσφορυλιωμένης μορφής της ιστόνης 3 στη σερίνης 10 (H3S10), που αποτελεί υπόστρωμα της IKKα, ως απόκριση στο H_2O_2 (Σχ. 4) υποδήλωσε ότι η ενεργοποίηση του NF-κB από το H_2O_2 διεξήχθη πιθανά διαμέσου της IKKα-

εξαρτώμενης φωσφορυλίωσης της υπομονάδας του NF-κB, p65, και την επακόλουθη μετατόπιση της στον πυρήνα όπου σχημάτισε ένα έτερο-διμερές σύμπλοκο με την πυρηνική υπομονάδα p50. Ο προσδιορισμός της μεταγραφικής ενεργότητας του NF-κB, μολονότι επάχθηκε με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο στα κύτταρα A549 τα οποία εκτέθηκαν στο H₂O₂, η επαγωγή ήταν ~2 - 2.5 - φορές (Σχ. 4). Αυτή η φαινομενικά χαμηλή ενεργότητα μπορεί να οφείλεται στο ότι τα κύτταρα A549 παρουσιάζουν υψηλή ενεργότητα NF-κB, συγκρινόμενα με άλλες ανθρώπινες καρκινικές σειρές (Sun et al., 2007), όπως αναφέρθηκε παραπάνω ή ότι η επαγωγή της ενεργότητας του NF-κB κατά ~2 - 2.5 φορές, σε συνάρτηση με την πυρηνική μετατόπιση της φωσφορυλιωμένης μορφής της p65 (p-p65 S536) ήταν επαρκής για να επηρεάσει την έκφραση γονιδίων-στόχων του NF-κB. Θα πρέπει βέβαια να σημειώσουμε ότι η IKKα εκτός από τις NF-κB-εξαρτώμενες επιδράσεις της έχει και NF-κB-ανεξάρτητες επιδράσεις που οφείλονται στην πυρηνική μετατόπιση της τόσο από τον TNFα (Anest et al., 2003; Yamamoto et al., 2003), όσον και από το H₂O₂ (Yamaguchi et al., 2007a; Yamaguchi et al., 2007b). Επομένως, η χορήγηση του H₂O₂ στα κύτταρα A549 οδήγησε τόσο στην πυρηνική μετατόπιση της IKKα, όσον και στην IKKα-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της p65 (p-p65 S536) που μετατοπίσθηκε στον πυρήνα όπου σχημάτισε ένα έτερο-διμερές σύμπλοκο p-p65/p50 με επακόλουθο την ενεργοποίηση του NF-κB. Αυτά τα ευρήματα είναι φανερό ότι, το H₂O₂, τουλάχιστον στα κύτταρα A549, ενεργοποιεί την κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB (διαμέσου της φωσφορυλίωσης και πυρηνικής μετατόπισης της p65) και επάγει την πυρηνική μετατόπιση της IKKα που ανεξάρτητα μπορεί να επηρεάσει τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων του NF-κB (Gloire et al., 2006; Perkins, 2007). Αυτά τα ευρήματα συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες σε σχέση με την επαγωγή του NF-κB (Rahman et al., 2002; Moodie et al., 2004; Hou et al., 2009) και τη φωσφορυλίωση της p65 (Hou et al., 2008) σε κύτταρα A549, καθώς επίσης και με την πυρηνική μετατόπιση της IKKα σε διαφορετικά καρκινικά κύτταρα (Yamaguchi et al., 2007a, b) και φυσιολογικές ανθρώπινες εμβρυϊκές ινοβλάστες πνεύμονα, MRC-5 (αδημοσίευτα αποτελέσματα, Ε. Κωλέττας & Χ. Μπάτση).

Ισχυρή ενεργοποίηση της κανονικής πορείας του NF-κΒ στα κύτταρα A549 από το ετοποσίδιο/VP16

Επειδή οι βλάβες στο DNA ενεργοποιούν τόσο τον μεταγραφικό παράγοντα p53 (Ding et al., 2003; Kastan & Bartek, 2004; Braithwaite et al., 2005; Vousden and Lane, 2007; Harper and Elledge, 2007; Riley et al., 2008) όσον και την κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κΒ (Wu et al., 2006; Janssens and Tschopp, 2006; Habraken & Piette, 2006; Wu and Miyamoto, 2007; Brzóska and Szumiel, 2009), αναλύθηκε, κατά τον ίδιο τρόπο όπως παραπάνω, η χρόνο-εξαρτώμενη έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στις πορείες ενεργοποίησης του NF-κΒ, σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από ασύγχρονες καλλιέργειες κυττάρων A549 (Σχ. 11) και σε κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα και σε ολικά εκχυλίσματα από απομονωμένους πυρήνες κυττάρων A549, παρουσία ή απουσία 25 μM ετοποσιδίου/VP16 για 24 h (Σχ. 11).

Πρώτον, ενώ η έκφραση των ενεργοποιητικών κινασών του NF-κΒ, IKKα και IKKβ δεν επηρεάστηκε από το ετοποσίδιο/VP16, η επαγωγή της έκφρασης των IκΒα, p50 και p65 από το ετοποσίδιο/VP16 υποδήλωσαν την ενεργοποίηση της κανονικής πορείας του NF-κΒ, καθώς η IκΒα είναι γονίδιο-στόχος του NF-κΒ, και η προοδευτική αποδόμηση της, μετά από τη χορήγηση VP16 οδήγησε στην παρατεταμένη επαγωγή της έκφρασης των υπομονάδων της κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κΒ, p50 και p65 (Σχ. 11A). Επίσης, το VP16 δεν επηρέασε τον υπό-κυτταρικό εντοπισμό των IKKα και IKKβ (Σχ. 11B, και Σχ. 12), σε αντίθεση με το H₂O₂ που προκάλεσε την πυρηνική μετατόπιση της IKKα (Σχ. 4) και σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (Yamaguchi et al., 2007a, b), ενώ ανιχνεύθηκαν διάφορες μπάντες της IKKβ στα κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα των κυττάρων A549, ανεξαρτήτως της χορήγησης VP16 (Σχ. 11B), οι οποίες μπορεί να αντιστοιχούν στη φωσφορυλιωμένη μορφή της, πιθανώς λόγω της αυξημένης μεταγραφικής ικανότητας του NF-κΒ στα κύτταρα A549, συγκριτικά με άλλες ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές (Sun et al., 2007).

Επιπλέον, το ετοποσίδιο/VP16 επήγαγε τη φωσφορυλίωση της IκΒα (σερίνη 32/36) στο κυτταρόπλασμα και σε μικρότερο βαθμό στον πυρήνα (Σχ. 11B), πιθανά λόγω της κυτταροπλασματικής - πυρηνικής παλινδρόμησης

(cytoplasmic-nuclear shuttling) της IκBα (Renard et al., 2000; Birbach et al., 2002; Viatour et al., 2003; Kanarek et al., 2009), καθώς επίσης και την πυρηνική μετατόπιση και των δυο υπομονάδων της κανονικής πορείας του NF-κB, p50 και p65, και αύξησε τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της p65 στη σερίνη 536 (p-p65 S536) (Σχ. 11B και Γ), χωρίς να μεταβάλλει τα επίπεδα έκφρασης της υπομονάδας της μη-κανονικής πορείας του NF-κB, p52 (Σχ. 11Γ). Η φωσφορυλίωση της p65 (p-p65 S536) υποδήλωσε αυξημένη ενεργότητα της p65, και επομένως αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα του NF-κB (Σχ. 11B και Γ), η οποία και επιβεβαιώθηκε με το προσδιορισμό της ενεργότητας του γονιδίου της λουσιφεράσης, ως γονίδιο αναφοράς, συνδεδεμένο με 5XκB ρυθμιστικά στοιχεία (Σχ. 11Δ). Μια επιπλέον απόδειξη για την ενεργοποίηση της κανονικής πορείας του NF-κB επιτεύχθηκε με άνοσο-φθορισμό και συνεστιακή μικροσκοπία με λέιζερ που ανίχνευσε την πυρηνική μετατόπιση τόσο της p65 όσον και της φωσφορυλιωμένης μορφής της p-p65 S536 ως απόκριση στο ετοποσίδιο/VP16 (Σχ. 12).

Συμπερασματικά, ενώ το H₂O₂ επήγαγε την πυρηνική μετατόπιση της IKKα, και πιθανά την IKKα-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της p65 (p-p65 S536) που μετατοπίστηκε στον πυρήνα όπου σχημάτισε ένα έτερο-διμερές σύμπλοκο p-p65/p50 με την επακόλουθη ενεργοποίηση του NF-κB κατά ~2-2.5 φορές (Σχ. 4Γ), το ετοποσίδιο/VP16 οδήγησε στην ενεργοποίηση της κανονικής πορείας του NF-κB, αυξάνοντας τη μεταγραφική του ενεργότητα κατά ~12 φορές (Σχ. 11Δ). Επομένως, η ενεργοποίηση του NF-κB ήταν ισχυρότερη στα κύτταρα A549 που εκτέθηκαν στο ετοποσίδιο/VP16 από ότι εκείνα που εκτέθηκαν στο H₂O₂ κατά ~6 φορές. Επιπρόσθετα, ο μηχανισμός ενεργοποίησης του NF-κB από το H₂O₂ φαίνεται να οφείλεται στις NF-κB-εξαρτώμενες και NF-κB-ανεξάρτητες επιδράσεις της IKKα λόγω της πυρηνικής της μετατόπισης, ενώ ο μηχανισμός ενεργοποίησης του NF-κB από το ετοποσίδιο/VP16 οφείλεται αποκλειστικά στην ενεργοποίηση της κανονικής πορείας του NF-κB, και επομένως θα επηρεάζει γονίδια-στόχους μόνον αυτής της πορείας ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα.

4.5 Ο ρόλος της κανονικής πορείας του NF-κB στις επιδράσεις του H₂O₂ στα κύτταρα A549

Ο γενετικός χειρισμός της κανονικής πορείας του NF-κB μετέβαλε την έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

Επειδή το H₂O₂ οδήγησε στην μικρή επαγωγή της ενεργότητας του NF-κB (Σχ. 3), διερευνήσαμε το ρόλο της κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κB ως απόκριση στο H₂O₂ στα κύτταρα A549.

Για το σκοπό αυτό, αρχικά χρησιμοποιήθηκε ένας υπερκαταστολέας της κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κB, η IκBaSR, η οποία είναι μια κυρίαρχη αρνητική μορφή της IκBa (S32A/S36A) που δρα *in trans*, με τις σερίνες (S) 32 και 36 να έχουν μεταλλαχθεί σε αλανίνες (A). Λόγω των μεταλλάξεων των σερινών σε αλανίνες, η IκBaSR δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί και κατ' ακολουθία να ουβικιτινωθεί και να αποδομηθεί από το πρωτεόσωμα 26S. Επομένως ακόμη και αν η ενδογενής IκBa φωσφορυλιωθεί από το πρωτεϊνικό σύμπλοκο των IKK ως απόκριση σε κάποιο ερέθισμα, ελευθερώνοντας το έτερο-διμερές της κανονικής πορείας του NF-κB, p50/p65, επιτρέποντας το έτσι να μετατοπιστεί στον πυρήνα, η ιδιοσυστατική έκφραση της εξωγενούς μεταλλαγμένης πρωτεΐνης IκBaSR [IκBa (S32A/S36A)] θα ξαναδεσμεύσει το έτερο-διμερές p50/p65 στο κυτταρόπλασμα και θα παρεμποδίσει την πυρηνική μετατόπιση του, και τη δέσμευση του στους προαγωγείς γονιδίων-στόχων του. Συνολικά, η IκBaSR [IκBa (S32A/S36A)] δρα ως κυρίαρχος καταστολέας της ενεργοποίησης της κανονικής πορείας του NF-κB. Με τη χρήση αυτού του συστήματος κατασκευάστηκαν με ρετροϊκή επιμόλυνση σταθεροί κυτταρικοί κλώνοι των κυττάρων A549 που έφεραν είτε την IκBaSR ή έναν πρότυπο φορέα ελέγχου (Vec) (Σχ. 5).

Σε αντίθεση, χρησιμοποιώντας ένα δεύτερο ρετροϊκό σύστημα το οποίο έφερε μια μεταλλαγμένη, ιδιοσυστατικά ενεργό μορφή της IKKβ, την IKKβca, ενεργοποιήθηκε η κανονική πορεία του NF-κB. Η IKKβca έφερε μεταλλάξεις στο βρόγχο ενεργοποίησης-T (T-loop activation motif) όπου οι σερίνες 177/178, που φωσφορυλιώνονται ως απόκριση σε ένα εξωγενές ερέθισμα, μεταλλάχθηκαν σε γλουταμινικό οξύ. Ως αποτέλεσμα της εισαγωγής της

IKKβca σε κύτταρα είναι η ενεργοποίηση της κανονικής πορείας του NF-κB. Με τη χρήση αυτού του συστήματος κατασκευάστηκαν με ρετροϊκή επιμόλυνση σταθεροί κυτταρικοί κλώνοι των κυττάρων A549 που έφεραν είτε την IKKβca ή έναν πρότυπο φορέα ελέγχου (Neo) (Σχ. 7).

Η ιδιοσυστατική υπερέκφραση της IκBaSR επηρέασε την έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μετά την έκθεση των κυττάρων A549 στο H₂O₂, σε σύγκριση με τα κύτταρα A549 Vec. Η χορήγηση H₂O₂ είχε ως αποτέλεσμα τη δόσο-εξαρτώμενη αυξορρύθμιση της κυκλίνης D1 στα κύτταρα A549 Vec, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες σε κύτταρα A549 (Dandrea et al., 2004).

Η υπό-κυτταρική κατανομή της κυκλίνης D1 εξαρτάται από τη φάση του κυτταρικού κύκλου. Μολονότι η κυκλίνη D1 συνθέτεται καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, η πυρηνική συνάθροιση της είναι περιοδική. Υψηλά επίπεδα πυρηνικής κυκλίνης D1 παρατηρούνται κατά τη φάση-G1, μειώνονται κατά τη φάση-S και αυξάνονται πάλι κατά τη φάση-G2. Κατά τη φάση-G1, η νεοσυντιθέμενη κυκλίνη D1 αλληλεπιδρά με την CDK4/6 και μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου επάγει τη φωσφορυλίωση της pRb για την απελευθέρωση του E2F1. Κατά τη φάση-S, η κυκλίνη D1 εξέρχεται από τον πυρήνα και εντοπίζεται πλέον στο κυτταρόπλασμα. Η πυρηνική εξαγωγή της κυκλίνης D1, και η επακόλουθη πρωτεολυτική αποδόμηση της εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση της στο κατάλοιπο θρεονίνης 268 (Thr268) από την κινάση GSK-3β (Sherr, 2002). Επομένως η επαγωγή και η πυρηνική συνάθροιση της κυκλίνης D1 από το H₂O₂ (Σχ. 2 και 65) συσχετίζεται με τη διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2-M (Σχ. 2). Σε αντίθεση, στα κύτταρα A549 IκBaSR η επαγωγή της κυκλίνης D1 από το H₂O₂ ήταν χαμηλότερη και εμφανής σε υψηλές συγκεντρώσεις H₂O₂ (Σχ. 5B). Η χρόνο-εξαρτώμενη ανάλυση της έκφρασης της κυκλίνης D1 μετά τη διέγερση των κυττάρων με ορό έδειξε ότι η IκBaSR καθυστέρησε την επαγωγή της κυκλίνης D1 από τον ορό, σε σύγκριση με τα κύτταρα A549 Vec (Σχ. 5Γ). Αυτά τα ευρήματα ήταν σύμφωνα με το ρόλο του NF-κB ως θετικού ρυθμιστή της έκφρασης της κυκλίνης D1 σε διάφορα κυτταρικά συστήματα και χρησιμοποιώντας έναν παρόμοιο υπερκαταστολέα του NF-κB (Hinze et al., 1999; Guttridge et al., 1999; Joyce et al., 1999; Eto, 2000; Ouyang et al., 2005; Klein et al., 2007) ή άλλες μοριακές αναλύσεις (Toualbi-Abed et al.,

2008). Αυτό επιβεβαιώθηκε περαιτέρω όταν συγκρίθηκε η έκφραση της κυκλίνης D1 σε κύτταρα A549 Vec και σε A549 IKKβca (Σχ. 7) στα οποία η κανονική πορεία του NF-κΒ ήταν ενεργοποιημένη (Σχ. 7B). Ενώ η επαγωγή της κυκλίνης D1 από το H₂O₂ στα κύτταρα A549 Neo (Σχ. 7Γ) ήταν όμοια μ' αυτήν στα κύτταρα A549 Vec (Σχ. 5B), η υπερέκφραση της IKKβca είχε σαν αποτέλεσμα την επαύξηση της έκφρασης της κυκλίνης D1 μετά την έκθεση των κυττάρων στο H₂O₂. Επομένως ενώ η IκΒαSR μειορρύθμισε τα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1, η IKKβca αυξορρύθμισε τα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1 μετά την έκθεση των κυττάρων στο H₂O₂, σε σύγκριση με τα πρότυπα κύτταρα ελέγχου (A549 Vec ή A549 Neo).

