



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ & ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

«Μελέτη του ρόλου της Pim-2 στην απόπτωση κυττάρων που εκτίθενται σε παράγοντες επαγωγής οξειδωτικού στρες και σε κυτταροκίνες».

**Ευαγγελία Τσελίκου
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2009**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ & ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

«Μελέτη του ρόλου της Pim-2 στην απόπτωση κυττάρων που εκτίθενται σε παράγοντες επαγωγής οξειδωτικού στρες και σε κυτταροκίνες».

**Ευαγγελία Τσελίκου
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2009**

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

Ημερομηνία αίτησης της κ. Τσελίκου Ευαγγελίας: 11-1-2006

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 575^α/28-2-2006

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

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

Μέλη

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

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

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 8-3-2006

«Μελέτη του ρόλου του Pim-2 στην απόπτωση κυττάρων που εκτίθενται σε παράγοντες επαγωγής οξειδωτικού στρες και σε κυτταροκίνες»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 668^α/13-10-2009

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-Ιστολογίας-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 16-10-2009

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Γουδέβενος Ιωάννης

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας

Η Γραμματέας της Σχολής

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΦΕΝΙΖΟΥΡΗ-ΖΩΗ



**Στους Γονείς μου,
Ανθούλα και Γιώργο**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή, εκπονήθηκε στη μονάδα Κυτταρικής και Μοριακής Φυσιολογίας του εργαστηρίου Φυσιολογίας, της Ιατρικής Σχολής του πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου, τον Επίκουρο καθηγητή κ. Κωλέττα Ευάγγελο για τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη συγκεκριμένη εργασία, για τον τρόπο που μου έμαθε να προσεγγίζω επιστημονικά ζητήματα καθώς και για τις εποικοδομητικές και χρήσιμες συμβουλές του. Η επιστημονική υποστήριξη και καθοδήγησή του ήταν σημαντική καθ' όλη της διάρκειας της διατριβής μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, κ. Γαλάρη Δημήτριο, Καθηγητή Βιολογικής Χημείας και κ. Καναβάρο Παναγιώτη, Καθηγητή Ανατομίας και Ιστολογίας-Εμβρυολογίας.

Απευθύνω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, Άγγελο Ευαγγέλου Καθηγητή Φυσιολογίας, Βασιλική Καλφακάκου Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Μαίρη Μπάη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας και Βασιλική Γαλάνη Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας, Ιστολογίας και Εμβρυολογίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Βαρθολομάτο Γεώργιο για την πολύτιμη βοήθεια του όσον αφορά τη διεξαγωγή των πειραμάτων της κυτταρομετρίας ροής στο Αιματολογικό Εργαστήριο-Μονάδα Μοριακής Βιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Θα ήταν μεγάλη παράλειψη, να μην ευχαριστήσω όλα τα μέλη ΔΕΠ και ΕΤΕΠ του εργαστηρίου Φυσιολογίας.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους διδάκτορες και μέλη της ομάδας, Μπάτση Χριστίνα και Σφήκα Αλέξανδρο για την άριστη συνεργασία και βοήθεια τους.

Κλείνοντας, θα ήθελα ολόψυχα να πω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου για την πολύπλευρη υποστήριξή της καθ' όλη την πορεία των σπουδών μου καθώς επίσης την ξαδέρφη μου Χριστίνα, τον φίλο μου Μάνο και τους στενούς μου φίλους μου Γιωτίνα, Άννα, Δημήτρη και Μιχαέλα για την αγάπη και τη συμπαράσταση τους.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή χρηματοδοτήθηκε από το Πρόγραμμα Ενίσχυσης Ερευνητικού Δυναμικού ΠΕΝΕΔ 2003 (Κωδικός έργου : 03ΕΔ478:Μέτρο/Δράση: 8.3.1).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ-ΕΙΣΑΓΩΓΗ		
1.1.	Προοίμιο	1
2.1.	Η οικογένεια των πρωτεϊνικών κινάσων Pim	2
2.1.1.	Ο ρόλος των Pim κινασών στην καρκινογένεση	2
2.1.2.	Ο ρόλος των κινασών Pim στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό	4
2.1.3.	Ο ρόλος των κινασών Pim στη ρύθμιση της απόπτωσης	5
2.1.4.	Pim-2 και Akt	9
3.1.	Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου	10
3.1.1.	Φάση G1 του κυτταρικού κύκλου	11
3.1.2.	Μετάβαση από τη G1 στη φάση S (G1-S transition)	11
3.1.3.	Συγκρότηση του συμπλόκου προ-έναρξης της αντιγραφής του DNA	12
3.1.4.	Ρύθμιση της μετάβασης G1-S	13
3.1.5.	Φάση S (ή συνθετική φάση)	14
3.1.6.	Φάση G2	14
3.1.7.	Φάση M(ή Μιτωτική φάση ή Μίτωση)	15
4.1.	Απόπτωση	16
4.1.1.	Η εξωγενής πορεία της απόπτωσης ή πορεία μέσω υποδοχέων θανάτου	18
4.1.2.	Η ενδογενής πορεία ή μιτοχονδριακή πορεία της απόπτωσης	19
4.1.3.	Η λειτουργία της p53 στον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση	20
5.1.	Απόπτωση επαγόμενη από οξειδωτικό στρες	21
5.1.1.	Οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες στο κύτταρο	22
5.1.2.	Απόπτωση επαγόμενη από H ₂ O ₂	24
6.1.	hTERT	26
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ		
		27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ-ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ		
1.2.	Υλικά	28
2.2.	Βακτηριακές τεχνικές	29
2.2.1.	Παρασκευή L-Broth (Luria-Bertani; LB) και τρυβλίων με L-άγαρ (L-agar)	29
2.2.2.	Παρασκευή βακτηρίων επιδεκτικών προς μετασχηματισμό (competent cells)	30
2.2.3.	Μετασχηματισμός βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA	31
2.2.4.	Ανάπτυξη υγρών καλλιέργειών βακτηρίων	32
2.2.5.	Παρασκευή βακτηριακών αποθεμάτων γλυκερόλης	32
2.2.6.	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρούς όγκους (mini prep)	32
2.2.7.	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλους όγκους (maxi prep)	33
3.2.	Κυτταρική καλλιέργεια	35
3.2.1.	Κυτταρικές σειρές και καλλιέργεια	35
3.2.2.	Ανακαλλιέργεια κυττάρων	36
3.2.3.	Ανάπτυξη, διατήρηση και αποθήκευση κυτταρικών σειρών	37
3.2.4.	Διατήρηση των κυττάρων-Πάγωμα κυττάρων	37
3.2.5.	Ανασύσταση κυττάρων-Ξεπάγωμα κυττάρων	38

3.2.6.	Καταμέτρηση κυττάρων με το αιμοκυτταρόμετρο	38
3.2.7.	Προσδιορισμός του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής	39
3.2.8.	Χορήγηση υπεροξειδίου του υδρογόνου (H ₂ O ₂)	40
3.2.9.	Προσδιορισμός των ενδογενών επιπέδων ΔΜΟ σε κύτταρα A549 και MRC-5 TERT	40
4.2.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	41
4.2.1.	Απομόνωση χαμηλού μοριακού βάρους γενωμικού DNA	41
4.2.2.	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτική αгарόζη	42
5.2.	ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	43
5.2.1.	Κοπή πλασμιδίων με περιοριστικά ένζυμα	43
6.2.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	44
6.2.1.	Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων για την ανάλυση πρωτεϊνών	44
6.2.2.	Απομόνωση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων	45
6.2.3.	Απομόνωση 'καθαρών' πυρήνων	46
6.2.4.	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	47
6.2.5.	Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσο-αποτύπωμα κατά western (western blot)	49
7.2.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ	52
7.2.1.	Ρετροϊκοί φορείς (Retroviral vectors)	52
7.2.2.	Κατασκευή κυτταρικών σειρών που εκφράζανε τα επιθυμητά γονίδια	56
7.2.3.	Παραγωγή ρετροϊών με διαμόλυνση DNA	56
7.2.4.	Κυτταρικοί πληθυσμοί ινοβλαστών και καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων που κατασκευάστηκαν ώστε να εκφράζουν το γονίδιο Pim-2	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		
	I. Οι επιδράσεις της πρωτεϊνικής κινάσης Pim-2 στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου	60
1.3.	Κατασκευή και χαρακτηρισμός της έκφρασης της Pim-2 στα κύτταρα MRC-5 TERT και A549	61
2.3.	Ενισχυμένη έκφραση της Pim-2 επάγει τη συσσώρευση των MRC-5 TERT αλλά όχι των A549 στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου	64
3.3.	Η Pim-2 επιβράδυνε την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου μέσω του άξονα p53-p21 ^{Cip1/Waf1}	67
	II. Οι επιδράσεις της Pim-2 στην απόπτωση ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες	75
4.3.	Αποκρίσεις των ινοβλαστών MRC-5 TERT στο H ₂ O ₂	76
5.3.	Το H ₂ O ₂ επήγαγε τη συσσώρευση ενδογενών επιπέδων δραστικών μορφών οξυγόνου και την έκφραση της Pim-2 στα κύτταρα MRC-5 TERT και A549	78
6.3.	Η ενισχυμένη έκφραση της Pim-2 επήγαγε τη συσσώρευση των κυττάρων στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου	80
7.3.	Η Pim-2 επέφερε προστασία στα κύτταρα MRC-5 TERT και A549 από την επαγόμενη από το H ₂ O ₂ απόπτωση	88
8.3.	Η κυτταροκίνη TNF-α δεν επήγαγε απόπτωση στα κύτταρα A549	90
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	92
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	104
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ	105
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ	107
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	109
	ΕΙΚΟΝΕΣ-ΣΧΗΜΑΤΑ-ΠΙΝΑΚΕΣ	121

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Προοίμιο

Οι μηχανισμοί ρύθμισης του κυτταρικού θανάτου παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση με τους μηχανισμούς ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Η ακριβής ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου είναι κρίσιμης σημασίας σε όλα τα στάδια της ζωής των πολυκυττάρων οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων της αναπτυξιακής διαδικασίας της μορφογένεσης-οργανογένεσης και της ενήλικης ζωής και αφορά κυρίως στην χρονική ρύθμιση (timing) της αναπαραγωγής του DNA και της μιτωτικής διαδικασίας μέσω σύνθετων κυτταρικών σηματοδοτικών οδών που κατά κύριο λόγο ενορχηστρώνονται από την δράση ενός μικρού αριθμού ετεροδιμερών πρωτεϊνικών κινασών, των κυκλινών. Η διαταραχή του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου εμπλέκεται στην παθογένεια του καρκίνου καθώς επίσης και στην παθοφυσιολογία μιας σειράς άλλων νόσων.

Η φυσιολογική ανάπτυξη κάθε πολυκύτταρου οργανισμού εξαρτάται από τον προγραμματισμένο θάνατο επιλεγμένων κυττάρων. Η απόπτωση αποτελεί ένα ενδογενές πρόγραμμα κυτταρικής αυτοκτονίας απαραίτητο για την εξάλειψη ανεπιθύμητων κυττάρων και για τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών. Η ρύθμισή της είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και πλήθος γονιδίων συμμετέχουν σε αυτή.

Μεταξύ των γονιδίων που ελέγχουν τόσο τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όσο και την απόπτωση είναι η πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης Pim-2. Η οικογένεια των κινασών Pim αποτελείται από 3 μέλη, την Pim-1, Pim-2 και Pim-3. Μελέτες που έχουν γίνει έχουν δείξει ότι εμφανίζουν υψηλή έκφραση σε λεμφώματα (Yoshida et al., 1999), λευχαιμία (Amson et al., 1989; Cohen et al., 2004), σε πολλαπλά μυελώματα (Claudio et al., 2002), σε καρκίνο του προστάτη, του παγκρέατος και του παχέος εντέρου (Dhanasekaran et al., 2001; Neill and Kelsell 2001; Li et al., 2006;

Porivanova et al., 2007) υποδηλώνοντας έτσι τον συμβάλλοντα ρόλο τους στην ανθρώπινη παθογένεση.

2.1. Η οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών Pim

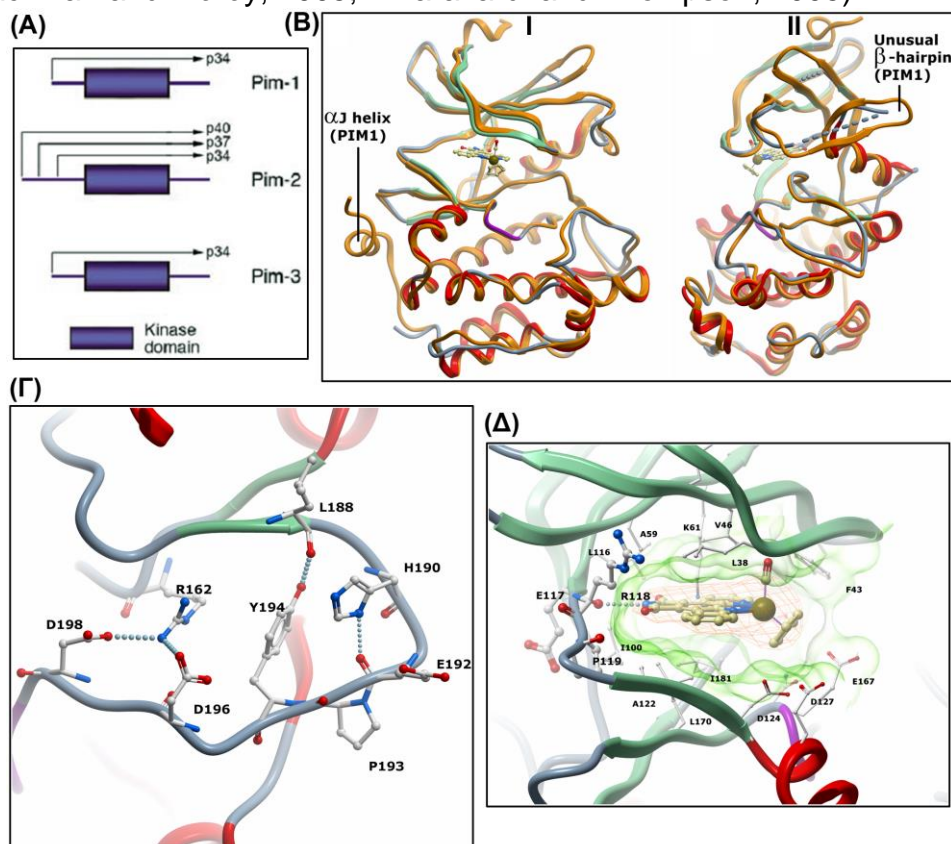
Η οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης Pim ανήκουν στην οικογένεια των εξαρτώμενων κινασών από καλμοδουλίνη-CAMK (Manning et al., 2002; Shimizu et al., 2004; Bachmann and Moroy 2005) και αποτελούνται από 3 μέλη (White et al., 2003) την Pim-1 (Selten et al., 1986), την Pim-2 (van der Lugt et al., 1995) και την Pim-3 (Feldman et al., 1998). Οι κινάσες της οικογένειας Pim εμφανίζουν μεγάλη ομολογία (Εικόνα 1.1.) και φέρουν μια αλληλουχία με μια περιοχή άρθρωσης αλλά διαφέρουν ως προς την ιστο-ειδική έκφραση τους (Eichmann et al., 2000). Κάθε ένα μέλος της οικογένειας ταυτοποιήθηκε λόγω της εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης του ιού των τρωκτικών MuMoLV εγγύς των γονιδίων Pim με αποτέλεσμα την λεμφωμαγένεση (Breuer et al., 1989; van der Lugt et al. 1995; Allen and Berns, 1996; Allen et al. 1997; Mikkers et al., 2002). Η Pim-3 θεωρείται ότι έχει επικαλυπτόμενες λειτουργίες με τις Pim-1 και Pim-2 (White et al., 2003; Amaravadi and Thompson, 2005).

2.1.1. Ο ρόλος των κινασών Pim στην καρκινογένεση

Αυξημένη έκφραση των κινασών Pim ανιχνεύθηκε σε λεμφώματα (Allen et al., 1996; Wang et al., 2001; Yoshida et al., 1999), λευχαιμία (Amson et al., 1989; Cohen et al., 2004), σε πολλαπλά μυελώματα (Claudio et al., 2002), σε καρκίνο του προστάτη, του παγκρέατος και του παχέος εντέρου (Dhanasekaran et al., 2001; Neill and Kelsell 2001; Li et al., 2006; Porivanova et al., 2007) υποδηλώνοντας έτσι τη συμβολή τους στην ανθρώπινη παθογένεση.

Επιπρόσθετα με τη συμβολή των κινασών Pim στην πρόοδο λευχαιμιών, λεμφωμάτων και συμπαγών όγκων, η Pim-1 και η Pim-2 είναι γνωστό ότι αποκρίνονται στην επίδραση κυτταροκινών και σε αυξητικούς παραγόντες σε ένα μεγάλο αριθμό ιστών. Σε αντίθεση με άλλες κινάσες σερίνης/θρεονίνης, οι κινάσες Pim ρυθμίζονται μέσω μεταγραφής και όχι μέσω φωσφορυλίωσης (Lilly et al., 1992). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι κινάσες Pim παίζουν σημαντικό ρόλο στον

κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική επιβίωση και τη διαφοροποίηση (White, 2003; Backman and Möröy, 2005; Amaravardi and Thompson, 2005).



Εικόνα 1.1. Δομή της κινάσης σερίνης/θρεονίνης Pim-2 και σύγκριση με τα άλλα μέλη της οικογένειας Pim-1 και Pim-3.

(Α) Δομή των κινασών *Pim*. Οι δομές των ανθρώπινων κινασών *Pim*: *Pim*-1, *Pim*-2, και *Pim*-3 απεικονίζουν μια διατηρημένη περιοχή που φέρει ενεργότητα κινάσης (kinase domain) χωρίς να φέρουν μια ρυθμιστική περιοχή (regulatory domain). Επίσης δεν υπάρχουν θέσεις φωσφορυλίωσης για την ενεργοποίηση των κινασών *Pim*. Εναλλακτικά εναρκτήρια κωδικόνια απεικονίζονται για την *Pim*-2 τα οποία παράγουν πολλαπλές ισομορφές της *Pim*-2 [*Pim*-2S (p34), *Pim*-2M (p37) και *Pim*-2L (p40)], οι οποίες διατηρούν την ενεργότητα κινάσης. **(Β)** Δομή της *Pim*-2 και σύγκριση με την *Pim*-1. Συνολικά η δομή της *Pim*-2 είναι όμοια μ' αυτήν της *Pim*-1 με την οποία εμφανίζουν 55% ομολογία. Η *Pim*-2 δείχνει μια δίλοβη αρχιτεκτονική τυπικής κινάσης με ιδιοστατικά ενεργό διαμόρφωση. Η αλληλοεπικάλυψη των δύο πρωτεϊνών *Pim*-1 και *Pim*-2 (απεικονίζεται σε μορφή ταινίας) δείχνει την καλά διατηρημένη περιοχή της κινάσης. **(Ι)** Η *Pim*-1 (πορτοκαλί) περιέχει ένα C-τελικό αJ-έλικα η οποία είναι απύσχα από την *Pim*-2 (πράσινη για τη β-άλυσσο και κόκκινη για την α-έλικα), και αυτή είναι η σημαντικότερη διαφορά μεταξύ των δύο κινασών. **(ΙΙ)** Η δομή περιστράφηκε 90° για να αναδειχθεί ο ασυνήθιστος β-βρόγχος στο N-λοβό της κινάσης, ο οποίος είναι μερικώς αποδιοργανωμένος στην *Pim*-2. **(Γ)** Δομή του βρόγχου ενεργοποίησης της *Pim*-2. Απεικονίζονται τα κατάλοιπα υπό μορφή ράβδου που σταθεροποιούν με δεσμούς υδρογόνου την ιδιοστατικά ενεργό διαμόρφωση της *Pim*-2. **(Δ)** Θέση δέσμευσης της ATP και η αλληλεπίδραση της με έναν αναστολέα. Η επιφάνεια της ATP απεικονίζεται με διάφανο πράσινο χρώμα, ενώ του αναστολέα με πορτοκαλί χρώμα (Amaravadi and Thompson, 2005; Bullock et al., 2009).

2.1.2. Ο ρόλος των κινασών Pim στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Μελέτες έχουν δείξει ότι σε φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών Pim-1 και Pim-2 ρυθμίζονται με την προσθήκη κυτταροκινών, όπως ιντερλευκίνη-3 και ιντερλευκίνη-7 (Lilly et al., 1992). Επιπλέον, ο παράγοντας νέκρωσης-α (TNF-α) και προσδέματα σε υποδοχείς όπως οι Toll φαίνεται ότι επάγουν την έκφραση της Pim-1 (Saito et al., 1992; Isibashi et al., 2001; Xu et al., 2002). Ποντίκια τα οποία εμφανίζουν έλλειψη και στις τρεις κινάσες Pim αυξάνονται φυσιολογικά αλλά έχουν μικρότερο μέγεθος σε σύγκριση με αυτά του αγρίου τύπου και έχουν ελαττωμένες αποκρίσεις σε συγκεκριμένους αιμοποιητικούς αυξητικούς παράγοντες (Mikkers et al., 2004).

Ωστόσο, οι επιδράσεις της Pim-2 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό δεν περιορίζονται μόνο σε κυτταρικές σειρές του αιμοποιητικού συστήματος. Αυξημένα επίπεδα της Pim-2 ανιχνεύθηκαν στον καρκίνο του προστάτη και προτάθηκε ότι ίσως διευκολύνει την περινευρική διήθηση, ένα κοινό παθολογικό εύρημα του καρκίνου του προστάτη (Dai et al., 2005). Το επιβιωτικό πλεονέκτημα των καρκινικών κυττάρων στο περινευρικό τμήμα φαίνεται να ρυθμίζεται κατά ένα μέρος μέσω της πορείας ενεργοποίησης του NF-κΒ (Ayala et al., 2004) και μέσω αυξορρύθμισης της έκφρασης της Pim-2, στα καρκινικά κύτταρα που σχετίζονται με την PNI. Επιπλέον, αυτές οι μελέτες παρείχαν επίσης δεδομένα για τη διαφοροποιημένη ενδοκυττάρια κατανομή της Pim-2 σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα του προστάτη (Dai et al., 2005a). Επιπρόσθετα, η χρήση αντι-νοηματικών ολιγονουκλεοτίδων ενάντια στην Pim-2 ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μείωσε την κυτταρική επιβίωση χωρίς ένδειξη της απόπτωσης των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του προστάτη DU-145 (Dai et al., 2005b). Υπερέκφραση της Pim-2 σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του προστάτη PC3 ενίσχυσε την αύξηση του όγκου σε ανοσοσυμβατά ποντίκια φωσφορυλιώνοντας την 4E-BP1 και αυξάνοντας τη σταθερότητα του c-Myc (Chen et al., 2005).

Η έκτοπη έκφραση της Pim-2 σε αθανатоποιημένα ανθρώπινα κύτταρα ήπατος L02 συνέβαλε στη διατήρηση των κυττάρων απουσία IL-3 από το θρεπτικό μέσω της φωσφορυλίωσης της Bad και του 4E-BP1. Ενώ απάλειψη της Pim-2 σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ήπατος HepG2 κύτταρα είχε σαν αποτέλεσμα την απώλεια της ικανότητας τους να επιβιώσουν απουσία IL-3 (Gong et al., 2009).

Έχει δειχθεί ότι η Pim-2 έχει επιπλέον επιδράσεις στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη συμπεριφορά μεσεγχυματικών κυττάρων (Bohensky et al., 2007; Hogan et al., 2008). Πειράματα έδειξαν υψηλή έκφραση της Pim-2 σε χονδροκύτταρα της επίφυσης η οποία είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ανθεκτικότητας των κυττάρων από την επαγόμενη απόπτωση από τη ραπαμυκίνη. Η Pim-2 ρυθμίζει την επιβίωση των χονδροκυττάρων ως απόκριση στην αυτοφαγία μέσω φωσφορυλίωσης της Bad, προτείνοντας έτσι ότι η Pim-2 ίσως διατηρεί την επιβίωση των τελικών διαφοροποιημένων χονδροκυττάρων (Bohensky et al., 2007).

Πειράματα έχουν δείξει ότι τα ενδογενή επίπεδα των Pim-1 και Pim-2 αλληλεπιδρούν και φωσφορυλιώνουν την ενδογενή Mdm2 σε καλλιιεργημένες κυτταρικές σειρές, αυξάνοντας έτσι την ικανότητα της Mdm2 να αλληλεπιδράσει με τον αναστολέα της ARF. Επιπλέον, η Pim-1 και η Pim-2 παρεμπόδισαν την αποικοδόμηση της p53 και Mdm2 κατά ένα τρόπο ανεξάρτητο από τη φωσφορυλίωση της Mdm2, οδηγώντας στην αύξηση των επιπέδων έκφρασης της p53. Υπερέκφραση της Pim-1 σε κύτταρα MEFs επήγαγε τα ενδογενή επίπεδα της ARF, p53, Mdm2 και p21 και διέγειρε τα επίπεδα της SA-β-γαλακτοσιδάσης, που συσχετίζονται με την έναρξη της κυτταρική γήρανσης. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η Pim-1 αλληλεπιδράσε μέσω της πορείας της p53 αλλά όταν εκφράζεται σε παθολογικό επίπεδο, δρα ως ένα κλασικό κυρίαρχο ογκογονίδιο προάγοντας την επιβίωση ως απόκριση στην πορεία επαγωγής της p53 (Hogan et al., 2008).

Πολύ λίγες μελέτες για την Pim-3 αναφέρουν τη συμβολή της στην ανάπτυξη καρκινώματος στο ήπαρ. Η απουσία της είχε σαν αποτέλεσμα την απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την ενίσχυση της απόπτωσης. Επομένως, η παρουσία της Pim-3 συμβάλλει στον αυτόνομο κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή την παρεμπόδιση της απόπτωσης σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα (Cohen et al., 2004).

2.1.3. Ο ρόλος των κινασών Pim στη ρύθμιση της απόπτωσης

Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Pim-2 καθώς επίσης και η ενεργότητα του ενζύμου καταστέλλονται δραματικά με την αφαίρεση της IL-3 από λεμφοκύτταρα των οποίων η αύξηση και η επιβίωση εξαρτώνται από την παρουσία της IL-3 και όπως έδειξαν πειράματα στις κυτταρικές σειρές FL5.12 και FDCP1, η Pim-2 ανέστειλε την

απόπτωση η οποία επάγεται φυσιολογικά λόγω έλλειψης IL-3 (Fox et al., 2003; Yan et al., 2003). Επιπλέον, Pim-2 knock-down πειράματα ή υπερέκφραση μιας κυρίαρχης αρνητικής μορφής της Pim-2, απέτρεψαν την αποτελεσματική επιβίωση από IL-3 ενισχύοντας το ρόλο της Pim-2 ως μεσολαβητή της παρεμπόδισης της απόπτωσης από IL-3 (White, 2003; Fox et al., 2003; Yan et al., 2003).

Η αυξημένη επιβίωση λόγω υπερέκφρασης της Pim-2 συσχετίζεται με την ικανότητα της να διατηρεί την ανθεκτικότητα των κυττάρων στη ραπαμυκίνη μέσω φωσφορυλίωσης του μεταφραστικού αναστολέα 4E-BP1 προκαλώντας την αποδέσμευση του από την eIF-4E και τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Bad (Fox et al., 2003; Yan et al., 2003; Fox et al., 2005; MacDonald et al., 2006). Άλλα υποστρώματα φωσφορυλίωσης που έχουν αναφερθεί είναι η HP-1 (Koike et al., 2000), η φωσφατάση Cdc25A (Mochizuki et al., 1999) και η SOCS-1 (Chen et al., 2002).

Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι οι κινάσες Pim προάγουν την επιβίωση των T-λεμφοκυττάρων κυττάρων από τη ραπαμυκίνη. Τα T-λεμφοκύτταρα Pim1^{-/-}Pim2^{-/-} από διαγονιδιακά ποντίκια παρουσίασαν μια ευαισθησία στην ανοσο-κατασταλτική ραπαμυκίνη. Η επαγόμενη έκφραση των ενδογενών επιπέδων των Pim-1 και Pim-2 από κυτταροκίνες προήγαγε την κυτταρική επιβίωση των λεμφοκυττάρων από τη ραπαμυκίνη και συνέβαλλε στην αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Fox et al., 2005). Η έκτοπη έκφραση της Pim-2 σε κύτταρα επαρκή σε κινάσες Pim είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του κυτταρικού μεγέθους και την ανθεκτικότητα στην απόπτωση που προκαλείται από τη ραπαμυκίνη (Hammerman et al., 2005). Σε διαγονιδιακά ποντίκια η Pim-2 εμφανίζει χαμηλό ογκογενικότητα αλλά επαυξάνει πιο τη λεμφωμαγένεση μετά από ιική επιμόλυνση ή έκθεση σε χημικούς καρκινογόνους παράγοντες (Mikkers et al., 2002). Μελέτες έχουν αποδείξει ότι η Pim-2 έχει ένα καλά καθορισμένο ρόλο στην ογκογένεση.

Παρόλο που η Pim-2 ανακαλύφθηκε ως ογκογονίδιο που συμμετέχει στη παθογένεση λεμφωμάτων (White, 2003; Amaravardi and Thompson, 2005), η δράση της είναι ξεχωριστή από αυτή άλλων μεταγραφικών στόχων στις πορείες μεταγωγής σήματος από αυξητικούς παράγοντες. Τα περισσότερα ογκογονίδια που εμπλέκονται σε μετατροπές κακοηθειών των λεμφοκυττάρων, όπως το c-Myc, επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και είναι προ-αποπτωτικά όταν εκφράζονται από μόνα τους. Αντίθετα, η έκφραση της Pim-2 επιφέρει την ανθεκτικότητα των κυττάρων στην

απόπτωση χωρίς να προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η Pim-2 επιφέρει προστασία στα κύτταρα για ένα αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα απουσία αυξητικών παραγόντων, επιτρέποντας έτσι να φέρουν εις πέρας αναβολικές διαδικασίες όπως η γλυκόλυση, η διατήρηση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και την αποτροπή από κυτταρική ατροφία. Αυτά τα στοιχεία δείχνουν ότι η Pim-2 συμμετέχει στον αρχική ογκογόνο μετασχηματισμό ρυθμίζοντας κυρίως την κυτταρική επιβίωση παρά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αυτό, ίσως εξηγεί και το γεγονός ότι η Pim-2 συνεργεί με το ογκογονίδιο c-Myc που οδηγεί στο μετασχηματισμό λεμφωμάτων. Η μεμονωμένη έκφραση της c-Myc οδηγεί σε απορρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση, κάτι το οποίο μπορεί να κατασταλεί με την προσθήκη κυτταροκινών (Allen et al., 1997, Fox et al., 2003). Πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε ποντίκια, έχουν δείξει ότι ένα ποσοστό 10-20% που εκφράζουν μόνον την Pim-2 ή μόνον τη c-Myc εμφανίζουν λέμφωμα σε ηλικία 6 μηνών. Ενώ στα ποντίκια που εκφράζανε και τα δυο γονίδια, παρουσίασαν μια προφανή επιταχυνόμενη αύξηση λεμφωμάτων με αποτέλεσμα το θάνατο των ζώων πριν ή λίγο αμέσως μετά τη γέννηση τους από επιθετική λευχαιμία (Hammerman et al., 2004). Πρόσφατα δείχθηκε ότι η υπερέκφραση της Pim-2 σταθεροποιεί τη c-Myc μέσω φωσφορυλίωσής της στη σερίνη 328, ενισχύοντας έτσι τη μεταγραφική ενεργότητα της. Επιπλέον, η συν-έκφραση της Pim-2 και της c-Myc συνέβαλαν στον νεοπλασματικό μετασχηματισμό των κυττάρων NIH3T3 (Zhang et al., 2008).

Προηγούμενες μελέτες σε προ-B-λεμφοκύτταρα ποντικού έδειξαν ότι η Pim-2 είναι ένα γονίδιο-στόχος του NF-κB (Li et al., 2001) και ότι η ικανότητα της Pim-2 να προάγει την επιβίωση των κυττάρων εξαρτάται από την ενεργοποίηση του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (Hammerman et al., 2004). Η Pim-2 ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων-στόχων του NF-κB, επάγοντας τη φωσφορυλίωση της κινάσης σερίνης/θρεονίνης Cot, οδηγώντας στη φωσφορυλίωση της IκBα και στη μετατόπιση των ετεροδιμερών p50/p65 του NFκ-B στον πυρήνα (Hammerman et al., 2004). Η παρεμπόδιση της ενεργοποίησης του NF-κB κατέστειλε την επιβιωτική δράση της Pim-2 στις κυτταρικές σειρές. Ένας πιθανός τρόπος με τον οποίο η Pim-2 αυξάνει την ενεργοποίηση του NFκ-B είναι μέσω φωσφορυλίωσης της IκB στις σερίνες 32 και 36 με την επακόλουθη αποδόμηση της από το πρωτεόσωμα με αποτέλεσμα την απελευθέρωση και την πυρηνική μετατόπιση του NF-κB (Hammerman et al., 2004).

Επομένως, η μη κατάλληλη ενεργοποίηση της Pim-2 αποτρέπει την απόπτωση μέσω της αύξησης της ενεργότητας του NF-κB και την επαγωγή αντι-αποπτωτικών γονιδίων-στόχων (Hammermann et al., 2004), αλλά και μέσω της σταθεροποίησης της πρωτεΐνης c-Myc που υποδηλώνει με αυτό τον τρόπο ένα πιθανό μηχανισμό ενίσχυσης της επαγόμενης ογκογένεσης από το Myc (Allen et al., 1997; White, 2003; Hammerman et al., 2004; Zhang et al., 2008).

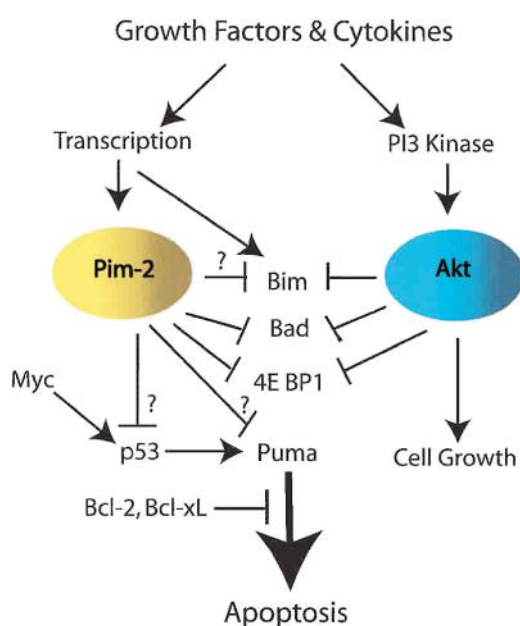
Ένας τρόπος με τον οποίο οι κυτταροκίνες μπορούν να καταστείλουν την απόπτωση είναι μέσω της μεταγραφικής επαγωγής της Pim-2. Μελέτες έδειξαν ότι η υπερέκφραση της Pim-2 επέφερε ανθεκτικότητα στην επαγόμενη απόπτωση από τη σταυροσπορίνη, ένας ευρέως φάσματος αναστολέας κινασών και τη θαψυγαργίνη, η οποία επάγει την απόπτωση αναστέλλοντας την Ca^{2+} -ATPase του ενδοπλασματικού δικτύου, σε κύτταρα HeLa καθώς επίσης και σε λεμφοκύτταρα ποντικού (Fox et al., 2003).

