



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ

**ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ  
ΣΠΟΡΑΔΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ  
(ΚΠΕ) ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΙΣ ΟΓΚΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ  
K-RAS ΚΑΙ B-RAF**

ΕΛΕΝΗ ΜΑΚΡΟΔΟΥΛΗ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διδακτορική διατριβή με τίτλο: "Γονιδιακή έκφραση σε κυτταρικά μοντέλα Σποραδικού Καρκίνου του Παχέος Εντέρου (ΣΚΠΕ) επαγόμενη από τις ογκοπρωτεΐνες KRAS και BRAF", εκπονήθηκε στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Γονιδιακής Ρύθμισης με την οικονομική υποστήριξη του προγράμματος ΠΕΝΕΔ 03ΕΔ562, το οποίο και θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Κατ' αρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιστημονικό μου υπεύθυνο, Δρ. Πίντζα Αλέξανδρο, τόσο για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με την έρευνα, όσο και για την επιστημονική καθοδήγηση, την επίβλεψη και την υποστήριξη που μου παρείχε όλο αυτό το διάστημα. Ένα μεγάλο ευχαριστώ ανήκει επίσης στον καθηγητή Θεόδωρο Φώτση, ο οποίος είναι και ο επιβλέπων της παρούσας διατριβής, για τις πολύτιμες παρατηρήσεις και συμβουλές που μου παρείχε, όποτε αυτό ήταν απαραίτητο.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: Παπαμαρκάκη Θωμαΐς (Αναπλ. Καθηγήτρια, Παν/μιο Ιωαννίνων), Γαλάρη Δημήτριο (Καθηγητής, Παν/μιο Ιωαννίνων), Φριλίγγος Ευστάθιο (Αν. Καθηγητής Παν/μιο Ιωαννίνων), Τζαβάρα Θεόδωρο (Επικ. Καθηγητής, Παν/μιο Ιωαννίνων) και Χριστοφορίδη Σάββα (Επικ. Καθηγητής, Παν/μιο Ιωαννίνων), που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην εξεταστική επιτροπή και να με βοηθήσουν στην ορθή συγγραφή της παρούσας διατριβής με τις παρατηρήσεις και υποδείξεις τους.

Ένα πολύ μεγάλο και θερμό ευχαριστώ ανήκει στα μέλη του εργαστηρίου Γονιδιακής Ρύθμισης, όπου εκπονήθηκε η παρούσα διατριβή, για την πολύτιμη βοήθεια και συμπαράστασή τους από την πρώτη έως και την τελευταία ημέρα. Συγκεκριμένα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους: Δρ. Ψαχούλια Φαίη, Δρ. Βούλγαρη Αγγελική, Δρ. Καλογεροπούλου Μαργαρίτα, Δρ. Ignacio Mazon Pelaez, Δρ. Ανδρεόλα Χρυσοβαλάντη, Κοσμίδου Βιβή και κυρίως τη Δρ. Οικονόμου Ευτυχία, της οποίας η βοήθεια ήταν καθοριστική για την ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής μου.

Θα ήθελα τέλος, να ευχαριστήσω θερμά τους δικούς μου ανθρώπους που όλα αυτά τα χρόνια ήταν κοντά μου και με στήριζαν πραγματικά όποτε το είχα ανάγκη. Το πιο μεγάλο ευχαριστώ απ' όλα, δικαιωματικά ανήκει στην οικογένειά μου, η οποία

ήταν η «δύναμή» μου όλο αυτό το χρονικό διάστημα και η οποία πίστεψε σε μένα και με στήριξε με κάθε τρόπο.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	7
1.1 Ο καρκίνος .....	8
1.1.2 Ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων .....	8
1.1.3 Η μοριακή βάση του καρκίνου .....	9
1.2 Ο καρκίνος του παχέος εντέρου .....	12
1.3 Η πρωτεΐνη K-RAS.....	14
1.3.1 Μονοπάτια μεταγωγής σήματος που ρυθμίζονται από την πρωτεΐνη RAS	16
1.3.2 K-RAS και καρκίνος.....	18
1.4 Η πρωτεΐνη RAF.....	19
1.4.1 B-RAF και καρκίνος .....	20
1.5 Τα ογκογονίδια K-RAS και B-RAF και ο κυτταρικός κύκλος .....	23
1.5.1 Ογκογονίδια και κυτταρική γήρανση (cellular senescence) / μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability).....	25
1.6 Οι Rho GTPάσες.....	26
1.6.1 Ρόλος των Rho GTPασών μέσα στο κύτταρο .....	28
1.6.2 Rho GTPάσες και καρκίνος.....	30
1.7 Επιθήλιο-Μεσεγχυματική μετάβαση (Epithelial - Mesenchymal Transition, EMT).....	34
1.7.1 Επιθήλιο-Μεσεγχυματική μετάβαση και καρκίνος .....	35
Σκοπός της διδακτορικής διατριβής .....	38
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	40
2.1 Υλικά.....	41
2.1.1 Χημικά / Αναλώσιμα .....	41
Υλικά για την κυτταροκαλλιέργεια .....	41
Χημικά/αναλώσιμα για χρήση <i>in vitro</i> τεχνικών .....	41
Χημικά/αναλώσιμα για την παρασκευή διαλυμάτων.....	42
2.1.2 Αντισώματα .....	43
2.1.3 Εκκινητές.....	44
2.2 Διαλύματα .....	46
Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αραρόζης .....	46
Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου.....	46
Διαλύματα λύσης των κυττάρων για την ανάλυση πρωτεϊνών .....	49
Διαλύματα λύσης των κυττάρων για την ανίχνευση των ενεργών GTPασών (GST- pull down assay) .....	49
Καλλιέργεια βακτηρίων ( <i>E.coli</i> ).....	50
2.3 Μέθοδοι.....	51
2.3.1 Μέθοδοι χειρισμού και μελέτης κυτταρικών συστημάτων .....	51
Καλλιέργεια κυττάρων .....	51
Κυτταρικές σειρές.....	52
Μόνιμη επιμόλυνση των Caco-2 κυττάρων με πλασμίδια που φέρουν τα ογκογονίδια BRAF <sup>V600E</sup> και KRAS <sup>G12V</sup> .....	53
Παροδική επιμόλυνση των κυττάρων με μικρά ανασταλτικά μόρια RNA ( <i>small         inhibitory RNA, siRNA</i> ).....	54
Καλλιέργεια κυττάρων σε σύστημα 3 διαστάσεων (3D culture).....	54
Μελέτη ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων .....	55
Δημιουργία αποικιών σε μαλακό άγαρ .....	55
Δημιουργία όγκων σε άθυμα ποντίκια ( <i>SCID mice</i> ) .....	56
Έλεγχος της επίδρασης του αναστολέα της MEK, UO126, στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με την τεχνική MTT.....	57