Αντίθετα, η έκφραση των E2F1 και Cdc6, ενός παράγοντα αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA, που βρίσκεται κάτω από το μεταγραφικό έλεγχο του E2F1 (και ιδιαίτερα του E2F2), μειώθηκε και σε όλους τους κυτταρικούς τύπους μετά από τη χορήγηση H₂O₂, ανεξάρτητα αν έφεραν είτε έναν πρότυπο φορέα ελέγχου, την IκΒαSR (Σχ. 5) ή την IKKβca (Σχ. 7). Η χρόνο-εξαρτώμενη ανάλυση της Cdc6 και του E2F1 μετά τη διέγερση και των δύο κυτταρικών τύπων με ορό έδειξε ότι η έκφραση τους επάχθηκε 8 h μετά από τη διέγερση των κυττάρων με ορό. Όμως, ενώ η έκφραση της Cdc6 ήταν οριακά χαμηλότερη στα κύτταρα A549 IκΒαSR σε σχέση με αυτήν που ανιχνεύθηκε στα κύτταρα A549 Vec, η έκφραση του E2F1 ήταν οριακά υψηλότερη στα A549 IκΒαSR σε σύγκριση με εκείνη στα κύτταρα A549 Vec, 8 h μετά από τη διέγερση τους με ορό (Σχ. 5Γ), ευρήματα που εν μέρει συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες σε ινοβλάστες ποντικού MEFs (Penzo et al., 2009).

Επιπλέον, ενώ επάχθηκε η έκφραση του άξονα p53 - p21^{Cip1/Waf1} ως απόκριση στο H₂O₂ κατά έναν δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, και στους δυο κυτταρικούς τύπους A549 Vec και A549 IκΒαSR, με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα A549 IκΒαSR συγκριτικά με τα A549 Vec (Σχ. 5Γ); η υπερέκφραση της IKKβca μειορρύθμισε την επαγωγή της p53, ενώ αυξορρύθμισε την επαγωγή της p21^{Cip1/Waf1} από το H₂O₂ (Σχ. 7Γ). Η υψηλότερη έκφραση της p53 στα A549 IκΒαSR επιβεβαιώθηκε με την ανάλυση της χρόνο-εξαρτώμενης έκφρασης της μετά τη διέγερση των κυττάρων με ορό, υποδηλώνοντας ότι η ενεργοποίηση της κανονικής πορείας του NF-κΒ οδηγεί στη μειορρύθμιση της p53, σύμφωνα με προηγούμενα

ευρήματα (Batsi et al., 2009; Xia et al., 2009). Όμως, η επαγωγή της p21^{Cip1/Waf1} από το H₂O₂ στα κύτταρα A549 IκBaSR και στα A549 IκKβca έδειξε ότι η έκφραση της p21^{Cip1/Waf1} ρυθμίζεται από NF-κB-εξαρτώμενους και NF-κB-ανεξάρτητους μηχανισμούς (Batsi et al., 2009; Penzo et al., 2009).

Η καταστολή της ενεργοποίησης της κανονικής πορείας του NF-κB ευαισθητοποίησε τα κύτταρα A549 στην H₂O₂-επαγόμενη απόπτωση

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το H₂O₂ επήγαγε την απόπτωση στις καλλιέργειες καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα A549 (Kazzaz et al., 1996 ; Li et al., 1997; Jyonouchi et al., 1998; Franek et al., 2001; Nanavaty et al., 2002; Ravid et al., 2003; Geiser et al., 2004) και πως η έκταση της επαγόμενης από το H₂O₂ απόπτωσης μειώθηκε σημαντικά σε κύτταρα, που είχαν προηγουμένως εκτεθεί σε υπεροξεία μέσω επαγωγής της ενεργοποίησης του NF-κB (Li et al., 1997; Franek et al., 2001). Η καταστολή της ενεργοποίησης του NF-κB μέσω διαμόλυνσης των κυττάρων A549 με μια κυρίαρχη αρνητική μορφή της IκB ενίσχυσε σημαντικά την έκταση της επαγόμενης από το H₂O₂ απόπτωσης, προτείνοντας πως η υπεροξεία αναστέλλει την οξειδωτικά επαγόμενη απόπτωση και πως αυτή η αναστολή επιτυγχάνεται μέσω του NF-κB (Franek et al., 2001).

Η ανάλυση με κυτταρομετρίας ροής με χρώση αννεξίνης-V/PI των κυττάρων A549 Vec και A549 IκBaSR μετά από την έκθεσή τους σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις H₂O₂ έδειξε ότι το H₂O₂ επήγαγε την απόπτωση και των δυο κυτταρικών τύπων, A549, ωστόσο η υπερέκφραση της IκBaSR ευαισθητοποίησε σε μεγαλύτερο βαθμό τα κύτταρα A549 στην H₂O₂-επαγόμενη απόπτωση (Σχ. 6A). Αυτό επιβεβαιώθηκε μελετώντας την έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην απόπτωση όπως η μειορρύθμιση της Bcl-2, η αυξορρύθμιση της Bax, η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και η πρωτεολυτική διάσπαση της PARP-1, μεταβολές που ήταν εντονότερες στα κύτταρα A549 IκBaSR σε σύγκριση με τα A549 Vec μετά την έκθεσή τους στο H₂O₂ (Σχ. 5B). Ήταν δε αξιοσημείωτη η ανίχνευση χαμηλότερου μοριακού βάρους θραυσμάτων της PARP-1 στον πυρήνα και δύο κυτταρικών τύπων, με τη έκφρασή τους να είναι εντονότερη στα κύτταρα A549 IκBaSR μετά την έκθεσή τους στο H₂O₂ (Σχ. 5Γ). Αυτά τα μικρότερα

πρωτεϊνικά θραύσματα της PARP-1 έχουν περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες και συσχετίζονται με την νέκρωση των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της νέκρωσης επαγόμενης από το H₂O₂ (Gobeil et al., 2001; Nozawa et al., 2002; Soldani and Scovassi, 2002; Lu et al., 2006) καθώς επίσης και με μια μείωση στην ενεργότητα NF-κB (Bottino et al., 2004). Σε αντίθεση, η υπερέκφραση της IKKβca κατέστειλε την απόπτωση των κυττάρων επαγόμενη από το H₂O₂, καθώς δεν ανιχνεύθηκε η πρωτεολυτικά διασπασμένη 89 kDa μορφή της PARP-1 στα κύτταρα A549 IKKβca σε σύγκριση με τα A549 Neo (Σχ. 7).

4.6 Σύγκριση του ρόλου των κινασών IKKα και IKKβ στις αποκρίσεις των κυττάρων A549 στο H₂O₂

Επειδή: (α) το H₂O₂ επήγαγε την πυρηνική μετατόπιση της IKKα, τη φωσφορυλίωση της p65 (p-p65 S536) και την, μολονότι μικρή, ενεργοποίηση του NF-κB, και (β) η συσσωρεύτηκε στον πυρήνα των κυττάρων A549 ως απόκριση στη χορήγηση και η καταστολή της κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κB με τη χρήση της IκBaSR ευαισθητοποίησε τα κύτταρα A549 στην επαγόμενη από το H₂O₂ απόπτωση, ενώ η IKKβca κατέστειλε την H₂O₂-επαγόμενη απόπτωση των κυττάρων A549, μελετήθηκε περαιτέρω ο ρόλος των IKKα και IKKβ στις αποκρίσεις των κυττάρων A549 στο H₂O₂ (Σχ. 8). Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν κύτταρα ελέγχου A549 GL2 και κύτταρα A549 IKKα^{KD} και A549 IKKβ^{KD}, στα οποία είχαν αποσιωπηθεί η IKKα και η IKKβ αντίστοιχα (Σχ. 8A).

Σύγκριση του ρόλου των κινασών IKKα και IKKβ στην έκφραση πρωτεϊνών που ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου

Αρχικά αναλύθηκαν οι επιδράσεις τους στην έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, ως απόκριση στο H₂O₂ (Σχ. 8B). Η χορήγηση H₂O₂ επήγαγε την έκφραση της κυκλίνης D1 με ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο στα κύτταρα A549 GL2 και μόνο ύστερα από τη χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων H₂O₂ στα κύτταρα A549

IKKβ^{KD}, επιβεβαιώνοντας το ρόλο της κανονικής πορείας του NF-κB στη ρύθμιση της κυκλίνης D1 (Σχ. 5 & &) (Hinz et al., 1999; Guttridge et al., 1999; Joyce et al., 1999; Eto, 2000; Ouyang et al., 2005; Klein et al., 2007; Toualbi-Abed et al., 2008). Σε αντίθεση, στα κύτταρα A549 IKKα^{KD} τόσο τα βασικά όσο και τα επαγμένα από το H₂O₂ επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1 ήταν χαμηλότερα από τα επίπεδα έκφρασης που ανιχνεύθηκαν στους δυο προηγούμενους κυτταρικούς τύπους. Η μειορρύθμιση της έκφρασης της κυκλίνης D1 από την απώλεια της IKKα στα κύτταρα A549 συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες σε ινοβλάστες τρωκτικών που έδειξαν ότι η απάλειψη της IKKα (IKKα^{-/-} MEFs) παρεμπόδιζε τη μεταγραφή της κυκλίνης D1, υποδεικνύοντας ότι η IKKα ρυθμίζει τη μεταγραφική επαγωγή της κυκλίνης D1 μετά τη διέγερση των κυττάρων με ορό, διαμέσου της πορείας μεταγωγής σήματος του Wnt (Albanese et al., 2003). Παρόμοια, η αποσιώπηση της IKKα σε ανθρώπινα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού MCF-7 είχε σαν αποτέλεσμα τόσο τη μειορρύθμιση των βασικών επιπέδων έκφρασης της κυκλίνης D1, όσον και των επαγόμενων από οιστραδιόλη (E2) (Tu et al., 2006).

Επίσης, το H₂O₂ μειορρύθμιζε τα επίπεδα έκφρασης των Cdc6 και E2F1 στα κύτταρα A549 GL2 και A549 IKKβ^{KD}, ωστόσο τα επίπεδα έκφρασής τους ήταν οριακά υψηλότερα στα κύτταρα A549 IKKβ^{KD} (Σχ. 8B), ευρήματα που συμφωνούν με άλλες μελέτες στις οποίες η αποσιώπηση της έκφρασης της IKKβ σε κύτταρα MCF-7 οδήγησε σε οριακά υψηλότερα τόσο βασικά όσο και E2-επαγόμενα επίπεδα του E2F1 (Tu et al., 2006).. Όμως, η αποσιώπηση της IKKα είχε ως αποτέλεσμα τη, σχεδόν, ολοκληρωτική απώλεια της έκφρασης των Cdc6 και E2F1 απουσία ή παρουσία H₂O₂, υπονοώντας πως η IKKα έδρασε ανοδικά του E2F1 (Tu et al., 2006) (Σχ. 8B). Επιπλέον, το H₂O₂ επήγαγε την έκφραση της p53, σε παρόμοια έκταση, στα κύτταρα A549 GL2 και A549 IKKβ^{KD} αλλά και της p21^{Cip1/Waf1}, αν και σε οριακά υψηλότερο βαθμό στα κύτταρα A549 IKKβ^{KD} (Σχ. 8B). Στα κύτταρα A549 IKKα^{KD}, η επαγωγή της p53 ήταν σε χαμηλότερα επίπεδα από ότι στους άλλους δυο κυτταρικούς τύπους και παρατηρήθηκε μετά τη χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων H₂O₂, υποδηλώνοντας, πως η απώλεια της IKKα είχε, πιθανώς, ως αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση της p53 ως απόκριση στο H₂O₂, όπως έχει πρόσφατα αναφερθεί (Yamaguchi et al., 2007a, b). Σε αντίθεση, η επαγωγή της

έκφρασης της $p21^{Cip1/Waf1}$, από το H_2O_2 , στα κύτταρα A549 IKK α^{KD} ήταν παρόμοια με αυτήν που παρατηρήθηκε στα κύτταρα A549 GL2 και A549 IKK β^{KD} (Σχ.7B).

Σύγκριση του ρόλου των κινασών IKK α και IKK β στην H_2O_2 -επαγόμενη απόπτωση των κυττάρων A549

Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής με αννεξίνη-V/PI των κυττάρων A549 GL2, A549 IKK α^{KD} και A549 IKK β^{KD} με αννεξίνη-V/PI έδειξε ότι το H_2O_2 επήγαγε τόσο την πρόωμη όσο και την όψιμη απόπτωση και νέκρωση των κυττάρων A549 GL2 και A549 IKK β^{KD} , αλλά η όψιμη απόπτωση-νέκρωση ήταν ~3X πιο έντονη στα κύτταρα A549 IKK β^{KD} (Σχ. 8Γ). Αντίθετα, στα κύτταρα A549 IKK α^{KD} εντοπίστηκε μόνον η επαγωγή του όψιμου αποπτωτικού-νεκρωτικού θανάτου, ακόμη και σε κύτταρα που δεν είχε χορηγηθεί H_2O_2 (Σχ. 8Γ). Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος μετά την έκθεση των κυττάρων επιβεβαιώθηκε μελετώντας τι μεταβολές της έκφρασης της Bcl-2:Bax, στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και στην πρωτεολυτική διάσπαση της PARP-1 (Σχ. 8Δ). Μια από τις σημαντικότερες διαφορές μεταξύ της αποσιώπησης της IKK α και IKK β στην H_2O_2 -επαγόμενη απόπτωση ήταν ότι η αποσιώπηση της μεν πρώτης προκαλεί τον όψιμο αποπτωτικό-νεκρωτικό θάνατο των κυττάρων, της δε δεύτερης προάγει την ευαισθητοποίηση των κυττάρων στην απόπτωση που επάγεται από το H_2O_2 , όμοια με την I κ B α SR (Σχ. 6), προκαλώντας τόσο πρόωμο αποπτωτικό θάνατο, αλλά ιδιαίτερα όψιμο αποπτωτικό-νεκρωτικό θάνατο (Σχ. 8Γ). Μια προσεκτική μελέτη του προφίλ έκφρασης της PARP-1 μετά την έκθεση των κυττάρων A549 GL2, A549 IKK α^{KD} και A549 IKK β^{KD} σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις H_2O_2 έδειξε ότι ήταν διαφορετικό στους τρεις κυτταρικούς τύπους, αλλά παρουσίασε μια συσχέτιση με τα ευρήματα της κυτταρομετρίας ροής (Σχ. 8Γ). Και στους τρεις κυτταρικούς τύπους εντοπίστηκαν η ανέπαφη (intact) 116 kDa μορφή της PARP-1 και η πρωτεολυτικά διασπασμένη (κολοβωμένη) 89 kDa μορφή της PARP-1, αλλά εντοπίστηκε και ένας αριθμός άλλων μικρότερων θραυσμάτων της PARP-1 με ένα θραύσμα ~50 kDa να εμφανίζεται πιο έντονα και στους τρεις κυτταρικούς τύπους μετά τη χορήγηση H_2O_2 και ειδικότερα στα κύτταρα A549 IKK α^{KD} και σε μικρότερο βαθμό στα A549 IKK β^{KD} σε σύγκριση με τα

κύτταρα A549 GL2, ενώ αυτά τα θραύσματα της PARP-1 ήταν ανιχνεύσιμα ακόμη και απουσία H_2O_2 στα κύτταρα A549 IKK α^{KD} (Σχ. 8Δ). Τα μικρότερα θραύσματα της PARP-1 και ειδικότερα αυτό των ~50 kDa, περιγράφηκαν πρόσφατα και έχει δειχθεί να σχετίζονται με το νεκρωτικό θάνατο, συμπεριλαμβανομένου αυτού που επάγεται από τη χορήγηση H_2O_2 (Gobeil et al., 2001; Nozawa et al., 2002; Soldani and Scovassi, 2002; Lu et al., 2006) και με τη μείωση της ενεργότητας του NF-κB (Bottino et al., 2004). Μια άμεση σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής και της έκφρασης της PARP-1 έδειξε πως η IKK α θα μπορούσε πιθανά να αποτελεί παράγοντα ρύθμισης του νεκρωτικού θανάτου.