Από πειράματα που έχουν γίνει σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος και του παχέος εντέρου, έχειδειχθεί ότι η υπερέκφραση της Pim-3 παρεμποδίζει την απόπτωση τους διαμέσου της φωσφορυλίωσης της Bad (Li et al., 2006; Porivanova et al., 2007).

Ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους οι κυτταροκίνες ασκούν τις επιδράσεις τους είναι μέσω της ενεργοποίησης της πορείας μεταγωγής σήματος των JAK-STAT. Η πρωτεΐνη Socs-1 έχει χαρακτηριστεί ως ένας ισχυρός ανατροφοδοτικός αναστολέας της ενεργοποίησης των JAKs. Η Socs-1 δεσμεύεται στις JAKs και καταστέλλει την ενεργότητά τους. Επομένως, οι κυτταροκίνες διεγείρουν την πορεία μεταγωγής του σήματος των JAK-STAT που με τη σειρά της ενεργοποιεί τη μεταγραφή των Socs-1. Η πρωτεΐνη Socs-1 μετατοπίζεται στους υποδοχείς των κυτταροκινών και καταστέλλει την ενεργότητα των JAKs. Η Socs-1 είναι μια ασταθής πρωτεΐνη και ρυθμίζεται από την Pim-2. Η Pim-2 δεσμεύεται και φωσφορυλιώνει τη Socs-1 με αποτέλεσμα να αυξάνει τη σταθερότητα της και να επιμηκύνει την περίοδο ημι-ζωής της. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την επαύξηση της ανασταλτικής δράσης στην ενεργοποίησης των JAK-STAT και επομένως στη ρύθμιση των πορειών μεταγωγής σήματος των JAK-STAT που ενεργοποιούνται από κυτταροκίνες (Chen et al., 2002).

2.1.4. Pim-2 και Akt

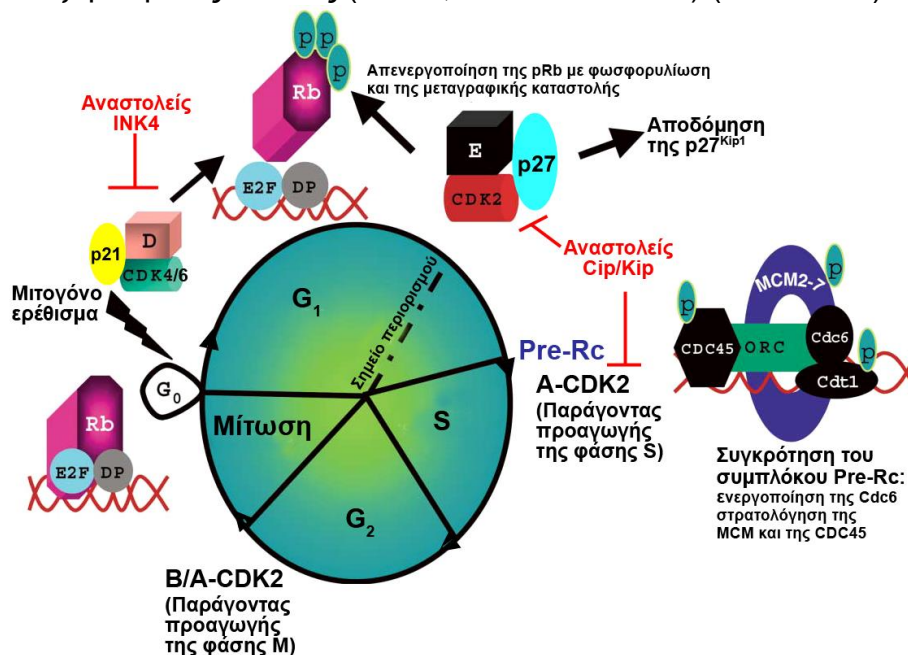
Η Pim-2 φαίνεται ότι έχει όμοιες επιδράσεις με την Akt, συμβάλλοντας στη διατήρηση του κυτταρικού μεγέθους, τη διαδικασία της γλυκόλυσης, του μιτοχονδριακού δυναμικού και στην κυτταρική επιβίωση απουσία αυξητικών παραγόντων (Εικόνα 2.1.). Ωστόσο, η Pim-2 δεν επηρεάζει τη δράση της Akt και η εξαρτώμενη επιβίωση από την Pim-2 δεν επηρεάστηκε από διάφορους αναστολείς της πορείας P13K/Akt/TOR (Fox et al., 2003; White, 2003). Η ικανότητα της Pim-2 να προάγει την κυτταρική επιβίωση φαίνεται να λειτουργεί μέσω ενός μηχανισμού διαφορετικού από αυτόν των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και της Akt. Η Pim-2 και η Akt είναι παράγοντες παράλληλων αποπτωτικών πορειών που συγκλίνουν σε ένα επικαλυπτόμενο σετ ρυθμιστικών μορίων που συμβάλλουν στην κυτταρική επιβίωση και τον έλεγχο του μεγέθους. Η έκτοπη έκφραση της Pim-2 δεν επηρεάζει την έκφραση της Akt, την φωσφορυλίωσή της ή τη λειτουργία της. Επιπλέον, η ικανότητα της Pim-2 να προάγει την κυτταρική επιβίωση - απουσία αυξητικών παραγόντων, είναι ανεξάρτητη από διάφορους ρυθμιστές της Akt, συμπεριλαμβανομένων των P13K, HSP-90 και TOR. Επομένως, η λειτουργία της Pim-2 και Akt προάγει την αυτόνομη κυτταρική επιβίωση μέσω διαφορετικών πορειών, καθένα από τα οποία διατηρεί το κυτταρικό τροπισμό απουσία αυξητικών παραγόντων.



Εικόνα 2.1. Επιβιωτικές πορείες σήματος που ελέγχονται από την Pim-2 και την Akt (White, 2003).

3.1. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Ο κυτταρικός κύκλος είναι μια σειρά σταδίων ενός ευκαρυωτικού κυττάρου μεταξύ μιας κυτταρικής διαίρεσης και της επόμενης. Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από τέσσερις χαρακτηριστικές φάσεις : τη φάση G₁, S, G₂ και τη φάση M. Τα μοριακά στάδια που ελέγχουν τον κυτταρικό είναι οργανωμένα σε μια κατεύθυνση, που σημαίνει ότι διεξάγονται διαδοχικά και είναι αδύνατον να αντιστραφεί ο κύκλος. Υπάρχουν δυο σημαντικές κατηγορίες ρυθμιστικών μορίων που καθορίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου: οι κυκλίνες (τύπου D, E, A και CDK4 και CDK6) και οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDK2, CDK4 και CDK6) (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1. Σχηματική απεικόνιση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου και τα ρυθμιστικά μόρια που ρυθμίζουν την πρόοδο του. Μιτογόνα ερεθίσματα προάγουν τη συγκρότηση ενός ενεργού τριμερούς συμπλόκου κυκλίνης D-CDK4/6-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 κυκλίνης E-CDK2 συμβάλλουν στη φωσφορυλίωση της pRb μειώνοντας την ικανότητα της να καταστείλει τα μέλη της οικογένειας του μεταγραφικού παράγοντα E2F που ενεργοποιούν γονίδια που απαιτούνται για τη μετάβαση στη φάση S. Μεταξύ των γονιδίων-στόχων των E2F είναι οι κυκλίνες E και A, που 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*.

3.1.1. Φάση G1 του κυτταρικού κύκλου

Η έναρξη της προόδου του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 ελέγχεται από τις κυκλίνες τύπου D (D1, D2, D3) και από τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες CDK4 και CDK6. Ένας σημαντικός στόχος αυτών των CDKs είναι η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος, pRb, η οποία όταν φωσφορυλιώνεται προάγει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου καθώς απελευθερώνει τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F οι οποίοι ενεργοποιούν *in trans* διάφορα γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην πρόοδο και τη ρύθμιση επακόλουθων σταδίων του κυτταρικού κύκλου. Ο σχηματισμός των συμπλόκων κυκλίνης D - Cdk4/6 προάγεται από δύο πρωτεΐνες: p21^{Cip1/Waf1} και p27^{Kip1}, ενώ η ενεργότητα των συμπλόκων δύναται να ανασταλεί από μικρές ανασταλτικές πρωτεΐνες των CDKs (ή αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών; CKIs): p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C} και p19^{INK4D}. Συγκεκριμένα, οι κυκλίνες D προσδένουν και ενεργοποιούν τη CDK4 και CDK6. Ο σχηματισμός όλων των συμπλόκων μεταξύ των κυκλινών D και των CDK4/6 προάγεται από τις πρωτεΐνες p21^{Cip1/WAF1} και p27^{Kip1}. Στη συνέχεια ενεργοποιούνται CDKs που φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη pRb με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των μεταγραφικών παραγόντων E2F (1-6), που διεγείρουν τη μετάβαση του κυττάρου από τη G1 στη φάση S (G1-S transition). Η δέσμευση και απομάκρυνση της p27^{Kip1} συμβάλλει επίσης στην ενεργοποίηση του συμπλόκου CDK2-κυκλίνη E/CDK2-κυκλίνη, ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που σχηματίζεται κατά τη μετάβαση G1-S (Sherr and Roberts, 2004; Malumbres and Barbacid, 2001; Malumbres and Barbacid, 2007).

3.1.2. Μετάβαση από τη G1 στη φάση S (G1-S transition)

Τα σύμπλοκα κυκλίνης E - CDK2 ελέγχουν τη μετάβαση από τη G1 στη φάση S. Σ' αυτή την περίπτωση η δέσμευση των p21^{Cip1/Waf1} ή p27^{Kip1} είναι ανασταλτική. Σημαντικά υποστρώματα των συμπλόκων κυκλίνης E - CDK2 είναι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην έναρξη της αντιγραφής του DNA. Οι δύο πρωτεΐνες κυκλίνης E (E1 και E2) υπόκεινται σε πρωτεόλυση που εξαρτάται από την ουβικιτίνωση τους η οποία καταλύεται από την E3 λιγάση της ουβικιτίνης, γνωστή ως SCF. Τα σύμπλοκα της κυκλίνης A - CDK2 τα οποία επίσης ρυθμίζονται από τις p21^{Cip1/Waf1} and p27^{Kip1}, είναι

επίσης σημαντικά στη σύνθεση του DNA καθώς και στην πρόοδο του κυττάρου στη φάση G2.

Η μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S ελέγχεται από τα σύμπλοκα των κυκλινών E-CDK2. Με το σχηματισμό των συμπλόκων κυκλινών E-CDK, η CDK2 φωσφορυλιώνεται από τις κινάσες Wee1 και Myt1 και απενεργοποιείται. Η αποφωσφορυλίωση της CDK2 από την Cdc25A οδηγεί στην ενεργοποίηση της CDK2, και συγχρονίζεται με το κατάλληλο κυτταρικό μέγεθος και με την κατάλληλη προετοιμασία του μηχανισμού σύνθεσης του DNA. Η CDK2 φωσφορυλιώνει με τη σειρά της συγκεκριμένες πρωτεΐνες - υποστρώματα που εκφράζονται κατά τη G1-S, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών που απαιτούνται για την έναρξη της αντιγραφής του DNA.

Οι κυκλίνες E (E1 & E2) και η CDK2 ελέγχουν τη μετάβαση από τη G1 στη φάση S. Η CDK2 είναι ικανή να καταλύσει τις απαραίτητες αντιδράσεις μόνον όταν αλληλεπιδρά με τις κυκλίνες E (E1 ή E2). Μετά το σχηματισμό τους, τα σύμπλοκα κυκλίνης E-CDK2 μετατοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου.

Κατά τη G1, η ενεργότητα των CDKs ελέγχεται από τις CKIs p27 και p21, έτσι ώστε να παρεμποδίζεται η πρόωρη είσοδος στη φάση S. Η αποτελεσματική αναγνώριση και ουβικιτίνωση της p27 από το πρωτεϊνικό σύμπλοκο SCF(Skp2) απαιτεί το σχηματισμό ενός τριμερούς πρωτεϊνικού συμπλέγματος αποτελούμενο από την p27 και κυκλίνη E/A-CDK2. Η G1 ολοκληρώνεται με το σχηματισμό του συμπλόκου προ-έναρξης της αντιγραφής του DNA (Sherr and Roberts, 2004; Malumbres and Barbacid, 2001; Malumbres and Barbacid, 2007)

3.1.3. Συγκρότηση του συμπλόκου προ-έναρξης της αντιγραφής του DNA

Η προ-έναρξη της αντιγραφής του DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα αρχίζει με το σχηματισμό του συμπλόκου προ-έναρξης της αντιγραφής (pre-initiation replication complex), pre-RC, κατά την όψιμη φάση M και συνεχίζεται στη φάση G1, μια διαδικασία που ονομάζεται αδειοδότηση της θέσης έναρξης της αντιγραφής του DNA (DNA replication origin licensing). Κατά τη φάση G1, η ενεργότητα των CDKs ελέγχεται από τις CKIs p27 και p21, παρεμποδίζοντας την πρόωρη είσοδο στη φάση S. Αυτές οι CKIs αποδομούνται στην όψιμη G1 λόγω της ουβικιτίνωσης τους με τη δράση της λιγάσης της ουβικιτίνης SCF(Skp2) και της ρυθμιστικής πρωτεΐνης Cks1.

Η αναγνώριση και η επακόλουθη αποδόμηση της p27 εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση της στη Thr187 που καταλύεται από τα σύμπλοκα κυκλινών E/A-CDK2 (και πιθανά και από τα σύμπλοκα κυκλινών A/B-CDK1. Η αποδόμηση της πολύ-ουβικιτινωμένης p27 από το πρωτεόσωμα 26S οδηγεί στην ενεργοποίηση των CDKs που προάγουν την είσοδο στη φάση S. Ο μηχανισμός αποδόμησης της p21 με τη δράση των SCF^{Skp2} είναι όμοιος μ' αυτόν της p27 και απαιτεί την παρουσία των Cks1 και CDK2-κυκλίνες E/A. Η p21 φωσφορυλιώνεται στη θέση Ser130 από τα CDK2-κυκλίνες E/A και γίνεται επίσης στόχος ουβικιτίνωσης, αν και, σε αντίθεση με την p27, η φωσφορυλίωση της p21 δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ουβικιτίνωση της, αλλά είναι λιγότερο αποτελεσματική. Η αποδόμηση των p27/p21 από το SCF(Skp2) συνεχίζει από την όψιμη G1 στη φάση M. Κατά τη G0 και την πρώιμη G1 προς τη μετάβαση G1-S, η Skp2 αποδομείται από το σύμπλοκο του APC/C και τον ενεργοποιητή του Cdh1, APC/C:Cdh1, με αποτέλεσμα να παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάβαση των φάσεων G1-S. Το APC/C-Cdh1 ενεργοποιείται στην όψιμη φάση M λόγω της αλληλεπίδρασης του με τη μη-φωσφορυλιωμένη μορφή της Cdh1. Το APC/C:Cdh1 διατηρείται ενεργό μέχρι τη μετάβαση G1-S, όπου σ' αυτό το σημείο αλληλεπιδράει με την ανασταλτική πρωτεΐνη Emi1. Η αναστολή της ενεργότητας του APC/C:Cdh1 οδηγεί στη συνάθροιση των κυκλινών που οδηγούν στη φωσφορυλίωση και την επακόλουθη αποδόμηση της Cdh1 κατά τη G1-S. Για να διατηρηθεί η το APC/C:Cdh1 ανενεργό, η Cdh1 απομακρύνεται με αυτό-ουβικιτίνωση. Κατά τη G1-S, η Skp2 συναθροίζεται λόγω της απενεργοποίησης της Cdh1, επιτρέποντας την ουβικιτίνωση των p21 και p27 με αποτέλεσμα την επαύξηση της ενεργότητας των CDK (Sherr and Roberts, 2004; Malumbres and Barbacid, 2001; Malumbres and Barbacid, 2007).

3.1.4. Ρύθμιση της μετάβασης G1-S

Μιτογόνα ερεθίσματα προάγουν τη συγκρότηση ενεργών κυκλινών D-CDKs που φέρουν είτε CDK4 ή CDK6 και μια πρωτεΐνη Cip ή Kip. Η χήλωση (απόσυρση) των πρωτεϊνών Cip/Kip χαμηλώνει την ανασταλτική ουδό τους και διευκολύνει την ενεργοποίηση του συμπλόκου κυκλίνης E-CDK2. Οι CDKs της κυκλίνης D-CDK4/6 ή κυκλίνης E-CDK2 φωσφορυλιώνουν διαδοχικά την pRb μειώνοντας την ικανότητα

αλληλεπίδρασης (δέσμευσης) της με τα μέλη των μεταγραφικών παραγόντων E2F, με αποτέλεσμα οι E2Fs να μπορούν να διεγείρουν την ενεργοποίηση γονιδίων που απαιτούνται για τη σύνθεση του DNA, όπως των κυκλινών E και A, καθώς και μια σειρά άλλων γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό νουκλεοτιδίων. Το σύμπλοκο κυκλίνης E-CDK2 ανταγωνίζεται τη δράση της p27^{Kip1} φωσφορυλιώνοντας την και διεγείροντας έτσι την αποδόμηση της. Η αποδόμηση των πρωτεϊνών Cip/Kip και η επαγωγή των κυκλινών από τους E2Fs συμβάλλουν στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ανεξάρτητης μιτογόνων ερεθισμάτων αλλά και στην μη-αναστροφή του (Sherr and Roberts, 2004; Malumbres and Barbacid, 2001; Malumbres and Barbacid, 2007).

3.1.5. Φάση S (ή συνθετική φάση)

Η σύνθεση του DNA διεξάγεται κατά τη φάση S ή τη συνθετική φάση του κυτταρικού κύκλου. Το κύτταρο αντιγράφει το DNA του και σχηματίζονται δύο αντίγραφα των χρωμοσωμάτων του. Καθώς η αντιγραφή του DNA συνεχίζεται, οι κυκλίνες E που δρουν κατά το τέλος της φάσης G1 (μετάβαση G1 – S) και την αρχή της φάσης S αποδομούνται και αυξάνονται τα επίπεδα των μιτωτικών κυκλινών A και B. Τα σύμπλοκα της κυκλίνης A-CDK2 παίζουν το σημαντικότερο ρόλο κατά την είσοδο του κυττάρου στη φάση S καθώς φωσφορυλιώνουν σημαντικές πρωτεΐνες όπως Cdh1, Rb, p21 και p27. Κατά τη G1, συντίθεται η κυκλίνη A η οποία αλληλεπιδράει με τη CDK2 στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια μετατοπίζεται στον πυρήνα. Όμως, πριν την είσοδο του κυττάρου στη φάση S, η ενεργότητα των συμπλόκων κυκλίνης A-CDK2 ρυθμίζεται αρνητικά λόγω της φωσφορυλίωσης της CDK2 στην Tyr15 και της αλληλεπίδρασης τους με τις CKIs, p27 και p21. Για την ενεργοποίηση της CDK2 απαιτείται η φωσφορυλίωση της από την CDK-ενεργοποιούσα κινάση (CDK-activating kinase) CAK.

Η είσοδος στη φάση S προάγεται από την αποφωσφορυλίωση της CDK2 και ειδικότερα την αφαίρεση της ανασταλτικής φωσφορυλίωσης Tyr15 από τη φωσφατάση Cdc25 καθώς επίσης και από την SCF^{Skp2}-διαμεσολαβούμενη αποδόμηση των p27/p21. Ενώ μέχρι σήμερα η CDK2 ήταν η κύρια CDK της

προαγωγής της εισόδου του κυττάρου στη φάση S, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι και η CDK1 είναι κατά το ίδιο τρόπο ικανή να προάγει τη φάση S και την έναρξη της αντιγραφής του DNA (Sherr and Roberts, 2004; Malumbres and Barbacid, 2001; Malumbres and Barbacid, 2007).

3.1.6. Φάση G2

Καθώς το κύτταρο βρίσκεται στη μετάβαση από τη φάση S στη G2, αυξάνουν προοδευτικά τα επίπεδα των μιτωτικών κυκλινών B και A. Κατά το τέλος της φάσης G2 συγκροτείται ένα σύμπλοκο που αναφέρεται ως *παράγοντας προαγωγής της φάσης M*, το οποίο προετοιμάζει το κύτταρο για τη μίτωση. Ο παράγοντας προαγωγής της φάσης M αποτελείται από τις μιτωτικές κυκλίνες B ή A και τη CDK1 της μιτωτικής φάσης. Η κυκλίνη A (A1 και A2) μπορεί επίσης να σχηματίσει σύμπλοκα, εκτός από την CDK2, και με τη CDK1 (Cdc2). Μαζί με τις τρεις κυκλίνες τύπου B (B1, B2, B3), η CDK1 (Cdc2) ρυθμίζει τη μετάβαση από τη φάση G2 στη μίτωση. Αυτά τα σύμπλοκα ενεργοποιούνται με την αποφωσφορυλίωση των καταλοίπων θρεονίνης-14 (T14) και τυροσίνης-15 (Y15). Τα σύμπλοκα κυκλινών A/B-CDK1(Cdc2) φωσφορυλιώνουν διάφορες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη δομή και τη λειτουργία της μιτωτικής ατράκτου, την αποδόμιση του πυρηνικού φακέλου καθώς επίσης και σε τοπολογικές μεταβολές χρωμοσωμάτων που επιτρέπουν το διαχωρισμό τους και τη συμπύκνωση τους, οι οποίες είναι απαραίτητες για το διαχωρισμό ~2 m DNA κατά τη μίτωση (Sherr and Roberts, 2004; Malumbres and Barbacid, 2001; Malumbres and Barbacid, 2007).

3.1.7. Φάση M (ή Μιτωτική φάση ή Μίτωση)

Η ικανότητα ενός κυττάρου να διαιρεθεί είναι ίσως η πιο θεμελιώδης ιδιότητα της ζωής. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαιρούνται με δύο διαδικασίες: τη μίτωση και τη μείωση. Το κύριο χαρακτηριστικό της μιτωτικής κυτταρικής διαίρεσης είναι ότι τα

θυγατρικά κύτταρα είναι πανομοιότυπα μεταξύ τους και με το προγονικό κύτταρο. Τα προγονικά και τα θυγατρικά κύτταρα είναι διπλοειδή ($2n$): υπάρχουν δύο αντίγραφα καθενός τύπου χρωμοσώματος. Η μιτωτική φάση χαρακτηρίζεται από τέσσερα στάδια: *πρόφαση, μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση*.

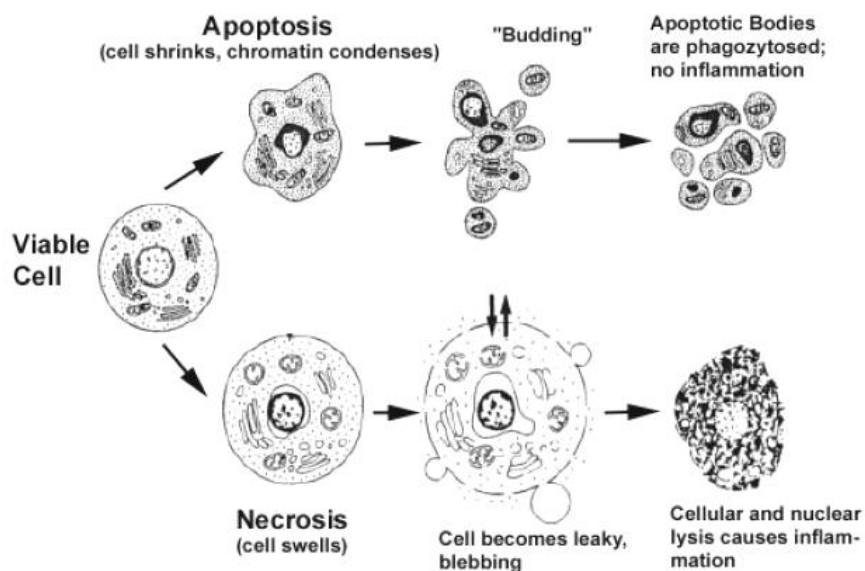
Ο παράγοντας προαγωγής της φάσης *M*, που συγκροτείται στο τέλος της φάσης G_2 , είναι υπεύθυνος για την έναρξη της συγκρότησης της μιτωτικής ατράκτου, της αποδόμησης του πυρηνικού φακέλου και της συμπύκνωσης της χρωματίνης. Αυτές οι μεταβολές οδηγούν το κύτταρο στη μετάφαση και ο παράγοντας προαγωγής της φάσης *M* ενεργοποιεί το σύμπλοκο προαγωγής της ανάφασης (Anaphase-Promoting Complex; APC), το οποίο επιτρέπει το διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων στην πλάκα μετάφασης (ή ισημερινή πλάκα) και τη μετακίνηση τους στους πόλους της ατράκτου κατά την ανάφαση, η οποία ολοκληρώνεται κατά την τελόφαση. Επίσης, το σύμπλοκο APC συμβάλλει στην αποδόμηση της κυκλίνης B από το πρωτεόσωμα, στη σύνθεση των κυκλινών της φάσης G_1 και την αποδόμηση της τζεμίνης. Με την ολοκλήρωση της τελόφασης επανασυνθέτονται οι πυρηνικές μεμβράνες γύρω από τους πυρήνες των θυγατρικών κυττάρων, εμφανίζονται οι πυρηνίσκοι και ξετυλίγονται τα χρωμοσώματα. Η μίτωση ολοκληρώνεται και αρχίζει η διαίρεση του κυτταροπλάσματος με κυττοκίνηση που οδηγεί στη δημιουργία δύο πανομοιότυπων θυγατρικών κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G_1 του κυτταρικού κύκλου (Pines and Rieder, 2001; Pines, 2006).

4.1. ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Το φαινόμενο της απόπτωσης ή ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι ένα πεδίο εκτενούς μελέτης εξαιτίας της σημαντικότητας της διατήρησης της ομοιοστατικής ισορροπίας ως απόκριση σε προ- και αντι-αποπτωτικά ερεθίσματα. Η ισορροπία ανάμεσα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον κυτταρικό θάνατο είναι απαραίτητη για την υγιή λειτουργία των οργανισμών. Η απορρύθμιση του αποπτωτικού μηχανισμού εμπλέκεται σε αυτοάνοσα νοσήματα, εκφυλιστικές διαταραχές και στον καρκίνο (Bagci et al., 2006). Μέσω της απόπτωσης καταστρέφονται τα μεταλλαγμένα κύτταρα και συνεπώς η απενεργοποίησή της είναι σημαντική για την ογκογένεση (Johnstone et al., 2002). Ένας δεύτερος τρόπος θανάτου είναι η νέκρωση, η οποία σε αντίθεση με την απόπτωση, προκαλείται από

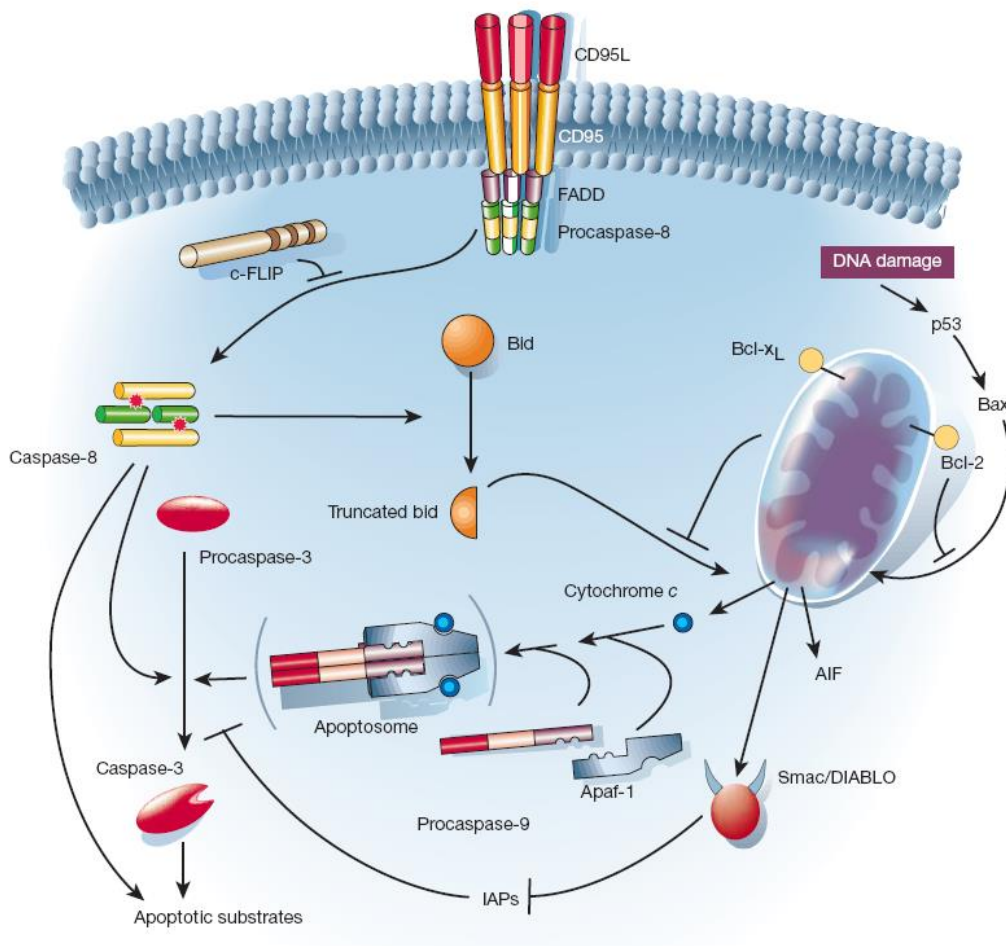
απότομες κυτταρικές βλάβες, όπως είναι η ισχαιμία, η υπερθερμία, η υποθερμία, η υποξία, ο φυσικός ή χημικός τραυματισμός (Ameisen, 1996; Zong and Thompson, 2006) (Εικόνα 4.1.).

Η απόπτωση χαρακτηρίζεται από βιοχημικές και μορφολογικές αλλαγές, όπως την ταχεία δημιουργία μαλακής προεκβολής της πλασματικής μεμβράνης χωρίς απώλεια της ακεραιότητάς της, τη διάλυση του πυρηνίσκου και του κυτταροσκελετού, την εκτεταμένη καταστροφή στη χρωματίνη, την κατάτμηση του DNA σε ολιγονουκλεοσώματα, τη συμπύκνωση του πυρήνα, την απώλεια μιτοχονδριακής λειτουργίας και τη συρρίκνωση του κυττάρου. Η διάτρηση της κυτταρική επιφάνειας έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αποπτωτικών σωματιδίων διαφόρων μεγεθών και σύστασης, τα οποία παραμένουν συνδεδεμένα με τη μεμβράνη, φαγοκυτταρώνονται από γειτονικά κύτταρα και διασπώνται από λυσοσωμικά ένζυμα.



Εικόνα 4.1. Τα στάδια και οι μορφολογικές αλλαγές κατά τη διαδικασία της απόπτωσης και της νέκρωσης (van Cruchten, 2002).

Η απόπτωση ενεργοποιείται από εξωκυττάρια σήματα θανάτου, έλλειψη επιβιωτικών σημάτων και γενετικών ή τοξικολογικών βλαβών. Ως απόκριση σε αυτά τα ερεθίσματα ενεργοποιούνται, μια ομάδα κυστεϊνικών πρωτεασών, οι οποίες υπηρετούν ως τελεστές της απόπτωσης, οι λεγόμενες κασπάσες. Υπάρχουν δυο βασικές πορείες ενεργοποίησης της απόπτωσης. Η μια είναι η εξωγενής πορεία ή η πορεία μέσω των υποδοχέων θανάτου, η οποία διαμεσολαβείται από υποδοχείς κυτταρικού θανάτου στην επιφάνεια του κυττάρου και η ενδογενής ή η μιτοχονδριακή πορεία η οποία διαμεσολαβείται από τα μιτοχόνδρια (Bagci et al. 2006) (Εικόνα 5.1.).



Εικόνα 5.1. Σχηματική απεικόνιση των δυο πορειών θανάτου των κυττάρων μέσω υποδοχέων θανάτου και μέσω του μιτοχονδρίου (Hengartner, 2000).

4.1.1. Η εξωγενής πορεία της απόπτωσης ή πορεία μέσω υποδοχέων θανάτου

Οι υποδοχείς θανάτου είναι μέλη της υπεροικογένειας των γονιδίων που κωδικοποιούν τον υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης των όγκων TNF, μέλη της οποίας είναι TNFR1, Fas/CD95, DR3, DR4, DR5 και DR6. Τα μέλη της οικογένειας αυτής χαρακτηρίζονται από την παρουσία παρόμοιων εξωκυττάριων περιοχών, που είναι πλούσιες σε κυστεΐνη και από μια ενδοκυττάρια περιοχή κυτταρικού θανάτου DD εξαιρετικά σημαντική για τη μεταγωγή του αποπτωτικού σήματος. Δέσμευση ενός προσδέματος θανάτου από έναν υποδοχέα κυτταρικού θανάτου επάγει την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Μόλις ενεργοποιηθούν οι περιοχές θανάτου των υποδοχέων στρατολογούν προσαρμοστικές πρωτεΐνες όπως η FADD για τον Fas/CD95 (Hengartner, 2000). Είναι ακόμη γνωστό ότι κάποια μόρια-προσαρμοστές περιέχουν και αυτά περιοχές θανάτου προκειμένου να μεταβιβάζουν σήματα από τους υποδοχείς θανάτου. Ο ρόλος των υποδοχέων Fas, TNFR1 και DR3 είναι να μεταβιβάζουν τα σήματα στην περιοχή θανάτου. Ο υποδοχέας Fas συνδέεται στο FADD άμεσα, ενώ οι TNFR1 και DR3 συνδέονται με αυτό έμμεσα μέσω ενός άλλου μορίου-προσαρμοστή που λέγεται TRADD. Επίσης, ο FADD περιέχει μια περιοχή θανάτου “death effector domain” (DED), που συνδέεται με ανάλογη περιοχή της προκασπάσης 8. Ύστερα από τη μετάδοση του σήματος μέσω του FADD, ο ολιγομερισμός της κασπάσης-8 που είναι γνωστή και ως FLICE, οδηγεί στην ενεργοποίησή της μέσω αυτοδιάσπασης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η κασπάση-8 να ενεργοποιεί άλλες κασπάσες-τελεστές, όπως την κασπάση-9, οδηγώντας το κύτταρο στην απόπτωση (Ashkenazi and Dixit, 1998; Jin and El-Deiry, 2005).