<i>Ανίχνευση ενεργότητας ενδογενούς β-γαλακτοσιδάσης σχετιζόμενης με την κυτταρική γήρανση (χρώση SA-β-gal) .....</i>	<i>58</i>
<i>Κυτταρομετρία ροής (Fluorescence Activated Cell Sorting-FACS analysis) .....</i>	<i>58</i>
<i>In vitro έλεγχος της κυτταρικής μετανάστευσης και διείσδυσης .....</i>	<i>59</i>
<b>2.3.2 Ανάλυση πρωτεϊνών .....</b>	<b>60</b>
<i>Παρασκευή ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων .....</i>	<i>60</i>
<i>Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωμα κατά Western .....</i>	<i>61</i>
<i>Ανίχνευση των ενεργών GTPασών με τη μέθοδο GST-pull down .....</i>	<i>63</i>
<i>Ανοσοφθορισμός .....</i>	<i>65</i>
<b>2.3.3 Μέθοδοι μελέτης DNA, RNA .....</b>	<b>66</b>
<i>Απομόνωση DNA από τα κύτταρα .....</i>	<i>66</i>
<i>Έλεγχος αστάθειας μικροδορυφορικού DNA .....</i>	<i>67</i>
<i>Απομόνωση mRNA και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) .....</i>	<i>67</i>
<i>Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης .....</i>	<i>70</i>
<i>Real Time – PCR .....</i>	<i>71</i>
<i>Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία .....</i>	<i>72</i>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>73</b>
<i>ΜΕΡΟΣ 'Α' .....</i>	<i>75</i>
<b>3.1 Δημιουργία και χαρακτηρισμός κυτταρικών συστημάτων έκφρασης των ογκογονιδίων <i>BRAF<sup>V600E</sup></i> και <i>KRAS<sup>G12V</sup></i> .....</b>	<b>75</b>
<b>3.1.1 Δημιουργία και επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων που εκφράζουν τις ογκοπρωτεΐνες <i>BRAF<sup>V600E</sup></i> και <i>KRAS<sup>G12V</sup></i> .....</b>	<b>75</b>
<b>3.1.2 Το ογκογονίδιο <i>BRAF<sup>V600E</sup></i> ενισχύει το ρυθμό πολλαπλασιασμού των Caco-2 κυττάρων και οδηγεί στο μετασχηματισμό τους αποτελεσματικότερα από ότι το <i>KRAS<sup>G12V</sup></i> .....</b>	<b>77</b>
<b>3.1.3 Μονοπάτια μεταγωγής σήματος από τις ογκοπρωτεΐνες <i>BRAF<sup>V600E</sup></i> και <i>KRAS<sup>G12V</sup></i> .....</b>	<b>81</b>
<b>3.1.4 Το ογκογονίδιο <i>KRAS<sup>G12V</sup></i> οδήγησε στην εμφάνιση χαρακτηριστικών κυτταρικής γήρανσης (senescence) στα Caco-2 κύτταρα .....</b>	<b>88</b>
<b>3.1.5 Η αδρανοποίηση (απενεργοποίηση) του Rb μονοπατιού και του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου, p19<sup>ARF</sup>, σχετίζονται με το ογκογονίδιο <i>BRAF<sup>V600E</sup></i> στο μετασχηματισμό των Caco-2 κυττάρων. ....</b>	<b>93</b>
<b>3.1.6 Το ογκογονίδιο <i>BRAF<sup>V600E</sup></i> προκαλεί αστάθεια μικροδορυφορικού DNA (Microsatellite Instability, MSI) στα Caco-2 κύτταρα .....</b>	<b>96</b>
<i>ΜΕΡΟΣ 'Β' .....</i>	<i>103</i>
<b>Συγκριτική επίδραση των ογκογονιδίων <i>BRAF<sup>V600E</sup></i>, <i>KRAS<sup>G12V</sup></i> &amp; <i>HRAS<sup>G12V</sup></i> στα μονοπατία μεταγωγής σημάτων, των RhoA, Rac1 και Cdc42 και τη κυτταρική διεισδυτικότητα και μεταναστευτικότητα .....</b>	<b>103</b>
<b>3.2.1 Το ογκογονίδιο <i>BRAF<sup>V600E</sup></i> προκάλεσε μορφολογικές αλλαγές στα Caco-2 κύτταρα σε σύγκριση με το <i>KRAS<sup>G12V</sup></i> καθώς και απώλεια της επιθηλιακής αρχιτεκτονικής τους σε καλλιέργεια τριών διαστάσεων (3D), παρόμοια με αυτή του <i>HRAS<sup>G12V</sup></i> .....</b>	<b>103</b>
<b>3.2.2 Το ογκογονίδιο <i>BRAF<sup>V600E</sup></i> μείωσε τα επίπεδα mRNA της E-καντερίνης και αλλοίωσε τη χαρακτηριστική επιθηλιακή κατανομή της στα Caco-2 κύτταρα. ....</b>	<b>107</b>
<b>3.2.3 Διαφορική ενίσχυση της μεταναστευτικής και διεισδυτικής ικανότητας των κυττάρων από τα ογκογονίδια <i>BRAF<sup>V600E</sup></i>, <i>KRAS<sup>G12V</sup></i> και <i>HRAS<sup>G12V</sup></i> (EMT) .....</b>	<b>110</b>
<b>3.2.4 Το ογκογονίδιο <i>BRAF<sup>V600E</sup></i> ενισχύει την ικανότητα των Caco-2 κυττάρων να μεταναστεύουν και να διεισδύουν <i>in vitro</i> μέσω ενεργοποίησης της RhoA GTPάσης εξαρτώμενης από τη MEK. ....</b>	<b>113</b>

3.2.5 Το ογκογονίδιο <i>KRAS</i> <sup>G12V</sup> επάγει την <i>in vitro</i> ικανότητα μετανάστευσης και διείσδυσης των Caco-2 κυττάρων μέσω ενεργοποίησης της Cdc42 από το μονοπάτι PI3K.....	119
3.2.6 Το ογκογονίδιο <i>HRAS</i> <sup>G12V</sup> ενεργοποιεί τη Rac1 GTPάση και αυξάνει σημαντικά την έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την Επιθηλιακή-Μεσεγχυματική μετάβαση (EMT).....	123
3.2.7 Αλληλεπίδραση και επικοινωνία μεταξύ των μονοπατιών των Rho GTPασών .....	128
3.2.8 Τα ογκογονίδια <i>BRAF</i> <sup>V600E</sup> και <i>KRAS</i> <sup>G12V</sup> συνεργάζονται με τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού β-1 (Transforming Growth Factor β-1, TGFβ-1) για να ενισχύσουν το μετασχηματισμό των Caco-2 κυττάρων.....	130
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	135
ΜΕΡΟΣ 'Α.....	136
4.1 Δημιουργία και χαρακτηρισμός νέων κυτταρικών συστημάτων έκφρασης των ογκογονιδίων.....	136
4.1.1 Μονοπάτια μεταγωγής σήματος επαγόμενα από το ογκογονίδιο <i>BRAF</i> <sup>V600E</sup> .....	137
4.1.2 Το ογκογονίδιο <i>KRAS</i> <sup>G12V</sup> οδήγησε στην ενεργοποίηση παραγόντων και μηχανισμών κυτταρικής γήρανσης στα Caco-2 κύτταρα. ....	140
4.1.3 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από τα ογκογονίδια <i>BRAF</i> <sup>V600E</sup> και <i>KRAS</i> <sup>G12V</sup> .....	142
ΜΕΡΟΣ 'Β.....	145
4.2 Συγκριτική επίδραση των ογκογονιδίων <i>BRAF</i> <sup>V600E</sup> , <i>KRAS</i> <sup>G12V</sup> & <i>HRAS</i> <sup>G12V</sup> στα μονοπατία μεταγωγής σημάτων των μικρών GTPασών <i>RhoA</i> , <i>Rac1</i> και <i>Cdc42</i> και τη κυτταρική διεισδυτικότητα και μεταναστευτικότητα.....	145
4.2.1 Το ογκογονίδιο <i>BRAF</i> <sup>V600E</sup> μεταβάλλει τα επιθηλιακά χαρακτηριστικά των αδενωματικών κυττάρων του παχέος εντέρου. ....	145
4.2.2 Το ογκογονίδιο <i>BRAF</i> <sup>V600E</sup> ενισχύει τη μεταναστευτική και διεισδυτική ικανότητα των αδενωματικών κυττάρων του παχέος εντέρου μέσω ενεργοποίησης της <i>RhoA</i> . ....	146
4.2.3 Το ογκογονίδιο <i>KRAS</i> <sup>G12V</sup> ενισχύει τη μεταναστευτική και διεισδυτική ικανότητα των αδενωματικών κυττάρων του παχέος εντέρου μέσω ενεργοποίησης της <i>Cdc42</i> . ....	148
4.2.4 Το ογκογονίδιο <i>HRAS</i> <sup>G12V</sup> οδηγεί τα κύτταρα σε επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση, μια αρκετά πολύπλοκη διαδικασία. ....	150
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	153
<b>ΣΥΜΜΑΡΥ.....</b>	156
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	159