4.7 Ο ρόλος του NF-κB στη ρύθμιση της έκφρασης του αδειοδοτικού παράγοντα της αντιγραφής του DNA, της πρωτεΐνης Cdc6

Ένα από τα νέα (novel) ευρήματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διαφορετική επίδραση του H_2O_2 και του ετοποσιδίου/VP16 στην έκφραση του αδειοδοτικού παράγοντα της αντιγραφής του DNA, της πρωτεΐνης Cdc6 (Σχ. 2Δ και Σχ. 10Γ & Δ), όπου το H_2O_2 επήγαγε την πυρηνική συσσώρευση του, ενώ η χορήγηση ετοποσιδίου/VP16 είχε σαν αποτέλεσμα την απώλεια της έκφρασης της Cdc6. Ένα δεύτερο νέο εύρημα ήταν ο τρόπος ενεργοποίησης του NF-κB από το H_2O_2 και το ετοποσίδιο/VP16. Ενώ στην πρώτη περίπτωση κεντρικό ρόλο έπαιξε η πυρηνική μετατόπιση της IKK α που οδήγησε στη φωσφορυλίωση της p65 (p-p65 S536) και στην πυρηνική μετατόπιση της και ενεργοποίησε τον NF-κB (Σχ. 4) διαμέσου NF-κB-εξαρτώμενες και NF-κB-ανεξάρτητες επιδράσεις (Perkins, 2007), στη δεύτερη περίπτωση, το ετοποσίδιο/VP16 επήγαγε τη φωσφορυλίωση της IκB α και την πυρηνική μετατόπιση του έτερο-διμερούς p50/p65 με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κανονικής IKK β -εξαρτώμενης πορείας του NF-κB (Σχ. 11 & 12).

Προκειμένου να συσχετισθεί ο ρόλος του NF-κB στη ρύθμιση της έκφρασης της Cdc6, μελετήθηκε λεπτομερώς η έκφραση της σε κύτταρα A549 στα οποία είχε αποσιωπηθεί είτε η IKK α ή IKK β , σε συνάρτηση με την έκφραση της p53 (αρνητικός ρυθμιστής της Cdc6) και του E2F1 (θετικός ρυθμιστής της Cdc6).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, πρώτον, η έκφραση της Cdc6 διεγείρεται από μιτογόνα ερεθίσματα (Σχ. 15Α και Ε) και εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα σε συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, και ιδιαίτερα κατά τη μετάβαση G1-S (Σχ. 15Ε). Δεύτερον, η Cdc6 εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων που συνάδει με το ρόλο της ως αδειοδοτικού παράγοντα της αντιγραφής του DNA (Σχ. 15ΣΤ). Τρίτον, το προφίλ έκφρασης της Cdc6 δεν ταυτίζεται πλήρως με το προφίλ έκφρασης του E2F1, που δρα ως θετικός ρυθμιστής της μεταγραφής της, ή με αυτό της p53, που δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης της (Σχ. Δ και Ε). Τέταρτον, η έκφραση της Cdc6 βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο των πορειών μεταγωγής σήματος του NF-κΒ, που φαίνεται ότι δρουν ανάρρους του E2F1 και p53 (Σχ. Β, Γ και Δ).

Όμως, η ενεργοποιητικές κινάσες των πορειών μεταγωγής σήματος του NF-κΒ, IKKα και IKKβ, ρυθμίζουν διαφορετικά την έκφραση της Cdc6.

Η αποσιώπηση τη IKKα σε ανθρώπινα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα, A549, οδήγησε στην ολική απώλεια της έκφρασης της άθικτης (intact) 62 kDa μορφής της Cdc6 (Σχ. 15Α και Β), και την εμφάνιση δύο χαμηλότερου μοριακού βάρους μορφές της πρωτεΐνης, 49 kDa και 32 kDa, που πιθανά αντιστοιχούν στις κολοβωμένες (truncated) μορφές της tCdc6 που έχουν ενοχοποιηθεί στην επαγωγή της κυτταρικής απόπτωσης (Yim et al., 2003; Yim et al., 2006). Όμως, η αποσιώπηση τη IKKα σε ένα ζεύγος ανθρωπίνων καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων κεφαλής και τραχήλου, UT-SCC-60Α και UT-SCC-60Β, τα οποία αντιπροσωπεύουν κύτταρα από έναν πρωτογενή όγκο της αριστερής αμυγδαλής και κύτταρα από τη μετάσταση του σε λεμφαδένια του τραχήλου, αντίστοιχα, ανέδειξε σημαντικά ευρήματα. Πρώτον, ενώ η έκφραση της IKKα ήταν υψηλή στα πρωτογενή καρκινικά κύτταρα UT-SCC-60Α, ήταν κατά 2-3 φορές χαμηλότερη στα μεταστατικά κύτταρα UT-SCC-60Β (Σχ. 15Γ), υποδηλώνοντας ότι η μειορρύθμιση της συσχετίζεται με τη μετάσταση ανθρωπίνων καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων κεφαλής και τραχήλου, και επομένως μπορεί να δρα ως ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη. Δεύτερον, η έκφραση της Cdc6 συσχετιζονταν με την αντίστοιχη έκφραση της Cdc6 στα κύτταρα UT-SCC-60Α και UT-SCC-60Β. Η αποσιώπηση τη IKKα στα κύτταρα UT-SCC-60Α και UT-SCC-60Β, σε αντίθεση με τις επιδράσεις της στην έκφραση της Cdc6 στα A549, οδήγησε στην αυξορρύθμιση της έκφρασης της Cdc6 στα κύτταρα UT-SCC-60Α, και σε

μικρότερο βαθμό στα UT-SCC-60B, όπου πιθανά η IKKα να ήταν ανενεργή ή και μεταλλαγμένη (Σχ. 15Γ).

Συνολικά αυτά τα ευρήματα έδειξαν ότι η έκφραση της Cdc6 ελέγχεται από την IKKα που ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο/ιστό, μπορεί να οδηγήσει στη μειορρύθμιση της (π.χ. καρκινικά κύτταρα πνεύμονα) ή στην αυξορρύθμιση της (π.χ. καρκινικά κύτταρα κεφαλής και τραχήλου). Μεταξύ των πιθανών λόγων αυτής της διαφοράς που εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο/ιστό μπορεί να έγκειται στο ρόλο της IKKα στην ογκογένεση όπου φαίνεται ότι δρα ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας ή ως προαγωγέας της καρκινογένεσης (Nakayama et al. 2001; Cao et al., 2007; Luo et al., 2007; Maeda et al., 2007; Descargues et al., 2008; Liu et al., 2008). Σε κάθε περίπτωση, η έκφραση της IKKα επηρεάζει την έκφραση της Cdc6.

Η αποσιώπηση της IKKβ έδειξε αρχικά ότι οδηγεί στην αυξορρύθμιση της έκφρασης της Cdc6 (Σχ. 15Α και Δ), αλλά μια πιο λεπτομερή ανάλυση σε σύγκριση με την IKKα, αποκάλυψε ένα διαφορετικό τρόπο ρύθμισης της Cdc6 από την IKKβ (Σχ. 15Δ και Ε). Πρώτον, η μειορρύθμιση της έκφρασης της Cdc6 από την αποσιώπηση της IKKα φαίνεται ότι οφείλονταν στη μείωση της σταθερότητας της Cdc6 (Σχ. 15Δ). Σε αντίθεση, η αποσιώπηση της IKKβ έδειξε ότι αύξησε τη σταθερότητα της Cdc6 για το χρονικό διάστημα διεξαγωγής των πειραμάτων για 0 - 120 min (Σχ. 15Δ). Όμως, η ανάλυση της χρόνο-εξαρτώμενης έκφρασης της Cdc6 στα κύτταρα A549 GL2, A549 IKKα^{KD} και A549 IKKβ^{KD} (Σχ. 15Ε), έδειξε, πρώτον ότι η έκφραση της Cdc6 ήταν εξαρτώμενη από μιτογόνα ερεθίσματα και από τη φάση του κυτταρικού κύκλου (κύτταρα A549 GL2), δεύτερον, η αποσιώπηση της IKKα συσχετιζόταν με την ολική απώλεια της έκφρασης της Cdc6 (κύτταρα A549 IKKα^{KD}), και τρίτον, η αποσιώπηση της IKKβ σταθεροποίησε και αυξορρύθμισε την έκφραση της Cdc6 για μια περίοδο ~8 h, που συμφωνεί με το προφίλ έκφρασης της Cdc6 παρουσία κύκλο-εξαμιδίου (Σχ. 15Δ), αλλά η αποσιώπηση της IKKβ είχε σαν αποτέλεσμα την απώλεια της διέγερσης της έκφρασης της Cdc6 από μιτογόνα ερεθίσματα, όπως ο ορός (Σχ. 15Ε). Επομένως φαίνεται ότι η απώλεια της IKKβ αντισταθμίζεται από την λειτουργία της IKKα, η οποία είναι υπεύθυνη για τη σταθερότητα της Cdc6, με αποτέλεσμα να διατηρεί την έκφραση της Cdc6, απουσία της IKKβ, για ένα χρονικό διάστημα ~8 h χωρίς όμως να συμβάλλει στη διέγερση της Cdc6 από

μιτογόνα ερεθίσματα. Συνεπώς, η απώλεια της ΙΚΚβ οδηγεί στην απώλεια της απόκρισης της Cdc6 από μιτογόνα ερεθίσματα, όπως ο ορός.

Συνολικά, οι μελέτες έδειξαν ότι η ΙΚΚα και η ΙΚΚβ ρυθμίζουν διαφορετικά την έκφραση της Cdc6. Ενώ η αποσιώπηση της ΙΚΚα οδήγησε στην ολική απώλεια της έκφρασης της άθικτης 62 kDa μορφής της Cdc6 λόγω μείωσης της σταθερότητας της πρωτεΐνης, η αποσιώπηση της ΙΚΚβ είχε σαν αποτέλεσμα την απώλεια της διέγερσης της έκφρασης της Cdc6 από μιτογόνα ερεθίσματα και της εξάρτησης της από τη φάση του κυτταρικού κύκλου, που έδειξε ότι αντί να εκφράζεται κατά τη φάση G1-S όπως στα κύτταρα A549 GL2 εκφράζονταν καθ' όλη τη διάρκεια της φάσης G1. Επομένως, η ΙΚΚα πιθανά ελέγχει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης Cdc6, ενώ η ΙΚΚβ ελέγχει το χρόνο έκφρασης της κατά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.

4.8 Σύγκριση του ρόλου των κινασών ΙΚΚα και ΙΚΚβ στις επιδράσεις του ετοποσιδίου/VP16 στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων A549

Η διαφορετική ρύθμιση της έκφρασης της Cdc6 από την ΙΚΚα και ΙΚΚβ μας ώθησε να μελετήσουμε τις επιδράσεις των ΙΚΚ στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων A549 απουσία ή παρουσία του ετοποσιδίου/VP16, παράγοντα πρόκλησης βλαβών στο DNA, όπως αμφίκλωνες ρήξεις καθώς δρα ως αναστολέας της τοποϊσομεράσης-II.

Μελετήθηκε η κατανομή των κυττάρων A549 GL2, A549 ΙΚΚα^{KD} και A549 ΙΚΚβ^{KD} στις διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση στη χορήγηση 0 - 50 μ M ετοποσιδίου/VP16 για 24 και 48 h (Σχ. 16). Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (PI) έδειξε πως οι ΙΚΚα και ΙΚΚβ ρυθμίζουν διαφορετικά την πρόοδο της φάσης-G1 του κυτταρικού κύκλου με ένα χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο.

Ενώ η ΙΚΚα φαίνεται ότι ρυθμίζει κυρίως την πρόοδο της φάσης-G1 και ιδιαίτερα κατά τα πρώιμα στάδια της φάσης-G1 που γίνεται πιο εμφανής μετά από πρόκληση βλαβών στο DNA, η ΙΚΚβ εμπλέκεται στη ρύθμιση της των όψιμων σταδίων της φάσης-G1, αλλά και εν μέρει της φάσης-S, που είναι εμφανής απουσία βλαβών στο DNA και γίνεται εντονότερη μετά την έκθεση των κυττάρων σε παράγοντες πρόκλησης βλαβών στο DNA, όπως στο

ετοποσίδιο/VP16 (Schneider et al., 2006; Tu et al., 2006; Prajapati et al., 2006; Zhu et al., 2007).

Συμπεράσματα

- Τόσο η χορήγηση H_2O_2 όσο και VP16 είχε ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση των ενδογενών ΔΜΟ και ενεργοποίησαν την πορεία απόκρισης σε βλάβες στο DNA στα κύτταρα A549 και MRC5 TERT.
- Η χορήγηση H_2O_2 ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στη φάση G2-M και επήγαγε την απόπτωση των κυττάρων με ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, ενώ το ετοποσίδιο/VP16 επήγαγε μόνον την αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου κυρίως στις φάσεις G1-S και G2-M.
- Μολονότι το H_2O_2 και ετοποσίδιο/VP16 προκαλούν την ενδογενή συσσώρευση των ΔΜΟ επηρεάζουν διαφορετικά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, υποδηλώνοντας ότι πιθανά επηρεάζουν διαφορετικές πορείες μεταγωγής σήματος και επομένως την έκφραση διαφορετικών πρωτεϊνών που ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.
- Η ενεργοποίηση του NF-κΒ ήταν ισχυρότερη στα κύτταρα A549 που εκτέθηκαν στο ετοποσίδιο/VP16 από ότι σε εκείνα, που εκτέθηκαν στο H_2O_2 κατά ~6 φορές. Επιπρόσθετα, ο μηχανισμός ενεργοποίησης του NF-κΒ από το H_2O_2 φαίνεται να οφείλεται στις NF-κΒ-εξαρτώμενες και NF-κΒ-ανεξάρτητες επιδράσεις της IKKα λόγω της πυρηνικής της μετατόπισης, ενώ ο μηχανισμός ενεργοποίησης του NF-κΒ από το ετοποσίδιο/VP16 οφείλεται αποκλειστικά στην ενεργοποίηση της κανονικής πορείας του NF-κΒ, και επομένως θα επηρεάζει γονίδια-στόχους μόνον αυτής της πορείας ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα.
- Ο γενετικός χειρισμός της κανονικής πορείας του NF-κΒ μετέβαλε την έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, ενώ η καταστολή της ενεργοποίησης της κανονικής πορείας του NF-κΒ ευαισθητοποίησε τα κύτταρα A549 στην H_2O_2 -επαγόμενη

απόπτωση και η ιδιοσυστατική ενεργοποίηση της κανονικής πορείας ενεργοποίησης προστάτεψε τα κύτταρα A549 από την H₂O₂-επαγόμενη απόπτωση

- Η αποσιώπηση των κινασών IKKα ή IKKβ είχε ως αποτέλεσμα διαφορετικές επιδράσεις στην έκφραση των πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο, και στην επαγωγή της απόπτωσης, στα κύτταρα A549, ως απόκριση στο H₂O₂.
- Η χορήγηση H₂O₂ και ετοποσιδίου/VP16 είχε διαφορετική επίδραση στην έκφραση του αδειοδοτικού παράγοντα της αντιγραφής του DNA, της πρωτεΐνης Cdc6.
- Η έκφραση της Cdc6 ελέγχεται από την IKKα, που ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο/ιστό, μπορεί να οδηγήσει στη μειορρύθμιση της (π.χ. καρκινικά κύτταρα πνεύμονα) ή στην αυξορρύθμιση της (π.χ. καρκινικά κύτταρα κεφαλής και τραχήλου). Μεταξύ των πιθανών λόγων αυτής της διαφοράς που εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο/ιστό μπορεί να έγκειται στο ρόλο της IKKα στην ογκογένεση όπου φαίνεται ότι δρα ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας ή ως προαγωγέας της καρκινογένεσης.
- Η IKKα πιθανά ελέγχει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης Cdc6, ενώ η IKKβ ελέγχει το χρόνο έκφρασης της κατά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.
- Η IKKα φαίνεται ότι ρυθμίζει κυρίως την πρόοδο της φάσης-G1, ενώ η IKKβ εμπλέκεται στη ρύθμιση των όψιμων σταδίων της φάσης-G1, αλλά και εν μέρει της φάσης-S.