4.1.2. Η ενδογενής ή μιτοχονδριακή πορεία της απόπτωσης

Η μιτοχονδριακή αποπτωτική πορεία ενεργοποιείται μέσω των πρωτεϊνών της Bcl-2 οικογένειας, η οποία περιλαμβάνει τα προ-αποπτωτικά μέλη Bax, Bak και BNIP3 τα οποία βρίσκονται στο διαλυτό κυτταρόπλασμα, όπου δρουν ως ανιχνευτές κυτταρικής βλάβης ή στρες. Μετά από κυτταρικό στρες μετατίθενται στην επιφάνεια των μιτοχονδρίων όπου εντοπίζονται οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-X_L. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των προ- και αντι- αποπτωτικών πρωτεϊνών, διακόπτει την ομαλή λειτουργία των αντι-αποπτωτικών Bcl2 και μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία

πόρων στην επιφάνεια των μιτοχονδρίων και στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα, καθώς και άλλων προ-αποπτωτικών μορίων από το μεσομεμβρανικό διάστημα. Αυτό με τη σειρά του οδηγεί στη δημιουργία του αποπτωσώματος και στην ενεργοποίηση ενός καταρράκτη κασπασών.

Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-X_L δρουν παρεμποδίζοντας τη μιτοχονδριακή διαπερατότητα και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C, το οποίο απαιτείται για την ενεργοποίηση του παράγοντα APAF-1. Ειδικότερα, το κυτόχρωμα c απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα, προσδένεται στον αποπτωτικό παράγοντα Araf-1 και την προ-κασπάση 9, όπου μέσω μιας ATP-εξαρτώμενης διαμόρφωσης, ολιγομερίζεται και δημιουργείται ένα σύμπλεγμα το αποπτώσωμα το οποίο στη συνέχεια ενεργοποιεί την κασπάση 9, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την κασπάση 3 και δημιουργείται έτσι ένας αυτοενισχυόμενος κύκλος που ενισχύει την απόπτωση (Kroemer and Reed, 2000; Bagci et al., 2006).

Ένας άλλος προ-αποπτωτικός παράγοντας είναι ο Smac/Diablo ο οποίος λειτουργεί αναστέλλοντας τις IAPs που μπλοκάρουν τη δραστηριότητα των κασπασών. Όταν το σήμα που προέρχεται από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα θανάτου, δεν είναι τόσο δυνατό ώστε να προκαλέσει ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών για κυτταρικό θάνατο, τότε το σήμα ενισχύεται μέσω του αποπτωτικού μηχανισμού από τα μιτοχόνδρια. Ο σύνδεσμος μεταξύ της σηματοδοτικής ενεργοποίησης των κασπασών και των μιτοχονδρίων παρέχεται από το μέλος Bid της οικογένειας Bcl-2. Η Bid διασπάται από την κασπάση-8 σε μια truncated μορφή tBid, η οποία μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια δρώντας μαζί με τα προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 και επάγουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και άλλων μιτοχονδριακών προ-αποπτωτικών παραγόντων στο κυτταρόπλασμα (Hengartner, 2000; Tsujimoto, 2003; Adams and Cory, 2007; Chipuk and Greek, 2008).

4.1.3. Η λειτουργία της p53 στον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση

Η πρωτεΐνη p53 ανακαλύφθηκε αρχικά σε κύτταρα μετασχηματισμένα από την ιό SV40, στα οποία βρέθηκε συνδεδεμένη με το SV40 LT. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση της p53 σε μετασχηματισμένα κύτταρα ήταν πολύ μεγαλύτερη από αυτή των φυσιολογικών κυττάρων (Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine,

1979). Σε φυσιολογικά κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας η p53 είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμη. Ενεργοποιείται μόνο σε κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη ή έχουν εκτεθεί σε έντονο στρες. Τα κύτταρα αυτά πρέπει να απομονωθούν από τον υπόλοιπο πληθυσμό γιατί έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να μετατραπούν σε κακοήγη. Η p53 οδηγεί τα κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη σε παύση του κυτταρικού κύκλου μέχρι την επιδιόρθωση της βλάβης και αν αυτό δεν είναι εφικτό σε απόπτωση. Το γονίδιο p53 κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη που ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την επιδιόρθωση του DNA, την κυτταρική διαίρεση και την απόπτωση (Vogelstein et al., 2000).

Ποικίλλα ερεθίσματα πυροδοτούν την ενεργοποίηση της p53 και ανάλογα με τη φύση αυτών των σημάτων κινητοποιούνται 3 διαφορετικές πορείες. Η πρώτη από βλάβες DNA, η δεύτερη από την έκφραση ογκογονιδίων και η τρίτη από χημειοθεραπευτικά φάρμακα και την υπεριώδη ακτινοβολία (Vogelstein et al., 2000; Palmero et al., 2002; Vousden and Lu, 2005; Lu, 2005).

Η έκφραση της p53 έχει ως πρωταρχικό αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Η p53 διεγείρει την έκφραση της p21^{Cip1/Waf1} η οποία αναστέλλει τη μετάβαση G1-S και G2-M. Με παρόμοιο τρόπο διεγείρει και την έκφραση της 14-3-3σ η οποία συγκρατεί τα σύμπλοκα κυκλίνης B1-CDK1 στον πυρήνα διατηρώντας το κύτταρο στη φάση G2. Άλλοι ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου που επάγονται από την p53 είναι η GADD45a (Rich et al., 2000; Vogelstein et al., 2000).

Η αποπτωτική δράση της p53 συνδέεται άμεσα με τις ιδιότητες ενεργοποίησης γονιδίων στόχων της. Ο κύριος ρόλος της όμως είναι η ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής πορείας που επιτυγχάνεται με τη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων όπως Araf-1 και τα προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 (Yu and Zang, 2003). Η αδρανοποίηση του p53 έχει άμεση σχέση με την αδυναμία του να προκαλέσει αναστολή του κυτταρικού κύκλου ή απόπτωση.

5.1. 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 ($OH\cdot$). 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^- 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 χρόνιας φλεγμονών και διάφορες νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Droge, 2002; Ott et al., 2007).

5.1.1. 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 $[3\text{Fe}-4\text{S}]^+$, 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).

5.1.2. Απόπτωση επαγόμενη από H_2O_2

Παρότι το H_2O_2 θεωρείται ως ένα αδύναμο, σχετικά, οξειδωτικό μέσο συγκρινόμενο με άλλες ΔΜΟ, 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 εξωκυτάρια 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 ενδοκυτάρια 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).

6.1. hTERT

Τα τελομερή είναι σύμπλοκα DNA-πρωτεΐνης εντοπισμένα στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Προστατεύουν από γεγονότα που μπορούν να προκαλέσουν γενωμική αστάθεια όπως η διάβρωση των τελικών χρωμοσωμικών περιοχών, η σύντηξη μεταξύ δυο τελομερών και ο λανθασμένος ανασυνδυασμός. Το τελομεριδιακό DNA αποτελείται από εκατοντάδες αντίγραφα μικρών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών συνολικού μήκους 10-15 kb. Οι αλληλουχίες αυτές σχηματίζουν μια μοριακή κατασκευή στην οποία προσδένονται οι τελομερικές πρωτεΐνες. Το DNA των τελομερών συντίθεται από το ένζυμο τελομεράση μέσω ενός ανεξάρτητου από την κυτταρική διαίρεση μηχανισμού. Η τελομεράση είναι μια κυτταρική ριβονουκλεοπρωτεΐνη που δρα ως αντίστροφη μεταγραφάση. Η καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης στους ανθρώπους ονομάζεται hTERT (Elmore and Holt, 2000; Blackburn 2005).

Όταν τα τελομερή μειωθούν στα 4-6 br τότε τα ανθρώπινα κύτταρα εισέρχονται στη φάση της γήρανσης. Σε αυτή τη κατηγορία ανήκει και το κυτταρικό στέλεχος MRC-5 που χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα μελέτη, το οποίο είναι εμβρυικής προέλευσης και έχει φυσιολογικό δυναμικό αύξησης 55-65 πληθυσμιακούς διπλασιασμούς. Η διατήρηση του μήκους των τελομερών φαίνεται να είναι απαραίτητη για την αθανατοποίηση των ανθρώπινων κυττάρων (Weitzman and Yaniv, 1999).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση του ρόλου της πρωτεϊνικής κινάσης σερίνης/θρεονίνης Pim-2, γονίδιο-στόχος του μεταγραφικού παράγοντα NFκ-B, στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και τη στρεσο-επαγόμενη απόπτωση από το H₂O₂, ανθρώπινων τελομερισμένων ινοβλαστών και κακοήθων επιθηλιακών (καρκινικών) κυττάρων πνεύμονα.

Ως κυτταρικά μοντέλα χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινες τελομερισμένες ινοβλάστες πνεύμονα MRC5 TERT και ανθρώπινα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα A549 προκειμένου να μελετηθούν οι επιδράσεις της Pim-2 στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και στις αποκρίσεις των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες όπως αυτό που προκαλείται από το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂).

Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν σταθεροί κυτταρικοί πληθυσμοί των κυττάρων MRC5 TERT και A549 που έφεραν έναν πρότυπο φορέα ελέγχου, BIB, την αγρίου-τύπου μορφή του ανθρώπινου γονιδίου Pim-2(wt) [BIB-Pim-2(wt)] ή μια κυρίαρχη-αρνητική μορφή της, την Pim-2(DN) [BIB-Pim-2(DN)]. Στη συνέχεια μελετήθηκαν οι επιδράσεις της Pim-2 στον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση των κυττάρων παρουσία ή/και απουσία H₂O₂, με κυτταρομετρία ροής και με την ανάλυση της έκφρασης επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1-S ή/και G2-M, καθώς επίσης και της έκφρασης επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.2. ΥΛΙΚΑ

Παρατίθεται παρακάτω μια λίστα (Πίνακας 1.2) με τα σημαντικότερα αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μελέτης.

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.
Θρυπτόνη (Bacto-tryptone)	Sigma Chemical Co.
Εκχύλισμα ζύμης (Bacto-yeast extract)	Sigma Chemical Co.
Άγαρ	Sigma Chemical Co.
Διμεθυλο-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 StandardsPre-stained molecular weight markers	BIORad Laboratories, USA Fermentas
Kits απομόνωσης πλασμιδιακού DNA <ul style="list-style-type: none">Qiagen kitNucleobond kit	Qiagen, Germany Nucleobond, Germany
Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης OPTITRAN BA-S 85 Reinforced NC (Πρωτεΐνες)	Schleicher and Schnell, Bioscience
ECL kit	Amersham International
Αντισώματα	SantaCruz Biotech, USA BD Transduction Laboratories, USA Oncogene Science, DAKO

	Bioscience Systems, Calbiochem Upstate, Cell Signal
Διάφορα στερεά χημικά (MOPS, SDS, EDTA, NaCl, NaOH, Tris, βορικό οξύ, LiCl, ουρία, βρωμοφαινόλη, κρυσταλλικό ιώδες, οξικό νάτριο, γλυκίνη, βρωμιούχο αιθίδιο, φαινόλη, ακρυλαμίδιο, δις- ακρυλαμίδιο)	Riedel, Germany ή Sigma Chemical Co.
Διάφορα υγρά χημικά (Αιθανόλη, χλωροφόρμιο, ισοαμυλική αλκόλη, ισοπροπανόλη, οξικό οξύ, φορμαλδεΐδη, 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. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.2.1. 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).

2.2.2. Παρασκευή βακτηρίων επιδεκτικών προς μετασχηματισμό (competent cells)

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

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

Αρχικά, μη ικανά βακτήρια τοποθετήθηκαν σε 5 ml L- Broth και επωάστηκαν σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C για 24 ώρες ώστε να αναπτυχθούν. Την 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 A: 10 mM MOPS PH 7.0, 10 mM RbCl₂

Διάλυμα B: 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

2.2.3. Μετασχηματισμός βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA

50-100 μl ικανών βακτηριακών στελεχών *E. Coli* αναμίχθηκαν με περίπου 20 μl πλασμιδιακού DNA (100-500 ng DNA) σε σωλήνες erpendorff και αφέθηκαν στον πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια εκτέθηκαν σε θερμοκρασία 42°C για δύο λεπτά έτσι ώστε να υποστούν θερμικό στρες (heat shock) και να γίνει εισαγωγή του πλασμιδίου στα βακτηριακά κύτταρα. Προστέθηκε 1 ml L-Broth στους σωλήνες erpendorff και επωάστηκαν στους 37°C για μία ώρα. Τα βακτήρια φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στις 6500 στροφές και στους 4°C, αφαιρέθηκε το περισσότερο υπερκείμενο και το βακτηριακό ίζημα εναιωρήθηκε σε 300 μl υπερκειμένου. Τέλος με την υγρή αυτή καλλιέργεια εμβολιάσθηκαν τρυβλία L-άγαρ σύν 100 μg/ml αμπικιλλίνης με τη βοήθεια μιας ράβδου που διατηρήθηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να απορροφηθεί το εμβολίασμα. Στη

συνέχεια τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C για όλη τη νύχτα ώστε να σχηματιστούν αποικίες βακτηρίων. Να σημειωθεί ότι μετά την ολονύχτια επώαση αναπτύσσονται με τη μορφή αποικιών μόνον τα βακτήρια στα οποία έχει εισέλθει ο πλασμιδιακός φορέας, ο οποίος φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό (π.χ. αμπικιλίνη).

2.2.4. Ανάπτυξη υγρών καλλιιεργειών βακτηρίων

Για απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρούς όγκους (mini prep) ήταν απαραίτητη η ανάπτυξη υγρών καλλιιεργειών βακτηρίων. 5 ml L-Broth και 100 µg/ml αμπικιλίνης εμβολιάστηκαν με αποικίες ή αποθέματα γλυκερόλης βακτηρίων, με τη χρήση κρικοφόρου στυλεού και επώαστηκαν 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 καλλιιεργειών 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.

2.2.5. 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.

2.2.6. 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 ανάμιξη και το εναιώρημα αφέθηκε στον πάγο για 10 λεπτά (η χρήση οξικού νατρίου pH 5.2 υποβοηθεί στη καθίζηση πρωτεϊνών, RNA και χηματοσωμικού DNA). Ακολούθησε φυγοκέντρηση 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 φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 13000 στροφές στους 4°C. Το ίζημα DNA εκπλύθηκε με 70% αιθανόλη και ξηράνθηκε σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού. Το πλασμιδιακό DNA εναιωρήθηκε σε 50 μl 1xTE pH 8.0 και αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση. Ο έλεγχος του παρασκευάσματος γίνεται μετά από πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα (παρ. 2.3.3.) και ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης (παρ. 2.3.2).

Διάλυμα λύσης βακτηρίων (Bacterial lysis buffer): 50 mM Γλυκόζη, 25 mM Tris pH 8.0, 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 pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0

2.2.7. 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. 5.2.1.) και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (παρ. 4.2.2.).

3.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

3.2.1. Κυτταρικές σειρές και καλλιέργεια

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω κυτταρικές σειρές (Πίνακας 2.2):

Πίνακας 2.2. Περιγραφή κυτταρικών σειρών		
Κυτταρική Σειρά	Περιγραφή	Βιβλιογραφική αναφορά
MRC-5	Φυσιολογικό στέλεχος ανθρώπινων εμβρυϊκών ινοβλαστών πνεύμονα	Jacobs et al., 1970
MRC-5 TERT	Τελομερισμένες ινοβλάστες, κυτταρικά παράγωγα των MRC-5	Bartkova et al., 2007
IMR-90	Φυσιολογικό στέλεχος ανθρώπινων εμβρυϊκών ινοβλαστών πνεύμονα	Nichols et al., 1977
A549	Ανθρώπινα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα (πνευμονοκύτταρα τύπου-II)	American Tissue Culture Collection (ATCC)
Phoenix (ΦNX)	Αμφοτροπική κυτταρική σειρά πακεταρίσματος ρετροϊών	Αδημοσίευτη κυτταρική σειρά (ευγενική χορηγεία του Καθηγητή Κ. Β. Marcu, Stony Brook University at New York, USA)

Κύτταρα MRC-5, A549 και IMR-90 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 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. 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 55 ml ορός από έμβρυο μόσχου, 5.0 ml 10000IU/ml πενικιλίνης και 10000μg/ml στρεπτομυκίνης και 5,5 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-απεσταγμένου νερού και προέκυψαν οι εξής συγκεντρώσεις: 0.01 M ρυθμιστικού φωσφορικού άλατος, 0.0027 M χλωριούχου καλίου και χλωριούχου νατρίου σε pH 7.4. Η PBS αποστειρώθηκε στο αυτόκαυστο.

3.2.2. Ανακαλλιέργεια κυττάρων

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

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 (Ca²⁺) και μαγνησίου (Mg²⁺). Τα κύτταρα αφέθηκαν στον

επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5%CO₂ για περίπου 2-5 λεπτά, ώστε να αποκολληθούν από το τρυβλίο. Μετά προστέθηκε ο κατάλληλος όγκος PBS στα τρυβλία, ώστε να γίνουν οι επιθυμητές διαιρέσεις, συνήθως σε αναλογίες 1:2, 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.

3.2.3. Ανάπτυξη, διατήρηση και αποθήκευση κυτταρικών σειρών

3.2.4. Διατήρηση των κυττάρων - Πάγωμα κυττάρων

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

Για τη διατήρηση και τη βαθιά κατάψυξη των κυττάρων, 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-σουλφοξείδιο (DMSO) (Sigma Chemical Co.) και τα κύτταρα εναιωρήθηκαν με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης πλαστικής πιπέτας. Να σημειωθεί ότι το διμέθυλο-σουλφοξείδιο 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°C/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)

3.2.5. Ανασύσταση κυττάρων - Ξεπάγωμα κυττάρων

Οι κρυο-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 25cm² όπου προστέθηκαν σιγά σιγά 8 ml πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM. Τα κύτταρα ανακινήθηκαν ελαφρά και τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5%CO₂.

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).

3.2.6. 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, υπολογίστηκε ο μέσος όρος των κυττάρων των μετρήσεων, διαιρέθηκε δια 100 και πολλαπλασιάστηκε x 10⁶ δίνοντας έτσι το συνολικό αριθμό των κυττάρων x 10⁶ ανά ml του αρχικού εναιωρήματος κυττάρων.

3.2.7. 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.

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με θρυψινοποίηση, 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 2 ml 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: περιέχει κιτρικό νάτριο, σουκρόζη και διμέθυλο σουλφαμίδιο (DMSO) για τη συλλογή και/ή τήξη των κυτταρικών εναιωρημάτων.
- Διαλύμα A: ενζυματικός διαχωρισμός συμπαγών τμημάτων ιστού και «πέψη» κυτταρικών μεμβρανών και του κυτταροσκελετού.
- Διαλύμα B: περιέχει αναστολέα θρυψίνης και ριβονουκλεάση A σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού με τετραυδροχλωρίδιο σπερμίνης για την αναστολή της θρυψίνης και την αποδόμηση του RNA.
- Διαλύμα C: περιέχει ιωδιούχο προπίδιο και τετραυδροχλωρική σπερμιδίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού. Το ιωδιούχο προπίδιο προσδένεται στοιχειομετρικά στο DNA.

3.2.8 . Χορήγηση υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) στα κύτταρα

3x10⁶ κύτταρα MRC-5 TERT και A549 καλλιεργήθηκαν με πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και αντικαταστάθηκε με φρέσκο πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM παρουσία ή απουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂), 0 - 1000 μM για 2 ώρες στους 37°C, 5% CO₂. Μετά την επώαση των κυττάρων με το H₂O₂, το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και αντικαταστάθηκε με φρέσκο πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM απουσία H₂O₂ και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες πριν την ανάλυση με κυτταρομετρία ροής ή την απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων για την ανάλυση τους με ανοσο-αποτύπωμα κατά western.

3.2.9. Προσδιορισμός των ενδογενών επιπέδων ΔΜΟ σε κύτταρα A549 και MRC-5 TERT

Κύτταρα A549 ή MRC-5 TERT καλλιεργήθηκαν με πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM σε πολυτρυβλία 12 πηγαδιών. Μετά τη χορήγηση H₂O₂ Στη συνέχεια χορηγήθηκαν 5 μM C2935 6-carboxyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresce in diacetate, di(acetoxymethyl ester) (invitrogen probes), διαλυμένης σε DMSO και τα κύτταρα επώαστηκαν με την ουσία στους 37°C και σε 5% CO₂ για 45 min. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε η ουσία C2935 και χορηγήθηκαν στα κύτταρα αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0 - 1000μM) H₂O₂ για 2 ώρες. Στη συνέχεια επώαστηκαν για 24h απουσία H₂O₂ και την επόμενη μέρα τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν, επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα PBS, 0.1% αλβουμίνης και 1% HEPES 1 M και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα ΔΜΟ αμέσως με τη χρήση FACSCalibur με ρυθμίσεις διέγερσης και εκπομπής 488 και 525-550 nm(FL1), αντίστοιχα.

4.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

4.2.1. 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 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 erpendorff και επαναφυγοκεντρήθηκε σε μικροφυγόκεντρο στις 6500 rpm στους 4°C. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 μl ψυχρού ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης DNA (DNA lysis buffer), 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 erpendorff και επωάσθηκε διαδοχικά με 2 mg/ml RNάση A για 2 ώρες στους 37°C και με 250 μg/ml πρωτεϊνάση 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 εθίδιο σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης DNA 0.5XTBE σε τάση 70V για 3 ώρες. Το DNA ανιχνεύθηκε κάτω από λάμπα υν και φωτογραφήθηκε (παρ. 4.2.2.).

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

4.2.2. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

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

1. Για να γίνει έλεγχος των πλασμιδιακών και των ρετροϊικών φορέων έκφρασης (παρ. 2.2.3., 6.2.2.) ώστε να επιβεβαιωθεί ότι είναι οι ορθές κατασκευές και ότι περιλαμβάνουν τα επιθυμητά γονίδια μετά την απομόνωση τους από βακτηριακές καλλιέργειες.
2. Για να ελεγχθεί η τμηματοποίηση του DNA (παρ. 4.2.1). Η ηλεκτροφόρηση χαμηλού μοριακού βάρους γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε για να εκτιμηθεί ο βαθμός της απόπτωσης των κυττάρων μετά από έκθεση σε διάφορους παράγοντες σε συγκεκριμένες ποσότητες και για ορισμένα χρονικά διαστήματα.

Η ηλεκτροφόρηση του DNA γίνεται σε πηκτή 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 και πηκτές αγαρόζης 1.6% σε 0.5XTBE για την ηλεκτροφόρηση χαμηλού μοριακού βάρους γενωμικού DNA. Η στερεά αγαρόζη σε 0.5XTBE θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι βρασμού και αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία 50–56°C πριν την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/ml. Το διάλυμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και εισήχθη στο διάλυμα ένα κατάλληλο χτενάκι για τη δημιουργία επίπεδης πηκτής με υποδοχές (‘πηγαδάκια’). Μετά το πολυμερισμό της αγαρόζης και το σχηματισμό της πηκτής (gel), προστέθηκε ο απαραίτητος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος 0.5XTBE ώστε να καλυφθεί η πηκτή αγαρόζης και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις υποδοχές της πηκτής αφού αναμείχθηκαν σε αναλογία 1:10 με διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων

(sample loading buffer) για την κατακρήμνιση του DNA και την παρακολούθηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης (ολικός όγκος δειγμάτων 25 μl). Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν και μάρτυρες DNA με γνωστά, κλιμακούμενα μοριακά βάρη όπως 1 kb DNA ladder, Lambda DNA-Hind III digest και Lambda DNA-BstEII Digest (Gibco BRL Life Technologies Inc.). Μπορούν έτσι να υπολογιστούν προσεγγιστικά τα μοριακά βάρη των προς έλεγχο τμημάτων του DNA.

Η ηλεκτροφόρηση διεξήχθη σε θερμοκρασία δωματίου σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και σύνδεσης της συσκευής με τροφοδοτικό σταθερής τάσης 70-120 volt (τροφοδοτικό Consort) για 2-3 ώρες. Η πηκτή αγαρόζης παρατηρήθηκε σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας για την πρόοδο της ηλεκτροφόρησης και τον υπολογισμό του μεγέθους των τμημάτων του DNA καθώς επίσης και για φωτογράφιση. Να σημειωθεί ότι επειδή το βρωμιούχο αιθίδιο αποτελεί μεταλλαξιγόνο παράγοντα η χρήση του γίνεται σύμφωνα με τους θεσμοθετημένους κανόνες ασφαλείας και ο χειρισμός της πηκτής αγαρόζης με γάντια.

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

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

5.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

5.2.1. 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 ενδονουκλεάσες 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 ενδονουκλεάσες 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).

6.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

6.2.1. Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων για την ανάλυση πρωτεϊνών

Κυτταρικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν από τα κύτταρα MRC-5, MRC-5/TERT, MRC-5 TERT/BIB MRC5 TERT-Pim2(wt), MRC-5 TERT/Pim2(DN) και A549 BIB, A549 Pim2(wt) και A549 Pim2(DN), παρουσία/απουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων H₂O₂ σύμφωνα με προηγούμενες μεθόδους που έχουν περιγραφεί (Lane and Harlow, 1989; Sambrook et al., 1989). Τα κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες με H₂O₂ και στη συνέχεια επωάστηκαν για 24 ώρες απουσία H₂O₂. Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν την επόμενη μέρα όπως περιγράφεται παρακάτω.

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. 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 $\mu\text{g/ml}$ πεψιστατίνη (pepstatin), 1 $\mu\text{g/ml}$ λευπεψίνη (leupeptin), 1 mM PMSF και 1 mM ορθοβαναδικό άλας του νατρίου.

4ΧΔιάλυμα 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

6.2.2. Απομόνωση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων

Κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα

Κύτταρα MRC-5 που εξέφραζαν διαφορετικά γονίδια (MRC-5/TERT, MRC-5/TERT-Pim2(wt), MRC-5-TERT-Pim2(DN)) 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 μl υποτονικού διαλύματος το οποίο παρείχε 0.1% NP-40 (12 μl 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 (Batsi et al., 2009a; Batsi et al., 2009b).

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 απόμόνωσης με υψηλή συγκέντρωση άλατος το οποίο προστέθηκε σταγόνα-σταγόνα και στη συνέχεια το μίγμα ομογενοποιήθηκε με δίνη (vortex) και τοποθετήθηκαν σε πλατφόρμα ανακινήσης για 30 λεπτά στους 4°C. Οι πυρηνικές πρωτεΐνες απομονώθηκαν με φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C (Batsi et al., 2009a; Batsi et al., 2009b).

Υποτονικό διάλυμα: 10 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 5 mM KCl

Διάλυμα απόμόνωσης 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, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 1 μg/ml Pepstatin και 1 μg/ml Leupeptin

6.2.3. Απομόνωση 'καθαρών' πυρήνων

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, αφέθηκε για 5 λεπτά στον πάγο και το μίγμα ομογενοποιήθηκε με δίνη (vortex). Κατόπιν το περιεχόμενο

μεταφέρθηκε σε ένα σωλήνα eppendorff 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, αφέθηκε στον πάγο για 10 λεπτά και αποθηκεύτηκε στους -70 °C.

6.2.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

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

Η ηλεκτροφόρηση έγινε με τη μέθοδο του Laemmli (1970) σε σύστημα κάθετων γυάλινων πλακών [Lane and Harlow, 1989; Sambrook et al., 1989]. Η πηκτή αποτελείται από δύο μέρη: Από την πηκτή επιστοίβαξης με μεγάλο μέγεθος πόρων και την πηκτή διαχωρισμού με μικρότερο μέγεθος πόρων. Τα πρωτεϊνικά μόρια διαπερνούν γρήγορα την πρώτη συσσωρεύονται σε μια λεπτή στιβάδα και εισέρχονται ταυτόχρονα στη δεύτερη πηκτή όπου και γίνεται ο διαχωρισμός. Η αναλογία όγκων πηκτής διαχωρισμού: πηκτή επιστοίβαξης είναι ~5:1.

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν 10%, 12% και 15% πηκτές SDS-PAGE (πίνακας 3.2) 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 3.2. Όγκοι πηκτών επιστίβαξης (για δύο πηκτές: 10 ml)		
Διάλυμα	Όγκος (ml)	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο ddH ₂ O	6.84	
30% μίγμα ακρυλαμιδίου (29.2% ακρυλαμίδιο, 0.8% Δις-ακρυλαμίδιο)	1.7	5% w/v
1.0 M Tris pH6.8	1.25	0.125 M
10% SDS	0.1	0.1%
10% υπερθειικό αμμώνιο	0.1	0.1%
TEMED	0.01	
Τελικός όγκος (ml)	10	

Πίνακας 4.2. 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% υπερθειικό 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% υπερθειικό 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% υπερθειικό 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 πηκτική 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: μυοσίνη 199 kDa (μπλε), β-γαλακτοσιδάση 133 kDa (πορφυρό), λευκωματίνη ορού μόσχου 87 kDa (πράσινο), ανθρακική ανυδράση 40.1 kDa (βιολετί), αναστλέας θρυψίνης από σόγια 31.6 kDa (πορτοκαλί), λυσοζύμη 18.5 kDa (κόκκινο) και απροτινίνη 7.1 kDa (μπλε).

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

6.2.5. Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσο-αποτύπωμα κατά western (western blot)

Η προσπάθεια διαχωρισμού και ανίχνευσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση σε SDS-πηκτική πολυακρυλαμιδίου, μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης και ανίχνευση με τη χρήση αντισωμάτων (ανοσο-αποτύπωμα ή western blot).

Μετά την ηλεκτροφόρηση σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα Tris-γλυκίνης που περιείχε SDS, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης 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 επωάστηκαν για 3 ώρες– όλη τη νύχτα σε 5% άπαχο γάλα σκόνη ελεύθερο λιπιδίων διαλυμένο σε PBS το οποίο περιείχε 0.05% Tween-20 (5% blocking solution). Στην συνέχεια οι μεμβράνες επωάστηκαν με το πρώτο αντίσωμα 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 5.2. Κατάλογος αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν		
Αντισώματα	Εταιρεία	Κωδικός
Anti hTERT rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotech, USA	Sc-7212
Anti p53 (DO1) mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA	Sc-126
Anti Cyclin D1 mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA	Sc-20044
Anti Cyclin E mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA	Sc-25303
Anti E2F1 mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA	Sc-251
Anti p21^{Cip1/Waf1} mouse monoclonal	BD Transduction Laboratories, USA	Sc-187
Anti Cdc-6 mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA	Sc-9964
Anti p27^{Kip1} rabbit polyclonal	SantaCruz Biotech, USA	Sc-528
Anti Bcl-2 mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA	Sc-509
Anti Bax Rabbit monoclonal	Dako, USA	A3533
Anti PARP-1 mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA	Sc-8007
Anti FoxM1 goat polyclonal	SantaCruz Biotech, USA	Sc-32855
Anti Cyclin A rabbit polyclonal	SantaCruz Biotech, USA	Sc-751
Anti Cyclin B1 mouse polyclonal	SantaCruz Biotech, USA	Sc-246
Anti GADD45a rabbit polyclonal	SantaCruz Biotech, USA	Sc-797
Anti GADD153 rabbit polyclonal	SantaCruz Biotech, USA	Sc-793
Anti PCNA goat polyclonal	SantaCruz Biotech, USA	Sc-9857
Anti 14-3-3σ goat polyclonal	SantaCruz Biotech, USA	Sc-7683
Anti CDK1 mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA	Sc-8395
Anti Pim-2 goat polyclonal	ABCAM Ltd, Cambridge, UK	ab 13616
Anti β-actin mouse monoclonal	Sigma Aldrich	A 5441
Donkey anti-Goat IgG-HRP	SantaCruz Biotech, USA	Sc-2020
Goat anti-Rabbit IgG-HRP	SantaCruz Biotech, USA	Sc-2004
Goat anti-mouse IgG-HRP	SantaCruz Biotech, USA	Sc-2005

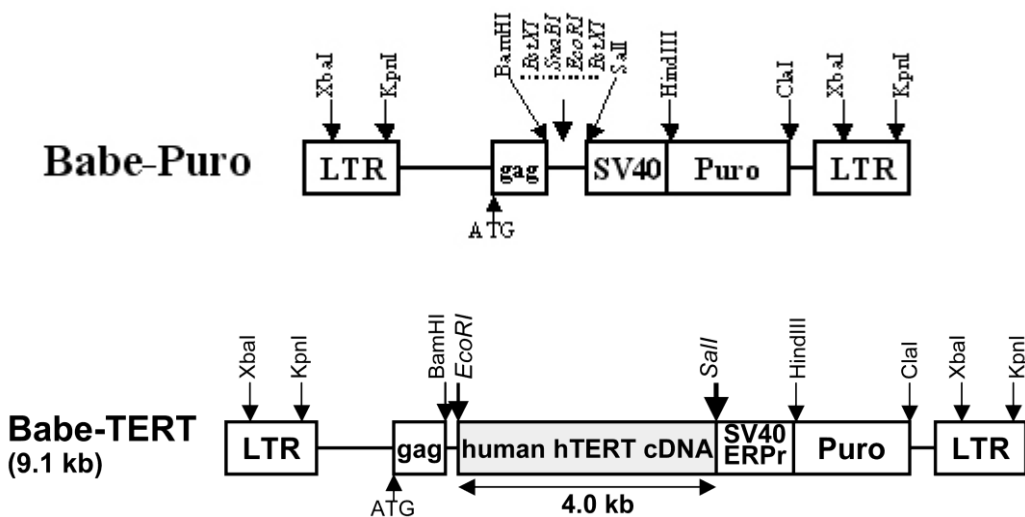
7.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

7.2.1. Ρετροϊικοί φορείς (Retroviral vectors)

Ανθρώπινες ινοβλάστες MRC-5, IMR-90, MRC-5 TERT καθώς και ανθρώπινα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα A549 επιμολύνθηκαν με αμοτροπικούς ρετροϊικούς φορείς έκφρασης όπως περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω. Οι ρετροϊικοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

pBabe-PURO: Είναι ένας πρότυπος ρετροϊικός φορέας έκφρασης που φέρει το γονίδιο της πουρομυκίνης (Puro) ως μάρτυρα επιλογής των επιμολυσμένων κυττάρων (Morgestern and Land,1990) (Σχήμα 1.2.). Το γονίδιο Puro εκφράζεται από τον προαγωγέα της πρώιμης περιοχής του DNA του ιού SV40. ο ρετροϊικός φορέας pBabe-PURO ήταν ευγενική προσφορά του καθηγητή Hartmut Land,Imperial Cancer Research Fund, London/Rochester Cancer Centre, University of Rochester, USA.

pBabe-PURO/hTERT: Βασίζεται στον ρετροϊικό φορέα pBabe-PURO και φέρει το γονίδιο Puro που επιφέρει ανθεκτικότητα των επιμολυσμένων κυττάρων στην πουρομυκίνη και ένα ~4.0 kb EcoRI-SalI τμήμα της καταλυτικής υπομονάδας (hEST2) της ανθρώπινης τελομεράσης hTERT (Σχήμα 1.2.). Ο ρετροϊικός φορέας pBabe-PURO/hTERT ήταν ευγενική προσφορά της καθηγήτριας Judith Campisi, του τμήματος Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας του Lawrence Berkley National Laboratory, Berkley,California.