## *ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ*

## 1.1 Ο καρκίνος

Ο καρκίνος αποτελεί μια γενετική ασθένεια που προκύπτει ύστερα από μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να συμβούν στα γεννητικά κύτταρα, (κληρονομικός-οικογενής καρκίνος), ή στα σωματικά κύτταρα (σποραδικός καρκίνος). Οι γενετικές αλλαγές που οδηγούν στους περισσότερους καρκίνους, προέρχονται από αλλαγές του DNA στα σωματικά κύτταρα και συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου. Αυτό που χαρακτηρίζει τα καρκινικά κύτταρα είναι ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας συμπαγούς μάζας κυττάρων, του καρκινικού όγκου. Αν σε κάποια κύτταρα του νεπλάσματος συμβούν οι κατάλληλες γενετικές αλλαγές, αποκτούν την ιδιότητα να διεισδύουν στους υγιείς ιστούς και μέσω της κυκλοφορίας μεταφέρονται και εγκαθίστανται σε νέους ιστούς και όργανα. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως καρκινική μετάσταση και τα νεοπλάσματα με την ιδιότητα αυτή χαρακτηρίζονται ως κακοήθη και έχουν συνήθως κακή πρόγνωση. Αντίθετα, οι νεοπλασίες που δεν έχουν την ικανότητα της μετάστασης συνήθως δεν απειλούν τη ζωή του ασθενούς εάν έγκαιρα αφαιρεθούν ή αντιμετωπιστούν θεραπευτικά.

### 1.1.2 Ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων

Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από μια σειρά ιδιοτήτων που τα ξεχωρίζει από τα φυσιολογικά. Οι κυριότερες ιδιότητες τους είναι οι εξής:

Ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα που έχουν περιορισμένο αριθμό διαιρέσεων, τα καρκινικά κύτταρα διαιρούνται συνεχώς χωρίς να χρειάζονται μάλιστα τη δράση αυξητικών ή άλλων περιβαλλοντικών παραγόντων.



Απώλεια της απόπτωσης. Στα καρκινικά κύτταρα ο μηχανισμός προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου δε λειτουργεί συχνά σωστά, με αποτέλεσμα τη συνεχή ανάπτυξη του όγκου.

Έχουν χάσει την ικανότητα αναστολής εξ επαφής (contact inhibition), με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολύστιβων συσσωματωμάτων όταν καλλιεργούνται. Σε συνθήκες καλλιέργειας τα καρκινικά κύτταρα δεν περιορίζονται από την επαφή του ενός κυττάρου με το άλλο, όπως συμβαίνει φυσιολογικά, με αποτέλεσμα να πολλαπλασιάζονται δημιουργώντας πολύστιβα συσσωματώματα.

Μείωση ή απώλεια της διαφοροποίησης. Τα καρκινικά κύτταρα χάνουν την δυνατότητα εξειδίκευσής τους, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να συμβάλλουν στη φυσιολογική λειτουργία διαφοροποίησης του οργάνου ή ιστού.

Επαγωγή αγγειογένεσης. Η αγγειογένεση φαίνεται να είναι απαραίτητη τουλάχιστον σε δύο στάδια της ογκογένεσης: α) Στην ανάπτυξη του όγκου πάνω από ένα συγκεκριμένο μέγεθος και στη διηθητική του συμπεριφορά και β) στην επιβίωση και ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων στη μεταστατική περιοχή.

Καρκινική Μετάσταση. Κάποια καρκινικά κύτταρα μπορεί να αποσπασθούν από τον αρχικό όγκο και να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος ή το λεμφικό σύστημα, με αποτέλεσμα την εγκατάστασή και ανάπτυξή τους σε διαφορετικές θέσεις από την πρωτοπαθή εστία.

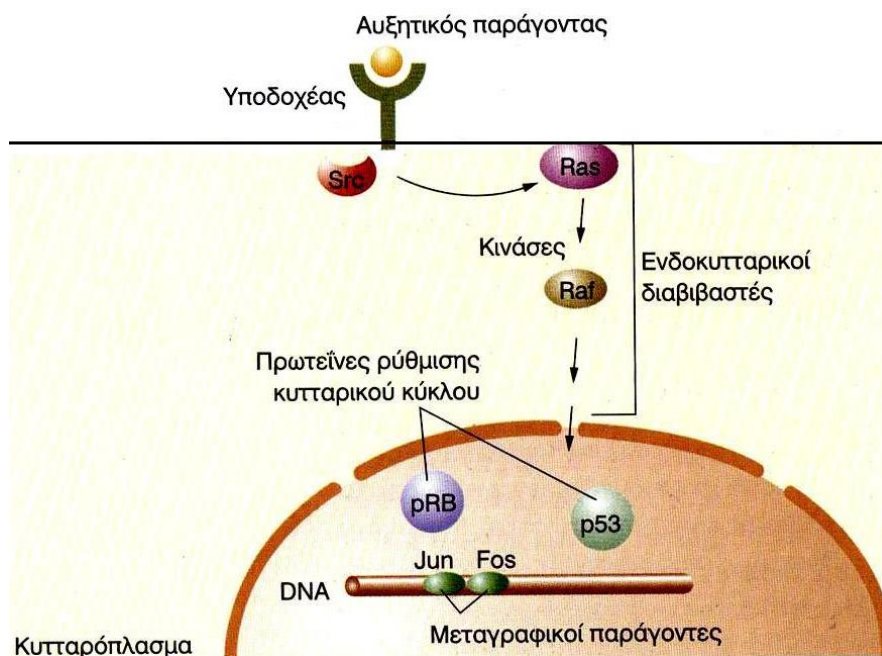
### **1.1.3 Η μοριακή βάση του καρκίνου**

Η έναρξη και εξέλιξη της καρκινογένεσης προϋποθέτει τη συσσώρευση μεταλλάξεων σε γονίδια τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση του κυττάρου. Τα γονίδια αυτά διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: στα *πρωτο-ογκογονίδια* και στα *ογκοκατασταλτικά γονίδια*. Τα πρωτο-ογκογονίδια

συμμετέχουν στις διαδικασίες που οδηγούν το κύτταρο στην αύξηση και τη διαίρεση, ενώ τα ογκοκατασταλτικά γονίδια συμβάλλουν στην καταστολή αυτών των λειτουργιών.