Συνοψίζοντας, μπορούμε να υποστηρίξουμε πως το H₂O₂ και το ετοποσιδίο/VP16 είναι υπεύθυνα για την αύξηση των ενδογενών δραστικών μορφών οξυγόνου, ωστόσο επηρεάζουν διαφορετικές πορείες μεταγωγής σήματος. Μια από τις πιο κύριες πορείες μεταγωγής σήματος για την επιβίωση του κυττάρου είναι αυτή της πορείας ενεργοποίησης του NF-κB. Η χορήγηση H₂O₂ και VP16 επηρεάζουν αυτήν την πορεία με διαφορετικό τρόπο και επιπρόσθετα συστατικά της πορείας ενεργοποίησης του NF-κB επηρεάζουν την έκφραση απαραίτητων πρωτεϊνών για την πορεία του κυτταρικού κύκλου και της αντιγραφής.

Περίληψη

Ο NF-κB είναι ένας οξειδοαναγωγικά ευαίσθητος μεταγραφικός παράγοντας, ωστόσο η ενεργοποίησή του και ο ρόλος του στα ανθρώπινα πνευμονικά κύτταρα, ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες, παραμένει ασαφής. Στη μελέτη αυτή διερευνήσαμε το ρόλο της σηματοδότησης NF-κB, ύστερα από τη χορήγηση H₂O₂ ή VP-16 σε ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα πνεύμονα A549.

Για το σκοπό αυτό, χειραγωγήσαμε γενετικά τα μονοπάτια ενεργοποίησης του NF-κB είτε χρησιμοποιώντας έναν υπέρ-καταστολέα του NF-κB, τον IκBaSR, ή αποσιωπώντας τις ενεργοποιητικές IKK κινάσες, τις IKKα και IKKβ. Αρχικά, δείξαμε πως η χορήγηση H₂O₂ ή VP-16 στα κύτταρα A549 είχε ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση των ενδογενών δραστικών μορφών οξυγόνου, εκκίνησε μια απόκριση σε βλάβες στο DNA, οδηγώντας στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της επαγωγής της απόπτωσης, μόνο μετά τη χορήγηση H₂O₂, δόσο-εξαρτώμενα. Η χορήγηση H₂O₂ και VP-16 είχε διαφορετικές επιδράσεις στην έκφραση πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου κυκλίνη D1 και Cdc6, E2F1 και του άξονα p53-p21^{Cip/Waf1}. Επίσης, η χορήγηση H₂O₂, αλλά όχι VP-16, επήγαγε την απόπτωση, η οποία συνοδεύτηκε από μείωση της έκφρασης της Bcl-2, αύξηση της έκφρασης της Bax, ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και πυρηνική συσσώρευση της πρωτεολυτικά διασπασμένης PARP-1. Η χορήγηση H₂O₂, αλλά όχι VP-16, διέγειρε την πυρηνική μετατόπιση και συσσώρευση της IKKα, αλλά όχι της IKKβ, και της IκBa και επιπρόσθετα επήγαγε τη φωσφορυλίωση της κυτταροπλασματικής IκBa, δόσο-εξαρτώμενα. Η πυρηνική μετατόπιση της IKKα συσχετίστηκε με τη φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 στη σερίνη10. Επιπλέον, το H₂O₂ επήγαγε τη φωσφορυλίωση της p65 και την πυρηνική μετατόπιση της p-p65 και διέγειρε τη μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB, ενώ η χορήγηση VP-16 επήγαγε τη φωσφορυλίωση της p65 και την πυρηνική μετατόπιση τόσο της p65 όσο και της p-p65.

Ενώσω η επιβαλλόμενη υπέρ-έκφραση του υπέρ-καταστολέα του NF-κB, IκBaSR, μετέβαλλε την έκφραση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου και ευαισθητοποίησε τα κύτταρα A549 στην επαγόμενη από το H₂O₂ απόπτωση, η ιδιοσυστατική ενεργοποίηση του NF-κB, με τη χρήση μιας

ιδιοσυστατικά ενεργής ΙΚΚβ με μεταλλαγμένο T-βρόγχο, ΙΚΚβca, κατέστειλε την επαγόμενη από το H₂O₂ απόπτωση. Ακόμα, η αποσιώπηση της ΙΚΚβ, άρα η καταστολή της κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κΒ, ευαισθητοποίησε τα κύτταρα στην επαγόμενη από το H₂O₂ πρώιμη και όψιμη απόπτωση, ενώ η αποσιώπηση της ΙΚΚα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της όψιμης απόπτωσης στα κύτταρα A549.

Τα δεδομένα προτείνουν πως τόσο το H₂O₂ όσο και το VP-16 ενεργοποίησαν τον NF-κΒ, αλλά το H₂O₂ μέσω φωσφορυλίωσης της RelA/p65 από την ΙΚΚα και το VP-16 μέσω της κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κΒ και πως η καταστολή των πορειών ενεργοποίησης του NF-κΒ ευαισθητοποίησε τα κύτταρα A549 στην επαγόμενη από το H₂O₂ απόπτωση.

Επιπρόσθετα, δείξαμε πως η χορήγηση H₂O₂ και VP16 επηρεάζουν διαφορετικά την έκφραση του αδειοδοτικού παράγοντα για την αντιγραφή, Cdc6. Τα δεδομένα μας προτείνουν πως η κινάση ΙΚΚα παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης της Cdc6.

Summary

“The role of NF- κ B in oxidative stress and cytokine induced apoptosis”

NF- κ B is a redox sensitive transcription factor, however, its activation and its role in human lung tumor cells in response to oxidative stress remains elusive. Here, we addressed the role of NF- κ B signaling in H₂O₂ or VP-16 treatment human lung tumor epithelial cells A549. To this end we genetically manipulated the NF- κ B signaling pathways either using a super repressor of NF- κ B, I κ B α SR, or by knocking down its activating IKK kinases, IKK α and IKK β .

First, we showed that treatment of A549 cells with H₂O₂ or VP-16 resulted in the accumulation of endogenous reactive oxygen species, initiated a DNA damage checkpoint response leading to inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis, only after treatment with H₂O₂, dose-dependently. H₂O₂ and VP-16 treatment had differential effects on the expression of proteins involved in the regulation of cell cycle progression cyclin D1 and Cdc6, E2F1 and p53-p21^{Cip/Waf1} axis. Also, H₂O₂ treatment, but not VP-16, induced apoptosis, which was accompanied by a reduction in Bcl-2 expression, conformational changes of Bax, activation of caspase-3 and nuclear accumulation of proteolytically cleaved form of PARP-1. H₂O₂, but not VP-16, stimulated the nuclear translocation and accumulation of IKK α , but not of IKK β , and of I κ B α and in addition mediated the phosphorylation of cytoplasmic I κ B α , dose-dependently. Nuclear translocation of IKK α correlated with the phosphorylation of histone H3 at serine 10. Further, H₂O₂ mediated the phosphorylation of p65 and nuclear translocation of p-p65 and stimulated NF- κ B transcriptional activity and VP-16 mediated the phosphorylation of p65 and nuclear translocation of both p65 and p-p65.

While forced overexpression of NF- κ B super repressor, I κ B α SR, altered the expression of cell cycle regulatory proteins and sensitized A549 cells to H₂O₂-mediated apoptosis, constitutive activation of NF- κ B, using a constitutively active IKK β T-loop mutant IKK β ca suppressed H₂O₂-mediated apoptosis. Importantly, while knocking-down IKK β -mediated canonical NF- κ B signaling sensitized A549 cells to H₂O₂-mediated early and late apoptosis, ablation of IKK α produced, mainly, evidence of late apoptosis.

These data suggested that both H₂O₂ and VP-16 activated NF-κB, but H₂O₂ through IKKα-mediated phosphorylation of RelA/p65 and VP-16 through the canonical pathway and that interfering with NF-κB signaling pathways sensitized tumor cells to apoptosis.

In addition, we showed that both H₂O₂ and VP16 effected differentially the expression of the replication licensing factor, Cdc6. Our data suggested that the IκB kinase α (IKKα) plays a major role in the regulation of Cdc6.

Βιβλιογραφία

A

Abraham T.R. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & Dev.*, 2007, 15: 2177-2196.

Abraham T.R. and Tibbetts S.R. Guiding ATM to Broken DNA. *Science*, 2005, 308:510-511.

Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X & Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*, 2002, 9:423–432.

Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol.* 2007 Oct; 19(5):488-96.

Agarwal M.L., W.R. Taylor, M.V. Chernov, O.B. Chernova, G.R. Stark. The p53 network. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273:1 – 4.

Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link?. *Biochem Pharmacol.*, 2006, 72: 1605–1621.

Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L, Talanian RV, Litwack G, Fernandes-Alnemri T & Alnemri ES. A novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res.*, 1997, 57: 615–619.

Ahn KS, Aggarwal BB. Transcription factor NF-kappaB: a sensor for smoke and stress signals. *Ann N Y Acad Sci.*, 2005, 1056:218–233.

Albanese C, Wu K, D'Amico M, Jarrett C, Joyce D, Hughes J, Hult J, Sakamaki T, Fu M, Ben-Ze'ev A, Bromberg JF, Lamberti C, Verma U, Gaynor RB, Byers SW, Pestell RG. IKKalpha regulates mitogenic signaling through transcriptional induction of cyclin D1 via Tcf. *Mol Biol Cell.* 2003 Feb;14(2):585-99.

Albano E, Bellomo G, Parola M, Carini R, Dianzani MU. Stimulation of lipid peroxidation increases the intracellular calcium content of isolated hepatocytes. *Biochim Biophys Acta.*, 1991, 1091:310–316.

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW & Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 1996, 87:171-178.

Altieri DC. Molecular circuits of apoptosis regulation and cell division control: the survivin paradigm. *J Cell Biochem.*, 2004, 92: 656–663.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 1981, 290:457–465.

Andreassen P.R., Ho G.P. and Andrea D.D.Alan. DNA damage responses and their many interactions with the replication fork. *Carcinogenesis*, 2006, 27(5): 883-892.

Anest V, Hanson JL, Cogswell PC, Steinbrecher KA, Strahl BD, Baldwin AS. A nucleosomal function for I κ B kinase- α in NF- κ B-dependent gene expression. *Nature*. 2003 Jun 5;423(6940):659-63.

Araki K., K. Kawauchi, and N. Tanaka. IKK/NF- κ B signaling pathway inhibits cell-cycle progression by a novel Rb-independent suppression system for E2F transcription factors. *Oncogene*, 2008, 27:5696-5705.

Arita Y, Harkness SH, Kazzaz JA, Koo HC, Joseph A, Melendez JA, Davis JM, Chander A, and Li Y. Mitochondrial localization of catalase provides optimal protection from H₂O₂-induced cell death in lung epithelial cells. *Am J Physiol.*, 2006, 290: 978–986.

Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: Signaling and modulation. *Science*, 1998, 281:1305-1308.

Aslan M, Ozben T. Oxidants in receptor tyrosine kinase signal transduction pathways. *Antioxid Redox Signal.*, 2003, 5(6):781–8.

Ayoub N, Jeyasekharan AD, Venkitaraman AR. Mobilization and recruitment of HP1: a bimodal response to DNA breakage. *Cell Cycle*. 2009 Sep 15;8(18):2945-50.

B

Bacon BR, O'Neill R, Britton RS. Hepatic mitochondrial energy production in rats with chronic iron overload. *Gastroenterology*, 1993, 105:1134–1140.

Baetz D, Regula KM, Ens K, Shaw J, Kothari S, Yurkova N et al. Nuclear factor- κ B-mediated cell survival involves transcriptional silencing of the mitochondrial death gene BNIP3 in ventricular myocytes. *Circulation.*, 2005, 112:3777–3785.

Baird DM, Rowson J, Wynford-Thomas D, Kipling D. Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nat Genet*. 2003 Feb;33(2):203-7.

Bakkenist C.J. and Kastan M.B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimerdissociation *Nature*, 2003, 421(6922):499-506.

- Bakkenist** C.J. and Kastan M.B. Initiating cellular stress responses. *Cell*, 2004, 118(1):9-17.
- Baltimore**, D. (2009). Discovering NF- κ B. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Sept 14, 2009, pp. 1-3.
- Bartek** J, Lukas J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol.*, 2007, 19(2):238-45.
- Bartke** T, Pohl C, Pyrowolakis G & Jentsch S. Dual role of BRUCE as an antiapoptotic IAP and a chimeric E2/E3 ubiquitin ligase. *Mol Cell.*, 2004, 14:801–811.
- Bartkova** J., Horejsi Z., et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 2005, 434(7035): 864-870.
- Bartkova** J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, Vassiliou LV, Kolettas E, Niforou K, Zoumpourlis VC, Takaoka M, Nakagawa H, Tort F, Fugger K, Johansson F, Sehested M, Andersen CL, Dyrskjot L, Ørntoft T, Lukas J, Kittas C, Helleday T, Halazonetis TD, Bartek J, Gorgoulis VG. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, 2006, 444(7119):633-637.
- Bartosz** G Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol.* 2009 Apr 15;77(8):1303-15.
- Basile** JR, Eichten A, Zacny V, Münger K. NF-kappaB-mediated induction of p21(Cip1/Waf1) by tumor necrosis factor alpha induces growth arrest and cytoprotection in normal human keratinocytes. *Mol Cancer Res.* 2003 Feb;1(4):262-70.
- Bassères** DS, Baldwin AS. Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene.* 2006 Oct 30;25(51):6817-30.
- Batsi** C, Markopoulou S, Vartholomatos G, Georgiou I, Kanavaros P, Gorgoulis VG, Marcu KB, Kolettas E. Chronic NF- κ B activation delays RasV12-induced premature senescence of human fibroblasts by suppressing the DNA damage checkpoint response. *Mech. Ageing Dev.*, 2009, Jul;130(7):409-19.
- Beere** H. M. et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biol.*, 2000, 2:469–475.
- Belinsky** S.A., K.J. Nikula, W.A. Palmisano, R. Michels, G. Saccomanno, E. Gabrielson, et al. Aberrant methylation of P16 INK4a is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1998, 95:11891–11896.

Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol.*, 2005, 37:961-976.

Ben-Yehoyada M., Gautier J., Dupre A. The DNA damage response during an unperturbed S-phase. *DNA Repair.*, 2007, 6:914-922.

Bergqvist M, Henriksson R, Brattström D. Novel agents in the treatment of non-small cell lung cancer: implications for neoadjuvant chemotherapy? *In Vivo.*, 2005, 19(3): 523-533.