Σχήμα 1.2. 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.

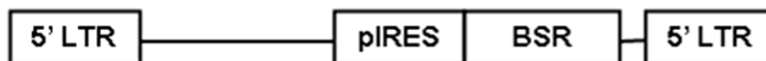
BIB: Το βακτηριακό γονίδιο της απαμινάσης της βλασισιδίνης S (*Bacterila Blastocidin S deaminase gene*) ή όπως αλλιώς ονομάζεται γονίδιο ανθεκτικότητας στη βλασισιδίνη (*Blastocidin resistance gene*), BSR, είναι 0.4 kb από το βακτήριο *Bacillus cereus* strain K55-S1 από τον προαγωγέα IRES του ιού ECMV. Το τμήμα IRES-BSR κλωνοποιήθηκε ως ~ 1.0 kb EcoRI-ClaI κασέτα. Η βλασισιδίνη είναι ένα πεπτιδυλ-νουκλεοσίδιο που δρα ως αντιμυκητιακό και κυτταροτοξικό αντιβιοτικό στο 28SRNA και παρεμποδίζει το σχηματισμό των πεπτιδικών δεσμών. Ο ρετροϊκός φορέας BIB φέρει θέσεις κλωνοποίησης γονιδίων 5'-BamHI-SnaBI-EcoRI- 3' στο 5' άκρο του προαγωγέα IRES για την κλωνοποίηση φορέα BIB από τη 5'-LTR στη 3'- LTR είναι ~3.0 kb (Σχήμα 2.2.).

BIB-Pim2(wt): Ο ρετροϊκός φορέας βασίζεται στον πρότυπο φορέα BIB και φέρει το επιπλέον του γονιδίου BSR, το ~1.0 kb αγρίου τύπου ανθρώπινο γονίδιο Pim2(wt) που κωδικοποιεί μια κινάση σερίνης/θρεονίνης που αποτελεί μεταγραφικό στόχο του NF-κB και έχει κλωνοποιηθεί στη θέση SnaBI. Το γονίδιο Pim2(wt) εκφράζεται από τη 5'-LTR του ρετροϊού. Το μέγεθος του ρετροϊκού φορέα BIB-Pim2(wt) από τη 5'-LTR στη 3'-LTR είναι 4.0 kb (Σχήμα 2.2.).

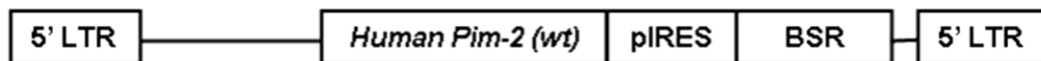
BIB-Pim2(DN): Ο ρετροϊκός φορέας βασίζεται στον πρότυπο φορέα BIB και φέρει το επιπλέον του γονιδίου BSR, το ~1.0 kb μεταλλαγμένο ανθρώπινο γονίδιο Pim2(DN) κλωνοποιημένο στη θέση SnaBI που κωδικοποιεί μια ανενεργό κινάση σερίνης/θρεονίνης καθώς φέρει μια μετάλλαξη (απλή αντικατάσταση αμινοξέος) στη περιοχή πρόσδεσης ATP της κινάσης. Το Pim2(DN) εκφράζεται από τη 5'-LTR του ρετροϊού. Το μέγεθος του ρετροϊκού φορέα BIB-Pim2(DN) από τη 5'-LTR στη 3'-LTR είναι 4.0 kb (Σχήμα 2.2.).

Όλοι οι ρετροϊκοί φορείς, BIB, BIB-Pim2(wt) και BIB-Pim2(DN) ήταν ευγενική προσφορά του Καθηγητή Βιοχημείας και Κυτταρικής Βιολογίας Kenneth B. Marcu του Πολιτειακού Πανεπιστημίου της Νέας Υόρκης στο Stony Brook, USA

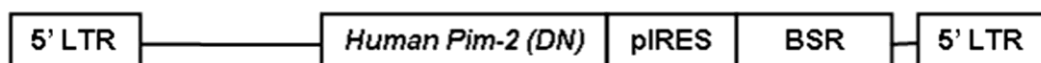
BIB



BIB-Pim2 (wt)



BIB-Pim2 (DN)



Σχήμα 2.2. Σχηματική παράσταση των ρετροϊκών φορέων έκφρασης της **Pim-2**, ενός γονιδίου-στόχου του **NF-κB**. BIB είναι ο πρότυπος ρετροϊκός φορέας που επιφέρει ανθεκτικότητα στη βλαστισιδίνη. Ο φορέας BIB χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση της αγρίου τύπου Pim-2(wt) ή της κυρίαρχης αρνητικής μορφής Pim-2(DN) στη θέση περιορισμού SnaBI του BIB. BSR, (Blasticidin-Resistance), γονίδιο που επιφέρει ανθεκτικότητα στη βλαστισιδίνη.

7.2.2 Κατασκευή κυτταρικών σειρών που εκφράζανε τα επιθυμητά γονίδια

7.2.3. Παραγωγή ρετροϊών με διαμόλυνση DNA

Για την παραγωγή ρετροϊών χρησιμοποιήθηκε η αμοτροπική κυτταρική σειρά πακεταρίσματος ρετροϊών Phoenix (ΦNX) η οποία διαμολύνθηκε με τους επιθυμητούς ρετροϊικούς φορείς με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου (Gorman et al., 1983). Τα ρετροϊικά σωματίδια που προέκυψαν μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων ΦNX χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση των κυττάρων MRC-5, A549 και IMR-90 (Batsi et al., 2009a; Batsi et al., 2009b).

(α) Διαμόλυνση των κυττάρων Phoenix με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου

Η διαμόλυνση των κυττάρων ΦNX με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου στηρίζεται στην ικανότητα των κυττάρων να ενσωματώνουν, πιθανά μέσω ενδοκύτωσης, 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 ΦNX ανά 6cm τριβλύο 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 31μl 2M CaCl₂ και αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 250 μl. Το μίγμα προστέθηκε στάγδην και υπό χαμηλή συνεχή ανάδευση, σε 250 μl αποστειρωμένου διαλύματος 2XHBS pH7.12. Το καθαρό (διαφώτιστο; translucent) ίζημα συμπλεγμάτων DNA-CaPO₄ που σχηματίστηκε (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 επωάστηκαν στους 37°C, 5%CO₂ για 24 - 48 ώρες πριν τη συλλογή των ρετροϊκών σωματιδίων για την επιμόλυνση των κυττάρων MRC-5-TERT, A549 και IMR-90.

2XHBS, pH7.12: 50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 15 mM Na₂HPO₄, pH 7.12, 10 mg/ml πολυβρίνη σε αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό

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

(β) *Επιμόλυνση των κυττάρων MRC-5 και A549 με τους ρετροϊούς*

Οι ανασυνδυασμένοι ρετροϊοί ελαττωματικής αντιγραφής (replication-defective recombinant retroviruses) που παράχθηκαν με τη διαμόλυνση των κυττάρων ΦΝΧ με τους ρετροϊικούς φορείς χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση των κυττάρων MRC-5, A549 και IMR-90 όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Batsi et al., 2009a; Batsi et al., 2009b).

Περίληπτικά η διαδικασία πραγματοποιείται σε δύο βασικά στάδια:

- (i) Το θρεπτικό υλικό των διαμολυσμένων κυττάρων ΦΝΧ που περιείχε τα ρετροϊικά σωματίδια συλλέχθηκε μετά από 24 ώρες και φιλτραρίσθηκε διαμέσου ενός μικροφίλτρου 0.45μm (Sartorius). Στα 4 ml του διηθήματος προστέθηκε πολυβρίνη σε τελική συγκέντρωση 8 μg/ml, τα οποία στη συνέχεια προστέθηκαν στα κύτταρα MRC-5- TERT, A549 και IMR-90 (βλέπε ii).
- (ii) Έγινε σπορά 5x10⁵ κυττάρων MRC-5-TERT, A549 και IMR-90 σε φλάσκες 25cm² και τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες της 37°C, 5%CO₂. Μετά την επώαση το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με το διήθημα (4 ml) από τα διαμολυσμένα κύτταρα ΦΝΧ (βλέπε i) και η επώαση της 37°C, 5%CO₂ συνεχίστηκε για 8 ώρες. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό με της ρετροϊούς αντικαταστάθηκε και προστέθηκαν στα κύτταρα 5 ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού

υλικού DMEM και η επώαση συνεχίστηκε της 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 MRC-5 και A549 και η επώαση συνεχίστηκε της 37°C, 5%CO₂ για 10-14 ημέρες για την επιλογή σταθερών κυτταρικών πλυθησμών. Η επιλογή των επιμολυσμένων κυττάρων MRC-5-TERT, A549 και IMR-90 έγινε σε βλαστισιδίνη για 14 μέρες. Το θρεπτικό υλικό με το αντιβιοτικό επιλογής ανανεώνονταν κάθε 3-4 ημέρες καθ' όλη τη διάρκεια της επιλογής των επιμολυσμένων κυττάρων.

7.2.4. Κυτταρικοί πληθυσμοί ινοβλαστών και καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων που κατασκευάστηκαν ώστε να εκφράζουν το γονίδιο Pim-2

Κατασκευάστηκαν οι κυτταρικοί πληθυσμοί φυσιολογικών ανθρώπινων ινοβλαστών και ανθρώπινων καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων που αναφέρονται στον Πίνακα 5.2.

Πίνακας 6.2. κατασκευή κυτταρικών πληθυσμών MRC-5 TERT και A549 εκφράζανε διαφορετικά γονίδια		
Ινοβλάστες	Ρετροϊκός φορέας	Κατασκευή
MRC-5	Babe-Puro	MRC-5 Puro
MRC-5	Babe-Puro/TERT	MRC-5 TERT
MRC-5 TERT	BIB(BSR)	MRC-5 TERT/BIB
MRC-5 TERT	BIB-Pim-2(wt)	MRC-5 TERT/Pim-2(wt)
MRC-5 TERT	BIB-Pim-2(DN)	MRC-5 TERT/Pim-2(DN)
A549	BIB(BSR)	A549 BIB
A549 BIB	BIB-Pim-2(wt)	A549 Pim-2(wt)
A549 BIB	BIB-Pim-2(DN)	A549 Pim-2(DN)
IMR-90	BIB	IMR-90 BIB
IMR-90	BIB-Pim-2(wt)	IMR-90 Pim-2(wt)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- I. Οι επιδράσεις της πρωτεϊνικής κινάσης Pim-2 στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου**

- II. Οι επιδράσεις της Pim-2 στην απόπτωση ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες**

**I. Οι επιδράσεις της πρωτεϊνικής κινάσης Rim-2 στην
πρόοδο του κυτταρικού κύκλου**

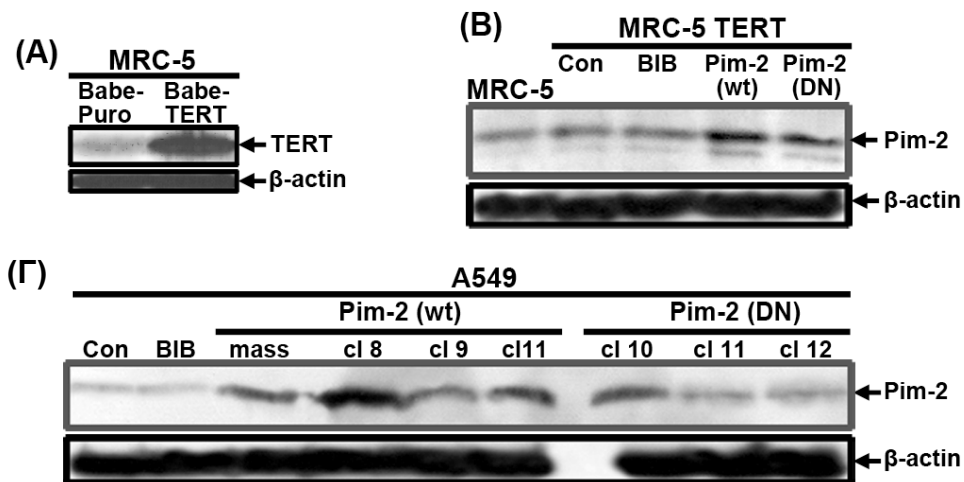
1.3. Κατασκευή και χαρακτηρισμός της έκφρασης της Pim-2 στα κύτταρα MRC-5 TERT και A549

Ενώ οι φυσιολογικές ανθρώπινες ινοβλάστες MRC-5 υφίστανται γήρανση μετά από 60 κυτταρικές διαιρέσεις, οι τελομερισμένες ινοβλάστες MRC-5 αυξάνονται συνεχώς καθώς η καλλιέργεια αυτών των κυττάρων έχει ξεπεράσει τις 250 κυτταρικές διαιρέσεις (Bartkova et al., 2007). Επειδή η Pim-1 έχει δείχθει ότι επάγει ένα φαινότυπο γήρανσης στα κύτταρα MEFs (Hogan et al., 2008), στην παρούσα εργασία, κύτταρα MRC-5 TERT συγκεκριμένου αριθμού κυτταρικών διαιρέσεων 45, χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή κυτταρικών σειρών που υπερεκφράζουν την Pim-2, όπως περιγράφηκε στα υλικά και μέθοδοι, για 2 λόγους: (α) την αποφυγή οποιωνδήποτε επιδράσεων που συσχετίζονται με την έναρξη της κυτταρικής γήρανσης η οποία πιθανά να επάγεται από την ενισχυμένη έκφραση της Pim-2 και (β) τη δημιουργία κυττάρων με εκτεταμένη περίοδο ζωής αλλά φυσιολογικού κυτταρικού τύπου έτσι ώστε να μπορούν να συγκριθούν οι επιδράσεις της Pim-2 σε δυνητικά αθανатоποιημένα κύτταρα πνεύμονα όπως τα MRC-5 TERT έναντι καρκινικών κυττάρων πνεύμονα όπως τα A549.

Κατασκευάστηκαν ανθρώπινες τελομερισμένες ινοβλάστες πνεύμονα MRC5 (MRC-5 TERT) μέσω ρετροϊκής μεταγωγής φέροντας ως ρετροϊό ελέγχου το Babe-Puro ή το παράγωγο του Babe-Puro/TERT που φέρει το cDNA της καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης τελομεράσης (TERT) σε φυσιολογικές ανθρώπινες εμβρυϊκές ινοβλάστες πνεύμονα MRC-5 και πραγματοποιήθηκε επιλογή σε πουρομυκίνη για την κατασκευή σταθερών κυτταρικών πληθυσμών MRC-5 Puro ή MRC-5 TERT. Ανάλυση με ανοσο-αποτύπωμα έδειξε ότι τα κύτταρα MRC-5 TERT εκφράζανε υψηλά επίπεδα της εξωγενούς τελομεράσης (TERT) συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου (Σχήμα 1.3A).

Κύτταρα MRC-5 TERT και ανθρώπινα καρκινικά επιθηλιακά A549, επιμολύνθηκαν με ανασυνδυασμένους ρετροϊούς που έφεραν είτε τον πρότυπο φορέα έκφρασης (vector) BIB είτε την αγρίου τύπου (wt) ή την κυρίαρχη-αρνητική μορφή (DN) του ανθρώπινου Pim-2 cDNA κλωνοποιημένο στο BIB και επιλέχθηκαν στο αντιβιοτικό βλαστισιδίνη. Οι ανθεκτικές κυτταρικές σειρές στη βλαστισιδίνη (BSR^R) MRC5 TERT και A549 φέροντας είτε το BIB, BIB-Pim2(wt) ή BIB-Pim2(DN)

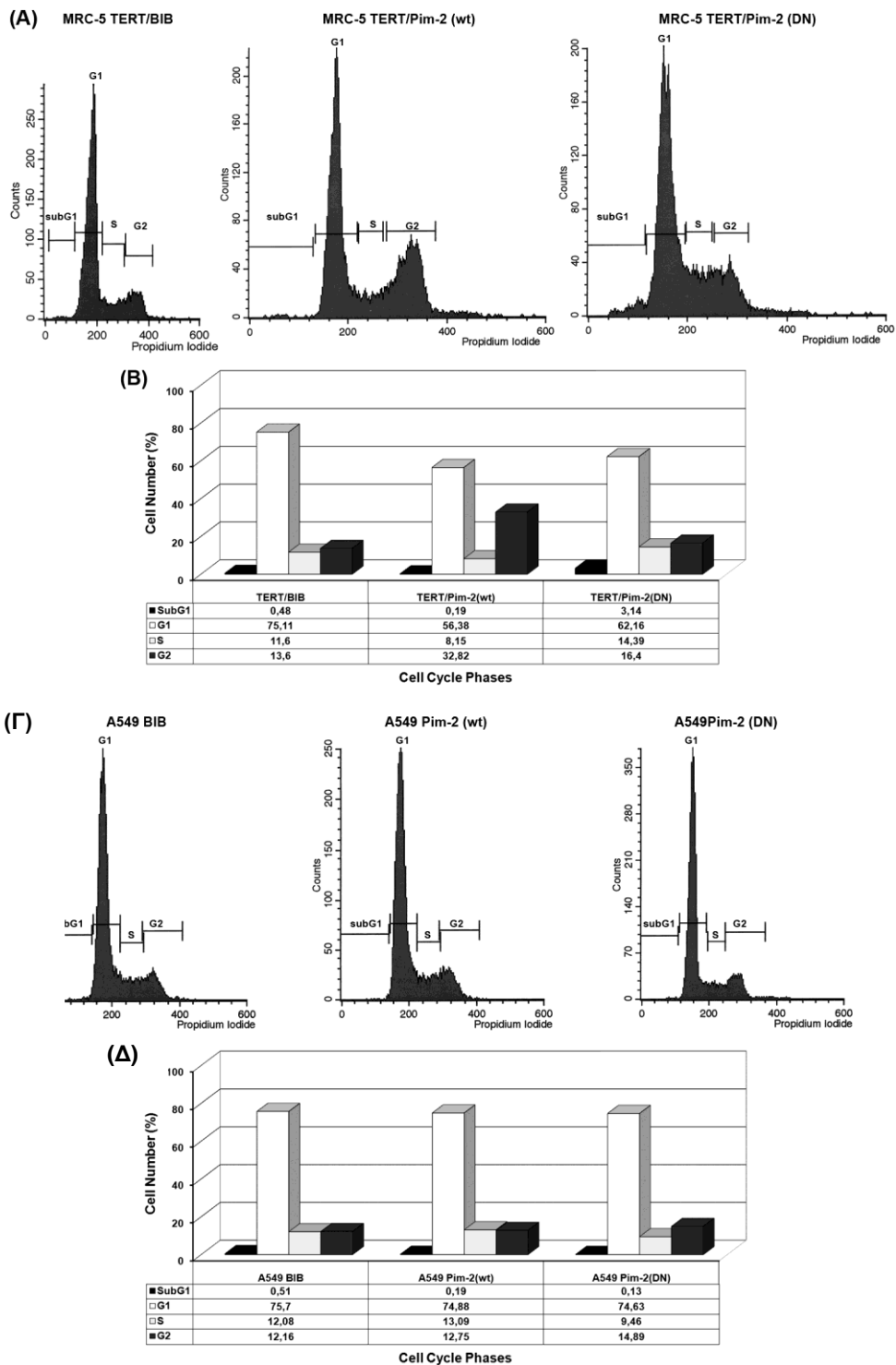
αναλύθηκαν για την έκφραση της Pim-2 με ανοσοαποτύπωμα κατά western. Η κυτταρική σειρά MRC5 TERT/Pim-2(wt) και σε μικρότερο βαθμό τα MRC5 TERT/Pim-2(DN) εκφράζανε υψηλότερα επίπεδα της εξωγενούς πρωτεΐνης Pim-2 συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου, μη επιμολυσμένα MRC5 TERT και MRC5 TERT/BIB και τις φυσιολογικές ινοβλάστες MRC5 (Σχήμα 1.3B). Ομοίως, απομονώθηκαν τυχαία 12 κλώνοι από τα κύτταρα A549 Pim2(wt) και 12 κλώνοι από τα A549 Pim2(DN) και αναλύθηκαν για την έκφραση της Pim-2. Η εικόνα 1.3Γ δείχνει την έκφραση της Pim-2 σε αντιπροσωπευτικούς κλώνους των κυττάρων A549 Pim2(wt) και A549 Pim2(DN) και σε μη επιμολυσμένα κύτταρα A549 ή σε κύτταρα που έφεραν τον ρετροϊκό φορέα ελέγχου BIB. Όλοι οι κυτταρικοί κλώνοι των A549 Pim2(wt) και A549 Pim2(DN) παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της Pim2 πρωτεΐνης συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου A549 και A549 BIB. Ωστόσο, ο όγδοος κυτταρικός κλώνος A549/Pim-2(wt) και ο δέκατος αντίστοιχα A549/Pim-2(DN) παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της εξωγενούς πρωτεΐνης Pim-2 (Σχήμα 1.3Γ) και συλλέχθηκαν για τα περαιτέρω πειράματα.



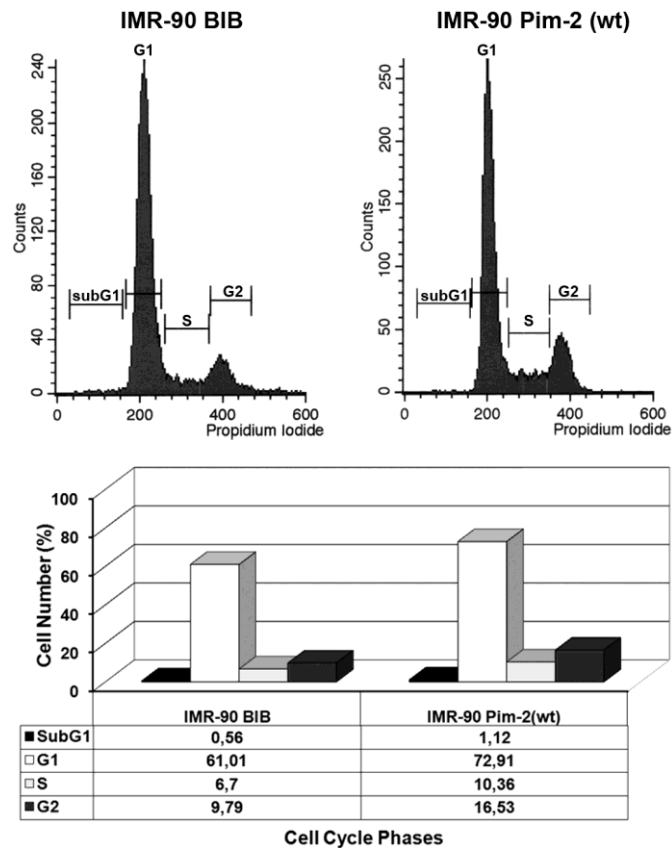
Σχήμα 1.3. Κατασκευή αθανатоποιημένων ινοβλαστών MRC5 TERT και κυττάρων MRC-5 TERT και A549 που έφεραν BIB, Pim-2(wt) ή Pim-2(DN) και έκφραση των εισαχθέντων γονιδίων. **(Α)** Ολικές πρωτεΐνες απομονώθηκαν από επιμολυσμένες ινοβλάστες με ένα πρότυπο ρετροϊκό φορέα Babe-Puro ή τον ρετροϊό Babe-Puro/TERT και αναλύθηκε με ανοσο-αποτύπωμα η έκφραση της ανθρώπινης τελομεράσης. **(Β)** Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν από ανθρώπινες τελομερισμένες φυσιολογικές ινοβλάστες MRC-5, MRC5 TERT (control) και MRC-5 TERT επιμολυσμένες με τον πρότυπο ρετροϊκό φορέα (BIB) ή με ρετροϊούς που έφεραν την αγρίου τύπου Pim-2(wt) ή την κυρίαρχη-αρνητική μορφή Pim-2(DN) και αναλύθηκε η έκφραση της Pim-2 με ανοσο-αποτύπωμα κατά western. **(Γ)** Όμοια, απομονώθηκαν από ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα A549 κλώνοι που έφεραν την αγρίου τύπου Pim-2(wt) ή την κυρίαρχη-αρνητική μορφή Pim-2(DN) και αναλύθηκε η έκφραση της Pim-2 με ανοσοαποτύπωμα κατά western. Η ισοφόρτωση των πρωτεϊνών ανιχνεύτηκε με την έκφραση της β-ακτίνης.

2.3. Ενισχυμένη έκφραση της Pim-2 επάγει τη συσσώρευση των MRC-5 TERT αλλά όχι των A549 κυττάρων στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου

Στη συνέχεια διερευνήσαμε τις επιδράσεις της ενισχυμένης έκφρασης της Pim-2 στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων MRC5 TERT και A549 (Σχήμα 2.3.). Η ανάλυση με κυτταρομετρίας ροής έδειξε ότι τα MRC5 TERT που εκφράζουν την Pim-2 συσσωρεύτηκαν στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου, συγκρινόμενα με τα MRC-5 TERT που έφεραν τον πρότυπο φορέα BIB, MRC-5 TERT/BIB και τα κύτταρα που έφεραν μια κυρίαρχη-αρνητική μορφή της Pim-2, MRC-5 TERT/Pim-2(DN), κατά τη διάρκεια μιας περιόδου 24 ωρών (Σχήμα 2.3A και B). Τα MRC-5 TERT/Pim-2(wt) παρουσίασαν μια σημαντική μείωση στη φάση G1 (56,58% στα MRC-5 TERT/Pim-2(wt) και 75,11% και 62,16% στα MRC-5 TERT/BIB και MRC-5 TERT/Pim-2(DN), αντίστοιχα.) Η μείωση στη φάση G1 συνοδεύτηκε κυρίως από αύξηση στη φάση G2-M (32,82% στα MRC-5 TERT/Pim-2(wt), 13,16% και 16,4% στα MRC-5 TERT/BIB και MRC-5 TERT/Pim-2(DN), αντίστοιχα.) (Σχήμα 2.3A και B). Αντιθέτως, μια παρόμοια ανάλυση των καρκινικών κυττάρων A549 έδειξε ότι η Pim-2(wt) και η Pim-2(DN) δεν παρουσίασαν σημαντική επίδραση στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου A549 BIB (Σχήμα 2.3Γ και Δ). Η διαφορά μεταξύ αθανατοποιημένων έναντι των καρκινικών κυττάρων μας προέτρεψε να κατασκευάσουμε φυσιολογικές ανθρώπινες ινοβλάστες IMR-90 που έφεραν την αγρίου τύπου Pim-2(wt) προκειμένου να διερευνήσουμε τις επιδράσεις της στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Τα κύτταρα IMR-90 Pim-2(wt) παρουσίασαν συσσώρευση στις φάσεις G1-S και G2-M του κυτταρικού κύκλου (Σχήμα 3.3.). Επομένως, η Pim-2 επιβράδυνε την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου κυρίως στη φάση G2-M στις αθανατοποιημένες και φυσιολογικές ανθρώπινες ινοβλάστες πνεύμονα αλλά όχι στα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα.



Σχήμα 2.3. Οι επιδράσεις της Pim-2 στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα MRC5 TERT και A549. **(A)** και **(B)** Έγινε σπορά ινοβλαστών ανά 10 cm τρυβλίο και τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 h. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα διεγέρθηκαν με ορό, συλλέχθηκαν μετά από 24h και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το CycleTest™ DNA Reagent kit. **(Γ)** και **(Δ)** Όμοια, η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για τα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα A549.



Σχήμα 3.3. Η Pim-2 επήγαγε τη συσσώρευση ανθρώπινων ινοβλαστών IMR90 στις φάσεις G1-S και G2-M. Έγινε σπορά ινοβλαστών IMR-90 ανά 10 cm τρυβλίο και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 h. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα διεγέρθηκαν με ορό, συλλέχθηκαν μετά από 24 h και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το CycleTest™ DNA Reagent kit.

3.3. Η Pim-2 επιβραδύνει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου μέσω του άξονα p53 - p21^{Cip1/Waf1}

Για να αποκτήσουμε περαιτέρω γνώση των επιδράσεων της Pim2(wt) στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, σε δυνητικά αθανатоποιημένα κύτταρα MRC5 TERT έναντι καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα A549, μελετήθηκε η έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου G1-S και G2-M με ανοσοαποτύπωμα κατά western, σε ολικά εκχυλισμάτα κύτταρων που έχουν διεγερθεί με ορό για 24 και 48 ώρες (Σχήμα 4.3.).

Ανάλυση των ρυθμιστών της φάσης G1-S έδειξε ότι η έκφραση της κυκλίνης D1 ήταν υψηλότερη μετά τη διέγερση με ορό για 24 ώρες στα MRC-5 TERT και A549 που εκφράζανε την Pim-2(wt) και σε μικρότερο βαθμό στα αντίστοιχα κύτταρα που έφεραν την Pim-2(DN) συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου (Σχήμα 4.3.). Ανιχνεύθηκαν επίσης οριακά υψηλότερα επίπεδα της κυκλίνης D1 στα MRC-5 TERT Pim-2(wt) και όχι στα MRC-5 TERT Pim-2(DN), ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα A549, μετά από διέγερση με ορό για 48h (Σχήμα 4.3.). Τα επίπεδα της κυκλίνης E ενισχύθηκαν στα A549 Pim-2(wt) αλλά όχι στα A549 Pim-2(DN) συγκρινόμενα με τα κύτταρα ελέγχου, ενώ η χαμηλή έκφραση της κυκλίνης E που ανιχνεύθηκε στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους MRC-5 TERT δεν παρουσίασε καμία αλλαγή. Το αντίθετο ήταν εμφανές για την έκφραση της κυκλίνης A, που είναι ένας δείκτης της φάσης S του κυτταρικού κύκλου (Σχήμα 4.3.). Η έκφραση της PCNA, ένας δείκτης της σύνθεσης του DNA, ήταν υψηλή σε όλους τους διαφορετικούς κυτταρικούς ασύγχρονους πληθυσμούς και όμοια στα κύτταρα MRC-5 TERT και A549 καθώς τα επίπεδα της δε παρουσίασαν σημαντική αλλαγή ως απόκριση στην Pim-2(wt) ή της Pim-2(DN) είτε στα κύτταρα MRC-5 TERT είτε στα A549 (Σχήμα 4.3.). Ωστόσο, η Pim-2(wt) ρυθμίζει διαφορετικά την έκφραση των κυκλινών σε δυναμικά αθανатоποιημένα MRC-5 TERT έναντι των καρκινικών επιθηλιακών πνεύμονα κύτταρα A549: ενώ η έκφραση της κυκλίνης D1 (φάσεις G1 και G2) (Sherr, 2002) αυξορρυθμίστηκε από την Pim-2(wt) και στους δυο κυτταρικούς τύπους MRC-5 TERT και A549, παρουσιάζοντας μια επίδραση πιο έντονη στον πρώτο κυτταρικό τύπο, η έκφραση της κυκλίνης E (φάση G1-S) αυξορρυθμίστηκε από την Pim-2(wt) μόνο στα A549 κύτταρα και η κυκλίνη A (φάση S) μόνο στα MRC-5 TERT.

Ερευνήθηκαν επίσης τις επιδράσεις της Pim-2 στην έκφραση της GADD153, ένα μέλος των μεταγραφικών παραγόντων C/EBPs και μια πρωτεΐνη ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και απόκρισης σε βλάβες DNA, το επίπεδο της οποίας σχετίζεται με το στρες στο ER (Oyadomari and Mori, 2004). Αρχικά, τα βασικά επίπεδα έκφρασης της GADD153 ήταν χαμηλότερα στα κύτταρα MRC-5 TERT σε σχέση με τα A549. Δεύτερον, ενώ η έκφραση της GADD153 ήταν υψηλότερη στα κύτταρα MRC-5 TERT διεγερθέντα με ορό για 48 ώρες, στα A549 ήταν παρόμοια μετά από 24 και 48 ώρες διέγερσης με ορό. Ωστόσο, η Pim-2(wt) αυξορύθμισε την έκφραση της GADD153 στα MRC-5 TERT μετά από 24 ώρες και τη διατήρησε σε υψηλότερα επίπεδα μετά από 48 ώρες συγκρινόμενα είτε με τα κύτταρα MRC5 TERT/BIB ή MRC-5 TERT/Pim2(DN). Τα επίπεδα της GADD153 αυξορρυθμίστηκαν οριακά στα κύτταρα A549 Pim-2(wt) στις 24-48 ώρες, συγκρινόμενα με τα A549 BIB ή A549 Pim-2(DN) (Σχήμα 4.3.). Η επαγωγή της GADD153 από την Pim-2(wt) ίσως είναι ένδειξη στρες καθώς επίσης και επιβράδυνση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στις φάσεις G1-S ή G2-M του κυτταρικού κύκλου (MacLachlan et al., 2002; Lin et al., 2008).

Αναλύθηκε στη συνέχεια, η έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη μετάβαση των φάσεων G2-M του κυτταρικού κύκλου. Η ανάλυση της έκφρασης της κυκλίνης B1 έδειξε ότι τα κύτταρα MRC-5 TERT εκφράζαν πολύ χαμηλά βασικά επίπεδα της κυκλίνης B1 συγκρινόμενα με τα A549. Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στην έκφραση της κυκλίνης B1 στα κύτταρα A549 μεταξύ 24 και 48 ώρες. Η Pim-2(wt) αλλά όχι η Pim-2(DN) αυξορρύθμισε την έκφραση της κυκλίνης B1 και στους δυο κυτταρικούς τύπους μετά από 24 ώρες διέγερσης με ορό, η οποία ήταν πιο εμφανής στα κύτταρα MRC-5 TERT (Σχήμα 4.3.). Σε αυτό το σημείο απομονώθηκαν κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα καθώς και ολικές πρωτεΐνες από 'καθαρούς' πυρήνες από κύτταρα MRC-5 TERT/BIB, MRC-5 TERT/Pim-2(wt) και MRC-5 TERT/Pim-2(DN) και διερευνήθηκε η έκφραση και η υποκυτταρική κατανομή της κυκλίνης B1 (Σχήμα 5.3.). Η ανάλυση της κυκλίνης B1 με ανοσο-αποτύπωμα έδειξε ότι η πρωτεΐνη ήταν κυρίως πυρηνικά κατανομημένη και τα πυρηνικά επίπεδα της αυξορρυθμίστηκαν από την Pim-2(wt) αλλά όχι από την Pim-2(DN), συγκρινόμενα με τα κύτταρα ελέγχου (Σχήμα 5.3.).

Τα επίπεδα της CDK1(Cdc2) παρέμειναν ανεπηρέαστα σε όλους τους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους A549 και MRC-5 TERT, τα οποία εκφράζανε χαμηλότερα επίπεδα CDK1 σε σχέση με τον πρώτο κυτταρικό τύπο (Σχήμα 4.3.).