Ογκογονίδια. Όταν τα πρωτο-ογκογονίδια μεταλλαχθούν μεταπίπτουν σε ογκογονίδια, τα οποία χαρακτηρίζονται από υπερπαραγωγή των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν ή από υπερβολική αύξηση της ενεργότητάς τους. Τα ογκογονίδια είναι υπεύθυνα για την παραγωγή μορίων που συμμετέχουν στη ρύθμιση της ανάπτυξης του κυττάρου και ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους κατατάσσονται σε κατηγορίες: α) Ογκογονίδια που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες ή τους υποδοχείς τους, όπως EGFR. Στην περίπτωση αυτή τα κύτταρα οδηγούνται σε υπερπαραγωγή αυξητικών παραγόντων ή σε ευαισθητοποίηση των υποδοχέων τους έναντι μικρών συγκεντρώσεων τους, με αποτέλεσμα να διαιρούνται σε συνθήκες που τα φυσιολογικά κύτταρα δε διαιρούνται. β) Ογκογονίδια που κωδικοποιούν ενδοκυτταρικούς διαβιβαστές σημάτων. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τα περισσότερα ογκογονίδια των οποίων τα προϊόντα συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος από τους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης σε κάποιο ενδοκυτταρικό στόχο. Τέτοια μόρια μπορεί να είναι κινάσες, όπως η RAF και η Src, που φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες-στόχους ή άλλες πρωτεΐνες που ανήκουν σε συγκεκριμένα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, όπως η RAS που είναι από τα πιο κοινά ογκογονίδια του ανθρώπινου καρκίνου (Εικόνα 1). (γ) Ογκογονίδια που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες. Τα γονίδια αυτά είναι υπεύθυνα για την παραγωγή πρωτεϊνών που δρουν ως παράγοντες μεταγραφής (π.χ. *myc*) συμμετέχοντας έτσι σε λειτουργίες όπως η κυτταρική διαίρεση. Όταν συμβεί η κατάλληλη μετάλλαξη σε αυτά, τότε τα κύτταρα διαιρούνται χωρίς τη δράση αυξητικών παραγόντων. (δ) Ογκογονίδια που σχετίζονται με τη διαδικασία της απόπτωσης. Στην περίπτωση αυτή γονίδια που κωδικοποιούν αποπτωτικούς

παράγοντες (π.χ. bcl-2) μεταλλάσσονται, με αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης και τη δημιουργία συμπαγούς όγκου. (ε) Ογκογονίδια των οποίων τα προϊόντα έχουν άλλες λειτουργίες .



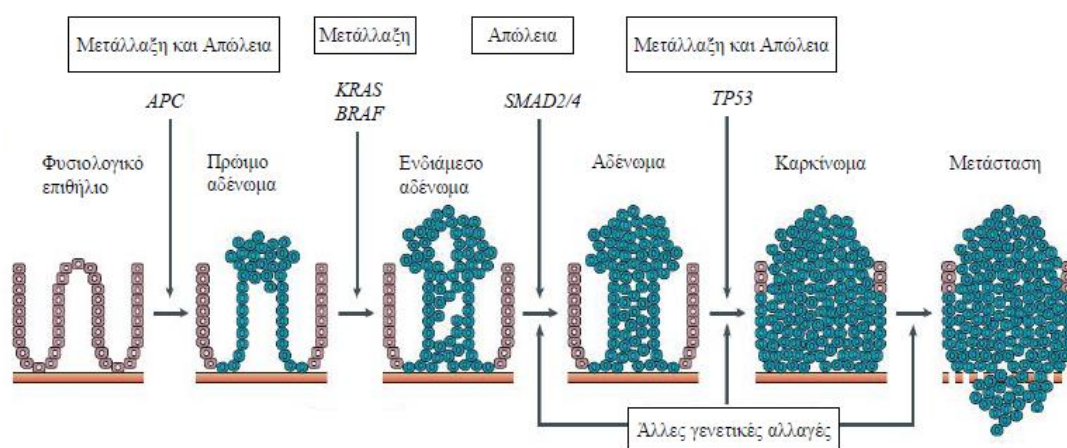
**Εικόνα 1.** Πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από ογκογονίδια και συμμετέχουν στην ενδοκυτταρική μεταγωγή μηνυμάτων <sup>1</sup>.

Ογκοκατασταλικά γονίδια. Η συνήθης φυσιολογική λειτουργία αυτών των γονιδίων σχετίζεται με την αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και άλλων λειτουργιών. Όταν όμως αλλοιωθούν με σημειακές μεταλλάξεις η/και ελλείψεις η ρύθμιση αυτή του κυτταρικού κύκλου διαταράσσεται και τα κύτταρα διαιρούνται ανεξέλεγκτα. Όπως στην περίπτωση των ογκογονιδίων, έτσι και τα ογκοκατασταλικά γονίδια κατατάσσονται σε κατηγορίες: (α) Ογκοκατασταλικά γονίδια που κωδικοποιούν ενδοκυτταρικούς διαβιβαστές, καταστολείς σημάτων καθώς και υποδοχείς μορίων που συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή. Παράδειγμα αυτής της κατηγορίας είναι ο υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (TGF-β). Φυσιολογικά, ο TGF-β έχει την ιδιότητα δεσμευόμενος στους κατάλληλους υποδοχείς να

παρεμποδίζει την κυτταρική διαίρεση όταν αυτό είναι απαραίτητο. Σε περίπτωση μετάλλαξης όμως, αυτός ο ομοιοστατικός μηχανισμός απενεργοποιείται και συνεπώς η κυτταρική διαίρεση συνεχίζεται οδηγώντας στην ανάπτυξη του όγκου. (β) Ογκοκατασταλτικά γονίδια που κωδικοποιούν κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, όταν το γονίδιο *NF-1* που είναι υπεύθυνο για την αναστολή της ογκοπρωτεΐνης RAS μεταλλαχθεί, τα κύτταρα δεν μπορούν να ρυθμίσουν τη δραστικότητα της RAS με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους. (γ) Ογκοκατασταλτικά γονίδια που κωδικοποιούν πυρηνικές πρωτεΐνες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι τα γονίδια *p53* και *RB*, των οποίων μεταλλάξεις απαντώνται συχνά σε διάφορους καρκίνους του ανθρώπου. Τα γονίδια αυτά είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου με αποτέλεσμα μεταλλάξεις/ελλείψεις τους να μετατρέπουν τα κύτταρα σε καρκινικά.