Bertin J, Armstrong RC, Otilie S, Martin DA, Wang Y, Banks S, Wang GH, Senkevich TG, Alnemri ES, Moss B et al. Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1997, 94:1172–1176.

Birbach A, Gold P, Binder BR, Hofer E, de Martin R, Schmid JA. Signaling molecules of the NF- κ B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277:10842-10851.

Blank M, Shiloh Y. Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle*, 2007, 6:686-695.

Boatright KM, Deis C, Denault JB, Sutherlin DP & Salvesen GS. Activation of caspases-8 and -10 by FLIPL. *Biochem J.*, 2004, 382:651–657.

Bohr VA. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic Biol Med.*, 2002, 32:804–812.

Bonizzi G. & Karin, M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.*, 2004, 25:280–288.

Borges HL, Linden R, Wang JY. DNA damage-induced cell death: lessons from the central nervous system. *Cell Res.*, 2008, 18(1):17-26.

Bottero V, Busuttill V, Loubat A, Magné N, Fischel JL, Milano G, Peyron JF. Activation of nuclear factor kappaB through the IKK complex by the topoisomerase poisons SN38 and doxorubicin: a brake to apoptosis in HeLa human carcinoma cells. *Cancer Res.* 2001 Nov 1;61(21):7785-91.

Bottino R, Balamurugan AN, Tse H, Thirunavukkarasu C, Ge X, Profozich J, Milton M, Ziegenfuss A, Trucco M, Piganelli JD. Response of Human Islets to Isolation Stress and the Effect of Antioxidant Treatment. *Diabetes*, 2004, 53:2559-2568.

Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, et al. Role of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem.*, 1999, 274:22932-40.

Boyle P. Cancer, cigarette smoking and premature death in Europe: a review including the Recommendations of European Cancer Experts Consensus Meeting, Helsinki, October 1996. *Lung Cancer*, 1997, 17(1): 1-60.

Braithwaite AW, Royds JA, Jackson P. The p53 story: layers of complexity. *Carcinogenesis*. 2005 Jul; 26(7):1161-9

Brummelkamp TR, Nijman SM, Dirac AM, Bernards R. Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature*, 2003, 424: 797–801.

Brzóška K, Szumiel I Signalling loops and linear pathways: NF-kappaB activation in response to genotoxic stress. *Mutagenesis*, 2009, 24(1):1-8.

Buchmann A.M., J.R. Skaar, J.A. DeCaprio. Activation of a DNA damage checkpoint response in a TAF1-defective cell line, *Mol. Cell Biol.*, 2004, 24:5332–5339.

Budd RC, Yeh WC, Tschopp J. (2006) cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nat. Rev. Immunol.*, 6: 196–204.

Burden D.A., P.S. Kingma, S.J. Froelich-Ammon, et al. Topoisomerase II. Etoposide interactions direct the formation of drug-induced enzyme-DNA cleavage complexes. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271:29238–29244.

C

Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, 29:222–230.

Cain K., Brown, D. G., Langlais, C. & Cohen, G. M. Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274: 22686–22692.

Caldecott KW. Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin. *DNA Repair (Amst)*. 2007 Apr 1;6(4):443-53

Cao Y, Luo JL, Karin M. IkappaB kinase alpha kinase activity is required for self-renewal of ErbB2/Her2-transformed mammary tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct 2;104(40):15852-7.

Chan DW, Gately DP, Urban S, Galloway AM, Lees-Miller SP, Yen T, Allalunis-Turner J. Lack of correlation between ATM protein expression and tumour cell radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1998, 74:217–224.

Chang DW, Xing Z, Pan Y, Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, Yaish-Ohad S, Peter ME & Yang X. c-FLIPL is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J.*, 2002, 21:3704–3714.

- Chang** PY, Miyamoto S. Nuclear factor-kappaB dimer exchange promotes a p21(waf1/cip1) superinduction response in human T leukemic cells. *Mol Cancer Res.* 2006 Feb;4(2):101-12.
- Chariot** A. The NF-kappaB-independent functions of IKK subunits in immunity and cancer. *Trends Cell Biol.* 2009 Aug;19(8):404-13.
- Chen** JJ, Bertrand H, Yu BP. Inhibition of adenine nucleotide translocator by lipid peroxidation products. *Free Radic. Biol. Med.*, 1995, 19:583–590.
- Chen** X, Kandasamy K, Srivastava RK. Differential roles of RelA (p65) and c-Rel subunits of nuclear factor kappa B in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling. *Cancer Res.*, 2003, 63:1059–1066.
- Cheng** S., Y. Gao, X. Dong, Y. Lu, Q. An, T. Tong, Y. Wang. Molecular and cytogenetic alterations in early stage of carcinogenesis of human lung. *Cancer Lett.*, 2001, 162:5–10.
- Cherbonnel-Lasserre** C and Dosanjh MK. Suppression of apoptosis by overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL promotes survival and mutagenesis after oxidative damage. *Biochimie.*, 1997, 79: 613–617.
- Chipuk** JE, Green DR. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol.* 2008 Apr;18(4):157-64.
- Chung** YW, Jeong DW, Won JY, Choi EJ, Choi YH, Kim IY. H₂O₂-induced AP-1 activation and its effect on p21(WAF1/CIP1)-mediated G2/M arrest in a p53-deficient human lung cancer cell. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 May 17;293(4):1248-53.
- Clingen** PH, Wu JY, Miller J, Mistry N, Chin F, Wynne P, Prise KM, Hartley JA. Histone H2AX phosphorylation as a molecular pharmacological marker for DNA interstrand crosslink cancer chemotherapy. *Biochem Pharmacol.* 2008 Jul 1;76(1):19-27.
- Cook** SA, Sugden PH, and Clerk A. Regulation of bcl-2 family proteins during development and in response to oxidative stress in cardiac myocytes: association with changes in mitochondrial membrane potential. *Circ. Res.*, 1999, 85: 940–949.
- Courtois** G, Gilmore TD. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene.* 2006 Oct 30;25(51):6831-43.

D

d'Adda di Fagagna F, Hande MP, Tong WM, Lansdorp PM, Wang ZQ, Jackson SP. Functions of poly(ADP-ribose) polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability. *Nat. Genet.*, 1999, 23:76-80.

Dandrea T, Hellmold H, Jonsson C, Zhivotovsky B, Hofer T, Wärngård L, Cotgreave I. The transcriptosomal response of human A549 lung cells to a hydrogen peroxide-generating system: relationship to DNA damage, cell cycle arrest, and caspase activation. *Free Radic Biol Med.* 2004 Apr 1;36(7):881-96.

Darroudi F, Wiegant W, Meijers M, Friedl AA, van der Burg M, Fomina J, van Dongen JJ, van Gent DC, Zdzienicka MZ. Role of Artemis in DSB repair and guarding chromosomal stability following exposure to ionizing radiation at different stages of cell cycle. *Mutat Res.* 2007 Feb 3;615(1-2):111-24.

DeBusk LM, Chen Y, Nishishita T, Chen J, Thomas JW, Lin PC. Tie2 receptor tyrosine kinase, a major mediator of tumor necrosis factor alpha-induced angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003 Sep;48(9):2461-71.

Delhase M, Hayakawa M, Chen Y, Karin M. Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science.* 1999 Apr 9;284(5412):309-13.

De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA. The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Nov;20(11):E83-8.

Denk A, Wirth T, Baumann B. NF-kappaB transcription factors: critical regulators of hematopoiesis and neuronal survival. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2000, 11:303–320. **D'Errico** M, Parlanti E, Dogliotti E. Mechanism of oxidative DNA damage repair and relevance to human pathology. *Mutat Res.* 2008 Jul-Aug;659(1-2):4-14.

Descargues P, Sil AK, Karin M. IKK α , a critical regulator of epidermal differentiation and a suppressor of skin cancer. *EMBO J.* 2008 Oct 22;27(20):2639-47.

Deslauriers J, Ginsberg RJ, Dubois P, Beaulieu M, Goldberg M and Piraux M. Current operative morbidity associated with elective surgical resection for lung cancer. *Can. J. Surg.*, 1989, 32(5): 335-339.

Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS & Reed JC. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J.*, 1999, 18:5242–5251.

Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS & Reed JC. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.*, 1998, 17:2215–2223.

Ding H., W. Duan, W-G. Zhu, R. Ju, K. Srinivasan, G. A. Otterson, and M. A. Villalona-Calero. p21 response to DNA damage induced by genistein and etoposide in human lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2003, 305:950-956.

Dobrzanski P., Ryseck, R. P. & Bravo, R. Differential Interactions of Rel–NF- κ B complexes with I κ B α determine pools of constitutive and inducible NF- κ B activity. *EMBO J.*, 1994, 13:4608–4616.

Dohrman A, Russell JQ, Cuenin S, Fortner K, Tschopp J & Budd RC. Cellular FLIP long form augments caspase activity and death of T cells through heterodimerization with and activation of caspase-8. *J. Immunol.*, 2005, 175:311–318.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 2002, 82: 47–95.

Du C, Fang M, Li Y, Li L & Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome- c dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 2000, 102:33–42.

Du GJ, Lin HH, Xu QT, and Wang MW. Bcl-2 switches the type of demise from apoptosis to necrosis via cyclooxygenase-2 upregulation in HeLa cell induced by hydrogen peroxide. *Cancer Lett.*, 2006, 232: 179–188.

Duan H & Dixit VM. RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature*, 1997, 385:86–89.

Dutta J Y Fan N Gupta G Fan and C Ge'linas. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-Kb. *Oncogene*, 2006, 25:6800–6816.

Duursma A, Agami R. p53-dependent regulation of Cdc6 protein stability controls cellular proliferation. *Mol. Cell. Biol.*, 2005, 25:6937-6947.

E

Earnshaw W. C., Martins, L. M. & Kaufmann, S. H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.*, 1999, 68: 383–424.

Ekert PG, Silke J, Hawkins CJ, Verhagen AM & Vaux DL. DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9. *J. Cell Biol.*, 2001, 152: 483–490.

Enesa K, Ito L, Luong LA, Thorbjornsen I, Phua C, To Y, Dean J, Haskard DO, Boyle J, Adcock I, Evans PC. Hydrogen peroxide prolongs nuclear localization of NF- κ B in activated cells by suppressing negative regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 2008, 283: 18582-18590.

Eto I. Molecular cloning and sequence analysis of the promoter region of mouse cyclin D1 gene: implication in phorbol ester-induced tumour promotion. *Cell Prolif.* 2000 Jun;33(3):167-87.

F

Fisher AE, Hochegger H, Takeda S, Caldecott KW. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Mol Cell Biol.* 2007 Aug;27(15):5597-605.

Franek WR, Horowitz S, Stansberry L, Kazzaz JA, Koo H-C, Li Y, Arita Y, Davis JM, Mantel AS, Scott W, Mantell LL. Hyperoxia inhibits oxidant-induced apoptosis in lung epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276:569-575.

Fridman J.S and S. W. Lowe Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 2003 22: 9030–9040.

Fridovich I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem.*, 1997, 272:18515–18517.

Fujita T, Maruyama M, Araya J, Sassa K, Kawagishi Y, Hayashi R, Matsui S, Kashii T, Yamashita N, Sugiyama E, Kobayashi M. Hydrogen peroxide induces upregulation of Fas in human airway epithelial cells via the activation of PARP-p53 pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002 Nov;27(5):542-52.

G

Geiser T, Ishigaki M, van Leer C, Matthay MA, Broaddus VC. H₂O₂ inhibits alveolar epithelial wound repair in vitro by induction of apoptosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2004, 287: 448–453.

Germain M, Affar EB, D'Amours D, Dixit VM, Salvesen GS, Poirier GG. Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J Biol Chem.*, 1999, 274:28379-28384.

Giri DK, Aggarwal BB. Constitutive activation of NF-kappaB causes resistance to apoptosis in human cutaneous T cell lymphoma HuT-78 cells: autocrine role of tumor necrosis factor and reactive oxygen intermediates. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273:14008–14014.

Glazko GV, Koonin EV, Rogozin IB. Mutation hotspots in the p53 gene in tumors of different origin: correlation with evolutionary conservation and signs of positive selection. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2004, 1679(2):95-106.

Gloire G., Legrand-Poels, S., and Piette, J. NF-κB activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.*, 2006a, 72:1493-1415.

Gloire G, Charlier E, Rahmouni S, Volanti C, Chariot A, Erneux C, Piette J. Restoration of SHIP-1 activity in human leukemic cells modifies NF-kappaB activation pathway and cellular survival upon oxidative stress. *Oncogene*. 2006 Sep 7;25(40):5485-94.

Gloire G., Dejardin, E., and Piette, J. Extending the nuclear roles of IκB kinase subunits. *Biochem. Pharmacol.*, 2006b, 72: 1082-1089.

Gobeil S, Boucher CC, Nadeauand D, Poirier GG. (2001). Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases. *Cell Death Diff.*, 2001, 8: 588-594.

Goetz ME, Luch A. Reactive species: a cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. *Cancer Lett.* 2008 Jul 18;266(1):73-83.

Goltsev YV, Kovalenko AV, Arnold E, Varfolomeev EE, Brodianskii VM & Wallach D. CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272: 19641–19644.

Gorman A. McGowan A, Cotter TG. Role of peroxide and superoxide anion during tumour cell apoptosis. *FEBS Lett.*, 1997, 404: 27-33.

Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis:caspases or mitochondria. *Trends Cell. Biol.*, 1998, 8: 267–271.

Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H, et al. Cathepsin B contributesto TNF-α-mediated hepatocyte apoptosis by promotingmitochondrial release of cytochrome c. *J. Clin. Invest.*, 2000, 106:1127–1137.

Guo TL, Miller MA, Datar S, Shapiro IM, Shenker BJ. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase rescues human T lymphocytes from methylmercury-induced apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1998, 152:397-405.

Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS Jr. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol.* 1999 Aug;19(8):5785-99.

H

- Habraken** Y, Piette J. NF- κ B activation by double-strand breaks. *Biochem. Pharmacol.*, 2006, 72: 11132-11141.
- Haddad** JJ. Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, 316(4): 969–77.
- Hail** N Jr, Carter BZ, Konopleva M, Andreeff M. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. *Apoptosis*, 2006, 11(6): 889-904.
- Hail** N Jr. Mitochondria: A novel target for the chemoprevention of cancer. *Apoptosis*, 2005, 10: 687–705.
- Halliwell** B, Gutteridge J. *Free radicals in biology and medicine* Oxford: University Press, 1999, Oxford.
- Hammond** EM, Kaufmann MR, Giaccia AJ. Oxygen sensing and the DNA-damage response. *Curr Opin Cell Biol.* 2007 Dec;19(6):680-4.
- Han** DK, Chaudhary PM, Wright ME, Friedman C, Trask BJ, Riedel RT, Baskin DG, Schwartz SM & Hood L. MRIT, a novel death-effector domain containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94: 11333–11338.
- Hande** K.R. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur. J. Cancer.*, 1998, 34: 1514–1521.
- Harper**, J. W., and S. J. Elledge. The DNA damage response: Ten years after. *Mol. Cell.*, 2007, 28: 739-745.
- Hassa** PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going?. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2006, 70: 789-829.
- Hateboer** G, Wobst A, Petersen BO, Le Cam I, Vigo e, Sardet C, Helin K. Cell cycle-regulated expression of mammalian CDC6 is dependent on E2F. *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18: 6679-6697.
- Hatip-Al-Khatib** I, Iwasaki K, Chung EH, Egashira N, Mishima K, Fujiwara M. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase and caspase-3, but not caspase-1, prevents apoptosis and improves spatial memory of rats with twice-repeated cerebral ischemia. *Life Sci.*, 2004, 75: 1967-1978.
- Hao** Y, Sekine K, Kawabata A, Nakamura H, Ishioka T, Ohata H, Katayama R, Hashimoto C, Zhang X, Noda T et al. Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function. *Nat. Cell. Biol.*, 2004, 6: 849–860.
- Hayden** MS, Ghosh S. Signaling to NF- κ B. *Genes Dev.*, 2004, 18: 2195-2224.
- Hengartner** MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000, 407: 770–776.