Η 14-3-3σ είναι μια πρωτεΐνη που επάγεται από την p53 και αναστέλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2-M μέσω σχηματισμού του συμπλέγματος CDK1(Cdc2)-κυκλίνη B1 στο κυτταρόπλασμα (Hermeking and Benzinger, 2006). Επιπλέον, ενισχύει την κυτταρική επιβίωση απενεργοποιώντας προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες (Hermeking and Benzinger, 2006; Morrison, 2009). Η ανάλυση της έκφρασης της 14-3-3σ με ανοσοαποτύπωμα κατά western έδειξε ότι τα A549 κύτταρα παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης σε σχέση με τα MRC5 TERT, αλλά δεν ανιχνεύθηκαν διαφορές στα επίπεδα της στα A549-Pim2(wt), συγκρινόμενα με τα A549 BIB ή A549 Pim2(DN). Ενώ στα κύτταρα MRC-5 TERT/BIB, η έκφραση της 14-3-3σ διεγέρθηκε από τον ορό μετά από 24 ώρες και επανήλθε στα βασικά επίπεδα μετά από 48 ώρες, η Pim-2(wt) αλλά όχι η Pim-2(DN) επαύξησε και διατήρησε τα επίπεδα της 14-3-3σ στις 24-48 ώρες συγκρινόμενα με τα κύτταρα ελέγχου (Σχήμα 4.3.).

Η GADD45a, ένας καταρρός στόχος της p53, αναστέλλει την κινάση CDK1 και μπορεί να επάγει την καταστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2-M (Siafakas and Richardson, 2009). Η ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα έδειξε ότι τα κύτταρα A549 εκφράζανε χαμηλά επίπεδα της GADD45a συγκρινόμενα με τα κύτταρα MRC-5 TERT κύτταρα. Η Pim-2(wt) αλλά όχι η Pim-2(DN) επάγει την έκφραση της GADD45a στα MRC5 TERT και σε ένα μικρότερο βαθμό στα A549 μετά από 24 ώρες διέγερσης με ορό (Σχήμα 4.3.). Επομένως, η Pim-2(wt) αυξορρύθμισε τα επίπεδα της κυκλίνης B1, 14-3-3σ και GADD45a στα κύτταρα MRC-5 TERT.

Στη συνέχεια αναλύσαμε την έκφραση της FoxM1 που εμπλέκεται στις φάσεις G1-S και G2-M του κυτταρικού κύκλου (Costa, 2005; Laoukili et al., 2006). Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ανίχνευσε και τις 3 ισομορφές της FoxM1: FoxM1A, B και C. Οι ισομορφές FoxM1B και C είναι μεταγραφικά ενεργές, ενώ η FoxM1A είναι μεταγραφικά ανενεργή. Η FoxM1A μπορεί να δράσει ως μια κυρίαρχη-αρνητική μορφή καθώς διατηρεί την ικανότητα της φυσιολογικής πρόσδεσης της στο DNA χωρίς να φέρει μια λειτουργική περιοχή μεταγραφικής ενεργότητας (functional transactivation domain). Αυτή η ισομορφή που προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα μπορεί να δράσει ρυθμίζοντας την ενεργότητα γενικά της FoxM1 υπό συγκεκριμένες

συνθήκες, λόγω του ανταγωνισμού της με τις άλλες ισομορφές, που επίσης είναι προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος, για δέσμευση σε ρυθμιστικά στοιχεία που ανταποκρίνονται στη FoxM1. Δεδομένου τοθ ότι οι ισομορφές FoxM1B και FoxM1C διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, η επαγωγή της FoxM1A πιθανά να αποτελεί έναν τρόπο με τον οποίο μπορεί να παρεμποδιστεί η αύγηση του ρυθμού του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, όπως τα καρκινικά κύτταρα, που υπερεκφράζουν FoxM1 (Laoukili et al., 2006). Ενώ τα κύτταρα MRC-5 TERT εκφράζανε τη FoxM1A και C αλλά σε πολύ χαμηλά έως μη ανιχνεύσιμα επίπεδα του FoxM1B, τα κύτταρα A549 εκφράζανε τις ισομορφές FoxM1B και C αλλά πολύ χαμηλά επίπεδα της FoxM1A. Επομένως η διαφορική έκφραση των ισομορφών της FoxM1 στους δυο κυτταρικούς τύπους πιθανά να καθορίζει τις πολλαπλασιαστικές τους αποκρίσεις (Kalinichenko et al., 2003; Kim et al., 2005; Kim et al., 2006). Στα κύτταρα MRC-5 TERT, η ενισχυμένη έκφραση της Pim-2(wt) αλλά όχι της Pim-2(DN) επήγαγε την έκφραση της FoxM1A και όχι της FoxM1C. Σε αντίθεση, στα κύτταρα A549, η Pim-2(wt) αλλά όχι η Pim-2(DN) επήγαγε την έκφραση της FoxM1C, ενός άμεσου στόχου των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών E/CDK2 (Lüscher-Firzlaff et al., 2006; Wierstra and Alves, 2006) και A/CDK2 (Wierstra and Alves, 2006) που εμπλέκονται στη μετάβαση των φάσεων G2-M (Ma et al., 2004), και όχι του FoxM1B (Σχήμα 4.3). Επομένως, ενώ στα A549 η Pim-2(wt) αυξορρύθμισε τα επίπεδα της μεταγραφικά ενεργής ισομορφής FoxM1C, στα MRC-5 TERT αυξορρύθμισε τα επίπεδα της μεταγραφικά ανενεργής FoxM1A δρώντας ως κυρίαρχη αρνητική μορφή στην επιβράδυνση του κυτταρικού κύκλου.

Επειδή ο άξονας p53 - p21^{Cip/Waf1} μπορεί να επιφέρει την καταστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1-S και G2-M, αναλύθηκε στη συνέχεια η έκφρασή τους στους δυο κυτταρικούς τύπους MRC-5 TERT και A549. Η έκφραση της p53, παρόλο που ήταν πολύ υψηλότερη στα A549 σε σύγκριση με τα MRC5 TERT, τα επίπεδα της παρέμειναν ανεπηρέαστα μετά από τη διέγερση με ορό ή από την Pim-2 (Σχήμα 4.3.). Αντίθετα, στα κύτταρα MRC5 TERT, η έκφραση της p53 ήταν υψηλότερη σε όλους τους διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς που καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες και αυξορρυθμίστηκε περαιτέρω από την Pim-2(wt) αλλά όχι από την Pim-2(DN), σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου που έφεραν τους πρότυπους φορείς έκφρασης BIB (Σχήμα 4.3.). Η ανάλυση της έκφρασης της πρωτεΐνης p21^{Cip/Waf1} έδειξε ότι ενώ τα επίπεδα της ήταν υψηλότερα σε

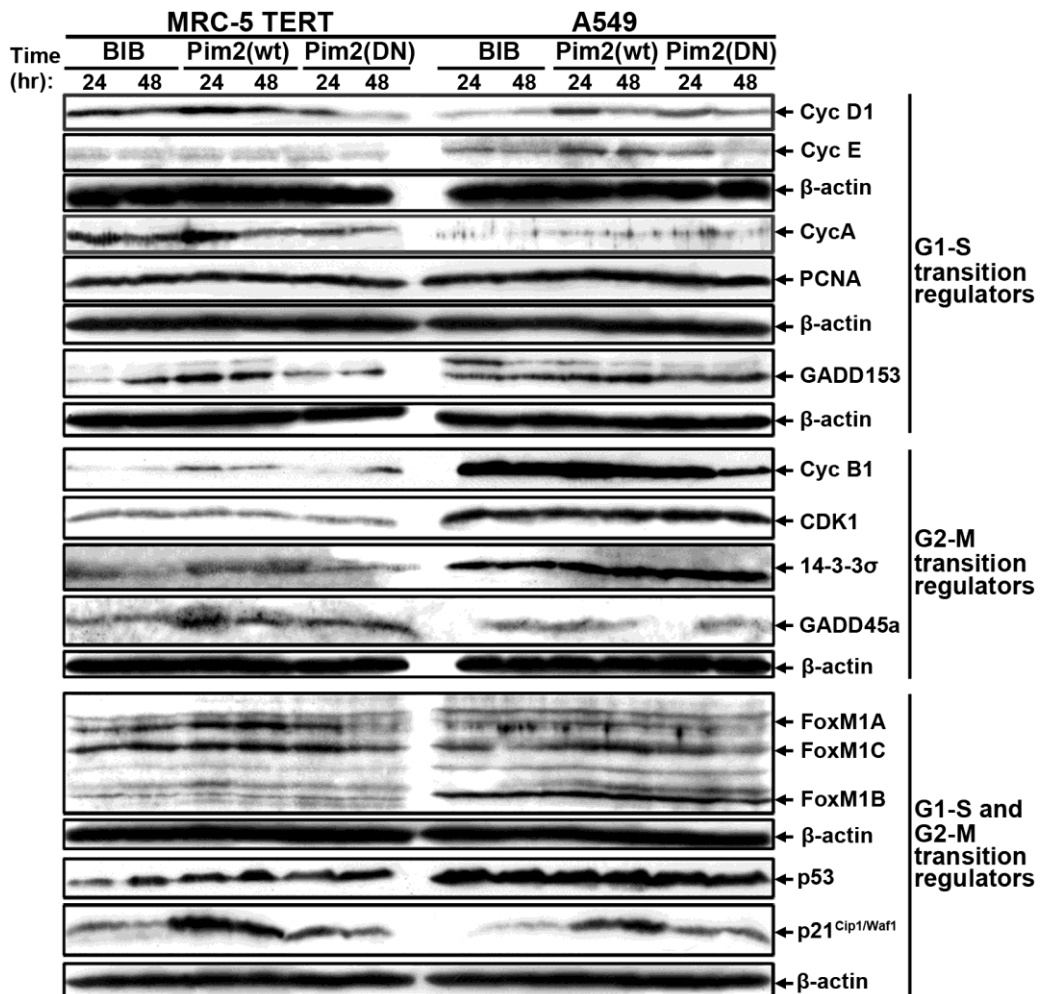
όλους τους διαφορετικούς τύπους των MRC-5 TERT μετά από 24 ώρες με διέγερση με ορό σε συμφωνία με το ρόλο του ως παράγοντας συγκρότησης του πρωτεϊνικού συμπλόκου κυκλίνης D-CDK4/6, όλα τα κύτταρα A549 έμφάνισαν υψηλότερη έκφραση μετά από 48 ώρες διέγερσης με ορό. Η Pim-2(wt) αλλά όχι η Pim-2(DN) αυξορύθμισαν τα επίπεδα έκφρασης της $p21^{Cip/Waf1}$ και στους δυο κυτταρικούς τύπους MRC-5 TERT και A549 αλλά σε μεγαλύτερο βαθμό στον πρώτο κυτταρικό τύπο (Σχήμα 4.3.).

Για να επιβεβαιωθούν οι επιδράσεις της Pim-2(wt) στην έκφραση των p53 και $p21^{Cip1/Waf1}$, αναλύθηκε η έκφραση και η υποκυτταρική κατανομή τους, παράλληλα με την $p27^{Kip1}$, με ανοσο-αποτύπωμα κατά western, σε κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα καθώς και σε ολικές πρωτεΐνες από 'καθαρούς' πυρήνες (Σχήμα 5.3.) Η p53 ήταν κυρίως πυρηνική σε όλους τους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους MRC-5 TERT και η Pim-2(wt) αλλά όχι η Pim-2(DN), αυξορρύθμισαν τα πυρηνικά επίπεδα της p53 σε σύγκριση με τα αντίστοιχα των κυττάρων ελέγχου (Σχήμα 5.3). Ενώ η $p21^{Cip1/Waf1}$ ήταν κυρίως πυρηνική στα MRC-5 TERT/BIB, ανιχνεύθηκε σε πολύ υψηλότερα επίπεδα και στο κυττοσολικό και πυρηνικό διαμέρισμα στα MRC-TERT/Pim-2(wt) συγκρινόμενα με τα κύτταρα ελέγχου (Σχήμα 5.3.). Επιπλέον, τα επίπεδα της $p21^{Cip1/Waf1}$ ήταν εμφανώς πιο μειωμένα στα MRC-TERT/Pim-2(DN) συγκρινόμενα με τα κύτταρα ελέγχου ή με τα κύτταρα που έφεραν την Pim-2(wt) (Σχήμα 5.3.). Αντίθετα, καμία μεταβολή δεν παρατηρήθηκε στην έκφραση της $p27^{Kip1}$ στα MRC-5 TERT/Pim-2(wt), η οποία εντοπιζόταν κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ενώ ήταν σχεδόν μη ανιχνεύσιμη στα κύτταρα MRC-5 TERT/Pim-2(DN) συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου (Σχήμα 5.3.). Επομένως, η Pim-2(wt) επήγαγε τον άξονα p53 - $p21^{Cip1/Waf1}$ σε σύγκριση είτε με τα κύτταρα ελέγχου ή με τα κύτταρα MRC-5 TERT/Pim-2(DN).

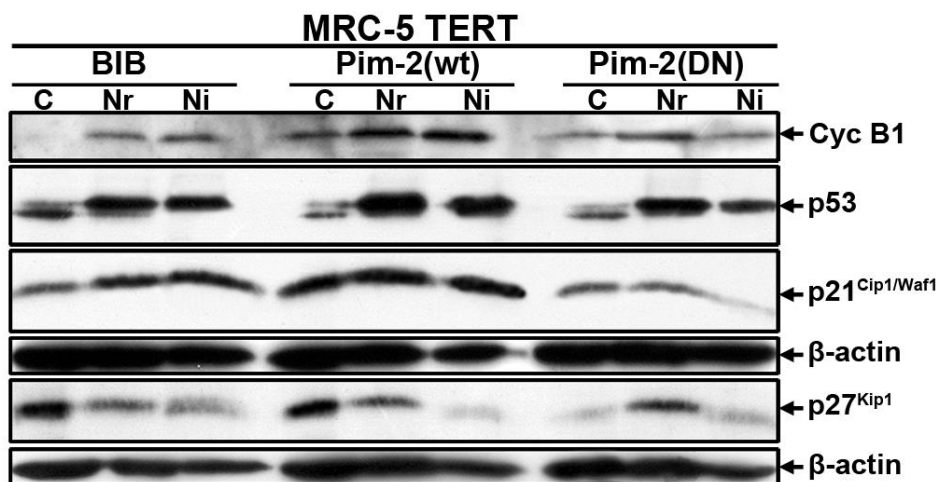
Συλλογικά, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η Pim-2(wt) ρυθμίζει διαφορετικά την έκφραση των κυκλίνων σε αθανατοποιημένες MRC-5 TERT έναντι επιθηλιακών καρκινικών πνεύμονα A549: ενώ η έκφραση της κυκλίνης D1 (φάσεις G1 και G2) (Sherr,2002) αυξορρυθμίστηκε από την Pim2(wt) και στους δυο κυτταρικούς τύπους MRC-5 TERT και A549, μια επίδραση πιο εμφανή στον πρώτο κυτταρικό τύπο, η έκφραση της κυκλίνης E (φάση G1-S) αυξορρυθμίστηκε από την Pim-2(wt) μόνο στα κύτταρα A549 και η κυκλίνη A (φάση S) μόνο στα MRC-5 TERT. Επιπλέον, η Pim-2(wt) αυξορρύθμισε τα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης B1, 14-3-3σ και GADD45a

στα κύτταρα MRC-5 TERT και όχι στα A549. Επιπρόσθετα, ενώ στα A549 η Pim-2(wt) αυξορυθμισε επίπεδα της μεταγραφικά ενεργούς ισομορφής FoxM1C, στα MRC-5 TERT αυξορύθμισε τα επίπεδα της μεταγραφικά ανενεργούς ισομορφής FoxM1A δρώντας ως κυρίαρχη αρνητικά μορφή στην επιβράδυνση του κυτταρικού κύκλου. Το πιο σημαντικό, ήταν ότι η Pim-2(wt) επήγαγε τον άξονα p53 - p21^{Cip1/Waf1} σε σύγκριση είτε με τα κύτταρα ελέγχου είτε με τα MRC-5 TERT/Pim-2(DN) και όχι στα A549.

Συμπερασματικά, αυτές οι μεταβολές στην έκφραση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα MRC-5 TERT/Pim-2(wt) πιθανότατα να συμβάλλουν στη συσσώρευση στη φάση G2-M.



Σχήμα 4.3. Ανάλυση της έκφρασης επιλεγμένων πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου σε αθανатоποιημένες ινοβλάστες και επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα που υπερεκφράζανε την *Pim-2(wt)* ή την *Pim-2(DN)*. Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, απομονώθηκαν μετά από 24 και 48h διέγερσης με ορό από κύτταρα MRC5 TERT και A549 που έφεραν είτε τον πρότυπο φορέα ελέγχου (*Vec*) είτε την αγρίου-τύπου *Pim-2(wt)* ή την κυρίαρχη-αρνητική μορφή *Pim-2(DN)* και αναλύθηκαν με ανοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, κυκλίνη D1, κυκλίνη E, κυκλίνη A, PCNA, p53, p21^{Cip1/Waf1}, GADD153 (G1-S), FoxM1A, FoxM1B, FoxM1C (G1-S και G2-M), κυκλίνη B1, CDK1, 14-3-3σ, GADD45a (G2-M). Η ισοφόρτωση των δειγμάτων έγινε με την ανίχνευση της β-ακτίνης.



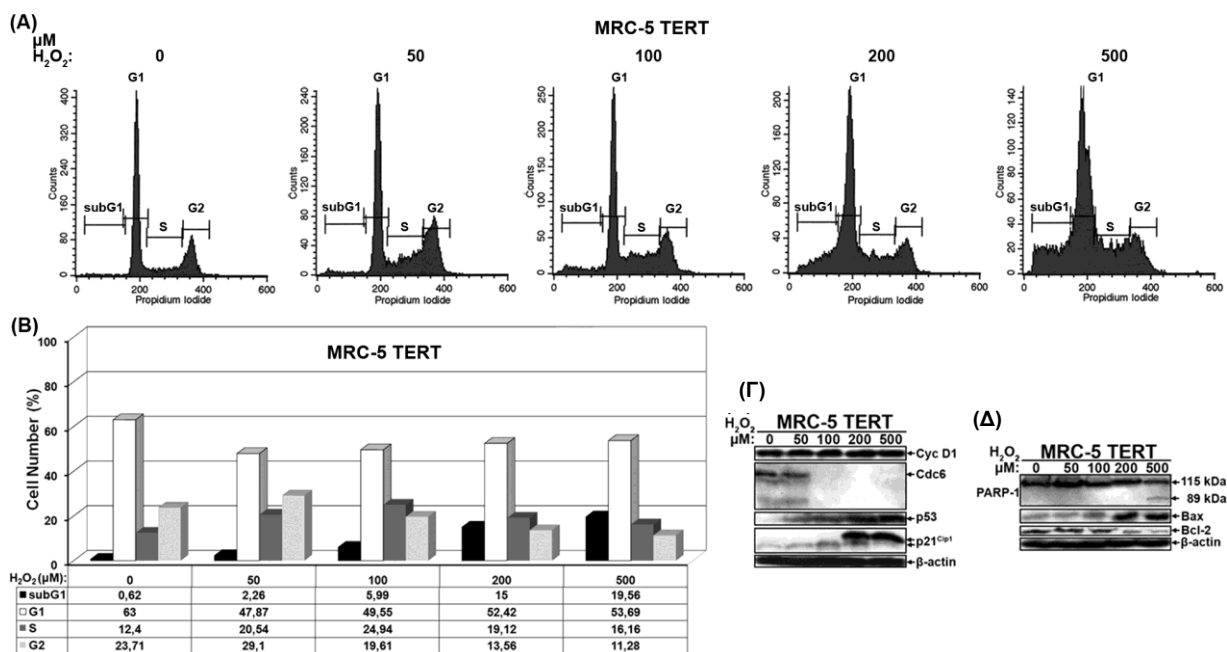
Σχήμα 5.3. Ανάλυση της έκφρασης επιλεγμένων πρωτεϊνών ρύθμισης της προόδου του κυτταρικού κύκλου σε κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα και εκχυλίσματα από ‘καθαρούς’ πυρήνες των κυττάρων MRC5 TERT. Κυτταροπλασματικά, πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και εκχυλίσματα ‘καθαρών πυρήνων απομονώθηκαν από αθανатоποιημένες ινοβλάστες MRC5 TERT που έφεραν τον πρότυπο ρετροϊκό φορέα ή την αγρίου-τύπου Pim-2(wt) ή την κυρίαρχη-αρνητική μορφή Pim-2(DN) και αναλύθηκαν με ανοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση των p53, p21^{Cip1/Waf1}, p27^{Kip1} και κυκλίνης B1. Η ισοφόρτωση των πρωτεϊνών ανιχνεύθηκε με την έκφραση της β-ακτίνης.

II. Οι επιδράσεις της Pim-2 στην απόπτωση ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες

4.3. Αποκρίσεις των ινοβλαστών MRC-5 TERT στο H₂O₂

Στη συνέχεια εκτιμήθηκαν οι επιδράσεις του H₂O₂ στα κύτταρα MRC-5 TERT. Οι ινοβλάστες MRC-5 TERT επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0 - 500 μM) για 2 ώρες και στη συνέχεια κυτταρομετρήθηκαν μετά από 24 ώρες. Παρατηρήθηκε μια δόσο-εξαρτώμενη αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού στη φάση υπο-G1 ως απόκριση στις αυξανόμενες δόσεις του H₂O₂, ιδιαίτερα στα 200 και 500 μM H₂O₂, ένδειξη της απόπτωσης μετά από συνακόλουθη μείωση των πλυθησμών στις φάσεις S και G2-M του κυτταρικού κύκλου (Σχήμα 6.3A και B).

Στη συνέχεια μελετήθηκαν οι επιδράσεις του H₂O₂ στην έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση. Ενώ, το H₂O₂ δεν επηρέασε την έκφραση της κυκλίνης D1, αξιοσημείωτα μειορρύθμισε την έκφραση της Cdc6 και αυξορρύθμισε την έκφραση της p53 και της πρωτεΐνης-στόχου της p21^{Cip/Waf1} (Σχήμα 6.3Γ). Καθώς της p53 μπορεί να επάγει την καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή την απόπτωση διερευνήθηκε επιπλέον, έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης. Στα κύτταρα MRC-5 TERT επεξεργασμένα με H₂O₂ παρατηρήθηκε μια αυξορρύθμιση της έκφρασης της Bax και μειορρύθμιση των επιπέδων της Bcl-2, μεταβάλλοντας έτσι την αναλογία προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών μελών της υπεροικογένειας Bcl-2 προς τη δημιουργία των πρώτων, ευαισθητοποιώντας έτσι τα κύτταρα στην απόπτωση που επάγεται από το H₂O₂. Πράγματι, το H₂O₂ επήγαγε την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP-1 παράγοντας την ανέπαφη μορφή της στα 115 kDa και την πρωτεολυτικά διασπώμενη 89 kDa μορφή του ενζύμου στα 500 μM H₂O₂ (Σχήμα 6.3Δ).

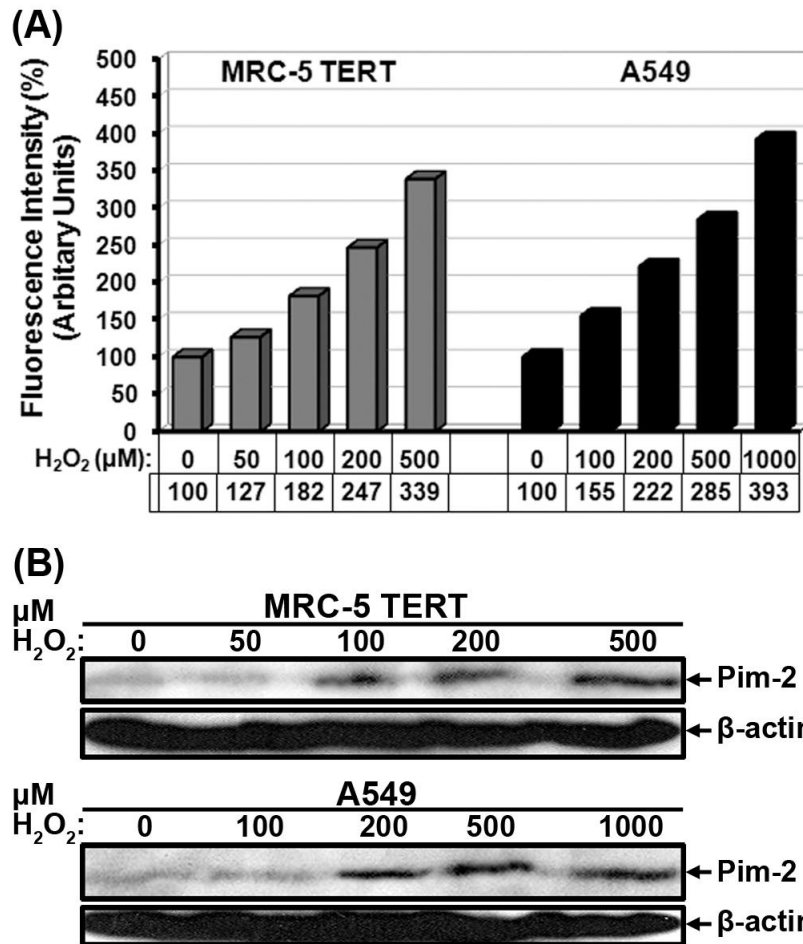


Σχήμα 6.3. Αποκρίσεις των αθανатоποιημένων ινοβλαστών MRC5 TERT στο H₂O₂. (A) και (B) Αθανατοποιημένες φυσιολογικές ινοβλάστες MRC5 TERT εκτέθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0 - 500 μM) H₂O₂ για 2 h και μετά την επώασή τους για 24 h απουσία H₂O₂, τα κύτταρα συλλέχθηκαν για κυτταρομετρία ροής. **(Γ) και (Δ)** Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν από MRC5 TERT παρουσία ή απουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων H₂O₂ και αναλύθηκαν τα επίπεδα έκφρασης επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης με ανοσο-αποτύπωμα κατά western.

5.3. Το H₂O₂ επήγαγε τη συσσώρευση ενδογενών επιπέδων δραστικών μορφών οξυγόνου και την έκφραση της Pim-2 στα κύτταρα MRC-5 TERT και A549

Αρχικά, αναλύθηκε η επίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) στη συσσώρευση ενδογενών επιπέδων δραστικών μορφών οξυγόνου (ΔΜΟ). Στα κύτταρα MRC-5 TERT και A549 χορηγήθηκαν συγκεντρώσεις H₂O₂ (0 - 1000 μΜ) και τα ενδογενή επίπεδα ΔΜΟ εκτιμήθηκαν βάσει της μεθόδου που περιγράφεται στα υλικά-μέθοδοι. Και οι δυο κυτταρικοί τύποι MRC-5 TERT και A549 συσσώρευσαν ενδογενή επίπεδα ΔΜΟ κατά ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο ως απόκριση στις αυξανόμενες συγκεντρώσεις του H₂O₂ (Σχήμα 7.3Α).

Επειδή η Pim-2 ρυθμίζεται από τον NFκ-B, ο οποίος είναι ένας ευαίσθητος στις οξινο-αναγωγικές μεταβολές (redox sensitive) μεταγραφικός παράγοντας, μελετήθηκε η έκφραση της Pim-2 σε επεξεργασμένα και μη με H₂O₂ κύτταρα MRC-5 TERT και A549. Και στις δυο κυτταρικές σειρές χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις H₂O₂ όπως υποδεικνύεται, και η έκφραση του ενδογενούς Pim-2 αναλύθηκε με ανοσοαποτύπωμα κατά western. Το H₂O₂ επήγαγε την έκφραση της ενδογενούς πρωτεΐνης Pim-2 κατά ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο και στους δυο κυτταρικούς τύπους MRC5 TERT και A549 (Σχήμα 7.3Β). Επομένως, το H₂O₂ ενεργοποιεί μια πορεία μεταγωγής σήματος πιθανά διαμέσου του NF-κΒ, επάγοντας την έκφραση της Pim-2 στις αθανοτοποιημένες ινοβλάστες πνεύμονα MRC-5 TERT και στα καρκινικά επιθηλιακά πνεύμονα A549.



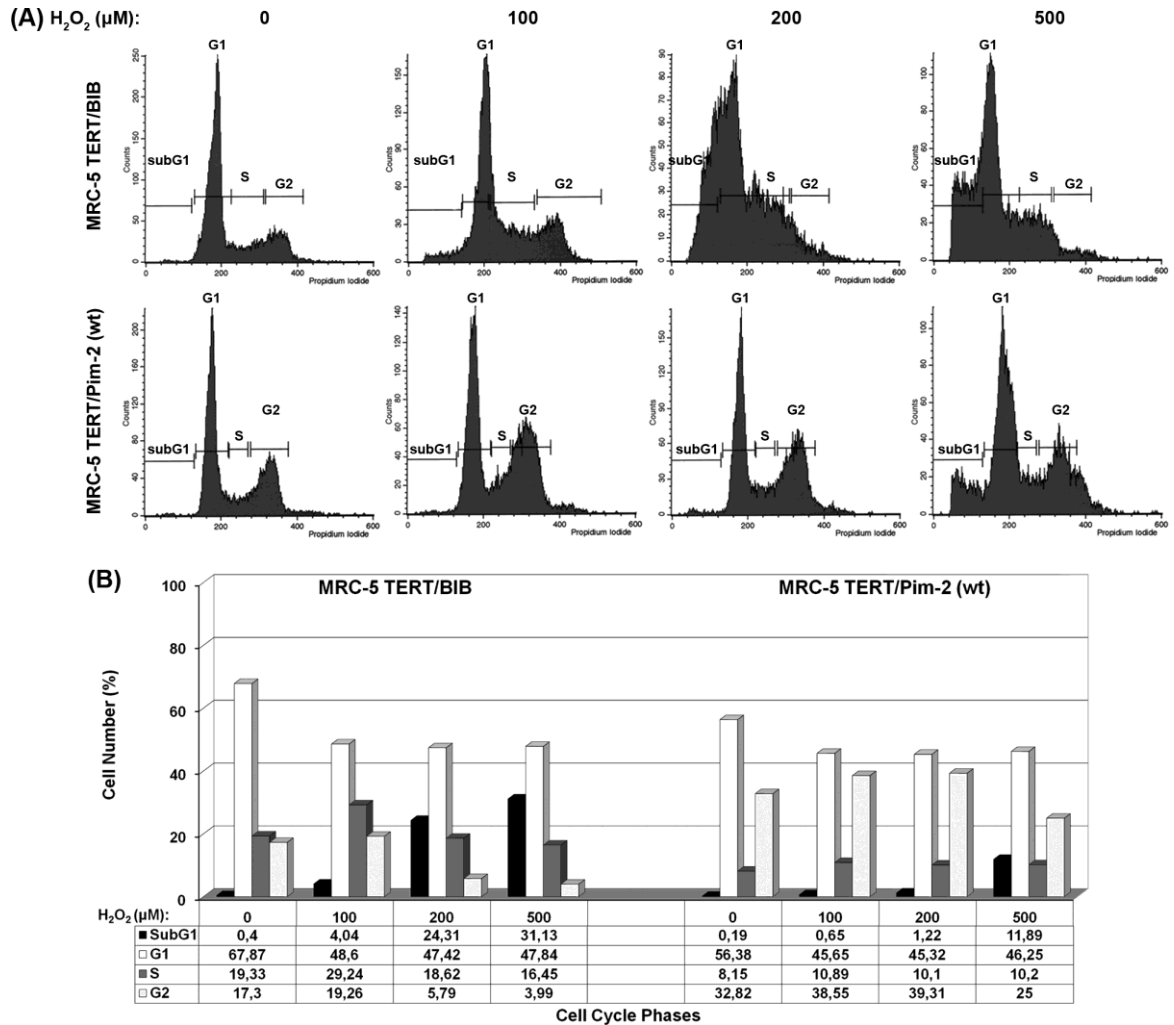
Σχήμα 7.3. Ενδογενή επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου ΔΜΟ σε κύτταρα MRC-5 TERT και A549 και δόσο-εξαρτώμενη επαγωγή της Pim-2 μετά την έκθεση των κυττάρων MRC5 TERT και A549 σε H₂O₂. **(A)** Στα κύτταρα MRC5 TERT A549 χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις H₂O₂ για 2 h και αμέσως μετά υπολογίστηκε η συσσώρευση των ενδογενών μορφών οξυγόνου όπως περιγράφεται στα υλικά και μέθοδοι. **(B)** Στα κύτταρα MRC-5 TERT και A549 χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις H₂O₂ για 2 h και μετά την επώασή τους για 24 h απουσία H₂O₂ απομονώθηκαν ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα και αναλύθηκε η έκφραση της ενδογενούς Pim-2 με ανοσο-αποτύπωμα κατά western χρησιμοποιώντας το ειδικό αντίσωμα.