## 1.2 Ο καρκίνος του παχέος εντέρου

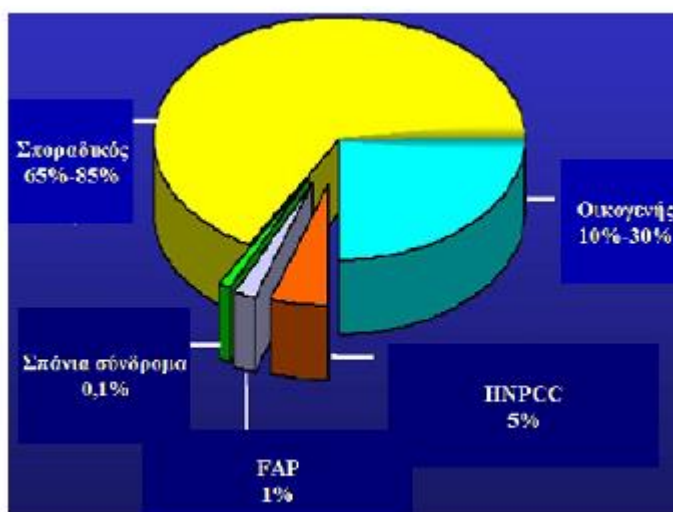
Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (Κ.Π.Ε.) ή κολο-ορθικός καρκίνος αποτελεί μία από τις συχνότερες μορφές καρκίνου στον άνθρωπο και προσβάλλει εκατομμύρια άτομα κάθε χρόνο. Με περίπου 655.000 θανάτους παγκοσμίως ετησίως, είναι η τρίτη πιο κοινή μορφή καρκίνου και η δεύτερη κύρια αιτία θανάτου προκαλούμενου από καρκίνο στο δυτικό κόσμο <sup>2</sup>. Στις περισσότερες περιπτώσεις ο Κ.Π.Ε. προκύπτει από αδενωματώδεις πολύποδες στο παχύ έντερο, οι οποίοι είναι συνήθως καλοήθεις, αλλά μερικοί μπορεί να αναπτυχθούν αργότερα σε καρκίνο. Ο καρκίνος μπορεί να αναπτυχθεί σε οποιοδήποτε από τα 4 τμήματα του εντέρου (το ανιόν, το εγκάρσιο, το κατιόν και το σιγμοειδές) και ο τρόπος εμφάνισής του μπορεί να είναι: σποραδικός ή κληρονομούμενος.



**Εικόνα 2.** Το πολυσταδιακό σύστημα της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου. Η μετάβαση από φυσιολογικό επιθήλιο μέσω αδενώματος προς καρκίνωμα χαρακτηρίζεται από γενετικές αλλοιώσεις σε συγκεκριμένα γονίδια. (Προσαρμογή από Davies R.G. *et al.*,<sup>3</sup> δεν υπάρχει το reference

Ο Κ.Π.Ε. είναι μια πολυσταδιακή διαδικασία τόσο σε μοριακό, όσο και σε μορφολογικό επίπεδο στην οποία γενετικές και επιγενετικές αλλαγές συσσωρεύονται προκειμένου να δώσουν νεοπλασματικό φαινότυπο. Οι μορφολογικές αλλαγές που δημιουργούνται στο επιθήλιο του παχέος εντέρου κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του όγκου, αποδίδονται σε συγκεκριμένες αλλοιώσεις γονιδίων, και απεικονίζουν τη διαδοχική μετάβαση από αδένωμα, σε αδenoκαρκίνωμα και τελικά σε μεταστατικό καρκίνωμα<sup>4</sup>, (Εικόνα 2). Οι αλλοιώσεις αυτές είναι απαραίτητες για την εξέλιξη του

καρκίνου και συχνά περιλαμβάνουν ενεργοποίηση ογκογονιδίων (από πρωτο-ογκογονίδια) σε συνδυασμό με την απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, που φυσιολογικά παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του όγκου<sup>5</sup>.

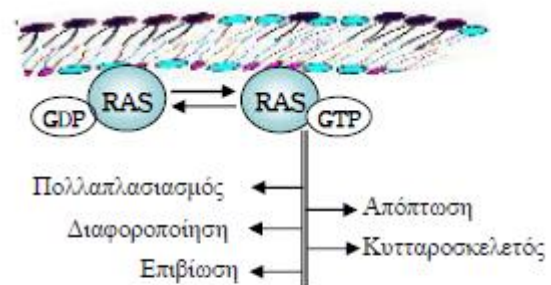


**Εικόνα 3.** Τύποι του ΚΠΕ.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω ο κολο-ορθικός καρκίνος μπορεί να είναι κληρονομούμενος ή σποραδικός. Οι δύο πιο συχνοί τύποι κληρονομικού Κ.Π.Ε. που έχουν μελετηθεί εκτενώς είναι ο κληρονομικός μη πολυπλοειδής καρκίνος του παχέος εντέρου (HNPCC) και η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (FAP). Ο κληρονομικός Κ.Π.Ε. συχνά εμφανίζεται σε σχετικά νεότερους ανθρώπους, σε αντίθεση με τον μη κληρονομικό (σποραδικό) που σπάνια εμφανίζεται πριν τα 45 χρόνια. Η παρούσα διατριβή μελετά το σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου (Σ.Κ.Π.Ε.), ο οποίος αντιστοιχεί στο 70%-90% περίπου των περιπτώσεων καρκίνου στο έντερο (Εικόνα 3).

### 1.3 Η πρωτεΐνη K-RAS

Η οικογένεια *RAS* περιλαμβάνει γονίδια τα οποία κωδικοποιούν μικρές πρωτεΐνες των 188 ή 189 αμινοξέων με μοριακό βάρος 21kDa (p21). Στον άνθρωπο υπάρχουν 3 γονίδια *RAS*: Kirsten-*RAS* (K-*RAS*), Harvey-*RAS* (H-*RAS*) και N-*RAS* (Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog) με το γονίδιο K-*RAS* να κωδικοποιεί για 2 ισομορφές, K-*RAS4A* και K-*RAS4B*, ως αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου. Οι πρωτεΐνες *RAS* ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των G πρωτεϊνών και εναλλάσσονται μεταξύ μιας ενεργής, προσδεμένης με GTP και μιας ανενεργής, προσδεμένης με GDP μορφής. Εντοπίζονται στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, από όπου συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος του κυττάρου, ρυθμίζοντας μια πληθώρα βιολογικών λειτουργιών, όπως κυτταρικό πολλαπλασιασμό,



Εικόνα 4. Οι πρωτεΐνες Ras ρυθμίζουν βασικές κυτταρικές λειτουργίες.

πολλαπλασιασμό, όπως κυτταρικό πολλαπλασιασμό,

διαφοροποίηση, απόπτωση, αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και επιβίωση (Εικόνα 4).