Herceg Z, Wang ZQ. Failure of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, 1999, 19:5124-5133.

Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M. NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol.* 1999 Apr;19(4):2690-8.

Ho P.K. and C. J. Hawkins Mammalian initiator apoptotic caspases. *FEBS Journal*, 2005, 272: 5436–5453.

Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, and Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 1993, 75: 241–251.

Hofmann K. The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cell. Mol. Life Sci.*, 1999, 55: 1113–1128.

Hou Y, An J, Hu XR, Sun BB, Lin J, Xu D, Wang T, Wen FQ. Ghrelin inhibits interleukin-8 production induced by hydrogen peroxide in A549 cells via NF-kappaB pathway. *Int Immunopharmacol.* 2009 Jan;9(1):120-6.

Hrdlickova´ R, Nehyba J, Liss AS, Bose Jr HR. Mechanism of telomerase activation by v-Rel and its contribution to transformation. *J. Virol.*, 2006, 80: 281–295.

Hu P, Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ, Exton JH. Autocrine Tumor Necrosis Factor Alpha Links Endoplasmic Reticulum Stress to the Membrane Death Receptor Pathway through IRE1{alpha}-Mediated NF-{kappa}B Activation and Down-Regulation of TRAF2 Expression. *Mol. Cell. Biol.*, 2006, 26: 3071–3084.

Hu S, Vincenz C, Buller M & Dixit VM. A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272: 9621–9624.

Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz R & Dixit VM. I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272: 17255–17257.

Huang B., Eberstadt, M., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P. & Fesik, S. W. NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature*, 1996, 384: 638–641.

Huang H, Joazeiro CA, Bonfoco E, Kamada S, Levenson JD & Hunter T. The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275: 26661–26664.

Huang TT, Wuerzberger-Davis SM, Wu ZH, Miyamoto S. Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell*, 2003, 115: 565–576.

Huber R.M., D.F. Stratakis. Molecular oncology-perspectives in lung cancer. *Lung Cancer*, 2004, 45: 209–213.

Hung J., Y. Kishimoto, K. Sugio, A. Virmani, D. McIntire, I. Minna, et al. Allele-specific chromosome 3p deletion occur in an early stage in the pathogenesis of lung carcinomas. *Am. J. Med. Assoc.*, 1995, 273: 558–563.

Hur GM, Lewis J, Yang Q, Lin Y, Nakano H, Nedospasov S, Liu ZG. The death domain kinase RIP has an essential role in DNA damage-induced NF-kappa B activation. *Genes Dev.*, 2003, 17:873–882.

Hurley PJ, Bunz F. ATM and ATR: components of an integrated circuit. *Cell Cycle*, 2007, 6:414-417.

I

Ikeda F, Dikic I. CYLD in ubiquitin signalling and tumor pathogenesis. *Cell*, 2006, 125: 643–645.

Imbert V, Rupec RA, Livolsi A, Pahl HL, Traenckner EB, Mueller-Dieckmann C, Farahifar D, Rossi B, Auberger P, Baeuerle PA, Peyron JF. Tyrosine phosphorylation of I kappa B-alpha activates NF-kappa B without proteolytic degradation of I kappa B-alpha. *Cell*. 1996 Sep 6;86(5):787-98.

Inohara N, Koseki T, Hu Y, Chen S & Nunez G. CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94: 10717–10722.

Irmiler M. et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 1997, 388: 190–195.

J

Jan H., J. Hoeijmakers. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 2001 411: 366-374.

Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Aesif SW, Pantano C, Ather JL, Reynaert NL, Ckless K, Anathy V, van der Velden J, Irvin CG, van der Vliet A. Nuclear factor kappaB, airway epithelium, and asthma: avenues for redox control. *Proc Am Thorac Soc*. 2009 May 1;6(3):249-55.

- Janssens S**, Tinel A, Lippens S, Tschopp J. PIDD mediates NF- κ B activation in response to DNA damage. *Cell*, 2005, 123: 1079–1092.
- Janssens S**, Tschopp J. Signals from within: the DNA damage-induced NF- κ B response. *Cell Death Diff.*, 2006, 13: 773-784.
- Jaspers I**, Zhang W, Fraser A, Samet JM, Reed W. Hydrogen peroxide has opposing effects on IKK activity and I κ B α breakdown in airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2001, 24: 769-777.
- Javelaud D**, Wietzerbin J, Delattre O, Besançon F. Induction of p21Waf1/Cip1 by TNF α requires NF- κ B activity and antagonizes apoptosis in Ewing tumor cells. *Oncogene*. 2000 Jan 6;19(1):61-8.
- Jiang B**, Xiao W, Shi Y, Liu M, and Xiao X. Role of Smac/DIABLO in hydrogen peroxide-induced apoptosis in C2C12 myogenic cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 2005, 39: 658–667.
- Jin Z**, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.*, 2005, 4(2): 139-63.
- Joyce D**, Bouzahzah B, Fu M, Albanese C, D'Amico M, Steer J, Klein JU, Lee RJ, Segall JE, Westwick JK, Der CJ, Pestell RG. Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor- κ B-dependent pathway. *J Biol Chem*. 1999 Sep 3;274(36):25245-9.
- Juin P**, Hunt A, Littlewood T, Griffiths B, Swigart LB, Korsmeyer S and Evan G. c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, 2002, 22: 6158–6169.
- Jung M**, Ditschilo A. Signal transduction and cellular responses to ionizing radiation. *Semin. Radiat. Oncol.*, 1996, 6: 268–272.
- Jung M**, Zhang Y, Lee S, Ditschilo A. Correction of radiation sensitivity in ataxia telangiectasia cells by a truncated I κ B- α . *Science*, 1995, 268: 1619–1621.
- Jung M**, Kondratyev A, Lee SA, Dimtchev A, Ditschilo A. ATM gene product phosphorylates I κ B- α . *Cancer Res.*, 1997, 57: 24–27.
- Jyonouchi H**, Sun S, Abiru T, Chareancholvanich S, Ingbar D. The effects of hyperoxic injury and antioxidant vitamins on death and proliferation of human small airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1998, 19: 426-436.

K

Kagan VE, Yalowich JC, Day BW et al. Ascorbate is the primary reductant of the phenoxyl radical of etoposide in the presence of thiols both in cell homogenates and in model systems. *Biochemistry*, 1994, 33: 9651-60.

Kameoka M, Nukuzuma S, Itaya A, Tanaka Y, Ota K, Ikuta K, et al RNA interference directed against poly(ADP-ribose) polymerase 1 efficiently suppresses human immunodeficiency virus type 1 replication in human cells. *J. Virol.*, 2004, 78: 8931-8934.

Kanai M, Tong WM, Sugihara E, Wang ZQ, Fukasawa K, Miwa M. Involvement of poly(ADP-ribose)polymerase 1 and poly(ADP-ribose)ylation in regulation of centrosome function. *Mol. Cell. Biol.*, 2003, 23: 2451-2462.

Kanai M, Uchida M, Hanai S, Uematsu N, Uchida K, Miwa M. Poly(ADP-ribose) polymerase localizes to the centrosomes and chromosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, 278: 385-389.

Kanarek N, London N, Schueler-Furman O and Ben-Neriah Y. (2009). Ubiquitination and degradation of the inhibitors of NF- κ B. *Perspectives in Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory, CSHL Press, 1-16

Kang SJ, Wang S, Hara H, Peterson EP, Namura S, Amin-Hanjani S et al. Dual role of caspase-11 in mediating activation of caspase-1 and caspase-3 under pathological conditions. *J. Cell. Biol.*, 2000, 149: 613–622.

Kannan K, Kaminski N, Rechavi G, Jakob-Hirsch J, Amariglio N, Givol D. DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. *Oncogene*, 2001, 20: 3449-3455.

Karin M, Yamamoto Y, Wang QM. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2004 Jan;3(1):17-26.

Karin M, Greten FR. NF- κ B: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, 5: 49-759.

Kashatus D, Cogswell P, Baldwin AS. Expression of the Bcl-3 proto-oncogene suppresses p53 activation. *Genes Dev.*, 2006, 20: 225–235.

Kasof GM & Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276:3238–3246.

Kastan M.B. and Bartek J. Cell cycle checkpoints and cancer *Nature*, 2004, 432(7015): 316-323.

Kaufmann S.H. Cell death induced by topoisomerase targeted drugs: more questions than answers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 1400: 195–211.

Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell. Biol.*, 2001, 11(12):526-534.

Kaufmann S.H., W.C. Earnshaw. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp. Cell. Res.*, 2000, 256: 42–49.

Kawakami H, Tomita M, Matsuda T, Ohta T, Tanaka Y, Fujii M et al. Transcriptional activation of survivin through the NF- κ B pathway by human T-cell leukemia. *Int. J. Cancer*, 2005, 115: 967–974.

Kazzaz JA, Xu J, Palaia TA, Mantell L, Fein AM, and Horowitz S. Cellular oxygen toxicity. Oxidant injury without apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271: 15182–15186.

Kerr JFR, Gobe GC, Winterford CM, Harmon BV. Anatomical methods in cell death. *Methods Cell. Biol.*, 1995, 46: 1–27.

Kishimoto Y., K. Sugio, J. Huang, A. Vinnani, D. Mc Intire, J. Minna, et al. Allele-specific loss in chromosome 9p loci in preneoplastic lesions accompanying non-small cell lung cancers. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1995, 87: 1224–1229.

Klein EA, Yang C, Kazanietz MG, Assoian RK. NF κ B-independent signaling to the cyclin D1 gene by Rac Cell Cycle. 2007 May 2;6(9):1115-21.

Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.*, 2000, 6: 513–519.

Kowaltowski AJ, Fenton RG, and Fiskum G. Bcl-2 family proteins regulate mitochondrial reactive oxygen production and protect against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004, 37:1845–1853.

Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, Gélinas C. To be, or not to be: NF- κ B is the answer--role of Rel/NF- κ B in the regulation of apoptosis. *Oncogene*, 2003 22(56): 8961-82.

Kwak YT, Li R, Becerra CR, Tripathy D, Frenkel EP, Verma UN. I κ B kinase alpha regulates subcellular distribution and turnover of cyclin D1 by phosphorylation. *J Biol Chem*. 2005 Oct 7;280(40):33945-52.

L

Lagadec P, Griessinger E, Nawrot MP, Fenouille N, Colosetti P, Imbert V, Mari M, Hofman P, Czerucka D, Rousseau D, Berard E, Dreano M, Peyron JF. Pharmacological targeting of NF- κ B potentiates the effect of the topoisomerase inhibitor CPT-11 on colon cancer cells. *Br J Cancer*. 2008 Jan 29;98(2):335-44.

- Lamkanfi** M, D'Hondt K, Vande Walle L, van Gurp M, Denecker G, Demeulemeester J, Kalai M, Declercq W, Saelens X & Vandenameele P. A novel caspase-2 complex containing TRAF2 and RIP1. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280: 6923–6932.
- Launay** S, Hermine O, Fontenay M, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Vital functions for lethal caspases. *Oncogene*, 2005, 24: 5137–5148.
- Laurent** A., C. Nicco, C. Chereau, C. Goulvestre, J. Alexandre, A. Alves, E. Levy, F. Goldwasser, Y. Panis, O. Soubrane, B. Weill, and F. Batteux. Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res.*, 2005, 65: 948–956.
- Lee** CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS. NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors*, 2007, 29(1): 19-35.
- Lee** J-H and Paull T.T. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50Nbs1 complex. *Science*, 2004, 304: 93-96.
- Lee** SJ, Dimtchev A, Lavin MF, Dritschilo A, Jung M. A novel ionizing radiation-induced signaling pathway that activates the transcription factor NF-kappaB. *Oncogene*, 1998, 17: 1821–1826.
- Lee** SK, Seo SH, Kim BS, Kim CD, Lee JH, Kang JS et al. IFN-gamma regulates the expression of B7-H1 in dermal fibroblast cells. *J. Dermatol. Sci.*, 2005, 40: 95–103.
- Lee** SR, Yang KS, Kwon J, Lee C, Jeong W, and Rhee SG. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277: 20336–20342.
- Li** F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC & Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, 1998, 396: 580–584.
- Li** H Mitchell JR, Hasty P. DNA double-strand breaks: a potential causative factor for mammalian aging? *Mech Ageing Dev.* 2008 Jul-Aug;129(7-8):416-24.
- Li** N, Karin M. Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *FASEB Journal*, 1999, 13(10): 1137–43.
- Li** N, Banin S, Ouyang H, Li GC, Courtois G, Shiloh Y, Karin M, Rotman G. ATM is required for Ikappa B kinase (IKK) activation in response to DNA double strand breaks. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276: 8898–8903.
- Li** P. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 1997, 91: 479–489.

- Li Y**, Zhang W, Mantell L, Kazzaz J, Fein A, Horowitz S. Nuclear factor-kappaB is activated by hyperoxia but does not protect from cell death. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272: 20646-20649.
- Li Z.H**, J. Zheng, L.M. Weiss, D. Shibata. C-k-ras and p53 mutations occur very early in adenocarcinoma of the lung. *Am. J. Pathol.*, 1994, 144: 303–309.
- Liochev SI**, Fridovich I. The relative importance of HO* and ONOO– in mediating the toxicity of O*. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 26: 777–778.
- Liston P**, Fong WG, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene*, 2003, 22: 8568–8580.
- Livolsi A**, Busuttill V, Imbert V, Abraham RT, Peyron JF. Tyrosine phosphorylation-dependent activation of NF-kappa B. Requirement for p56 LCK and ZAP-70 protein tyrosine kinases. *Eur J Biochem.* 2001 Mar;268(5):1508-15.
- Ljungman M**. Activation of DNA damage signaling. *Mutation Research*, 2005, 577: 203–216.
- Look MP**, Musch E. Lipid peroxides in the polychemotherapy of cancer patients. *Chemotherapy*, 1994, 40: 8-15.
- Lou X**, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from the mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 1998, 94: 481–490.
- Lou Z.**, Chen J. Cellular senescence and DNA repair. *Exp. Cell Res.*, 2006, 312: 2641-2646.
- Lu H**, Hou Q, Zhao T, Zhang H, Zhang Q, Wu L, Fan Z. Granzyme M directly cleaves inhibitor of caspase-activated DNase (CAD) to unleash CAD leading to DNA fragmentation. *J. Immunol.*, 2006, 177: 1171-1178.
- Lukas J**, Vilhelm A.B., Halazonetis D.T. Cellular responses to DNA damage: current state of the field and review of the 52nd Benzon Symposium. *DNA repair*, 2006, 5: 591-601.
- Luo JL**, Kamata H, Karin M. The anti-death machinery in IKK/NF-kappaB signaling. *Journal of clinical immunology*, 2005, 25(6):541-550.
- Luo JL**, Tan W, Ricono JM, Korchynskyi O, Zhang M, Gonias SL, Cheresch DA, Karin M. Nuclear cytokine-activated IKKalpha controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin. *Nature*. 2007 Apr 5;446(7136):690-4.

M

Mabb AM, Wuerzberger-Davis SM, Miyamoto S. PIASy mediates NEMO sumoylation and NF- κ B activation in response to genotoxic stress. *Nat. Cell Biol.*, 2006, 8: 986–993.

Mabb AM, Miyamoto S. SUMO and NF- κ B ties. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Aug;64(15):1979-96.

MacLachlan TK and El-Deiry WS. Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99: 9992–9997.

Maeda G, Chiba T, Kawashiri S, Satoh T, Imai K. . Epigenetic inactivation of IkappaB Kinase-alpha in oral carcinomas and tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2007 Sep 1;13(17):5041-7

Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, 1995, 146(1):3-15.

Mans DR, Schuurhuis GJ, Treskes M et al Modulation by D, L-buthionine-S-R-sulfoximine of etoposide cytotoxicity on human non-small-cell lung, ovarian and breast carcinoma cell lines. *Eur. J. Cancer*, 1992, 28A: 1447-52.

Martinon F, Holler N, Richard C & Tschopp J. Activation of a pro-apoptotic amplification loop through inhibition of NF- κ B-dependent survival signals by caspase-mediated inactivation of RIP. *FEBS Lett.*, 2000, 468: 134–136.