6.3. Η ενισχυμένη έκφραση της Pim-2 επήγαγε τη συσσώρευση των κυττάρων στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου

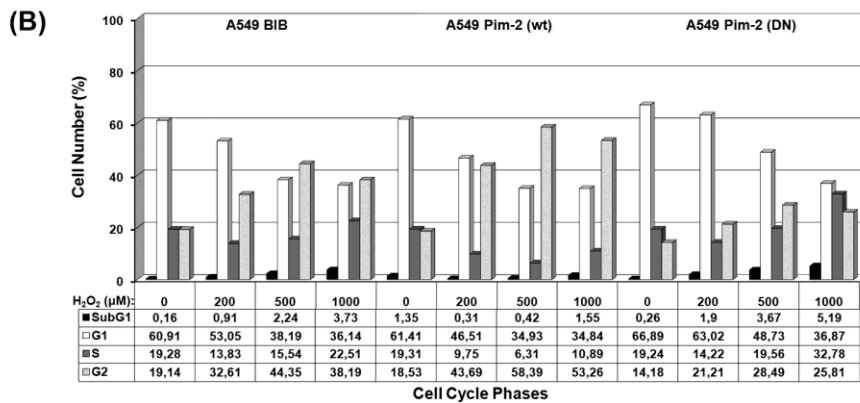
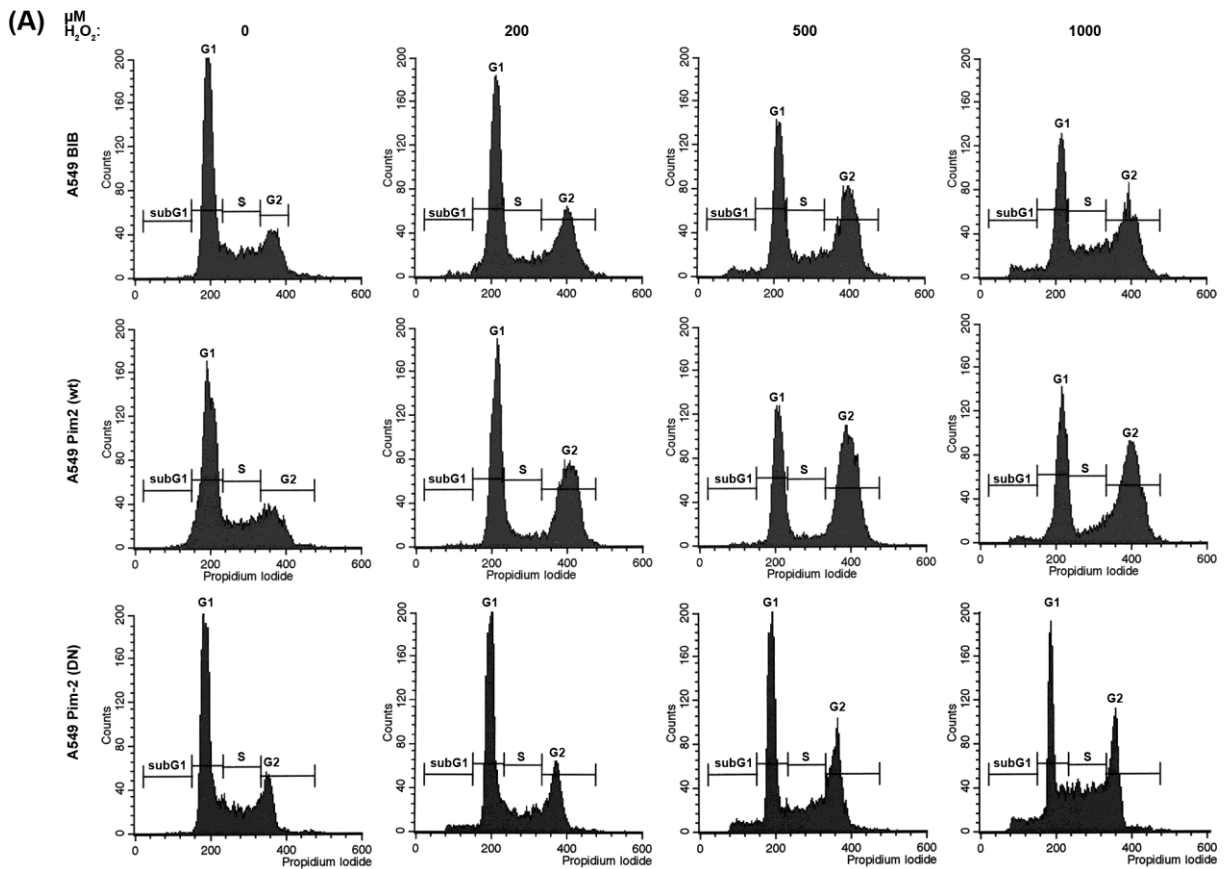
Αρχικά, αναλύθηκε η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα MRC-5 TERT/Pim-2(wt) σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου MRC5 TERT/ BIB, ως απόκριση στο H₂O₂ (Σχήμα 8.3.). Ενώ η χορήγηση H₂O₂ στα κύτταρα MRC-5 TERT επήγαγε τη δόσο-εξαρτώμενη αύξηση τους στη φάση υπο-G1 ως ένδειξη της απόπτωσης των κυττάρων η οποία ήταν εντονότερη στις συγκεντρώσεις 200 και 500 μM H₂O₂ (24,31% και 31.13% στα MRC-5 TERT/BIB έναντι 1,22% και 11,89% στα MRC-5 TERT/Pim-2(wt), αντίστοιχα), τα MRC-5 TERT/Pim-2(wt) έδειξαν μια αυξημένη συσσώρευση στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου (5,79% και 3,99% στα MRC-5 TERT/BIB έναντι 39,31% και 25% στα MRC-TERT/Pim-2(wt), αντίστοιχα) και ένα ανθεκτικό φαινότυπο στην επαγόμενη απόπτωση από το H₂O₂ (Σχήμα 8.3A και B).

Όμοια, η κυτταρομετρική ανάλυση των κυττάρων A549 έδειξε ότι σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του H₂O₂, συγκεκριμένα στα 200, 500 και 1000 μM H₂O₂, τα κύτταρα εμφάνισαν μια δόσο-εξαρτώμενη συσσώρευση στη φάση G2-M (32,61%, 44,35% και 38,19% στα A549/BIB αντίστοιχα) με μια μικρή αύξηση στη φάση υπο-G1 (Σχήμα 9.3A και B). Ωστόσο, η Pim-2(wt) αλλά όχι η Pim-2(DN) επαύξησε τη συσσώρευση των κυττάρων A549 στη φάση G2-M ως απόκριση στο H₂O₂ με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (43,69%, 58,39% και 53,26% στα A549 Pim-2(wt) αντίστοιχα, έναντι 21,22%, 28,49% και 25,81% στα A549 Pim-2(DN) αντίστοιχα). Επιπλέον, τα A549 Pim-2(DN) παρουσίασαν μια αύξηση του κυτταρικού δυναμικού στη φάση υπο-G1 συγκριτικά με αυτή των A549 BIB ή A549 Pim-2(wt) (Σχήμα 9.3A και B).

Συνολικά, τα αποτελέσματά έδειξαν ότι η ενισχυμένη έκφραση της Pim-2 προήγαγε τη συσσώρευση και των δυο κυτταρικών τύπων, MRC-5 TERT και A549, στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση στο H₂O₂.



Σχήμα 8.3. Η Pim-2 προήγαγε τη συσσώρευση τελομερισμένων ινοβλαστών MRC5 TERT στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση στο H_2O_2 . (A) και (B): Έγινε σπορά αθανатоποιημένων ινοβλαστών MRC-5 TERT/BIB και από MRC-5 TERT/Pim-2(wt) ανά 10 cm τρυβλίο και επώαστηκαν για 24 h. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα εκτέθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις H_2O_2 για 2 h και μετά την επώασή τους για 24 h απουσία H_2O_2 , συλλέχθηκαν για κυτταρομετρία ροής που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το CycleTest™ DNA Reagent kit.



Σχήμα 9.3. Η Pim-2 προήγαγε τη συσσώρευση των καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων A549/BIB, A549/Pim-2(wt) και A549/Pim-2(DN) στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση στο H_2O_2 . (A) και (B): Έγινε σπορά των καρκινικών κυττάρων A549/BIB, A549/Pim-2(wt) και A549/Pim-2(DN) ανά 10 cm τρυβλίο και επωάστηκαν για 24 h. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα εκτέθηκαν σε H_2O_2 για 2 h και μετά την επώασή τους για 24 h απουσία H_2O_2 , συλλέχθηκαν για κυτταρομετρία ροής που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το CycleTest™ DNA Reagent kit.

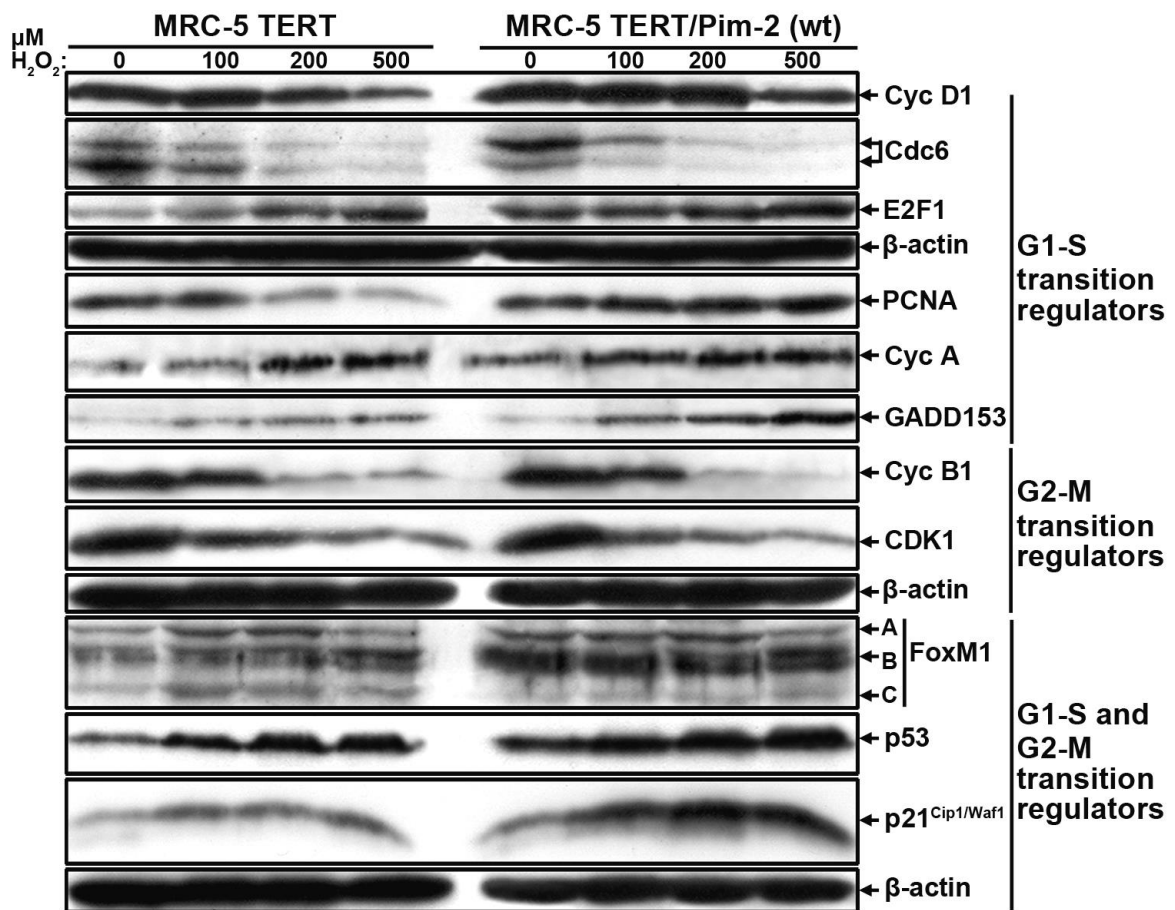
Για να διερευνηθεί ο μηχανισμός με τον οποίο η Pim-2 επηρέασε την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση στο H₂O₂, αναλύθηκε η έκφραση εκλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και συγκεκριμένα κατά τις φάσεις στη G1-S και G2-M των κυττάρων MRC-5 TERT (Σχήμα 8.3.) και A549 (Σχήμα 9.3.).

Το H₂O₂ μειορρύθμισε τα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1 κατά δόσο-εξαρτώμενο τρόπο στα κύτταρα MRC-5 TERT/BIB και MRC-5 TERT/Pim-2(wt), ωστόσο, ο τελευταίος κυτταρικός τύπος έκφραζε κατά ένα βαθμό υψηλότερα επίπεδα της κυκλίνης D1 (Σχήμα 10.3.). Ενώ τα επίπεδα της Cdc6 μειορρυθμίστηκαν και στα MRC-5TERT/BIB και στα MRC-5 TERT/Pim-2(wt) ως απόκριση στις αυξανόμενες συγκεντρώσεις του H₂O₂, τα επίπεδα του E2F1, ενός μεταγραφικού ενεργοποιητή του γονιδίου της Cdc6, αυξορρυθμίστηκαν και στους δυο κυτταρικούς τύπους ως απόκριση στο H₂O₂ με υψηλότερα επίπεδα συσσωρευμένα στα κύτταρα που εκφράζανε την Pim-2(wt) σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου. Αντίθετα, τα επίπεδα της PCNA, ένας άλλος μεταγραφικός στόχος του E2F1, μειορρυθμίστηκαν από το H₂O₂ κατά ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο στα MRC-5 TERT/BIB αλλά αυξορρυθμίστηκαν στα MRC-5 TERT Pim-2(wt). Ένας τρίτος στόχος του E2F1, η κυκλίνη A, παρουσίασε το ίδιο μοτίβο έκφρασης με αυτό του E2F1; Τα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης A αυξορρυθμίστηκαν και στους δυο κυτταρικούς τύπους ως απόκριση στο H₂O₂ με υψηλότερα επίπεδα συσσωρευμένα στα κύτταρα που εκφράζανε την Pim-2(wt) σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου. Η GADD153 είναι ένας δείκτης στρες και επιβράδυνσης της προόδου του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1-S ή G2-M (MacLachlan et al., 200; Lin et al., 2008). Τα επίπεδα της GADD153 μειορρυθμίστηκαν δόσο-εξαρτώμενα από το H₂O₂ και στα MRC-5 TERT/BIB και MRC-5 TERT/Pim-2(wt) με υψηλότερα επίπεδα στον τελευταίο κυτταρικό τύπο (Σχήμα 10.3.).

Στη συνέχεια αναλύθηκε η έκφραση ρυθμιστικών πρωτεϊνών της φάσης G2-M, όπως της κυκλίνης B1 και της CDK1(CDC2). Η ανάλυση με ανοσο-αποτύπωμα κατά western έδειξε ότι το H₂O₂ μειορρύθμισε τα επίπεδα έκφρασης και της κυκλίνης B1 και της CDK1 στα MRC-5 TERT/BIB και MRC-5 TERT/Pim-2(wt) στον ίδιο βαθμό (Σχήμα 10.3.).

Ανάλυση της έκφρασης ρυθμιστών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της προόδου των φάσεων G1-S και G2-M του κυτταρικού κύκλου έδειξε ότι το H₂O₂ επήγαγε την αυξορρύθμιση των επιπέδων της FoxM1 και συγκεκριμένα της ισομορφής FoxM1B κατά ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο στα κύτταρα MRC-5 TERT/BIB και MRC-5 TERT/Pim-2(wt), με τα υψηλότερα επίπεδα να εμφανίζονται στον τελευταίο κυτταρικό τύπο (Σχήμα 10.3.). Σημαντικό είναι ότι το H₂O₂ επήγαγε την p53 και την πρωτεΐνη-στόχο της p21^{Cip1/Waf1}, κατά δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, στα κύτταρα MRC-5 TERT/BIB αλλά τα επίπεδα έκφρασης της ήταν πολύ υψηλότερα στα κύτταρα MRC-5 TERT/Pim-2(wt) (Σχήμα 10.3.).

Συνολικά, αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ενώ το H₂O₂ επήγαγε την αυξορρύθμιση των επιπέδων έκφρασης των FoxM1, p53 και p21^{Cip1/Waf1} και τη μειορρύθμιση των επιπέδων έκφρασης της Cdc6 που εμπλέκονται στη ρύθμιση της μετάβασης των φάσεων G1-S και G2-M του κυτταρικού κύκλου, οι επιδράσεις του H₂O₂ στην έκφραση αυτών των πρωτεϊνών ήταν πιο προφανείς στα κύτταρα MRC-5 TERT/Pim-2(wt).



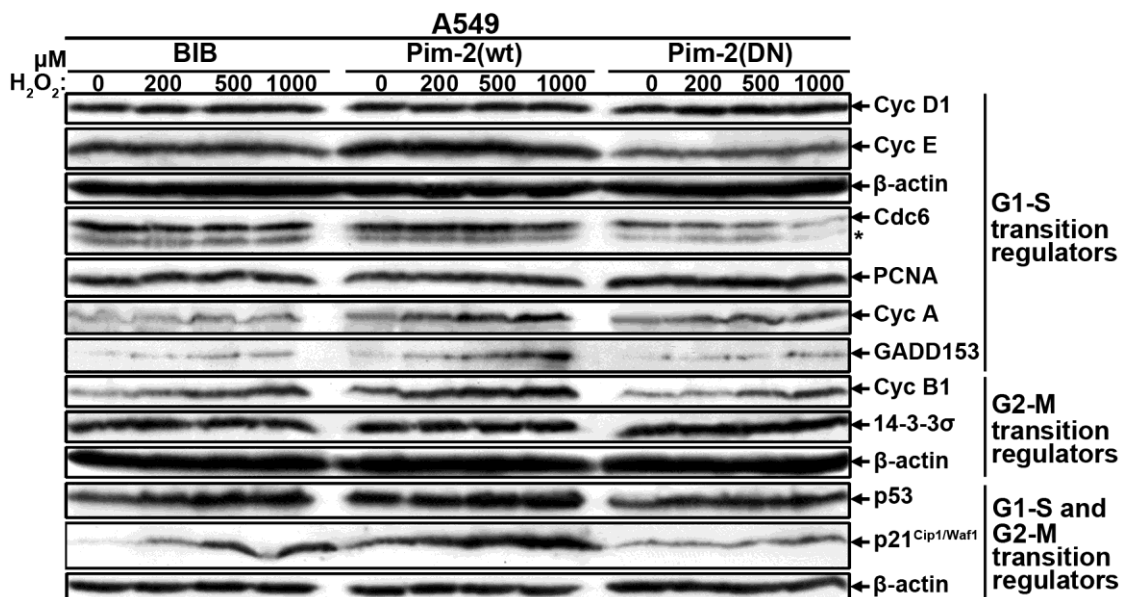
Σχήμα 10.3. Ανάλυση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στις ινοβλάστες MRC-5 TERT/BIB και MRC5 TERT/Pim-2(wt) που εκτίθενται σε H₂O₂. Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν από τους διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς των ινοβλαστών MRC-5 TERT/BIB και MRC5 TERT/Pim-2(wt) παρουσία ή απουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων H₂O₂ και αναλύθηκαν με ανοσο-αποτύπωμα για την έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση των φάσεων G1-S και G2-M του κυτταρικού κύκλου όπως κυκλίνη D1, Cdc6, E2F1, PCNA, κυκλίνη A, GADD153, κυκλίνη B1, CDK1, FoxM1, p53 και p21. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων έγινε με την ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης της β-ακτίνης.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε παρόμοια ανάλυση στα κύτταρα A549 BIB, A549 Pim-2(wt) και A549 Pim-2(DN) επεξεργασμένα και μη με H₂O₂ (Σχήμα 11.3.). Το H₂O₂ δεν επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1, κυκλίνης E, Cdc6 και PCNA (Σχήμα 11.3.). Ωστόσο, τα επίπεδα της κυκλίνης E ήταν υψηλότερα στα A549 Pim-2(wt) αλλά όχι στα A549 Pim-2(DN) συγκρινόμενα με τα κύτταρα ελέγχου A549 BIB. Επιπλέον, η έκφραση της Pim-2(DN) αλλά όχι της Pim-2(wt) συνέβαλε σε μια αξιοσημείωτη μειορύθμιση της Cdc6 ως απόκριση στο H₂O₂ (Σχήμα 11.3.).

Τα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης A, GADD153 και κυκλίνης B1 αλλά όχι της 14-3-3σ, αυξορρυθμίστηκαν από το H₂O₂ δόσο-εξαρτώμενα και επαυξήθηκαν επιπλέον από την παρουσία της Pim-2(wt) αλλά όχι της Pim-2(DN) στα κύτταρα A549 συγκρινόμενα με τα κύτταρα ελέγχου A549 BIB (Σχήμα 11.3.). Όμοια με τα MRC-5 TERT, το H₂O₂ αυξορρυθμισε τον άξονα p53 - p21^{Cip1/Waf1}, ως απόκριση στο H₂O₂ σε όλους τους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους A549, με τα υψηλότερα επίπεδα αυτών των πρωτεϊνών να ανιχνεύονται στα A549 που εκφράζανε την Pim-2(wt) και όχι την Pim-2(DN), συγκρινόμενα με τα κύτταρα ελέγχου A549 BIB. Είναι γεγονός ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα των p53 και p21^{Cip1/Waf1} μειώθηκαν στα A549 Pim-2(DN) σε σύγκριση με τα A549 BIB (σχήμα 11.3.).

Συνολικά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυκλίνης A, GADD153, κυκλίνης B1 και ο άξονας p53 - p21^{Cip1/Waf1} αυξορρυθμίστηκαν στα A549 που εκφράζανε την Pim-2(wt).

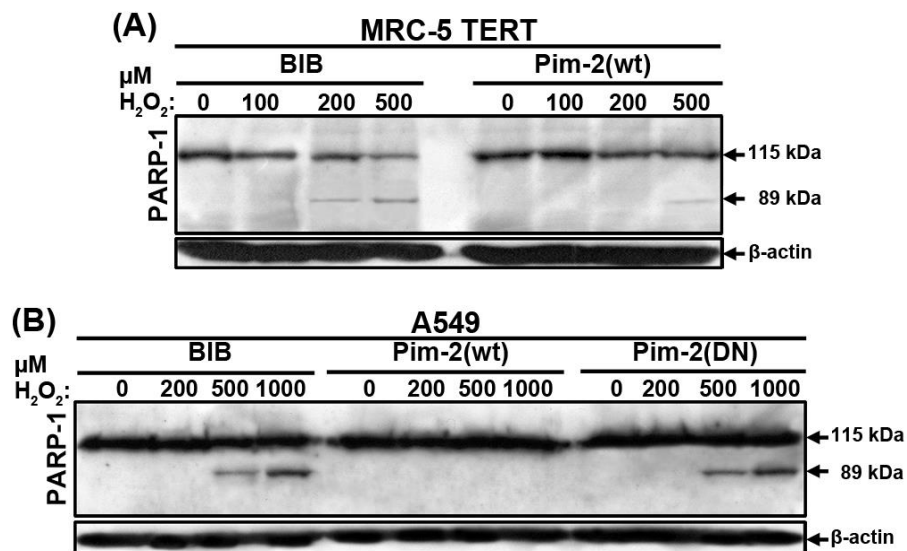
Μελετώντας τις μεταβολές στην έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα MRC-5 TERT και A549, συμπεράναμε ότι η επαγωγή κυρίως του άξονα p53 - p21^{Cip1/Waf1} και της GADD153 και σε μικρότερο βαθμό της κυκλίνης A, ήταν υπεύθυνα για την αυξημένη συσσώρευση των κυττάρων που εκφράζανε την Pim-2(wt) στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου, ως απόκριση στο H₂O₂.



Σχήμα 11.3. Ανάλυση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στα επιθηλιακά καρκινικά A549 που εκτίθενται σε H₂O₂. Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν από τους διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς των καρκινικών κυτάρων A549 παρουσία ή απουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων H₂O₂ και αναλύθηκαν με ανοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση των φάσεων G1-S και G2-M του κυτταρικού κύκλου όπως κυκλίνης D1, Cdc6, E2F1, PCNA, κυκλίνης A, GADD153, κυκλίνης B1, CDK1, FoxM1, p53 και p21. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων έγινε με την ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης της β-ακτίνης.

7.3. Η Pim-2 επέφερε προστασία στα κύτταρα MRC-5 TERT και A549 από την επαγόμενη από το H₂O₂ απόπτωση

Επειδή η Pim-2 δρα ως επιβιωτικός παράγοντας στην απόκριση πολλών αποπτωτικών ερεθισμάτων (Fox et al., 2003; White et al., 2003) και επάγεται από το H₂O₂ και δεύτερον επειδή η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής απέδειξε αύξηση των κυτταρικών πληθυσμών MRC-5 TERT (8.3) και A549 (9.3) στη φάση υπο-G1 ως απόκριση στο H₂O₂, μελετήθηκε στη συνέχεια η έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην απόπτωση με σκοπό να επιβεβαιωθεί η απόπτωση των κυττάρων που επάγεται από το H₂O₂ (Σχήμα 12.3.). Για το σκοπό αυτό απομονώθηκαν ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα απουσία/παρουσία H₂O₂ και αναλύθηκε με ανοσο-αποτύπωμα κατά western, η έκφραση της PARP-1, ενός αξιόπιστου δείκτη της απόπτωσης. Η ανάλυση έδειξε ότι το H₂O₂ επήγαγε την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP-1 την ανέπαφη μορφή του ενζύμου στα 115 kDa και τη διασπώμενη στα 89 kDa, κάτι το οποίο παρατηρήθηκε στα συγκέντρωση 500 μM H₂O₂ στα κύτταρα MRC-5 TERT αλλά όχι στα MRC5 TERT/Pim-2(wt) (Σχήμα 12.3A). Όμοια, το H₂O₂ επήγαγε την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP-1 την ανέπαφη μορφή του ενζύμου στα 115 kDa και τη διασπώμενη στα 89 kDa στις συγκεντρώσεις 500 και 1000 μM H₂O₂ στα A549 BIB και A549 Pim-2(DN) αλλά όχι στα A549 Pim-2(wt) (Σχήμα 12.3B).



Σχήμα 12.3. Η Pim-2 επέφερε προστασία στα κύτταρα MRC-5 TERT και A549 ως απόκριση στο H₂O₂. Απομονώθηκαν ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από ανθρώπινες τελομερισμένες ινοβλάστες MRC-5 TERT **(A)** και από ανθρώπινα καρκινικά επιθηλιακά πνεύμονα A549 **(B)** στα οποία είχαν χορηγηθεί αυξανόμενες συγκεντρώσεις H₂O₂ και αναλύθηκε με ανοσο-αποτύπωμα κατά western η έκφραση της PARP-1, ενός αξιόπιστου δείκτη της κυτταρικής απόπτωσης.

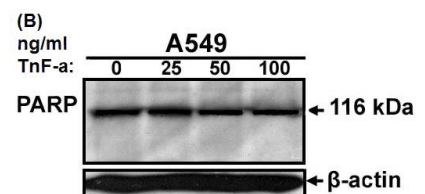
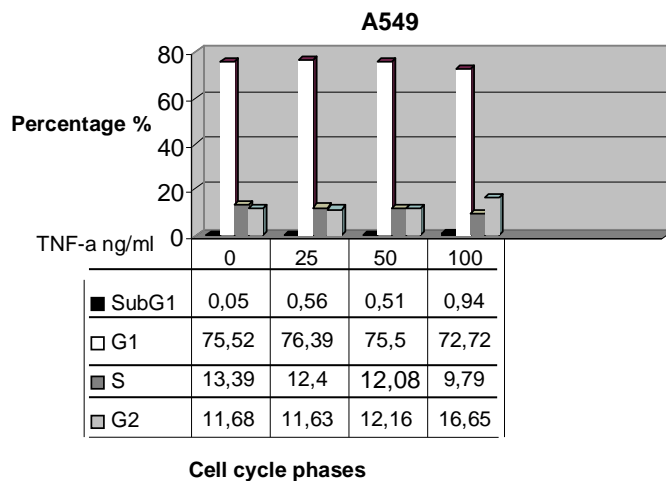
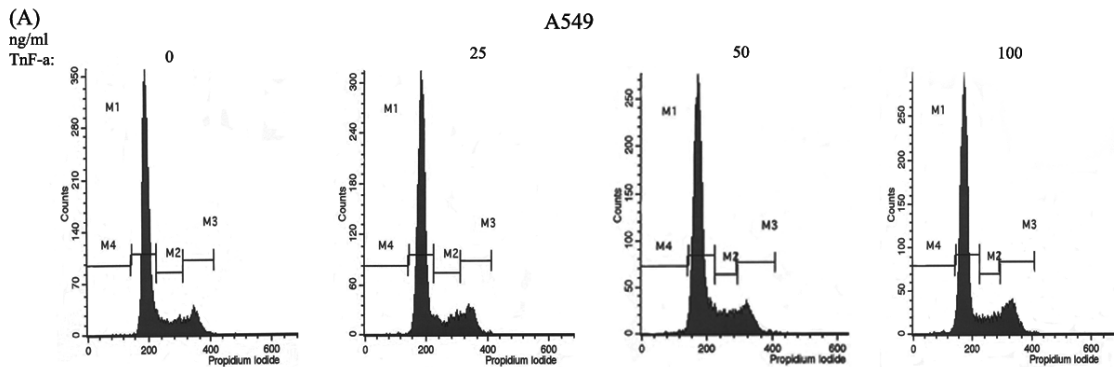
8.3. Η κυτταροκίνη TNF-a δεν προκάλεσε απόπτωση στα κύτταρα A549.

Ο παράγοντας TNF-a εμπλέκεται στην επαγωγή της απόπτωσης, της φλεγμονής και στην αναστολή της ογκογένεσης. Μελέτες αναφέρουν ότι η απορρύθμιση της λειτουργίας του TNF-a συμβάλλει στην ανθρώπινη παθογένεση, όπως ο καρκίνος.

Ο παράγοντας TNF, ως αντίδραση στη φλεγμονή, παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα μακροφάγα και T-λεμφοκύτταρα. Με τη σύνδεση του στον TNFR1 ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-κB και AP-1 οι οποίοι με τη σειρά τους επάγουν την έκφραση προφλεγμονωδών και ανοσοτροποποιητικών γονιδίων. Η σύνδεση όμως των TNF και TNFR1 σε κάποια κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση, γεγονός το οποίο παρατηρείται σπάνια όταν αναστέλλεται η πρωτεϊνοσύνθεση. Ο TNF προκαλεί τον τριμερισμό του TNFR1 μετά τη σύνδεση του σε αυτόν με αποτέλεσμα τη σύνδεση των «περιοχών θανάτου» των υποδοχέων. Στη συνέχεια το μόριο TRADD συνδέεται με τη δική του περιοχή θανάτου (DD), λειτουργώντας ως διαμεσολαβητής μεταξύ του ενεργοποιημένου υποδοχέα και των σηματοδοτικών μορίων. Ο παράγοντας TNFR2 συνδεόμενος με τον TNFR1 και RIP, η οποία αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα, πυροδοτεί οδούς σημάτων, οι οποίες οδηγούν τελικά στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και JNK/AP-1, ενώ το μόριο FADD οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση (Ashkenazi et al., 1998; Tartaglia et al., 1992; Beg et al., 1996).

Εκτιμήθηκαν οι επιδράσεις του TNF-a στα κύτταρα A549. Τα καρκινικά κύτταρα A549 επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 0-100ng/ml TNF-a και στη συνέχεια κυτταρομετρήθηκαν μετά από 24 ώρες. Παρατηρήθηκε ότι ο παράγοντας TNF-a δεν προκάλεσε καμία επίδραση στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των A549 (Σχήμα 13.3A).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκαν ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα απουσία/παρουσία TNF-a και αναλύθηκε με ανοσο-αποτύπωμα κατά western η έκφραση της PARP-1. Η ανάλυση έδειξε ότι ο TNF-a επήγαγε την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP-1 αλλά μόνο την ανέπαφη μορφή του ενζύμου στα 116 kDa (Σχήμα 13.3B). Τα αποτελέσματα από την ανάλυση με κυτταρομετρία ροής και με ανοσοαποτύπωμα κατά western έδειξαν ότι δε μεσολαβείται απόπτωση μέσω TNF-a στα κύτταρα A549 (Σχήμα 13.3).



13.3. Ο παράγοντας TNF-a δεν επήγαγε απόπτωση στα κύτταρα A549. (A) Καρκινικά κύτταρα A549 εκτέθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις 0 - 100 ng/ml TNF-a και τα κύτταρα συλλέχθηκαν για κυτταρομετρία ροής μετά από 24 ώρες. (B) Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν από A549 παρουσία ή απουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων TNF-a και αναλύθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της PARP-1 με ανοσο-αποτύπωμα κατά western.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά τον αερόβιο μεταβολισμό παράγονται συνεχώς μικρές ποσότητες δραστικών μορφών οξυγόνου στους οργανισμούς. Οι κυτταρικοί αντι-οξειδωτικοί μηχανισμοί αντιμετωπίζουν πολλές φορές επιτυχώς τη συσσώρευση των ενδογενών ΔΜΟ, αλλά όταν η ισορροπία μεταβάλλεται, τότε επικρατεί μια κατάσταση που ονομάζεται οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβη σε σημαντικά βιομόρια και όταν συσσωρεύεται συμβάλλει σε βιολογικές επιδράσεις στις πορείες μεταγωγής σημάτων και την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέχρι την πρόκληση μεταλλάξεων και κυτταρικό θάνατο.

Η απόπτωση αποτελεί ένα ενδογενές πρόγραμμα κυτταρικής αυτοκτονίας απαραίτητο για την εξάλειψη ανεπιθύμητων κυττάρων και για τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών. Η απόπτωση και ο καρκίνος είναι δυο φαινόμενα αντίθετα, αλλά έχει αναφερθεί ότι οι δραστικές μορφές οξυγόνου παίζουν σημαντικό ρόλο και στα δυο. Τα κύτταρα αντιδρούν αμέσως στην ανισορροπία της οξειδοαναγωγής με πληθώρα βιολογικών αποκρίσεων όπως αναστολή συγκεκριμένων φάσεων του κυτταρικού κύκλου, μεταγραφή γονιδίων, έναρξη πορειών μεταγωγικής σηματοδότησης και επιδιόρθωση βλαβών του DNA. Αυτά τα γεγονότα καθορίζουν εάν το κύτταρο εισέλθει στη νέκρωση, τη γήρανση, την απόπτωση ή την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό. Οι ΔΜΟ ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες και ένας από τους σημαντικότερους είναι ο πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ, που εμπλέκεται στην αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης.

Η ρύθμιση της επιβίωσης των κυττάρων παίζει ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης και στην απόκριση σε βλάβες, ενώ απορρυθμίζεται σε διάφορες ασθένειες. Επιβιοτικοί παράγοντες αυξάνουν την επιβίωση των κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης πορειών μεταγωγής σήματος που αποτελούνται συχνά από καταρράκτες πρωτεϊνικών κινασών, μεταξύ των οποίων είναι και η πορεία των IKK/NF-κΒ. Μέσω φωσφορυλίωσης συγκεκριμένων υποστρωμάτων, η επιβίωση μπορεί να είναι προφανής με πολλούς τρόπους που εκτείνονται από τη ρύθμιση της μεταγραφής μέσω της άμεσης τροποποίησης των αποπτωτικών επηρεαστών.

Μεταξύ των γονιδίων-στόχων του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ είναι και η Pim-2.

Επειδή: (α) οι επιδράσεις της Pim-2 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό δεν έχουν αποσαφηνιστεί, και (β) η Pim-2 αυξάνει την κυτταρική επιβίωση και αποτελεί γονίδιο-στόχο του NF-κΒ, ενός παράγοντα ευαίσθητου στις οξειδο-αναγωγικές μεταβολές, στην παρούσα διδακτορική διατριβή έγιναν προσπάθειες να αποσαφηνιστεί: **(α)** ο ρόλος της πρωτεϊνικής κινάσης σερίνης/θρεονίνης Pim-2 στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου φυσιολογικών (IMR-90), και δυνητικά αθανатоποιημένων (MRC-5 TERT) ανθρωπίνων ινοβλαστών πνεύμονα καθώς επίσης και καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα (A549), και **(β)** στην επαγόμενη απόπτωση από οξειδωτικό στρες όπως αυτή που προκαλείται από το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) των τελομερισμένων ινοβλαστών MRC-5 TERT και των καρκινικών κυττάρων A549.

Για το σκοπό αυτό κατασκευάσθηκαν σταθεροί κυτταρικοί πληθυσμοί ή κλώνοι ανθρώπινων φυσιολογικών ινοβλαστών IMR-90, τελομερισμένων ινοβλαστών MRC-5 TERT και καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων A549 πνεύμονα μετά από επιμόλυνση με ελαττωματικής αντιγραφής αμοτροπικούς ρετροϊούς που έφεραν είτε έναν πρότυπο φορέα ελέγχου BIB, την αγρίου τύπου Pim-2(wt) [(BIB-Pim-2(wt))] ή την κυρίαρχη-αρνητική μεταλλαγμένη μορφή της Pim-2(DN) [(BIB-Pim-2(DN))]. Αρχικά μελετήθηκαν οι επιδράσεις της Pim-2 στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και στη συνέχεια οι αποκρίσεις τους στο οξειδωτικό στρες μετά τη χορήγηση H₂O₂.