Φυσιολογικά, σε συνθήκες ηρεμίας οι πρωτεΐνες RAS βρίσκονται στην ανενεργή μορφή. Όταν όμως επιδράσει κάποιο εξωκυττάριο σήμα (αυξητικοί παράγοντες, ορμόνες, κυτταροκίνες) μέσω των κατάλληλων υποδοχέων, τότε το GDP απελευθερώνεται από την G πρωτεΐνη και τη θέση του παίρνει ένα μόριο GTP. Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης RAS έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγωγή της πληροφορίας, διαδικασία πολύπλοκη όπου συμμετέχουν αρκετές διακριτές πρωτεΐνες. Όταν η ενεργή RAS πρωτεΐνη έχει ολοκληρώσει το ρόλο της, το GTP υδρολύεται σε GDP με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της πρωτεΐνης. Η διαδικασία ενεργοποίησης-απενεργοποίησης των G πρωτεϊνών και κατά συνέπεια της RAS ρυθμίζεται από συγκεκριμένα μόρια που ονομάζονται παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (Guanine Nucleotide Exchange Factors, GEFs), πρωτεΐνες ενεργοποίησης της GTPάσης (GTPase Activating Proteins, GAPs) και αναστολείς αποδέσμευσης των νουκλεοτιδίων γουανίνης (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors, GDIs), όπου οι GEFs είναι υπεύθυνοι για την πρόσδεση του GTP στην πρωτεΐνη και οι GAPs για την υδρόλυσή του, ενώ οι GDIs εμποδίζουν την πρόσδεση του GTP με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να παραμένει στην ανενεργή μορφή. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών RAS είναι παροδική και το μεγαλύτερο ποσοστό τους βρίσκεται στην ανενεργή μορφή, κατάσταση που διαταράσσεται σε περίπτωση γενετικής βλάβης, με αποτέλεσμα την εμφάνιση καρκίνου.

### 1.3.1 Μονοπάτια μεταγωγής σήματος που ρυθμίζονται από την πρωτεΐνη RAS

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ενεργοποίηση της πρωτεΐνης RAS έχει σαν αποτέλεσμα τη ρύθμιση σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών και αυτό συμβαίνει μέσω διαφόρων μονοπατιών μεταγωγής σήματος (εικόνα 5). Τα κυριότερα είναι:

- Μονοπάτι μεταγωγής σήματος RAF-MEK-ERK (μονοπάτι MAPK).

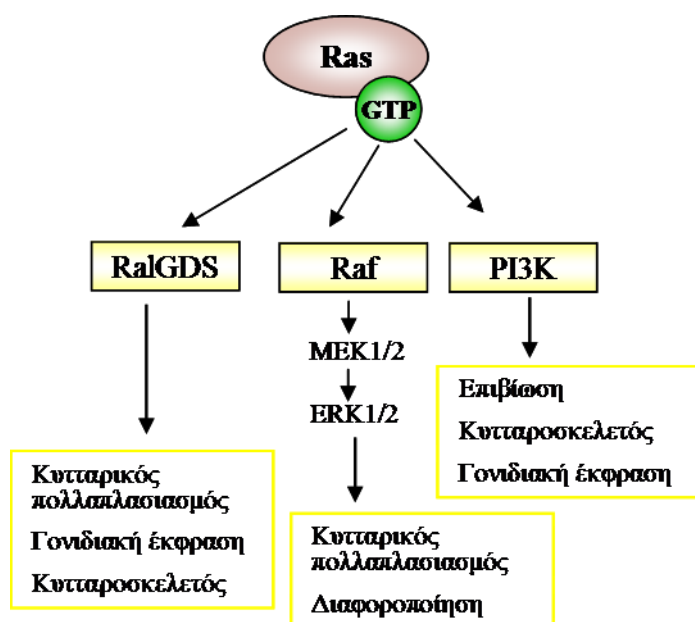
Πρόσδεση του GTP από την πρωτεΐνη RAS έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της ανενεργής RAF κινάσης από το κυτταρόπλασμα προς την κυτταρική μεμβράνη, όπου και ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης σε συγκεκριμένες αμινοξικές αλληλουχίες. Η ενεργή πλέον RAF κινάση ενεργοποιεί με τη σειρά της τη MEK (mitogen-activated protein kinase), η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί 2 MAP (mitogen-activated protein) κινάσες, γνωστές ως ERK1/2 ή p44MAPK/ERK-1/p42MAPK/ERK-2, (ERK: extracellular signal-related kinase). Μετά την ενεργοποίησή τους οι ERK1/2 κινάσες εισέρχονται στον πυρήνα, όπου ρυθμίζουν με φωσφορυλίωση τη δραστηριότητα μιας πληθώρας μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι προσδέονται σε χαρακτηριστικές αλληλουχίες υποκινητών, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας ομάδας γονιδίων. Με τον τρόπο αυτό ρυθμίζονται βασικές για το κύτταρο λειτουργίες, όπως κυτταρικός πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση.

- Μονοπάτι μεταγωγής σήματος RalGDS. Όταν η RAS πρωτεΐνη ενεργοποιείται δεσμεύεται στην πρωτεΐνη RalGDS (Ral-GDP dissociation stimulator). Η πρωτεΐνη RalGDS αποτελεί έναν από τους RAS-εξαρτώμενους GEFs και λειτουργεί προκειμένου να ενεργοποιήσει τις GTPάσες RalA και B <sup>6</sup>. Οι πρωτεΐνες RalA και RalB αλληλεπιδρούν στη συνέχεια με άλλα μόρια, όπως την πρωτεΐνη RalBP1, η οποία παρουσιάζει ενεργότητα GAP για τις μικρές GTPάσες Rac1 και Cdc42, αλλά



όχι για τη RhoA. Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη RalGDS αποτελεί μόριο-κλειδί στην *in vivo* καρκινογένεση που επάγεται από το ογκογονίδιο RAS<sup>7</sup>.

- Μονοπάτι μεταγωγής σήματος PI3K. Η πρωτεΐνη PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) αποτελεί σύμπλοκο δύο υπομονάδων, της καταλυτικής υπομονάδας μοριακού βάρους 110kDa (p110) και της ρυθμιστικής υπομονάδας μοριακού βάρους 85kDa (p85). Όταν η ενεργή πρωτεΐνη RAS συνδέεται με την καταλυτική υπομονάδα p110, τότε αυξάνεται η ενεργότητα της PI3K κινάσης, με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης μορίων PIP3 (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της GTPάσης Rac1 και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού<sup>8</sup>. Η πρωτεΐνη PI3K εμπλέκεται στη ρύθμιση διαφόρων κυτταρικών λειτουργιών, όπως επιβίωση, αύξηση μεταναστευτικότητας και μετάσταση. Το πλέον καλά μελετημένο μόριο που ενεργοποιείται από την PI3K είναι η πρωτεΐνη AKT (πρωτεϊνική κινάση B), η οποία αναστέλλει τη δράση αποπτωτικών μορίων και οδηγεί έτσι στην κυτταρική επιβίωση.