Massa P. E., X. Li, A. Hanidu, J. Siamas, M. Pariali, J. Pareja, A. G. Savitt, K. M. Catron, J. Li, and K. B. Marcu. Gene expression profiling in conjunction with physiological rescues of IKK α null cells with Wt. or mutant IKK α reveals distinct classes of IKK α /NF- κ B dependent genes. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280: 4057-14069.

Massoumi R, Podda M, Fassler R, Paus R. Cylindroma as tumor of hair follicle origin. *J. Invest. Dermatol.*, 2006, 126:1182–1184.

Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*. 2007 May 25;316(5828):1160-6.

Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature*, 2000, 407:796-801.

Mendoza FJ, G Ishdor, X Hu, SB Gibson. Death receptor-4 (DR4) expression is regulated by transcription factor NF- κ B in response to etoposide treatment. *Apoptosis*, 2008, 13: 756–770.

Micheau O, Thome M, Schneider P, Holler N, Tschopp J, Nicholson DW, Briand C & Grutter MG. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277: 45162–45171.

Michod D., and C. Widmann. DNA-damage sensitizers: Potential new therapeutical tools to improve chemotherapy. *Crit. Rev. Oncol/Hematol.*, 2007, 63:160-171.

Minna JD, Fong K, Zochbauer-Muller S and Gazdar. AF: Molecular pathogenesis of lung cancer and potential translational applications. *Cancer J.*, 2002, 8(1):41-46.

Mitsuuchi Y., J.R. Testa. Cytogenetics and molecular genetics of lung cancer. *Am. J. Med. Genet.*, (Semin. Med. Genet.), 2002, 115: 183–188.

Miyamoto S. RelA life and death decisions. *Mol Cell.* 2004 Mar 26;13(6):763-4.

Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B and Reed JC. *Oncogene*, 1994, 9: 1799–1805.

Moodie FM, Marwick JA, Anderson CS, Szulakowski P, Biswas SK, Bauter MR, Kilty I, Rahman I. Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but differentially regulate NF- κ B activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells. *FASEB J.*, 2004, 18: 1897-1899.

Morizane Y, Honda R, Fukami K & Yasuda H. X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac / DIABLO. *J. Biochem.*, (Tokyo), 2005, 137: 125–132.

Moroni MC, Hickman ES, Denchi EL, Caprara G, Colli E, Cecconi F, Muller H and Helin K. Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat. Cell. Biol.*, 2001, 3: 552–558.

Morotti D, Cilloni, M. Pautasso, F. Messa, F. Arruga, I. Defilippi, S. Carturan, R. Catalano, V. Rosso, A. Chiarenza, R. Taulli, E. Bracco, G. Rege-Cambrin, E. Gottardi, and G. Saglio. NF- κ B Inhibition as a Strategy to Enhance Etoposide-Induced Apoptosis in K562 Cell Line. *American Journal of Hematology*, 2006, 81: 938–945.

Mukhopadhyay A, Banerjee S, Stafford LJ, Xia C, Liu M, Aggarwal BB. Curcumin-induced suppression of cell proliferation correlates with down-regulation of cyclin D1 expression and CDK4-mediated retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogene*, 2002, 21: 8852–8861.

Muzio M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S. & Dixit, V. M. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273: 2926–2930.

N

Nakano K. & Vousden, K. H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell.*, 2001, 7: 683–694.

Nakayama H, Ikebe T, Beppu M, Shirasuna K. High expression levels of nuclear factor kappaB, IkappaB kinase alpha and Akt kinase in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer*. 2001 Dec 15;92(12):3037-44.

Nanavaty UB, Pawliczak R, Doniger J, Gladwin MT, Cowan MJ, Logun C, Shelhamer JH. Oxidant-induced cell death in respiratory epithelial cells is due to DNA damage and loss of ATP. *Exp. Lung Res.*, 2002, 28: 591-607.

Naugler WE, Karin M. NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev*. 2008 Feb;18(1):19-26.

Negri C., M. Donzelli, R. Bernardi, L. Rossi, A. Burkle, A.I. Scovassi. Multiparametric staining to identify apoptotic human cells. *Exp. Cell Res.*, 1997, 234: 174–177.

Nesbitt JC, Putnam JB Jr, Walsh GL, Roth JA and Mountain CF. Survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Ann. Thorac. Surg.*, 1995, 60(2): 466-472.

Norbury CJ and B Zhivotovsky. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, 2004, 23: 2797–2808.

Norbury C. J., and I. D. Hickson. Cellular responses to DNA damage. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2001, 41: 367-401.

Nozawa K, Casiano CA, Chan EKL. Fragmentation of Golgi complex and Golgi autoantigens during apoptosis and necrosis. *Arthr. Res.*, 2002, 4: 1-9.

O

Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T and Tanaka N. "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 2000, 288: 1053–1058.

Ohtani K., A. Tsujimoto, M. Ikeda, and M. Nakamura. Regulation of cell growth-dependent expression of mammalian CDC6 gene by the cell cycle transcription factor E2F. *Oncogene*, 1998, 17: 1777-1785.

Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, Murcia JM. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273: 33533-33539.

Olivotto E, Borzi RM, Vitellozzi R, Pagani S, Facchini A, Battistelli M, Penzo M, Li X, Flamigni F, Li J, Falcieri E, Facchini A, Marcu KB. Differential requirements for IKKalpha and IKKbeta in the differentiation of primary human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2008 Jan;58(1):227-39.

Ono M. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. *Cancer Sci.* 2008 Aug;99(8):1501-6.

Ott M, V Gogvadze, S Orrenius, B Zhivotovsky. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 2007, 12: 913–922.

Ouyang W, Ma Q, Li J, Zhang D, Liu ZG, Rustgi AK, Huang C. Cyclin D1 induction through I κ B kinase beta/nuclear factor-kappaB pathway is responsible for arsenite-induced increased cell cycle G1-S phase transition in human keratinocytes. *Cancer Res.* 2005 Oct 15;65(20):9287-93.

P

Pacifico F, Leonardi A. NF-kappaB in solid tumors. *Biochem Pharmacol.* 2006 Oct 30;72(9):1142-52

Panani AD, Roussos C. Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. *Cancer Lett.*, 2006, 239(1): 1-9.

Papa S, Bubici C, Zazzeroni F, Pham CG, Kuntzen C, Knabb JR et al. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF- κ B. *Cell Death Differ.*, 2006, 13: 712–729.

Pasparakis M., Luedde, T. & Schmidt-Suppran, M. Dissection of the NF- κ B signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell Death Differ.*, 2006, 13: 861–872 .

Paul C and Arrigo AP. Comparison of the protective activities generated by two survival proteins: Bcl-2 and Hsp27 in L929 murine fibroblasts exposed to menadione or staurosporine. *Exp. Gerontol.*, 2000, 35: 757–766.

Paull T.T. and Lee J-H. The Mre11/Rad50/Nbs1 Complex and its role as a DNA Double-Strand-Break sensor for ATM. *Cell Cycle*, 2005, 4:6: 737-740.

Pelicano H., D. Carney, and P. Huang. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist. Updat.*, 2004, 7: 97-110.

Penzo M, Massa PE, Olivotto E, Bianchi F, Borzi RM, Hanidu A, Li X, Li J, Marcu KB. Sustained NF- κ B activation produces a short -term cell proliferation block in conjunction with repressing effectors of cell cycle progression controlled by E2F or FoxM1. *J. Cell. Physiol.*, 2009, 218: 215-227.

- Perkins** N.D. Oncogenes, tumor suppressors and p52 NF- κ B. *Oncogene*, 2003, 22: 7553–7556.
- Perkins** N.D. & Gilmore, T. D. Good cop, bad cop: the different faces of NF- κ B. *Cell Death Differ.*, 2006, 13: 759–772.
- Perkins** N.D. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor κ B pathway. *Oncogene*, 2006, 25: 6717–6730.
- Perkins** ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2007, 8: 49-62.
- Pletjushkina** OY, Fetisova EK, Lyamzaev KG, Ivanova OY, Domnina LV, Vyssokikh MY, Pustovidko AV, Alexeevski AV, Alexeevski DA, Vasiliev JM, Murphy MP, Chernyak BV, and Skulachev VP. Hydrogen peroxide produced inside mitochondria takes part in cell-to-cell transmission of apoptotic signal. *Biochemistry, (Mosc)*, 2006, 71: 60–67.
- Pogrebniak** A, Schemainda I, Pelka-Fleischer R, Nussler V, Hasmann M. Poly ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitors transiently protect leukemia cells from alkylating agent induced cell death by three different effects. *Eur. J. Med. Res.*, 2003, 8: 438-450.
- Poole** JC, Thain A, Perkins ND, Roninson IB. Induction of transcription by p21Waf1/Cip1/Sdi1: role of NFkappaB and effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Cell Cycle*. 2004 Jul;3(7):931-40.
- Potter** A. J., and P. S. Rabinovitch. The cell cycle phases of DNA damage and repair initiated by topoisomerase II-targeting chemotherapeutic drugs. *Mut. Res.*, 2005, 572: 27-44.
- Poukkula** M, Kaunisto A, Hietakangas V, Denessiouk K, Katajamaki T, Johnson MS, Sistonen L & Eriksson, JE. Rapid turnover of c-FLIPshort is determined by its unique C-terminal tail. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280: 27345–27355.
- Prajapati** S., Z. Tu, Y. Yamamoto, and R. B. Gaynor. IKK α regulates the mitotic phase of the cell cycle by modulating aurora A phosphorylation. *Cell Cycle*, 2006, 5:2371-2380.
- Prindull** G. Apoptosis in the embryo and tumorigenesis. *Eur. J. Cancer*, 1995, 31: 116-123.
- Probin** V, Wang Y, Bai A, Zhou D. Busulfan selectively induces cellular senescence but not apoptosis in WI38 fibroblasts via a p53-independent but extracellular signal-regulated kinase-p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Nov;319(2):551-60.

R

- Rahman I**, Gilmour PS, Jimenez LA, MacNee W. Oxidative stress and TNF- α induce histone acetylation and NF- κ B/AP-1 activation in alveolar epithelial cells: Potential mechanism in gene transcription in lung inflammation. *Mol. Cell. Biochem.*, 2002, 234/235: 239-248.
- Raju U**, Gumin GJ, Tofilon PJ. Radiation-induced transcription factor activation in the rat cerebral cortex. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2000, 76:1045–1053.
- Ravid T**, Tsaba A, Gee P, Rasooly R, Medina EA, Goldkorn T. Ceramide accumulation precedes caspase-3 activation during apoptosis of A549 human lung adenocarcinoma cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2003, 284: 1082-1092.
- Reed JC**, Jurgensmeier JM, Matsuyama S. Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 1366: 127–137.
- Renard P**, Percherancier Y, Kroll M, Thomas D, Virelizier J-L, Arenzana-Seisdedos F, Bachelier F. Inducible NF- κ B activation is permitted by simultaneous degradation of nuclear I κ B α . *J. Biol. Chem.*, 2000, 275: 15193-15199.
- Riley T**, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 May; 9(5):402-12.
- Ritov VB**, Goldman R, Stoyanovsky DA et al. Antioxidant paradoxes of phenolic compounds: Peroxyl radical scavenger and lipid antioxidant, etoposide (VP-16). inhibits sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase via thiol oxidation by its phenoxyl radical. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995, 321: 140-52.
- Robles AI**, Bemmels NA, Foraker AB and Harris CC. APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res.*, 2001, 61: 6660–6664.
- Rodriguez J.** & Lazebnik, Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.*, 1999, 13: 3179–3184.
- Rom W.N.**, J.G. Hay, T.C. Lee, Y. Jiang, K.-M. Tchou-Wong, Molecular and genetic aspects of lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000, 161: 1355–1367.
- Roos WP**, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol. Med.*, 2006, 12:440-450.
- Rossi R.**, A. Montecucco, M. Donzelli, M. Denegri, G. Biamonti, A. Scovassi. DNA ligase I is dephosphorylated during the execution step of etoposide-induced apoptosis. *Cell. Death Differ.*, 2002, 9: 89–90.

Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS & Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.*, 1997, 16: 6914–6925.

Ryan KM, Ernst MK, Rice NR, Vousden KH. Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature*. 2000 Apr 20;404(6780):892-7.

Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Predictors of elevated nuclear factor-kappaB-dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Oct 1;174(7):824-30.

Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, Choi AM. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid. Redox. Signal.*, 2007, 9(1):49-89.

S

Sallmann FR, Vodenicharov MD, Wang ZQ, Poirier GG. Characterization of sPARP-1. An alternative product of PARP-1 gene with poly(ADP-ribose) polymerase activity independent of DNA strand breaks. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275: 15504-15511.

Salminen A, Kauppinen A, Suuronen T, Kaarniranta K. SIRT1 longevity factor suppresses NF-kappaB -driven immune responses: regulation of aging via NF-kappaB acetylation? *Bioessays*. 2008 Oct;30(10):939-42.

Salvesen G. S. & Dixit, V. M. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96: 10964–10967.

Savickiene J, Treigyte G, Magnusson KE, Navakauskiene R. p21 (Waf1/Cip1) and FasL gene activation via Sp1 and NFkappaB is required for leukemia cell survival but not for cell death induced by diverse stimuli. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 Apr;37(4):784-96.

Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*, 1995, 268: 1749–1753.

Sax JK, Fei P, Murphy ME, Bernhard E, Korsmeyer SJ, El-Deiry WS. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat. Cell. Biol.*, 2002, 4: 842-849.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Feng L, Tomaselli KJ, et al. Two CD95 (Apo-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.*, 1998,17: 1675-1687.

- Scagliotti G:** Consensus development conference on the medical treatment of non-small cell lung cancer: treatment of the early stages. *Lung Cancer*, 2002, 38(3): 23-29.
- Schneider G., D. Saur, J. T. Siveke, R. Fritsch, F. R. Greten, and R. M Schmid.** IKK α controls p52/RelB at the *skp2* gene promoter to regulate G1- to S-phase progression. *EMBO J.*, 2006, 25:3801-3812.
- Schoonbroodt S, Ferreira V, Best-Belpomme M, Boelaert JR, Legrand-Poels S, Korner M, Piette J.** Crucial role of the amino-terminal tyrosine residue 42 and the carboxyl-terminal PEST domain of I kappa B alpha in NF-kappa B activation by an oxidative stress. *J Immunol.* 2000 Apr 15;164(8):4292-300.
- Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA.** Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.*, 1991, 10(8): 2247–2258.
- Schultz DR, Harrington WJ Jr.** Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin. Arthritis Rheum.*, 2003, 32(6): 345-69.
- Schultz N, Lopez E, Saleh-Gohari N, Helleday T.** Poly(ADPribose) polymerase (PARP-1) has a controlling role in homologous recombination. *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31: 4959-4964.
- Sebban H, Yamaoka S, Courtois G.** Posttranslational modifications of NEMO and its partners in NF-kappaB signaling. *Trends Cell Biol.* 2006 Nov;16(11):569-77.
- Sengupta T, Mukherjee M, Das A, Mandal C, Das R, Mukherjee T, Majumder HK.** Characterization of the ATPase activity of topoisomerase II from *Leishmania donovani* and identification of residues conferring resistance to etoposide. *Biochem J.* 2005 Sep 1;390(Pt 2):419-26.
- Sethi G, Sung B. Aggarwal BB.** Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside. *Exp. Biol. Med.*, 2008, 233(1): 21-31.
- Shaw J., N. Yurkova, T. Zhang, H. Gang, F. Aguilar, D. Weidman, C. Scramsta, H. Weisman, and L. A. Kirshenbaum.** Antagonism of E2F-1 regulated Bnip3 transcription by NF- κ B is essential for basal cell survival. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2008, 105: 20734-20739.
- Sherr CJ.** D1 in G2. *Cell Cycle.* 2002 Jan;1(1):36-8.
- Shiloh Y.** The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci.* 2006 Jul;31(7):402-10.
- Shishodia S, Aggarwal BB.** Nuclear factor-kappaB activation: a question of life or death. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 2002, 35: 28–40.
- Shishodia S, Sethi G, Konopleva M, Andreeff M, Aggarwal BB.** A Synthetic Triterpenoid, CDDO-Me, Inhibits I{kappa}B{alpha} Kinase and Enhances

Apoptosis Induced by TNF and Chemotherapeutic Agents through Down-Regulation of Expression of Nuclear Factor κ B-Regulated Gene Products in Human Leukemic Cells. *Clin. Cancer Res.*, 2006, 12: 1828–1838.