Ο ρόλος της πρωτεϊνικής κινάσης σερίνης/θρεονίνης Pim-2 στην καρκινογένεση: Επιδράσεις της στην απόπτωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Η Pim-2 ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνικών κινάσων σερίνης/θρεονίνης Pim, η οποία αποτελείται από τρία μέλη: Pim-1, Pim-2 και Pim-3. Αυτές οι τρεις κινάσες Pim εμφανίζουν μεγάλη ομολογία αλλά διαφέρουν ως προς την ιστο-ειδική τους έκφραση. Τα προϊόντα των γονιδίων Pim αποτελούνται από 6 τουλάχιστον ισομορφές: κοντή και μακριά ισομορφή Pim-1S και Pim-1L, αντίστοιχα; Κοντή, μεσαία και μακριά ισομορφή Pim-2S, Pim-2M και Pim-2L, αντίστοιχα λόγω της χρήσης του

εναλλακτικού κωδικωνίου έναρξης της μετάφρασης-CTG; και Pim-3 (White, 2003; Amaravadi and Thompson, 2005).

Οι κινάσες Pim έχουν ενοχοποιηθεί στην καρκινογένεση. Η κατασκευή διαγονιδιακών ποντικών Pim-1 ή Pim-2, έδειξε ότι αυτές οι κινάσες Pim συμβάλλουν στην ανάπτυξη λεμφωμάτων και λευχαιμιών (White, 2003; Amaravadi and Thompson, 2005). Επίσης η έκφραση των κινασών Pim είναι συχνά αυξημένη σε ασθενείς με λεμφώματα και λευχαιμίες (Alizadeh et al., 2000; Cohen et al., 2004), με καρκίνο του προστάτη (Chen et al., 2005) και του ήπατος (Gong et al., 2009), αλλά και σε άλλες μορφές καρκίνου (Amson et al., 1989; Allen et al., 1996; Yoshida et al., 1999; Wang et al., 2001; Dhanasekaran et al., 2001; Neill and Kelsell 2001; Claudio et al., 2002; Cohen et al., 2004; Li et al., 2006; Popivanova et al., 2007), αναδεικνύοντας έτσι τη συμβολή των Pim στην εξέλιξη του καρκίνου.

Επιπλέον, οι κινάσες Pim αποκρίνονται σε κυτταροκίνες και σε αυξητικούς παράγοντες σε ένα μεγάλο αριθμό ιστών. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Pim-2 καθώς επίσης και η ενεργότητα του ενζύμου καταστέλλονται δραματικά με την αφαίρεση της IL-3 από λεμφοκύτταρα των οποίων η αύξηση και η επιβίωση εξαρτώνται από την παρουσία της IL-3. Επίσης η υπερέκφραση της Pim-2 εμποδίζει την απόπτωση που προκαλείται στα κύτταρα που στερούνται IL-3. Τέλος, η απάλειψη της Pim-2 ή η υπερέκφραση μιας κυρίαρχης-αρνητικής μεταλλαγμένης μορφής (dominant-negative mutant) της Pim-2, κατέστειλαν την κυτταρική επιβίωση εξαρτώμενη από την IL-3, ενισχύοντας το εμπλοκή της Pim-2 ως διαμεσολαβητή στην IL-3-εξαρτώμενη επιβίωση των λεμφοκυττάρων (Fox et al., 2003; White, 2003; Amaravadi and Thompson, 2005).

Ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους οι κυτταροκίνες ασκούν τις επιδράσεις τους είναι μέσω της ενεργοποίησης της πορείας μεταγωγής σήματος των JAK-STAT. Αρκετοί μηχανισμοί όμως έχουν χαρακτηριστεί με τους οποίους ελέγχεται η ένταση και η διάρκεια της ενεργοποίησης των JAK-STAT. Η πρωτεΐνη Socs-1 έχει χαρακτηριστεί ως ένας ισχυρός ανατροφοδοτικός αναστολέας της ενεργοποίησης των JAKs. Η Socs-1 δεσμεύεται στις JAKs και καταστέλλει την ενεργότητα τους. Επομένως οι κυτταροκίνες διεγείρουν τη πορεία μεταγωγής σήματος των JAK-STAT που με τη σειρά της ενεργοποιεί τη μεταγραφή του Socs-1. Η πρωτεΐνη Socs-1 μετατοπίζεται στους υποδοχείς των κυτταροκινών και καταστέλλει την ενεργότητα των JAKs (αρνητικός ανατροφοδοτικός μηχανισμός ρύθμισης). Η Socs-1 όμως είναι

μια ασταθής πρωτεΐνη και ρυθμίζεται από την Pim-2. Η Pim-2 δεσμεύεται και φωσφορυλιώνει τη Socs-1 με αποτέλεσμα να αυξάνει τη σταθερότητάς της και να επιμηκύνει την περίοδο ημι-ζωής της. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την επαύξηση της ανασταλτικής δράσης στην ενεργοποίηση των JAK-STAT και επομένως στη ρύθμιση των JAK-STAT πορειών μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούνται από κυτταροκίνες (Chen et al., 2002).

Επιδράσεις της Pim-2, ενός γονιδίου-στόχου του NF-κB, στην απόπτωση

Η επίπτωση της Pim-2 στην επιβίωση των κυττάρων είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος λαμβάνοντας υπόψη τον προηγούμενο γνωστό ρόλο της για την προαγωγή της λεμφωμαγένεσης. Όμως ο μηχανισμός με τον οποίο οι κινάσες Pim προάγουν την ανάπτυξη των λεμφωμάτων ήταν εν πολλοίς άγνωστος. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η Pim-2 προάγει την επιβίωση κυττάρων που εξαρτούνται από την IL-3, και ότι η μη-κατάλληλη ενεργοποίηση της παρεμποδίζει την απόπτωση, παρέχοντας έναν πιθανό μηχανισμό συνέργιας της Pim-2 με άλλους ογκογόνους παράγοντες για τη δημιουργία λεμφωμάτων (White et al., 2003).

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η υπερέκφραση της Pim-2 προάγει τη μακροπρόθεσμη επιβίωση των κυττάρων και όχι μόνο στη στέρηση IL-3, αλλά σε μια μυριάδα άλλων τοξικών ερεθισμάτων όπως σταυροσπορίνη (staurosporine), ένας ευρέως φάσματος αναστολέας των κινασών, που επάγει την απόπτωση διαφόρων κυτταρικών σειρών, θαψιγαργίνη (thapsigargin), η οποία επάγει απόπτωση αναστέλλοντας την Ca^{2+} -ATPάση του ενδοπλασματικού δικτύου και ραπαμυκίνη (rapamycin; TOR) (Fox et al., 2003; Fox et al., 2005; Hammerman et al., 2005; Adam et al., 2006). Αυτό δείχνει ότι τουλάχιστον ένας στόχος της Pim-2 είναι κοινός για πολλές αποπτωτικές πορείες. Η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bad στην πραγματικότητα φωσφορλιώνεται στο κατάλοιπο σερίνης 112 από την Pim-2 μια διαδικασία που ως γνωστό αποτρέπει την αλληλεπίδραση Bad-Bcl- X_L και επομένως την απόπτωση (Fox et al., 2003; Yan et al., 2003; McDonald et al., 2006; Peng et al., 2007; Gong et al., 2009). Επίσης η Pim-2 διατηρεί το δυναμικό των μιτοχονδρίων κυττάρων που καλλιεργούνται απουσία αυξητικών παραγόντων, τον αναερόβιο μεταβολισμό τους, τη γλυκόλυση και επιφέρει προστασία από την ατροφία. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η Pim-2 ρυθμίζει μάλλον περισσότερο την κυτταρική

επιβίωση από ότι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επομένως μπορεί να εξηγήσει την ικανότητα της να συνεργεί με το ογκογονίδιο c-myc στον νεοπλασματικό μετασχηματισμό λεμφοκυττάρων (Fox et al., 2003; White et al., 2003). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η Pim-2 φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη c-myc και τη σταθεροποιεί, εξηγώντας έτσι τη συνέργεια της Pim-2 και c-myc στη λεμφωμαγένεση (Zhang et al., 2008). Η Pim-2 φωσφορυλιώνει επίσης τη 4E-BP1 στο κατάλοιπο σερίνης 65 και αναστέλλει την προ-αποπτωτική δράση της (Fox et al., 2003; Peng et al., 2007; Gong et al., 2009). Με οποιοδήποτε μηχανισμό και αν η Pim-2 προάγει την κυτταρική επιβίωση από κυτταροκίνες, είναι βέβαιο ότι η Pim-2 μπορεί να θεωρηθεί στόχος για την αντικαρκινική ανακάλυψη φαρμάκων (Amaravadi and Thompson, 2005).

Επομένως ένας μηχανισμός με τον οποίο η Pim-2 συμβάλλει στην καρκινογένεση είναι διαμέσου της καταστολής της απόπτωσης (White et al., 2003; Amaravadi and Thompson, 2005) φυσιολογικών και καρκινικών λεμφοκυττάρων, (Fox et al., 2003; Yan et al., 2003; Fox et al., 2005; Hammerman et al., 2005a; Hammerman et al., 2005b; Woodland et al., 2007) και καρκινικών κυττάρων ήπατος (Gong et al., 2009), προστάτη (Dai et al., 2005a; Dai et al., 2005b) και φυσιολογικών χονδροκυττάρων (Bohensky et al., 2007).

Όμως, επιπλέον μελέτες έδειξαν ότι η Pim-2 συμβάλλει στην καρκινογένεση διαμέσου των πορειών ενεργοποίησης του μεταγραφικού πυρηνικού παράγοντα NF-κB. Επομένως, η Pim-2 θεωρείται ως μια ογκογόνος κινάση σερίνης/θρεονίνης. Η ενεργοποίηση του NF-κB, που παραδοσιακά έχει συνδεθεί με τη φλεγμονή και την ανοσία, έχει ενοχοποιηθεί στον καρκίνο (Karin and Greten, 2005; Luo et al., 2005; Tergaonkar, 2006). Προάγοντας τον πολλαπλασιασμό και καταστέλλοντας την απόπτωση, ο NF-κB μπορεί να μεταβάλλει την ισορροπία μεταξύ πολλαπλασιασμού και απόπτωσης προς την κακοήθη συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων. Επομένως δεν είναι παράδοξο ότι η καταστολή του NF-κB, παρεμβαίνοντας στα δύο στάδια-κλειδιά μεταγωγής σήματος του, στην ενεργοποίηση των IKK και στην αποδόμηση της IκB, θεωρείται ως μια υποσχόμενη προσέγγιση για τη θεραπεία του καρκίνου (Karin et al., 2004).

Η Pim-2 αποτελεί γονίδιο-στόχο του NF-κB (Li et al., 2001; Hammerman et al., 2004), ένας μεταγραφικός παράγοντας ευαίσθητος στις οξειδο-αναγωγικές μεταβολές (Gloire et al., 2006). Μελέτες έδειξαν ότι η υπερέκφραση της Pim-2 συσχετιζόταν με

τη μεταγραφική ενεργότητα του NF-κB και την έκφραση πολλών γονιδίων-στόχων του όπως Bcl-X_L και c-IAP2 που εμπλέκονται στην καταστολή της απόπτωσης. Σε αντίθεση, η υπερέκφραση ενός υπερ-καταστολέα της ενεργοποίησης της κανονικής πορείας του NF-κB, IκBΔN, κατέστειλε τις θετικές επιδράσεις της Pim-2 στην κυτταρική επιβίωση και την καρκινογένεση που επάγεται από τη συνέργεια της Pim-2 και του ογκογονιδίου Myc (Hammerman et al., 2004).

Επιδράσεις της Pim-2 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Ελάχιστες μελέτες έδειξαν ότι οι κινάσες Pim (Pim-1, Pim-2 και Pim-3) προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων προσάτη διαμέσου της αυξορρύθμισης της πρωτεΐνης c-myc (Chen et al., 2005), ενώ η αποσιώπηση και των τριών κινασών Pim επιβραδύνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όπως προκύπτει από την απάλειψη τους σε διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία επιβιώνουν αλλά ο αριθμός των κυττάρων τους και το σωματικό μέγεθος τους είναι μειωμένο (Mikkers et al., 2004). Μολονότι οι φωσφατάση CDC25A που εμπλέκεται στη ρύθμιση της φάσης G1-S και της φωσφατάσης CDC25C που εμπλέκεται στη ρύθμιση της φάσης G2-M φωσφορυλιώνονται από την Pim-1, ο ρόλος αυτών των τροποποιήσεων ή γενικότερα της Pim-1 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό δεν έχουν μελετηθεί (Mochizuki et al., 1999; Bachmann et al., 2004; Bachmann et al., 2006). Πρόσφατα δείχτηκε ότι οι κινάσες Pim-1 και Pim-2 δεσμεύουν και φωσφορυλιώνουν τον αναστολέα των κυκκλινο-εξαρτώμενων κινασών p27^{Kip1} στις θρεονίνες 157 και 198, η οποία εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1-S και G2-M, αλλά και στην κυτταρική επιβίωση (Hiromura et al., 1999; Borriello et al., 2007). Η φωσφορυλίωση της p27^{Kip1} που εξαρτάται από τις Pim προάγει τη δέσμευση της στην πρωτεΐνη 14-3-3, την επακόλουθη εξαγωγή της από τον πυρήνα και την αποδόμηση της από το πρωτεόσωμα. Σε αντίθεση, η αποσιώπηση των Pim είχε σαν αποτέλεσμα την αυξορρύθμιση της p27^{Kip1}. Επιπλέον, οι κινάσες Pim μειορρύθμισαν την έκφραση της p27^{Kip1} στο μεταγραφικό επίπεδο διαμέσου της φωσφορυλίωσης και απενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων Foxo1a και Foxo3a. Η υπερέκφραση των κινασών Pim διέσωσε τα καρκινικά κύτταρα HEK293T από τη διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 που προκλήθηκε από την υπερέκφραση της p27^{Kip1}. Επομένως αυτές οι μελέτες έδειξαν οι κινάσες Pim

προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μειορρυθμίζοντας την έκφραση της p27^{Kip1} (Morishita et al., 2008). Να σημειωθεί δε ότι η 14-3-3σ είναι μια πρωτεΐνη που επάγεται από την p53 και αναστέλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2-M μέσω σχηματισμού του συμπλέγματος CDK1(Cdc2)-κυκλίνη B1 στο κυτταρόπλασμα (Hermeking and Benzinger, 2006). Επιπλέον, ενισχύει την κυτταρική επιβίωση απενεργοποιώντας προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες (McDonald et al., 2006; Morrison, 2009). Επίσης, η χορήγηση αντι-νοηματικών ολιγονουκλεοτιδίων ενάντια στην Pim-2 σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 οδήγησε στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου τους στη φάση G1, χωρίς ενδείξεις του εμπλεκόμενου μηχανισμού (Dai et al., 2005).

Μολονότι η Pim-2 φαίνεται ότι προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μειορρυθμίζοντας την έκφραση της p27^{Kip1} σε καρκινικά κύτταρα (Morishita et al., 2008), και μόνο σε μια καρκινική κυτταρική σειρά, μια άλλη πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι οι κινάσες Pim-1 και Pim-2 καταστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προάγουν την κυτταρική γήρανση φυσιολογικών ινοβλαστών τρωκτικών (Hogan et al., 2008). Η υπερέκφραση της Pim-1 ή Pim-2 μαζί με την p53 σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα H1299 επήγαγε την έκφραση της p53. Επιπλέον η υπερέκφραση της Pim-1 ή της Pim-2 είχε σαν αποτέλεσμα την επαγωγή των ενδογενών επιπέδων έκφρασης των ARF, p53, Mdm2 και p21 σε φυσιολογικές ινοβλάστες ποντικού MEF και την προαγωγή της πρόωρης κυτταρικής γήρανσης τους (Hogan et al., 2008).

Είναι φανερό ότι η Pim-2 διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε καρκινικά κύτταρα (Morishita et al., 2008), ενώ καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προάγει την κυτταρική γήρανση φυσιολογικών κυττάρων (Hogan et al., 2008). Είναι φανερό ότι αυτές οι αντίθετες παρατηρήσεις σε σχέση με τις επιδράσεις της Pim-2 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό χρίζουν περαιτέρω μελέτη.

Επιδράσεις της Pim-2 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ινοβλαστών και επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα

Προκειμένου να εξετασθούν αρχικά οι επιδράσεις της Pim-2 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αναλύθηκε ο κυτταρικός κύκλος των MRC-5 TERT και A549 με κυτταρομετρία ροής. Ανάλυση από την κυτταρομετρία ροής ασύγχρονων καλλιιεργειών των διαφορετικών πληθυσμών ινοβλαστών και καρκινικών επιθηλιακών

κυττάρων έδειξε ότι η έκφραση της Pim-2 στις ινοβλάστες MRC5 TERT οδήγησε στην επιβράδυνση τους στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου, ενώ δεν παρατηρήθηκε παρόμοια επίδραση στα A549 (Σχήμα 2.3.) Επιπλέον, κατασκευάστηκαν ανθρώπινες φυσιολογικές ινοβλάστες IMR-90 στις οποίες η Pim-2(wt) επήγαγε τη συσσώρευση τους στη G1-S αλλά και στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου (Σχήμα 3.3.).

Προκειμένου να διερευνηθεί ο μηχανισμός της επιβράδυνσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στη φάση G2-M μελετήθηκε η έκφραση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα MRC-5 TERT και A549 ύστερα από τη διέγερσή τους με ορό για 24 και 48 ώρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η Pim-2(wt) ρύθμιζε διαφορετικά την έκφραση των κυκλινών σε αθανατοποιημένες ινοβλάστες MRC-5 TERT έναντι επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549: ενώ η έκφραση της κυκλίνης D1 (G1 και G2 φάση) (Sherr, 2002) αυξορρυθμίστηκε από την Pim2(wt) και στους δυο κυτταρικούς τύπους MRC-5 TERT και A549, μια επίδραση πιο εμφανή στον πρώτο κυτταρικό τύπο, η έκφραση της κυκλίνης E (G1-S φάση) αυξορρυθμίστηκε από την Pim-2(wt) μόνο στα κύτταρα A549 και η κυκλίνη A (φάση S) μόνο στα MRC-5 TERT. Επιπλέον, η Pim-2(wt) αυξορρυθμισε τα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης B1, 14-3-3σ και GADD45a (G2-M) στα κύτταρα MRC-5 TERT και όχι στα A549 (Σχήμα 4.3.).

Αυτά τα ευρήματα ήταν σημαντικά καθώς η GADD45a αποτελεί κατάρρους στόχο της p53, αναστέλλει την κινάση CDK1 και μπορεί να επάγει την καταστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2-M (Siafakas and Richardson, 2009), ενώ η 14-3-3σ που επίσης επάγεται από την p53 και καταστέλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2-M δεσμεύοντας στο κυτταρόπλασμα τα σύμπλοκα κυκλίνης B1-CDK1(CDC2) και ρυθμίζοντας την έκφραση των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών όπως της p27^{Kip1} (Hermeking and Benzinger, 2006). Επιπλέον η 14-3-3 δεσμεύει προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες (McDonald et al., 2006; Morrison, 2009).

Στη συνέχεια αναλύσαμε την έκφραση της FoxM1 που εμπλέκεται στις φάσεις G1-S και G2-M του κυτταρικού κύκλου (Costa, 2005; Laoukili et al., 2006). Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ανίχνευσε και τις 3 ισομορφές της FoxM1: FoxM1A, B και C. Οι ισομορφές FoxM1B και C είναι μεταγραφικά ενεργές, ενώ η FoxM1A είναι μεταγραφικά ανενεργή. Η FoxM1A μπορεί να δράσει ως μια κυρίαρχη-αρνητική

μορφή καθώς διατηρεί την ικανότητα της φυσιολογικής πρόσδεσης της στο DNA χωρίς να φέρει μια λειτουργική περιοχή μεταγραφικής ενεργότητας (functional transactivation domain). Αυτή η ισομορφή που προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα μπορεί να δράσει ρυθμίζοντας την ενεργότητα γενικά της FoxM1 υπό συγκεκριμένες συνθήκες, λόγω του ανταγωνισμού της με τις άλλες ισομορφές, που επίσης είναι προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος, για δέσμευση σε ρυθμιστικά στοιχεία που ανταποκρίνονται στη FoxM1. Δεδομένου του ότι οι ισομορφές FoxM1B και FoxM1C διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, η επαγωγή της FoxM1A πιθανά να αποτελεί έναν τρόπο με τον οποίο μπορεί να παρεμποδιστεί η αύξηση του ρυθμού του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, όπως τα καρκινικά κύτταρα, που υπερεκφράζουν FoxM1 (Laoukili et al., 2006). Ενώ τα κύτταρα MRC-5 TERT εκφράζανε τη FoxM1A και C αλλά σε πολύ χαμηλά έως μη ανιχνεύσιμα επίπεδα του FoxM1B, τα κύτταρα A549 εκφράζανε τις ισομορφές FoxM1B και C αλλά πολύ χαμηλά επίπεδα της FoxM1A. Επομένως η διαφορική έκφραση των ισομορφών της FoxM1 στους δυο κυτταρικούς τύπους πιθανά να καθορίζει τις πολλαπλασιαστικές τους αποκρίσεις (Kalinichenko et al., 2003; Kim et al., 2005; Kim et al., 2006). Στα κύτταρα MRC-5 TERT, η ενισχυμένη έκφραση της Pim-2(wt) αλλά όχι της Pim-2(DN) επήγαγε την έκφραση της FoxM1A και όχι της FoxM1C. Σε αντίθεση, στα κύτταρα A549, η Pim-2(wt) αλλά όχι η Pim-2(DN) επήγαγε την έκφραση της FoxM1C, ενός άμεσου στόχου των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών E/CDK2 (Lüscher-Firzlaff et al., 2006; Wierstra and Alves, 2006) και A/CDK2 (Wierstra and Alves, 2006) που εμπλέκονται στη μετάβαση των φάσεων G2-M (Ma et al., 2004) και όχι του FoxM1B (Σχήμα 4.3.). Επομένως, ενώ στα A549 η Pim-2(wt) αυξορρύθμισε τα επίπεδα της μεταγραφικά ενεργής ισομορφής FoxM1C, στα MRC-5 TERT αυξορρύθμισε τα επίπεδα της μεταγραφικά ανενεργής FoxM1A δρώντας ως κυρίαρχη αρνητική μορφή στην επιβράδυνση του κυτταρικού κύκλου (Σχήμα 4.3.).

Το πιο σημαντικό, ήταν ότι η Pim-2(wt) επήγαγε τον άξονα p53 - p21^{Cip1/Waf1} που εμπλέκεται στην καταστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1-S και G2-M. Τα κύτταρα MRC-5 TERT εκφράζανε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα p53 από ότι τα A549. Όμως, ενώ η Pim-2(wt) αυξορρύθμισε τα επίπεδα έκφρασης της p53 στα κύτταρα MRC-5 TERT δεν επέφερε καμιά μεταβολή στην έκφραση της p53 στα κύτταρα A549. Ανεξάρτητα από την διαφορική επαγωγή της p53 στους δύο κυτταρικούς τύπους παρουσία της Pim-2(wt), η Pim-2(wt) επήγαγε την έκφραση της

p21^{Cip1/Waf1}, πρωτεΐνης-στόχου της p53 αλλά και του NF-κB (Batsi et al., 2009b) και στους δυο κυτταρικούς τύπους MRC-5 TERT και A549, καθώς και τα πυρηνικά επίπεδα της p21^{Cip1/Waf1} και της p53, ιδιαίτερα στα κύτταρα MRC-5 TERT. Κατ' ακολουθία η υψηλή έκφραση του άξονα p53 - p21^{Cip1/Waf1} και οι μεταβολές στην έκφραση πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου πιθανότατα να συνέβαλαν στην επιβράδυνση του κυτταρικού κύκλου (Σχήμα 4.3. και Σχήμα 5.3.).

Συνολικά, οι μελέτες έδειξαν ότι η Pim-2(wt) επιβράδυνε την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου των δυνητικά αθανатоποιημένων ινοβλαστών πνεύμονα MRC-5 TERT (και φυσιολογικών ινοβλαστών IMR-90) αλλά όχι των καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα A549 στη φάση G2-M προκαλώντας τη συσσώρευση των κυκλινών A και B1, την αυξορρύθμιση της μεταγραφικά ανενεργής ισομορφής FoxM1A ή οποία δρα ως κυρίαρχη αρνητική μορφή στην επιβράδυνση του κυτταρικού κύκλου, και του άξονα p53 - p21^{Cip1/Waf1} που οδήγησε στην αυξορρύθμιση των GADD45a και 14-3-3σ, που αποτελούν πρωτεΐνες-στόχους της p53.

Επιδράσεις της Pim-2 στην απόπτωση των ινοβλαστών και επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα που επάγεται από οξειδωτικό στρες

Καθώς η μεταγραφική ενεργότητα του NFκ-B επάγεται από το οξειδωτικό στρες όπως αυτό που προκαλείται από το H₂O₂ (Gloire et al., 2006) με αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης γονιδίων-στόχων του μεταξύ των οποίων είναι το γονίδιο της Pim-2 (Li et al., 2001; Hammerman et al., 2004), μελετήθηκαν οι επιδράσεις του πρωτο-ογκογονιδίου Pim-2 στην κυτταρική επιβίωση διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών MRC5 TERT και A549 ως απόκριση στο H₂O₂.

Αρχικά μελετήθηκαν οι αποκρίσεις των ινοβλαστών MRC-5 TERT σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις H₂O₂. Παρατηρήθηκε μια δόσο-εξαρτώμενη αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού στη φάση υπο-G1, ένδειξη της επαγωγής της απόπτωσης, με τη συνακόλουθη μείωση του κυτταρικού πληθυσμού στις φάσεις S και G2-M του κυτταρικού κύκλου. Οι μεταβολές του κυτταρικού κύκλου των MRC-5 TERT ως απόκριση στο H₂O₂ οφείλονταν στη μειορρύθμιση της έκφρασης της Cdc6 που εμπλέκεται στη ρύθμιση των φάσεων G1-S και G2-M (Borlando and Mendez, 2008) και στην επαγωγή των p53 - p21^{Cip1/Waf1}. Επίσης το H₂O₂ προκάλεσε την αυξορρύθμιση της Bax, τη μειορρύθμιση της Bcl-2 μεταβάλλοντας έτσι το λόγο των

προ-αποπτωτικών προς τα αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2, και την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP-1 (Σχήμα 6.3.).

Για να διερευνηθεί αν η Pim-2 εμπλέκεται στις αποκρίσεις των τελομερισμένων ινοβλαστών MRC5 TERT και των καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων A549 στο H₂O₂, χορηγήθηκαν στα κύτταρα αυξανόμενες συγκεντρώσεις H₂O₂ και μελετήθηκε η έκφραση της Pim-2. Το H₂O₂ επήγαγε την έκφραση της ενδογενούς Pim-2 κα στους δύο διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους MRC5 TERT και A549 πιθανά διαμέσου της ενεργοποίησης μιας πορείας μεταγωγής σήματος του NF-κB (Σχήμα 7.3.).

Για να διερευνηθεί ο μηχανισμός με τον οποίο η επαγωγή της Pim-2 από το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στην απόπτωση, μελετήθηκαν οι επιδράσεις του H₂O₂ στα κύτταρα MRC-5 TERT και A549 που έφεραν είτε τον πρότυπο φορέα ελέγχου BIB ή την Pim-2(wt) ή Pim-2(DN).

Η ανάλυση με κυτταρομετρίας ροής έδειξε ότι η Pim-2(wt) επήγαγε τη συσσώρευση των κυττάρων MRC5 TERT στη φάση G2-M, επιφέροντας ταυτόχρονα έναν φαινότυπο ανθεκτικό στη διαμεσολαβούμενη απόπτωση από H₂O₂ (Σχήμα 8.3.). Όμοια, η Pim-2(wt) επαύξησε τη συσσώρευση των κυττάρων A549 στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου. Σε αντίθεση, η Pim-2(DN) όχι μόνο μείωσε τη συσσώρευση των κυττάρων A549 στη φάση G2-M αλλά ευαισθητοποίησε τα κύτταρα στην H₂O₂-επαγόμενη απόπτωση (Σχήμα 9.3.). Επομένως, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η Pim-2(wt) απαιτείται για τη συσσώρευση των κυττάρων MRC-5 TERT και A549 στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου, αλλά και για την αύξηση της επιβίωσης τους ως απόκριση στο H₂O₂. Σύμφωνα με τις παρούσες μελέτες, προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η αποσιώπηση της Pim-2 με χρήση siRNA μείωσε την κυτταρική επιβίωση χονδροκυττάρων στα οποία χορηγήθηκε H₂O₂ (Bohensky et al., 2007).

Μεταξύ των σημαντικότερων κοινών μεταβολών υπεύθυνων για τη συσσώρευση και των δύο κυτταρικών τύπων MRC-5 TERT και A549 στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση στο H₂O₂ ήταν η αυξορρύθμιση του άξονα p53 - p21^{Cip1/Waf1} καθώς επίσης και της GADD153 (ή CHOP), μέλος των μεταγραφικών παραγόντων (C/EBPs) που σχετίζεται με το στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), και ελέγχει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση σε βλάβες DNA, επιβραδύνοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στις φάσεις G1-S ή G2-M του κυτταρικού κύκλου (Oyadomari and Mori, 2004; MacLachlan et al., 2002; Lin et al., 2008) (Σχήμα 10.3. και Σχήμα 11.3.).

Αυτά τα ευρήματα ήταν σημαντικά καθώς η επαγωγή του άξονα p53 - p21^{Cip1/Waf1} εμπλέκεται στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1-S και G2-M, αλλά και στην επαγωγή της απόπτωσης, και αυτές οι δύο αντι-πολλαπλασιαστικές αποκρίσεις εξαρτώνται από την ένταση του ερεθίσματος. Επίσης, μελέτες έδειξαν ότι η επαγωγή της έκφρασης της GADD153 οδηγεί στη μειορρύθμιση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 που οδηγεί στην ευαισθητοποίηση των κυττάρων σε ER στρες και στην απόπτωση τους (McCullough et al., 2001). Η GADD153 που επάγεται από το H₂O₂ δρα ανάρρους των μιτοχονδρίων και προκαλεί την ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής πορείας της απόπτωσης (Corazzari et al., 2005; Kim et al., 2006). Επομένως είναι φανερός ο διπλός ρόλος της GADD153: ενώ το H₂O₂ επάγει την έκφραση της οδηγώντας τα κύτταρα σε διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2-M και στην απόπτωση διαμέσου της μιτοχονδριακής πορείας, η ενισχυμένη έκφραση της Pim-2(wt) οδηγεί στην αυξορρύθμιση της GADD153 και τη συσσώρευση των κυττάρων στη φάση G2-M, παρεμποδίζοντας ταυτόχρονα την αποπτωτική δράση της. Να σημειωθεί ότι η Pim2-(wt) κατέστειλε την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP-1 που προκαλείται από το H₂O₂ (Σχήμα 12.3.).

Επομένως, ενώ το H₂O₂ επήγαγε την απόπτωση των κυττάρων ελέγχου, τα κύτταρα που έφεραν την Pim-2(wt) επέδειξαν έναν φαινότυπο ανθεκτικό στην επαγόμενη απόπτωση από το H₂O₂. Η ανθεκτικότητα των κυττάρων που έφεραν την Pim-2(wt) στην επαγόμενη απόπτωση από το H₂O₂ πιθανά οφείλονταν στο ότι η Pim-2(wt) επιβράδυνε την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2-M δίνοντας έτσι χρόνο στα κύτταρα να επιδιορθώσουν τις βλάβες στο DNA πριν η συσσώρευση των βλαβών από τη χορήγηση του H₂O₂ οδηγήσουν στην μη-αναστρέψιμη καταστροφή των κυττάρων. Η δράση της Pim-2 που εξαρτάται από τον NF-κB (Li et al., 2001; Hammerman et al., 2004) είναι ανάλογη με τη δράση του NF-κB στις αποκρίσεις βλαβών στο DNA που οδηγεί στην αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης (Janssens et al., 2005; Wu et al., 2005, 2006; Wu and Miyamoto, 2007).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Η Pim-2 επιβράδυνε την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου κυρίως στη φάση G2-M στις αθανатоποιημένες ανθρώπινες ινοβλάστες πνεύμονα, MRC-5 TERT) αλλά όχι στα ανθρώπινα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα, A549.
2. Το H₂O₂ επήγαγε την έκφραση της Pim-2 πιθανά διαμέσου της ενεργοποίησης του IKK/NF-κB, και στους δύο κυτταρικούς τύπους στις ινοβλάστες MRC-5 TERT και στα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα A549.
3. Η ενισχυμένη έκφραση της Pim-2 επαύξησε τη συσσώρευση και των δύο κυτταρικών τύπων MRC-5 TERT και A549 στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου παρουσία H₂O₂.
4. Η Pim-2 επέφερε προστασία στα κύτταρα MRC-5 TERT και A549 από την απόπτωση επαγόμενη από το H₂O₂.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ Pim-2 ΣΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΟΥ ΕΚΤΙΘΕΝΤΑΙ ΣΕ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ.

Οι μηχανισμοί ρύθμισης του κυτταρικού θανάτου παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση με τους μηχανισμούς ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Το οξειδωτικό στρες επάγει διάφορες βιολογικές αποκρίσεις οι οποίες καθορίζουν αν ένα κύτταρο θα εισέλθει στη διαδικασία της νέκρωσης, της γήρανσης, της απόπτωσης ή θα επιβιώσει και θα πολλαπλασιαστεί. Ένας σημαντικός μεσολαβητής στην οξειδωτική βλάβη είναι το H_2O_2 .

Μια πρωτεϊνική κινάση η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική επιβίωση και τη διαφοροποίηση είναι η Pim-2, η οποία ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης Pim και αποτελεί γονίδιο-στόχου του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, ενός παράγοντα ευαίσθητου στις οξειδο-αναγωγικές μεταβολές του κυττάρου. Η Pim-2 υπερεκφράζεται σε διάφορους καρκινικούς τύπους και μολονότι ο ρόλος της στην κυτταρική απόπτωση που επάγεται από πολλά ερεθίσματα έχει μελετηθεί και αναδειχθεί η αντι-αποπτωτική δράσης της, ο ρόλος της Pim-2 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό δεν έχει αποσαφηνιστεί.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση του ρόλου της πρωτεϊνικής κινάσης Pim-2 στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και τη στρεσο-επαγόμενη απόπτωση από το H_2O_2 , ανθρώπινων τελομερισμένων ινοβλαστών MRC-5 TERT και καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα A549. Για το σκοπό αυτό κατασκευάσθηκαν σταθεροί κυτταρικοί πληθυσμοί ή κλώνοι που έφεραν είτε έναν πρότυπο φορέα ελέγχου, BIB, την αγρίου-τύπου Pim-2(wt) [BIB-Pim-2(wt)] ή μια κυρίαρχη αρνητική μορφή της, την Pim-2(DN) [BIB-Pim-2(DN)].