**Εικόνα 5.** Τρία από τα κύρια μονοπάτια μεταγωγής σήματος επαγόμενα από την πρωτεΐνη RAS.

### 1.3.2 *K-RAS* και καρκίνος

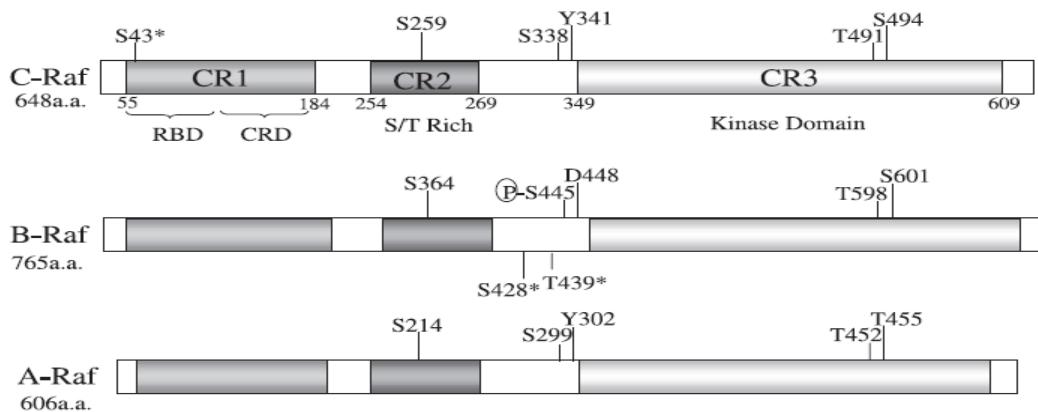
Τα γονίδια *RAS* αναγνωρίστηκαν αρχικά ως τα υπεύθυνα ογκογονίδια για τις καρκινικές ιδιότητες προερχόμενες από τους ιούς Harvey και Kirsten. Οι ιοί αυτοί ανακαλύφθηκαν από τους Jennifer Harvey<sup>9</sup> και Werner Kirsten<sup>10</sup> σε αρουραίους με σάρκωμα (*Rat sarcoma*) από όπου και προέκυψε το όνομα των γονιδίων (*Ras*).

Το ογκογονίδιο *RAS* είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο και υπερ-ενεργοποιημένο γονίδιο σε καρκινικά κύτταρα. Περίπου 20% των ανθρώπινων όγκων φέρουν σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια *RAS*. Το μεγαλύτερο ποσοστό εμφανίζεται στο *K-RAS* (περίπου 85% του συνόλου των *RAS*), έπειτα στο *N-RAS* (περίπου 15%) και τέλος στο *H-RAS* (λιγότερο από 1%). Όσον αφορά το ογκογονίδιο *K-RAS*, μεταλλάξεις εντοπίζονται στον Κ.Π.Ε. σε ποσοστό 35-50% και η πλειονότητα αυτών συμβαίνει στα κωδικόνια 12, 13 και 61, που έχουν ως αποτέλεσμα τη συνεχή ενεργοποίηση της πρωτεΐνης. Κατά συνέπεια, θεμελιώδεις βιολογικές διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η κινητικότητα, που ρυθμίζονται από τις πρωτεΐνες *RAS*, διαταράσσονται. Η πλέον συνήθης μετάλλαξη εντοπίζεται στο δωδέκατο κωδικόνιο του *K-RAS* γονιδίου και οδηγεί στην αντικατάσταση της γλυκίνης (G) από βαλίνη (V), με αποτέλεσμα να προκύπτει η ενεργοποιημένη ογκοπρωτεΐνη *K-RAS*<sup>G12V</sup><sup>11, 12, 13 14, 15</sup>.

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό γνώρισμα των *RAS*-μετασχηματισμένων κυττάρων είναι η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Συνέπεια του γεγονότος αυτού είναι η μειωμένη προσκόλληση, η αυξημένη κινητικότητα και διεισδυτικότητα καθώς και η ικανότητα ανάπτυξης σε μη στερεό υπόστρωμα<sup>16, 17, 18</sup>. Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι το ογκογονίδιο *K-RAS* είναι απαραίτητο για τις κυτταροσκελετικές αλλαγές και την αυξημένη κινητικότητα σε καρκινικά κύτταρα του Κ.Π.Ε. μέσω ενεργοποίησης των μονοπατιών MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), PI3K και Rho (Ras homologous)<sup>19</sup>

## 1.4 Η πρωτεΐνη RAF

Στα θηλαστικά, η οικογένεια *RAF* περιλαμβάνει τρία πρωτο-ογκογονίδια, το *A-RAF*, το *B-RAF* και το *C-RAF* (*RAF-1*)<sup>20</sup>. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια αυτά έχουν δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης και είναι από τους πλέον καλά χαρακτηρισμένους τελεστές των RAS πρωτεϊνών.



**Εικόνα 6.** Η διατηρημένη δομή των RAF κινασών. CR1, CR2 και CR3: οι τρεις διατηρημένες περιοχές ανάμεσα στις διαφορετικές ισομορφές και είδη. Η CR1 έχει 2 περιοχές δέσμησης για τη Ras (RBD και CRD), η CR2 είναι πλούσια σε σερίνες/ θρεονίνες και η CR3 είναι η καταλυτική μονάδα<sup>21</sup>.

Όλες οι Raf κινάσες περιλαμβάνουν τρεις διατηρημένες περιοχές, τις CR1, CR2 και CR3 (εικόνα 6)<sup>22</sup>. Φυσιολογικά, προκειμένου να ενεργοποιηθεί η RAF κινάση θα πρέπει να αλληλεπιδράσει με την ενεργή πλέον RAS πρωτεΐνη στην αλληλουχία δέσμησης της RAS (RAS Binding Domain, RBD) καθώς και στην πλούσια σε κυστεΐνες αλληλουχία (Cystein Reach Domain, CRD) της CR1 περιοχής (εικόνα 6).

Παρόλο που οι τρεις RAF ισομορφές παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες όσον αφορά την αλληλουχία τους, εμφανίζουν εξίσου σημαντικές διαφορές τόσο στη βιοχημεία όσο και στη λειτουργία τους. Ως εκ τούτου ο εντοπισμός τους διαφέρει αρκετά όχι μόνο ανάμεσα σε διαφορετικούς ιστούς, αλλά και μέσα στο ίδιο το κύτταρο<sup>21</sup>. Για παράδειγμα, η B-RAF και η C-RAF εκφράζονται στον εγκέφαλο, ενώ η A-RAF όχι<sup>23</sup>. Η A- και η C-RAF εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στο μυϊκό ιστό,

ενώ η B-RAF ανιχνεύεται εκεί σε πολύ χαμηλά ποσοστά. Σε κυτταρικό επίπεδο, η A- και η C-RAF εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια, γεγονός που συνδέει τις κινάσες αυτές με τη διαδικασία της απόπτωσης<sup>24, 24, 25</sup>. Επιπρόσθετα, η B- και η C-RAF εκφράζονται στα νευρικά κύτταρα, αλλά σε διαφορετικά τμήματα αυτών με την B-RAF να εντοπίζεται στους νευρίτες και τη C-RAF γύρω από τον πυρήνα<sup>23</sup>.