Shriver S.P., H.A. Bourdeau, C.T. Gubish, et al. Relationship to smoking history and risk of lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000, 92: 24–33.

Shu HB, Halpin DR & Goeddel DV. Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity*, 1997, 6: 751–763.

Siitonen T., P. Alaruikka, P. Mantymaa, E.-R. Savolainen, T. J. Kavanagh, C. M. Krejsa, C. C. Franklin, V. Kinnula & P. Koistinen. Protection of acute myeloblastic leukemia cells against apoptotic cell death by high glutathione and gamma-glutamylcysteine synthetase levels during etoposide-induced oxidative stress. *Annals of Oncology*, 1999, 10: 1361-1367.

Smith BT. Cell line A549: a model system for the study of alveolar type II cell function. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1977, 115(2): 285-93.

Soldani C, Scovassi AI. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: An update. *Apoptosis*, 2002, 7: 321-328.

Sozzi G., L. Sard, L. De Gregorio, A. Marchetti, K. Musso, F. Buttitta, et al. Association between cigarette smoking and FHIT gene alterations in lung cancer. *Cancer Res.*, 1997, 57: 2121–2123.

Srinivasula SM, Ahmad M, Otilie S, Bullrich F, Banks S, Wang Y, Fernandes-Alnemri T, Croce CM, Litwack G, Tomaselli KJ et al. FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas / TNFR1-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272: 18542–18545.

Stacey D.W., M. Hitomi, G. Chen. Influence of cell cycle and oncogene activity upon topoisomerase II α expression and drug toxicity. *Mol. Cell. Biol.*, 2000, 20: 9127–9137.

Stennicke H. R. et al. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274: 8359–8362.

Stoyanovsky D, Yalowich J, Gantchev T, Kagan V. Tyrosinase-induced phenoxyl radicals of etoposide (VP-16): Interaction with reductants in model systems, K562 leukemic cell and nuclear homogenates. *Free Radic. Res. Commun.*, 1993, 19: 371-86.

Strasser A. et al. Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.*, 2000, 69: 217–245.

Strozyk E, Pöppelmann B, Schwarz T, Kulms D. Differential effects of NF- κ B on apoptosis induced by DNA-damaging agents: the type of DNA damage determines the final outcome. *Oncogene*. 2006 Oct 12;25(47):6239-51

Sun C, Cai M, Meadows RP, Xu N, Gunasekera AH, Herrmann J, Wu JC & Fesik SW. NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275: 33777–33781.

Sun C, Chan F, Briassouli P, Linardopoulos S. Aurora kinase inhibition downregulates NF- κ B and sensitises tumour cells to chemotherapeutic agents. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 352: 220-225.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 1999, 397: 441-446.

Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, et al. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.*, 1996, 184: 1331-1341.

Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, et al. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.*, 1996, 184: 1331-1341.

Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Daugas E, Wang H-G, Geley S, et al. The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J. Exp. Med.*, 1997, 186: 25-37.

T

Tabruyn SP, Griffioen AW. NF-kappa B: a new player in angiostatic therapy. *Angiogenesis*. 2008;11(1):101-6. Epub 2008 Feb 19.

Takada Y, Mukhopadhyay A, Kundu GC, Mahabeleshwar GH, Singh S, Aggarwal BB. Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem*. 2003 Jun 27;278(26):24233-41.

Tang D, Wu D, Hirao A, Lahti JM, Liu L, Mazza B, Kidd VJ, Mak TW, Ingram AJ. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J Biol Chem*. 2002 Apr 12;277(15):12710-7.

Taylor JM, Crack PJ, Gould JA, Ali U, Hertzog PJ, Iannello RC. Akt phosphorylation and NFkappaB activation are counterregulated under conditions of oxidative stress. *Exp Cell Res*. 2004 Nov 1;300(2):463-75.

Tergaonkar V, Pando M, Vafa O, Wahl G, Verma I. p53 stabilization is decreased upon NF κ B activation: a role for NF κ B in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell.*, 2002, 1: 493–503.

Tergaonkar V. NF κ B pathway: A good signaling paradigm and therapeutic target. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2006, 38: 1647-1653.

Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M et al. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*, 1997, 386: 517–521.

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

Thun M.J., S.J. Henley, B.E. Calle. Tobacco use and cancer: an epidemiologic perspective for geneticists. *Oncogene*, 2002, 21: 7307–7325.

Tian R, Zhang GY, Yan CH, Dai YR. Involvement of poly(ADPribose) polymerase and activation of caspase-3-like protease in heat shock-induced apoptosis in tobacco suspension cells. *FEBS Lett.*, 2000, 474: 11-15.

Tinel A & Tschopp J. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science*, 2004, 304: 843–846.

Tonks NK. Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signalling. *Cell*, 2005, 121(5): 667–670.

Toualbi-Abed K, Daniel F, Güller MC, Legrand A, Mauriz JL, Mauviel A, Bernuau D. Jun D cooperates with p65 to activate the proximal kappaB site of the cyclin D1 promoter: role of PI3K/PDK-1. *Carcinogenesis*. 2008 Mar;29(3):536-43.

Tsujimoto Y. Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J. Cell Physiol.*, 2003, 195: 158–167.

Tu Z., S. Prajapati, K-J. Park, N. J. Kelly, Y. Yamamoto, and R. B. Gaynor. IKK α regulates estrogen-induced cell cycle progression by modulating E2F1 expression. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281: 6699-6706.

Tyurina YY, Tyurin VA, Yalowich JC et al. Phenoxy radicals of etoposide (VP-16) can directly oxidize intracellular thiols: Protective *versus* damaging effects of phenolic antioxidants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1995, 131: 277-288.

U

Upadhyay D, Bundesmann M, Panduri V, Correa-Meyer E, Kamp DW. Fibroblast growth factor-10 attenuates H₂O₂-induced alveolar epithelial cell DNA damage: role of MAPK activation and DNA repair. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004 Jul;31(1):107-13.

V

Van de Stolpe A, Caldenhoven E, Stade BG, Koenderman L, Raaijmakers JA, Johnson JP, van der Saag PT. 12-O-tetradecanoylphorbol- 13-acetate- and tumor necrosis factor alpha-mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone: functional analysis of the human intercellular adhesion molecular-1 promoter. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269: 6185–6192.

Van Waes C. Nuclear factor-kappaB in development, prevention, and therapy of cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Feb 15;13(4):1076-82.

Vaux DL & Silke J. IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2005 6: 287–297.

Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C et al. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277: 445–454.

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ & Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 2000, 102: 43–53.

Verhagen AM, Coulson EJ & Vaux DL. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol.*, 2001, 2, REVIEWS3009.

Viatour P., S. Legrand-Poels, C. van Lint, M. Warnier, M-P. Merville, J. Gielen, J. Piette, V. Bours, and A. Chariot. Cytoplasmic IκBα increases NF-κB-independent transcription through binding to histone deacetylase (HDAC)1 and HDAC3. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278: 46541-46548.

von Zglinicki T, Pilger R, Sitte N. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic Biol Med.* 2000 Jan 1;28(1):64-74.

Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Apr; 8(4):275-83.

W

Wang J. & Lenardo, M. J. Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J. Cell Sci.*, 2000, 113: 753–757.

Wang P., J.H. Song, D.K. Song, J. Zhang, C. Hao. Role of death receptor and mitochondrial pathways in conventional chemotherapy drug induction of apoptosis. *Cell Signal.*, 2006, 18: 1528–1535.

Wang Y, Meng A, Lang H, Brown SA, Konopa JL, Kindy MS, Schmiedt RA, Thompson JS, Zhou D. Activation of nuclear factor kappaB In vivo selectively protects the murine small intestine against ionizing radiation-induced damage. *Cancer Res.*, 2004, 64: 6240–6246.

Wang Z-B, Y-Q Liu, Y-F Cui. Pathways to caspase activation. *Cell Biology International*, 2005, 29: 489-496.

Westerheide SD, Mayo MW, Anest V, Hanson JL, Baldwin AS Jr. The putative oncoprotein Bcl-3 induces cyclin D1 to stimulate G(1) transition. *Mol Cell Biol.* 2001 Dec;21(24):8428-36.

Wistuba C. Behrens, S. Milchgrub, D. Bryant, J. Hung, J.D. Minna, et al. Sequential molecular abnormalities are involved in the multistage development of squamous cell lung carcinoma. *Oncogene*, 1999, 18: 643–650.

Wolfe JT, Ross D, Cohen GM. A role for metals and free radicals in the induction of apoptosis in thymocytes. *FEBS Lett.*, 1994, 352: 58-62.

Wotawa, S. Solier, E. Logette, E. Solary, L. Corcos. Differential influence of etoposide on two caspase-2 mRNA isoforms in leukemic cells. *Cancer Lett.*, 2002, 185: 181–189.

Wright CW, Duckett CS. Reawakening the cellular death program in neoplasia through the therapeutic blockade of IAP function. *J. Clin. Invest.*, 2005, 115: 2673–2678.

Wu ZH, Shi Y, Tibbetts RS, Miyamoto S. Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science*, 2006, 311: 1141–1146.

Wu ZH, Miyamoto S. Many faces of NF-kappaB signaling induced by genotoxic stress. *J. Mol. Med.*, 2007, 85(11): 1187-202.

Wuerzberger-Davis SM, Chang PY, Berchtold C, Miyamoto S. Enhanced G2-M arrest by nuclear factor- κ B-dependent p21waf1/cip1 induction. *Mol Cancer Res.* 2005 Jun;3(6):345-53.

X

Xia, Y., R. C. Padre, T. H. De Mendoza, V. Bottero, V. B. Tergaonkar, and I. M. Verma. Phosphorylation of p53 by I κ B kinase 2 promotes its degradation by β -TrCP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2009, 106: 2629-2634.

Xiao CY, Chen M, Zsengeller Z, Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase contributes to the development of myocardial infarction in diabetic rats and regulates the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2004, 310: 498-504.

Y

Yamaguchi T, Miki Y, Yoshida K. Protein kinase C δ activates I κ B-kinase α to induce the p53 tumor suppressor in response to oxidative stress. *Cell. Signal.*, 2007a, 19: 2088-2097.

Yamaguchi T, Kimura J, Miki Y, Yoshida K. The deubiquitinating enzyme USP11 controls an I κ B kinase α (IKK α)-p53 signaling pathway in response to tumor necrosis factor α (TNF α). *J. Biol. Chem.*, 2007b, 282: 33943-33948.

Yamamoto Y, Verma UN, Prajapati S, Kwak YT, Gaynor RB. Histone H3 phosphorylation by IKK- α is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature.* 2003 Jun 5;423(6940):655-9.

Yan, Z., J. DeGregori, R. Shohet, G. Leone, B. Stillman, J. R. Nevins, and R. S. Williams. Cdc6 is regulated by E2F and is essential for DNA replication in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95:3603-3608.

Yan N, Shi Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 2005, 21:35-56.

Yang Y, Zhao S, Song J. Caspase-dependent apoptosis and -independent poly(ADP-ribose) polymerase cleavage induced by transforming growth factor beta1. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 2004, 36:223-234.

Yim, H., Y. H. Jin, B. D. Park, H. J. Choi, and S. K. Lee. Caspase-3-mediated cleavage of Cdc6 induces nuclear localization of p49-truncated Cdc6 and apoptosis. *Mol. Biol. Cell.*, 2003, 14:4250-4259.

Yim, H., I. S. Hwang, J-S. Choi, K-H. Chun, Y. H. Jin, Y-M Ham, K. Y. Lee, and S. K. Lee. Cleavage of Cdc6 by caspase-3 promotes ATM/ATR kinase-mediated apoptosis of HeLa cells. *J. Cell Biol.*, 2006, 174: 77-88.

Yin X-M, Wang K, Gross A, et al. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*, 1999, 400: 886–891.

Yinjun L, Jie J, Weilai X, Xiangming T. Homoharringtonine mediates myeloid cell apoptosis via upregulation of pro-apoptotic bax and inducing caspase-3-mediated cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP). *Am. J. Hematol.*, 2004, 76:199-204.

Yu SW, Wang H, Dawson TM, Dawson VL. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity. *Neurobiol. Dis.*, 2003, 14: 303-317.

Z

Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernster L, Davies KJ. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265:16330–16336.

Zhou D, Brown SA, Yu T, Chen G, Barve S, Kang BC, Thompson JS. A high dose of ionizing radiation induces tissue-specific activation of nuclear factor- κ B in vivo. *Radiat. Res.*, 1999, 151: 703–709.

Zhou J., Lim C.U., Li J.J., Cai L., Zhang Y. The role of NBS1 in the modulation of PIKK family proteins ATM and ATR in the cellular response to DNA damage. *Cancer Letters*, 2006, 243: 9-15.

Zhou P., Chou, J., Olea, R. S., Yuan, J. & Wagner, G. Solution structure of Apaf-1 CARD and its interaction with caspase-9 CARD: a structural basis for specific adaptor/caspase interaction. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1999, 96: 11265–11270.

Zhou S. B-B. and Elledge S. The DNA damage response: putting check points in perspective. *Nature*, 2000, 408: 433-439.

Zoratti M, Szabo´ I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta*. 1995, 1241: 139–176.

Zou H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A. & Wang, X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 1997, 90: 405–413.

Zhu F., X. Xia, B. Liu, J. Shen, Y. Hu, M. Person, and Y. Hu. IKK α shields 14-3-3 σ , a G2/M cell cycle checkpoint gene, from hypermethylation, preventing its silencing. *Mol. Cell.*, 2007, 27:214-227.

Ανακοινώσεις-Δημοσιεύσεις

1. **A. Sfikas**, E.Tselikou, C. Batsi, D.Galaris, P.Kanavaros, E. kolettas. "The role of NF-κB in oxidative stress". 30th Scientific conference of Hellenic Association for Biological Sciences, Thessaloniki, Greece 2008 Meeting, Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, Athens, Greece, 2008.
2. **A. Sfikas**, E. Tselikou, C. Batsi, G. Vartholomatos, D. Galaris, P. Kanavaros, E. Kolettas. "The role of NF-κB in the apoptosis induced by oxidative stress". 6th Hellenic Conference of Free Radicals and Oxidative Stress, Pramanta Ioannina, Greece, 2008
3. **A. Sfikas**, V. Galani, G. Chondrogiannis, M. Kastamoulas, G. Vartholomatos, M. Bai, T.Markopoulou, E. Kolettas, P.Kanavaros "TNF-α effect on the cell death of the A549 lung carcinoma cells" Histopathology Vol. 53, Sp.Issue 1, 303-304, 2008
4. V. Galani, M. Kastamoulas, G. Chondrogiannis, **A. Sfikas** G. Vartholomatos, T.Markopoulou, E. Kolettas, P.Kanavaros " Cytokine effects on the cell death of the A549 carcinoma cells". European Respiratory Society Annual Congress, September, Vienna, Austria, 2009

5. V. Galani, M. Kastamoulas, G. Chondrogiannis, **A. Sfikas** G. Vartholomatos, T.Markopoulou, D. Arvanitis, E. Kolettas, P.Kanavaros
“ TNF-alpha, IL1beta, IL13 and IFNgamma effects on the cell death of the A549 lung carcinoma cells” 34th FEBS Congress, July 4-9, Prague, Czech Republic, 2009

6. E. Tselikou, **A. Sfikas**, C. Batsi, G. Vartholomatos, D. Galaris, P. Kanavaros, E. Kolettas. “The proteinic kinase PIM-2 protects human fibroblasts from apoptosis induced from Hydrogen Peroxide (H₂O₂)” 6th Hellenic Conference of Free Radicals and Oxidative Stress, Pramanta Ioannina, Greece, 2008