Αρχικά, δείξαμε ότι η έκφραση της Pim-2 προκάλεσε την επιβράδυνση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2-M των δυνητικά αθανатоποιημένων ινοβλαστών πνεύμονα MRC-5 TERT (και φυσιολογικών ινοβλαστών IMR-90) αλλά όχι των καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα A549 επάγοντας την αυξορρύθμιση των κυκλινών A και B1, της μεταγραφικά ανενεργής ισομορφής FoxM1A ή οποία δρα ως κυρίαρχη αρνητική μορφή στην επιβράδυνση του κυτταρικού κύκλου, και του

άξονα p53 - p21^{Cip1/Waf1} που οδήγησε στην αυξορρύθμιση των GADD45a και 14-3-3σ, που αποτελούν πρωτεΐνες-στόχους της p53.

Επειδή η Pim-2 ρυθμίζεται από τον NFκ-B, ο οποίος είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ευαίσθητος στις οξειδο-αναγωγικές μεταβολές, χορηγήσαμε H₂O₂ στα κύτταρα MRC-5 TERT και A549. Το H₂O₂ επήγαγε την Pim-2, πιθανά διαμέσου της ενεργοποίησης του NF-κB και επομένως διερευνήθηκαν στη συνέχεια οι επιδράσεις της Pim-2 στον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση των κυττάρων MRC-5 TERT και A549 ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες. Η Pim-2(wt) αλλά όχι η Pim-2(DN) επαύξησε τη συσσώρευση και των δύο κυτταρικών τύπων MRC-5 TERT και A549 στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου. Μεταξύ των σημαντικότερων κοινών μεταβολών υπεύθυνων για τη συσσώρευση και των δύο κυτταρικών τύπων στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση στο H₂O₂ ήταν η αυξορρύθμιση του άξονα p53 - p21^{Cip1/Waf1} καθώς επίσης και της GADD153 (ή CHOP), μέλος των μεταγραφικών παραγόντων (C/EBPs) που σχετίζεται με το στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), και ελέγχει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση σε βλάβες DNA, επιβραδύνοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στις φάσεις G1-S ή G2-M του κυτταρικού κύκλου. Αυτά τα ευρήματα ήταν σημαντικά καθώς η επαγωγή του άξονα p53 - p21^{Cip1/Waf1} εμπλέκεται στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1-S και G2-M, αλλά και στην επαγωγή της απόπτωσης, και αυτές οι δύο αντι-πολλαπλασιαστικές αποκρίσεις εξαρτώνται από την ένταση του ερεθίσματος. Η επαγωγή της GADD153 συμφωνεί με το διπλό ρόλο της στην επαγωγή της απόπτωσης που προκαλείται από δραστικές μορφές οξυγόνου διαμέσου της μιτοχονδριακής πορείας GADD153, αλλά και στη διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2-M. Ενώ το H₂O₂ επήγαγε την απόπτωση των κυττάρων ελέγχου, τα κύτταρα που έφεραν την Pim-2(wt) επέδειξαν έναν φαινότυπο ανθεκτικό στην επαγόμενη απόπτωση από το H₂O₂. Η ανθεκτικότητα των κυττάρων που έφεραν την Pim-2(wt) στην επαγόμενη απόπτωση από το H₂O₂ πιθανά οφείλονταν στο ότι η Pim-2(wt) επιβράδυνε την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2-M δίνοντας έτσι χρόνο στα κύτταρα να επιδιορθώσουν τις βλάβες στο DNA πριν η συσσώρευση των βλαβών από τη χορήγηση του H₂O₂ οδηγήσουν στην μη-αναστρέψιμη καταστροφή των κυττάρων. Η δράση της Pim-2 που εξαρτάται από τον NF-κB είναι ανάλογη με τη δράση του NF-κB στις αποκρίσεις βλαβών στο DNA που οδηγεί στην αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης.

Studies of the role of Pim-2 on the molecular mechanisms of apoptosis, in cells exposed to oxidative stress and cytokines.

The regulatory mechanisms of cell death are of the same importance in carcinogenesis as the control mechanisms of cell proliferation. Oxidative stress induces a plethora of biological responses that determine whether a cell will undergo necrosis, senescence, apoptosis or will survive and proliferate. An important oxidative damage mediator is H₂O₂, which activates, among others, NF-κB signaling pathways. A protein kinase that has an important role in cell proliferation and survival is Pim-2, that belongs to the serine/threonine Pim protein kinase family and is an NF-κB target gene, a redox-sensitive nuclear transcription factor. Pim-2 is overexpressed in different cancer types and although its role in cellular apoptosis by many stimuli has been studied and its anti-apoptotic activity well documented, its functional role in cell proliferation remains controversial.

The aim of the present study was to investigate the role of protein kinase Pim-2 in cell cycle progression and on stress-induced apoptosis by H₂O₂ in telomerised human fibroblasts MRC-5 TERT and human lung tumour epithelial cells A549. To this end, stable cell populations or clones were generated carrying either a control vector BIB, or a wild-type (wt) [BIB/Pim-2(wt)] or a dominant-negative (DN) [BIB/Pim-2(DN)] human Pim-2 cDNA.

First, we showed that expression of Pim-2 resulted in a delay in cell cycle progression at the G2-M cell cycle phase of the potentially immortalized lung fibroblasts MRC-5 TERT (and normal fibroblasts IMR-90) but not in tumour lung epithelial cells A549, inducing the up-regulation of cyclins A and B1, the transcriptionally inactive FoxM1A isoform, which act as a dominant-negative variant to slow down cell proliferation and the induction of the p53 - p21^{Cip1/Waf1} axis that contribute to up-regulation of GADD45a and 14-3-3σ, two p53 target-proteins.

Since Pim-2 is regulated by NF-κB, a redox-sensitive nuclear transcription factor, we next investigated the role of Pim-2 on H₂O₂-mediated effects on cell proliferation and apoptosis of MRC-5 TERT and A549 cells. First we showed that H₂O₂ induced apoptosis of MRC-5 TERT cells and up-regulated the expression of Pim-2, dose-dependently, probably through the activation of NF-κB. Both Pim-2(wt)-expressing, but not Pim-2(DN), MRC-5 TERT and A549 cells displayed an increased

accumulation in G2-M cell cycle phase. Among the common and important changes invoking a G2-M arrest in response to H₂O₂ were the up-regulation of the p53 - p21^{Cip1/Waf1} axis and of GADD153/CHOP, a member of the CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs) and a cell cycle controlling and DNA damage response protein, the level of which correlates with ER stress, delaying cell proliferation in G1-S and G2-M cell cycle phases. These findings were important as the induction of p53 - p21^{Cip1/Waf1} axis is involved in the control of G1-S and G2-M cell cycle phases, and in the induction of apoptosis, and these anti-proliferative responses are depended on the intensity of the stimulus. Induction of GADD153 was also important given its dual role in ROS-induced apoptosis through the mitochondrial pathway but also in G2-M arrest. While H₂O₂ mediated apoptosis of control cells, Pim-2(wt)-expressing cells displayed a resistant phenotype to H₂O₂-mediated apoptosis. This resistant phenotype was conferred by Pim-2(wt) most likely due to its ability to delay cell cycle progression in G2-M phase and to inactivate anti-apoptotic factors thereby giving cells time to repair their damaged DNA before an irreversible cell death response can become invoked, a function analogous to canonical IKK β /NF- κ B signaling pathway.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams** JM, Pogasic V, Bendit M, Chappuis R, Nawijin MC, Duyster J, Fox CJ, Thomson CB, Cools J and Schwaller J. (2006) Targeting Pim kinases impairs survival of hematopoietic cells transformed by kinase inhibitor-sensitive and kinase inhibitor-resistant forms of Fms-like tyrosine kinase 3 and BCR/ABL. *Cancer Res.* 66, 3828-3835.
- Adams** JM and Cory S. (2007) Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 488-96.
- Albano** E, Bellomo G, Parola M, Carini R, Dianzani MU. (1991) Stimulation of lipid peroxidation increases the intracellular calcium content of isolated hepatocytes. *Biochem Biophys Acta* 1091, 310–316.
- Alizadeh** AA and Staudt LM. (2000) Genomic-scale gene expression profiling of normal and malignant immune cells. *Curr Opin Immunol.*, 12,219-25.
- Allen** JD and Berns A. (1996) Complementation tagging of cooperating oncogenes in knockout mice. *Semin. Cancer Biol.* 7, 299-306.
- Allen** JD, Verhoeven, E, Domen J, van der Valk M and Berns A. (1997) Pim-2 transgene induces lymphoid tumors, exhibiting potent synergy with c-myc. *Oncogene* 15, 1133-1141.
- Amaravardi** R and Thompson CB. (2005) The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *J. Clin. Invest.* 115, 2618-2624.
- Ameisen** JC. (1996). The origin of programmed cell death. *Science* 272, 1278-1279.
- Amson** R, Sigaux F, Przedborski S, Flandrin G, Givol D and Telerman A. (1989) The human protooncogene product p33pim is expressed during fetal hematopoiesis and in diverse leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 8857-8861.
- Anderson** S, Bankier AT, Barrell BG et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465.
- Arita** Y, Harkness SH, Kazzaz JA, Koo HC, Joseph A, Melendez JA, Davis JM, Chander A and Li Y. (2006) Mitochondrial localization of catalase provides optimal protection from H₂O₂-induced cell death in lung epithelial cells. *Am J Physiol.* 290, 978–986.

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

Ayala GE, Dai H, Ittmann M, Li R, Powell M, Frolov A, Wheeler TM, Thompson TC and Rowley D. (2004) Growth and survival mechanisms associated with perineural invasion in prostate cancer. *Cancer Res.* 64, 6082-6090.

Bachmann M and Moroy T. (2005) The serine/threonine kinase Pim-1. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 37, 726-730

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

Bagci ZE, Vodovotz Y, Billiar RT, Ermentrout BG and Bahar I. (2006) Bistability in apoptosis: roles of Bax, Bcl-2, and mitochondrial permeability transition pores. *Biophysical J.* 90, 1546-1559.

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

Bartosz G. (2009) Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol.* 77, 1303-15.

Batsi C, Markopoulou S, Kontargiris E, Charalampous C, Thomas C, Christoforidis S, Kanavaros P, Constantinou AI, Marcu KB and Kolettas E. (2009a) Bcl-2 blocks 2-methoxyestradiol induced leukemia cell apoptosis by a p72^{Kip1} G1-S dependent cell cycle arrest in conjunction with NF-κB activation. *Biochem. Pharmacol.* 78, 33-44.

Batsi C, Markopoulou S, Vartholomatos G, Georgiou I, Kanavaros P, Gorgoulis VG, Marcu KB, Kolettas E. (2009b) Chronic NF-κB activation delays RasV12-induced premature senescence of human fibroblasts by suppressing the DNA damage checkpoint response. *Mech Ageing Dev.* 130, 409-19.

Blackburn EH. (2005) Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett* 579, 859-862.

Beg AA, Baltimore D. (1996) An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*, 274, 782-784.

Bohensky J, Shapiro IM, Leshinsky S, Watanabe H and Srinivas V. (2007) PIM-2 is an independent regulator of chondrocyte survival and autophagy in the epiphyseal growth plate. *J Cell Physiol.* 213, 246-251

- Bohr** VA. (2002) Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic Biol Med.* 32, 804-812.
- Borlado** LR and Mendez J. (2008). CDC6 : From DNA replication to cell cycle checkpoints and onogenesis. *Carcinogenesis* 29, 237-43.
- Breuer** ML, Cuypers HT and Berns A. (1989) Evidence for the involvement of pim-2, a new common proviral insertion site, in progression of lymphomas. *EMBO J.* 8, 743-748.
- Breuer** M, Slebos R, Verbeek S, van LM, Wientjens E and Berns A. (1989) Very high frequency of lymphoma induction by a chemical carcinogen in pim-1 transgenic mice. *Nature* 340, 61-63.
- Cadenas** E and Davies KJ. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 222-230.
- Chen** JJ, Bertrand H, Yu BP. (1995) Inhibition of adenine nucleotide translocator by lipid peroxidation products. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 583-590.
- Chen** XP, Losman JA, Cowan S, Donahue E, Fay S, Vuong BQ, Nawijn MC, Capece D, Cohan VL and Rothman P. (2002) Pim serine/threonine kinases regulate the stability of Socs-1 protein. *Proc Natl Acad Sci. USA* 99, 2175-2180.
- Chen** WW, Chan DC, Donald C, Lilly MB and Kraft AS. (2005) Pim family kinases enhance tumor growth of prostate cancer cells. *Mol Cancer Res.* 3, 443-451.
- Cherbonnel-Lasserre** C and Dosanjh MK. (1997) Suppression of apoptosis by overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL promotes survival and mutagenesis after oxidative damage. *Biochimie* 79, 613–617.
- Chipuk** JE and Green DR. (2008) How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol.* 18, 157-64.
- Claudio** JO, Masih-Khan E, Tang H et al. (2002) A molecular compendium of genes expressed in multiple myeloma. *Blood* 100, 2175-86.
- Cohen** AM, Grinblat B, Bessler H, Kristt D, Kremer A, Schwartz A, Halperin M, Shalom S, Merkelm D and Donm J. (2004) Increased expression of the hPim-2 gene in human chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 45, 951-955.

Cook SA, Sugden PH and Clerk A. (1999) 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.* 85, 940–949.

Corazzari M, Lorat PE, Oliverio SP, Sano F, Donnorso RP, Redfern CP and Piacentini M. (2005) Fenretinide: a p53-independent way to kill cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 331,810-5.

Costa RH. (2005) FoxM1 dances with mitosis. *Nat Cell Biol.*, 7, 108-10.

Dai H, Li R, Wheeler T, de Vivar AD, Frolov A, Tahir S, Agoulnik I, Thompson T, Rowley D and Ayala G. (2005a) Pim-2 upregulation: Biological implications associated with disease progression and perinueral invasion in prostate cancer. *Prostate* 65, 276-286

Dai J-M, Zhang S-Q, Zhang W, Lin R-X, Ji Z-Z and Wang S-Q. (2005b) Antisense oligodeoxynucleotides targeting the serine/threonine kinase Pim-2 inhibited proliferation of DU-145 cells. *Acta Pharmacol. Sinica* 26, 364-368.

D'Errico M, Parlanti E and Dogliotti E. (2008) Mechanism of oxidative DNA damage repair and relevance to human pathology. *Mutat Res.* 659, 4-14.

Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, Pienta KJ, Rubin MA and Chinnaiyan AM. (2001) Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 412, 822-826.

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

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

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

Eichmann A, Yuan L, Breant C, Alitalo K and Koskinen PJ. (2000) Developmental expression of pim kinases suggests functions also outside of the hematopoietic system. *Oncogene* 19, 1215-1224.

Elmore LW and Holt SE (2000). Telomerase and telomere stability: a new class of tumor suppressor? *Molecular carcinogenesis* 28, 1-4.

Feldman JD, Vician L, Crispino M, Tocco G, Marcheselli VL, Bazan NG, Baudry M and Herschman HR. (1998) KID-1, a protein kinase induced by depolarization in brain. *J Biol Chem.* 273, 16535-16543.

Fox CJ, Hammerman PS, Cinalli RM, Master SR, Chodosh LA and Thompson CB. (2003) The serine/threonine kinase Pim-2 is a transcriptionally regulated apoptotic inhibitor. *Genes Dev.* 17, 1841-1854.

Fox CJ, Hammerman PS and Thompson CB. (2005) The Pim kinases control rapamycin-resistant T cell survival and activation. *J Exp Med.* 201, 259-266.

Fridovich I. (1997) Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem.* 1997 272, 18515-18517.

Gladden AB and Diehl JA. (2003) Cell cycle progression without cyclin E/CDK2: Breaking down the walls of dogma. *Cancer Cell*, 4, 160-162.

Goetz ME and Luch A. (2008) Reactive species: a cell damaging route assisting to chemical carcinogens. *Cancer Lett.* 266, 73-83.

Gong J, Wang J, Ren K, Liu C, Li B and Shi Y. (2008) Serine/threonine kinase pim-2 promotes liver tumorigenesis induction through mediating survival and preventing apoptosis of liver cell. *J Surg Res.* 153, 17-22.

Hengartner MO. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-6.

Hermeking H, Benzinger A. (2006). 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin Cancer Biol*, 16, 183-92.

Hammerman PS, Fox CJ, Cinalli RM, Xu A, Wagner JD, Lindsten T and Thompson CB. (2004) Lymphocyte transformation by Pim-2 is dependent on nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Res.* 64, 8341-8348

Hammerman PS, Fox CJ, Birnbaum MJ and Thompson CB. (2005) The Pim and Akt oncogenes are independent regulators of hematopoietic cell growth and survival. *Blood* 105, 4477-4483.

Hiomura K, Pippin JW, Fero ML, Roberts JM and Shankland SJ. (1999). Modulation of apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1). *J Clin Invest*, 103, 597-604.

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

Hogan C, Hutchison C, Marcar L, Milne D, Saville M, Goodlad J, Kernohan N and Meek D. (2008) Elevated levels of oncogenic protein kinase pim-1 induce the p53

pathway in cultured cells and correlate with increased mdm2 in mantle cell lymphoma. *J Biol Chem.* 283, 18012-18023.

Ishibashi Y, Maita H, Yano M, Koike N, Tamai K, Ariga H, et al. (2001) Pim-1 translocates sorting nexin 6/TRAF4-associated factor 2 from cytoplasm to nucleus. *FEBS Lett.* 506, 33-38.

Jacobs JP, Jones CM, et al. (1970) Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* 227, 5254, 168-70.

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. (2009) Nuclear factor kappaB, airway epithelium, and asthma: avenues for redox control. *Proc Am Thorac Soc.* 6, 249-55.

Janssens S, Tinel A, Lippens S and Tschopp J. (2005) PIDD mediates NF- κ B activation in response to DNA damage. *Cell*, 123, 1079-1092.

Jiang B, Xiao W, Shi Y, Liu M, and Xiao X. (2005) Role of Smac/DIABLO in hydrogen peroxide-induced apoptosis in C2C12 myogenic cells. *Free Radic Biol Med.* 39, 658–667.

Johnstone RW, Ruefli AA and Lowe SW (2002) Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108, 153-64.

Kalinichenko VV, Gusarova GA, Tan Y, Wang IC, Major ML, Wang X, Yoder HM and Costa RH.(2003) Ubiquitous expression of the forkhead box M1B transgene accelerates proliferation of distinct pulmonary cell types following lung injury. *J Biol Chem.* 278, 37888-94.

Karin M.(2004). Mitogen activated protein kinases as targets for development novel anti-inflammatory drugs. *Ann.Rheum.Dis*, 63, 62-64.

Karin M and Greten FR.(2005) NF- κ B: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat.Rev.Immunol*, 5, 749-759.

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

Kim KT, Baird K, Ahn JY, et al. (2005) Pim-1 is up-regulated by constitutively activated FLT3 and plays a role in FLT3-mediated cell survival. *Blood* 105, 1759-67.

Koike N, Maita H, Taira T, Ariga H and Iguchi-Ariga SM. (2000) Identification of heterochromatin protein 1 (HP1) as a phosphorylation target by Pim-1 kinase and the

effect of phosphorylation on the transcriptional repression function of HP1. FEBS Lett. 467, 17-21.

Kolettas E, Rosenberger RF. (1998) Suppression of decorin expression and partial induction of anchorage-independent growth by the v-src oncogene in human fibroblasts. *Int J Biochem.* 254, 266-74.

Kolettas E, Skoufos I, Kontargiris E, Markopoulou S, Tzavaras Th and Gonos ES. (2006) Bcl-2 but not clusterin/apolipoprotein J protected human diploid fibroblasts and immortalised keratinocytes from ceramide-induced apoptosis: Role of p53 in the ceramide response. *Arch Biochem Biophys.* 445, 184-195

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

Kroemer G and Reed JC. (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.* 6, 513-519.

Lane DP and Crawford LV. (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263.

Laoukilli J, Stahl M and Medema RH. (2007). FoxM1: At the crossroads of ageing and cancer. *Biochem Biophys Acta*, 1775:1, 92-102.

Lee SR, Yang KS, Kwon J, Lee C, Jeong W, and Rhee SG. (2002) Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *J. Biol. Chem.* 277, 20336-20342.

Li H, Mitchell JR and Hastay P. (2008) DNA double-strand breaks: a potential causative factor for mammalian aging? *Mech Ageing Dev.* 129, 416-24.

Li J, Peet GW, Balzarano D, Li X, Massa P, Barton RW and Marcu KB. (2001) Novel NEMO/I κ B kinase and NF- κ B target genes at the pre-B to immature B cell transition. *J Biol Chem.* 276, 18579-18590.

Lilly M, Le T, Holland P and Hendrickson SL. (1992) Sustained expression of the Pim-1 kinase is specifically induced in myeloid cells by cytokines whose receptors are structurally related. *Oncogene* 7, 727-732.

Lin SS, Huang HP, Yang JS, Wu JY, Hsia TC, Lin CC, Lin CW, Kuo CL, Gibson WW and Chung JG. (2008). DNA damage and endoplasmic reticulum stress mediated curcumin induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A549

cells through the activation caspases-cascade and mitochondrial-dependent pathway. *Cancer Lett.* 272, 77-90.

Linzer DI and Levine AJ. (1979) Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43-52.

Lu X. (2005). p53: a heavily dictated dictator of life and death. *Cur opinion Genet Dev* 15, 27-33.

Luo JL, Kamata H and Karin M.(2005) The anti-death machinery in IKK/NF- κ B signaling. *Journal of Clinical Immunology*, 25:6, 541-550.

Luscher-Firzlaff JM, Lilischkis R and Luscher B. (2006). Regulation of the transcription factor FoxM1 by cyclin E/CDK2.

MacDonald A, Campbell DG, Toth R, McLauchlan H, Hastie CJ and Arthur JSC. (2006) Pim kinases phosphorylate multiple sites on Bad and promote 14-3-3 binding and dissociation from Bcl-X_L. *BMC Cell Biol* 10, 7:1

Malumbres M and Barbacid M. (2005) Mammalian cyclin dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences*, 30, 630-641.

Malumbres M and Barbacid M. (2007) Cell cycle kinases in cancer. *Curr Opin Genet Dev.*, 17, 60-65.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T and Sudarsanam S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934.

McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY and Holbrook NJ. (2001). GADD153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*, 21, 1249-59.

Mikkers H, Allen J, Knipscheer P, Romeijn L, Hart A, Vink E, Berns A and Romeyn L. (2002) High-throughput retroviral tagging to identify components of specific signaling pathways in cancer. *Nat. Genet.* 32, 153-159

Mikkers H, Nawijn M, Allen J, Brouwers C, Verhoeven E, Jonkers J and Berns A. (2004) Mice deficient for all PIM kinases display reduced body size and impaired responses to hematopoietic growth factors. *Mol. Cell. Biol.* 24, 6104-6115

Mochizuki T, Kitanaka C, Noguchi K, Muramatsu T, Asai A and Kuchino Y. (1999). Physical and functional interactions between Pim-1 kinase and Cdc25A phosphatase. Implications for the Pim-1- mediated activation of the c-Myc signaling pathway. *J Biol Chem.*, 274, 18659-66.

Mochizuki T, Kitanaka C, Noguchi K, Sugiyama A, Kagaya S, Chi S, Asai A and Kuchino Y. (1997) Pim-1 kinase stimulates c-Myc-mediated death signaling upstream of caspase-3 (CPP32)-like protease activation. *Oncogene* 15, 1471-1480.

Morishita D, Katayama R, Sekimizu K, Tsumo T and Fujita N.(2008). Pim kinases promote cell cycle progression by phosphorylating and down-regulating p27^{Kip1} at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cancer Res.*, 68, 5076-85.

Morrison DK. (2009). The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol.*,19, 16-23.

Neill GW and Kelsell DP. (2001) Spotting prostate cancer. *Trends Mol Med* 20017:432.

Nichols WW, Murphy DG et al. (1977) Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90. *Science* 196, 4285, 60-3.

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

Oyadomari S and Mori M. (2004). Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*, 11, 381-9.

Palmero IM, Zubiaga M, Serrano AM. (2002) Activation of ARF by oncogenic stress in mouse fibroblasts is independent of E2F1 and E2F2. *Oncogene* 21, 29399-47.

Paul C and Arrigo AP. (2000) 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.* 35, 757–766.

Peng C, Knebel A, Morrice NA, Li XJ, Barringer K, Li J, Jakes S, Wemeburg B, and Wang L. (2007) Pim kinase substrate identification and specificity. *J Biochem.* 141, 353-62.

Pines J. (2006) Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time. *Trends in Cell Biology*, 16, 55-63.

Pines J and Rieder CL. (2001) Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nature Cell Biology*, 3, E-3-E6.

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. (2006) Hydrogen peroxide produced inside mitochondria takes part in cell-to-cell transmission of apoptotic signal. *Biochemistry (Mosc)*, 71, 60–67.

Popivanova BK, Li YY, Zheng H, Omura K, Fujii C, Tsuneyama K and Mukaida N (2007) Proto-oncogene, Pim-3 with serine/threonine kinase activity, is aberrantly expressed in human colon cancer cells and can prevent Bad-mediated apoptosis. *Cancer Sci.* 98, 321-328

Rich T, Allen RL and Wyllie AH. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature* 407, 777-83.

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

Saito Y, Tada H, Nazarea M, Honjo T. (1992) Interleukin 2 and tumor necrosis factor are complementary for proliferation of the hematopoietic stem cell line LyD9. *Growth Factors* 7, 297-303.

Sambrook J.(1989). Protein structure, chaperones, paperones. *Nature*, 342:6247, 224-225.

Selten G, Cuypers HT, Boelens W, Robanus ME, Verbeek J, Domen J van BC and Berns A. (1986) The primary structure of the putative oncogene pim-1 shows extensive homology with protein kinases. *Cell* 46, 603-611.

Sherr CJ and Roberts JM. (2004) Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes and Development* 18, 851-855.

Sherr CJ and Roberts JM. (1999) CDK: inhibitors positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes and Development* 13, 1501-1512.

Siafakas RA and Richardson DR. (2009). Growth arrest and DNA damage-45 alpha (GADD45alpha). *Int J Biochem Cell Biol.* 41, 986-9.

Sugiki H, Hozumi Y, Maeshima H, Katagata Y, Mitsuhashi Y, Kondo S.(2000). C₂-ceramide induces apoptosis in a human squamous cell carcinoma cell line. *British Journal of Dermatology* 143, 1154-1163.

Tartaglia LA, Goeddel DV.(1992). Two TNF receptors. *Immunol Today*, 13, 151-153.

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

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

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

- Van Cruchten S** and van Den Broeck W. (2002) Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat. Histol. Embryol.* 31, 214-23.
- van der Lugt NM**, Domen J, Verhoeven E, Linders K, van der Gulden H, Allen J and Berns A. (1995) Proviral tagging in E mu-myc transgenic mice lacking the Pim-1 proto-oncogene leads to compensatory activation of Pim-2. *EMBO J.* 14, 2536-2544.
- Vogelstein BL**, Levine DAJ. (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
- von Zglinicki T**, Pilger R and Sitte N. (2000) Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic Biol Med.* 28, 64-74.
- Vousden KH** and Lu BX. (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* 2, 594-604.
- Wang Z**, Bhattacharya N, Weaver M, Petersen K, Meyer M, Gapter L and Magnuson NS. (2001) Pim-1: a serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis. *J Vet Sci.* 2, 167-179.
- Weitzman JB** and Yamiv M. (1999) Rebuilding the road to cancer. *Nature* 400, 401-402.
- White E.** (2003) The pims and outs of survival signaling: role for the Pim-2 protein kinase in the suppression of apoptosis by cytokines. *Genes and Development*, 17:1813-1816.
- Wierstra I** and Alves J. (2006). FoxM1 is activated by cyclin E/CDK2, cyclin A/CDK2 and cyclin A/CDK1, but repressed by GSK-3alpha. *Biochem Biophys Res Commun.*, 348, 99-108.
- Woodland R**, Fox CJ, Schmidt MR, Hammerman PS, Opferman JT, Korsmeyer SJ, Hilbert DM and Thompson CB. (2007). Multiple signalling pathways promote B lymphocyte stimulator (BLyS)-dependent B cell growth and survival. *Blood*, 15, 750-60.
- Wu ZH**, Mabb A, Miyamoto S. (2005) PIDD: a switch hitter. *Cell*, 123, 980-2.
- Wu ZH** and Miyamoto S. (2007). Many faces of NF-kappaB signaling induced by genotoxic stress. *J Mol Med.*, 85, 1187-202.
- Wu ZH**, Shi Y, Tibbets RS and Miyamoto S.(2006). Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science*, 311, 1141-6.

- Xu** LG, Wu M, Hu J, Zhai Z, Shu HB. (2002) Identification of downstream genes up-regulated by the tumor necrosis factor family member TALL-1. *J Leukoc Biol* 72, 410-6.
- Yan** B, Zemskova M, Holder S, Chin V, Kraft A, Koskinen PJ and Lilly M. (2003) The PIM-2 kinase phosphorylates BAD on serine 112 and reverses BAD-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 278, 45358-45367
- Yoshida** S, Kaneita Y, Aoki Y, et al. (1999) Identification of heterologous translocation partner genes fused to the BCL6 gene in diffuse large B-cell lymphomas: 5'-RACE and LA-PCR analyses of biopsy samples. *Oncogene* 18, 7994-9.
- Yu** J and Zhang L. (2003) No PUMA, no death: implications for p53 dependent apoptosis. *Cancer Cell* 4, 248-9.
- Zhang** Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernster L, Davies KJ. (1990) The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J Biol Chem.* 265, 16330–16336.
- Zhang** Y, Wang Z, Li X and Magnuson NS. (2008) Pim kinase-dependent inhibition of c-Myc degradation. *Oncogene* 27, 4809-19.
- Zong** W-X and Thompson CB. (2006) Necrotic cell death as a cell fate. *Genes Dev.* 20, 1-15.

ΕΙΚΟΝΕΣ-ΣΧΗΜΑΤΑ		
Εικόνα 1.1.	Δομή της κινάσης σερίνης/θρεονίνης Pim-2 και σύγκριση με τα άλλα μέλη της οικογένειας Pim-1 και Pim-3	3
Εικόνα 2.1.	Επιβιωτικές πορείες σήματος που ελέγχονται από την Pim-2 και την Akt.	9
Εικόνα 3.1.	Σχηματική απεικόνιση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου και οι κατηγορίες των ρυθμιστικών μορίων που ρυθμίζουν την πρόοδο του	10
Εικόνα 4.1.	Τα στάδια και οι μορφολογικές αλλαγές κατά τη διαδικασία της απόπτωσης και της νέκρωσης	17
Εικόνα 5.1.	Σχηματική απεικόνιση των δυο πορειών θανάτου των κυττάρων μέσω υποδοχέων θανάτου και του μιτοχονδρίου	18
Εικόνα 1.2.	Ρετροϊκείς φορείς έκφρασης που φέρουν την καταλυτική υπομονάδα της ανθρώπινης τελομεράσης	53
Εικόνα 2.2.	Σχηματική παράσταση των ρετροϊκών φορέων έκφρασης της Pim-2, γονίδιο-στόχος του NF-κΒ	55
Σχήμα 1.3.	Κατασκευή αθανатоποιημένων ινοβλαστών MRC5 TERT και κυττάρων MRC-5 TERT και A549 που έφεραν BIB, Pim-2(wt) ή Pim-2(DN) και έκφραση των εισαχθέντων γονιδίων	63
Σχήμα 2.3.	Οι επιδράσεις της Pim-2 στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα MRC5 TERT και A549	65
Σχήμα 3.3.	Η Pim-2 επήγαγε τη συσσώρευση ανθρώπινων ινοβλαστών IMR90 στις φάσεις G1-S και G2-M	66
Σχήμα 4.3.	Ανάλυση της έκφρασης επιλεγμένων πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου σε αθανатоποιημένες ινοβλάστες και επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα που υπερεκφράζανε την Pim-2(wt) ή την Pim-2(DN)	73
Σχήμα 5.3.	Ανάλυση της έκφρασης επιλεγμένων πρωτεϊνών ρύθμισης της προόδου του κυτταρικού κύκλου σε κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα και εκχυλίσματα από 'καθαρούς' πυρήνες των κυττάρων MRC5 TERT	74
Σχήμα 6.3.	Αποκρίσεις των αθανатоποιημένων ινοβλαστών MRC5 TERT στο H ₂ O ₂	77
Σχήμα 7.3.	Ενδογενή επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου ΔΜΟ σε κύτταρα MRC-5 TERT και A549 και δοσο-εξαρτώμενη επαγωγή της Pim-2 μετά την έκθεση των κυττάρων MRC5 TERT και A549 σε H ₂ O ₂	79
Σχήμα 8.3.	Η Pim-2 προήγαγε τη συσσώρευση τελομερισμένων ινοβλαστών MRC5 TERT στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση στο H ₂ O ₂	81
Σχήμα 9.3.	Η Pim-2 προήγαγε τη συσσώρευση των καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων A549/BIB, A549/Pim-2(wt) και A549/Pim-2(DN) στη φάση G2-M του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση στο H ₂ O ₂	82
Σχήμα 10.3.	Ανάλυση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στις ινοβλάστες MRC-5 TERT/BIB και MRC5 TERT/Pim-2(wt) που εκτίθενται σε H ₂ O ₂	85
Σχήμα 11.3.	Ανάλυση επιλεγμένων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στα επιθηλιακά καρκινικά A549 που εκτίθενται σε H ₂ O ₂	87

Σχήμα 12.3.	Η Ρim-2 επέφερε προστασία στα κύτταρα MRC-5 TERT και A549 ως απόκριση στο H ₂ O ₂	89
Σχήμα 13.3.	Ο παράγοντας TNF-α δεν επήγαγε απόπτωση στα κύτταρα A549	91

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1.2.	Υλικά	28
Πίνακας 2.2.	Περιγραφή κυτταρικών σειρών	35
Πίνακας 3.2.	Όγκοι πηκτών επιστίβαξης (για 2 πηκτές 10 ml)	48
Πίνακας 4.2.	Όγκοι πηκτών διαχωρισμού (για 2 πηκτές 20 ml)	48
Πίνακας 5.2.	Κατάλογος αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν	51
Πίνακας 6.2.	Κατασκευή κυτταρικών σειρών MRC-5 TERT και A549 που εκφράζανε διαφορετικά γονίδια	58

Το έργο συγχρηματοδοτείται κατά: 75% της Δημόσιας Δαπάνης από την Ευρωπαϊκή Ένωση – Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο, 25% της Δημόσιας Δαπάνης από το Ελληνικό Δημόσιο – Υπουργείο Ανάπτυξης – Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας και από τον Ιδιωτικό Τομέα στο πλαίσιο του Μέτρου 8.3 του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα – Γ΄ Κοινοτικό Πλαίσιο Στήριξης.

This research project (PENED) is co-financed by E.U.-European Social Fund (75%) and the Greek Ministry of Development-GSRT (25%).