#### 1.4.1 B-RAF και καρκίνος

Τα γονίδια *RAF* αναγνωρίστηκαν αρχικά ως ογκογονίδια σε ρετροϊούς που προκαλούν όγκους σε ποντίκια και κοτόπουλα<sup>26</sup>. Πιο συγκεκριμένα, το πρώτο *raf* γονίδιο που αναγνωρίστηκε ήταν το *v-raf*, το γονίδιο μετασχηματισμού του ιού MSV 3611, ο οποίος προκαλεί ινοσαρκώματα και ερυθρολευχαιμίες σε νεογέννητα ποντίκια<sup>27</sup>. Το ομόλογο πρωτοογκογονίδιο του *v-raf* είναι το *RAF-1*. Ύστερα από την ανακάλυψη αυτή έγιναν προσπάθειες να συσχετιστούν συγκεκριμένες μεταλλάξεις των ανθρώπινων *RAF* γονιδίων με καρκίνους που εμφανίζονται στον άνθρωπο. Αρχικά οι μελέτες αφορούσαν κυρίως στο *RAF-1* και χρησιμοποιούσαν όχι ιδιαίτερα ευαίσθητες μεθόδους για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων. Η χρησιμοποίηση όμως πιο εξελιγμένων και ευαίσθητων τεχνικών οδήγησε στην αναγνώριση σημειακών μεταλλάξεων για το *B-RAF* σε καρκίνους του ανθρώπου. Συγκεκριμένα, βρέθηκαν ενεργές μεταλλάξεις του γονιδίου *B-RAF* σε ποσοστό 70% στα κακοήγη μελανώματα και περίπου 8-15% στο σποραδικό Κ.Π.Ε. στον άνθρωπο. Μεταλλάξεις στο *B-RAF* ανιχνεύθηκαν επίσης σε μικρότερα ποσοστά σε γλοιώματα, καρκίνο του πνεύμονα, σαρκώματα, καρκίνο των ωοθηκών, του μαστού και του ήπατος<sup>3</sup>. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το 89% των μεταλλάξεων *B-RAF* αφορούν αμινοξικές αλλαγές στο τμήμα ενεργοποίησης της κινάσης, με τη V600E (αλλαγή T-A στο νουκλεοτίδιο 1796, αρχικά αναφερόταν

στη βιβλιογραφία ως V599E) να απαντά στο 92% των περιπτώσεων μετάλλαξης του συγκεκριμένου γονιδίου (*B-RAF*<sup>V600E</sup>). Η συγκεκριμένη μετάλλαξη οδηγεί σε αντικατάσταση του γλουταμικού οξέος από βαλίνη στη θέση 600 της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα σε πολλές περιπτώσεις τη μόνιμη ενεργοποίηση της ERK1/2 όπως συμβαίνει συνήθως και με τη μετάλλαξη στο δωδέκατο κωδικόνιο του *K-RAS*.

Μεταλλάξεις του γονιδίου *C-RAF* (*RAF-1*) δεν ανιχνεύθηκαν όταν ελέγχθηκαν 545 δείγματα όγκων προερχόμενα από μελάνωμα, καρκίνο του παχέος εντέρου, των ωοθηκών και του πνεύμονα <sup>3</sup>. Το γεγονός ότι το γονίδιο *B-RAF* αποτελεί συχνότερο στόχο μεταλλάξεων έναντι των άλλων ισομορφών *RAF*, ίσως οφείλεται στη διαφορετική ικανότητα που έχουν να ενεργοποιούν τη MEK και κατ' επέκταση την ERK. Όταν κύτταρα COS μετασχηματίστηκαν με το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup> η ενεργότητα της κινάσης αυξήθηκε κατά 12,5 φορές συγκριτικά με το μη μεταλλαγμένο γονίδιο. Η μετάλλαξη αυτή οδήγησε επίσης σε φωσφορυλίωση της ERK και στο μετασχηματισμό των NIH3T3 κυττάρων <sup>3</sup>. Όταν όμως μια αντίστοιχη μετάλλαξη της V600E εισάγεται στο γονίδιο *C-RAF* (V492E), η ενεργότητα της κινάσης και η ικανότητα μετασχηματισμού είναι κατά 10 φορές μικρότερη. Η υψηλή αυτή ενεργότητα της κινάσης *B-RAF* αποδίδεται στη συνεχή φωσφορυλίωση της σερίνης 445.

Στο σποραδικό Κ.Π.Ε. οι μεταλλάξεις στα γονίδια *B-RAF* και *K-RAS* εμφανίζονται με μεγάλη συχνότητα στους μη κακοήθεις όγκους, που μπορεί να έχουν επιπλέον ανεπάρκεια στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA, και στο στάδιο μετάβασης από αδένωμα σε καρκίνωμα <sup>28</sup>. Αυτό υποδεικνύει ότι τα *B-RAF* και *K-RAS* είναι ισοδύναμα όσον αφορά κάποιες από τις καρκινικές ιδιότητες που προσδίδουν στα κύτταρα. Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι λιγότερο από 1% των όγκων φέρουν ταυτόχρονα μεταλλάξεις στα ογκογονίδια *B-RAF* και *K-RAS* <sup>3, 28, 29</sup>, γεγονός που υποδηλώνει ότι αλλοιώσεις σε ένα από τα δύο αυτά ογκογονίδια που

ρυθμίζουν το μονοπάτι RAS/RAF/MEK/ERK είναι αρκετές για το «πλεονέκτημα» αυξημένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την καρκινική εξέλιξη σε συνδυασμό με αλλοιώσεις σε γονίδια που ρυθμίζουν άλλα μονοπάτια (π.χ, APC, SMAD, p53).

Ο ρόλος του ογκογονιδίου *B-RAF* στον ανθρώπινο καρκίνο είναι λιγότερο μελετημένος από εκείνον του *K-RAS* και οι περισσότερες μελέτες αφορούν στο μελάνωμα, καθώς σε αυτό τον τύπο καρκίνου συναντάται πολύ συχνά μεταλλαγμένο. Μία από αυτές τις μελέτες έχει αποδείξει ότι η μετάλλαξη που κωδικοποιεί για τη μεταλλαγμένη  $BRAF^{V600E}$  εντοπίζεται σε μεταστατικά μελανώματα σε ποσοστό 68%, σε πρώιμα μελανώματα σε ποσοστό 80% και παραδόξως σε κρεατοελιές (nevii) σε ποσοστό 82%. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού RAS/RAF/MAPK από το μεταλλαγμένο *B-RAF* είναι σημαντική για την έναρξη νεοπλασιών του δέρματος, αλλά δεν είναι αρκετή από μόνη της ώστε να οδηγήσει σε ογκογένεση<sup>19</sup>. Ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης του ογκογονιδίου *B-RAF* στον καρκίνο του ανθρώπου και ιδιαίτερα στον Κ.Π.Ε., δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, καθώς μόλις τα τελευταία χρόνια εφαρμόζεται έρευνα στον τομέα αυτό. Για παράδειγμα, μία σχετικά πρόσφατη μελέτη απέδειξε ότι η παρουσία του ογκογονιδίου  $B-RAF^{V600E}$  στον Κ.Π.Ε. σχετίζεται με την μικροδορυφορική αστάθεια (Microsatellite Instability, MSI) και την αποσιώπηση γονιδίων μέσω μεθυλίωσης των CpG περιοχών (CpG islands) του γονιδιώματος<sup>30</sup>. Και τα δύο αυτά φαινόμενα αποτελούν τη βάση για την γενετική αστάθεια που εμφανίζεται στον καρκίνο του ανθρώπου, συμβάλλοντας στην εξέλιξή του. Άλλη μελέτη απέδειξε ότι το μεταλλαγμένο γονίδιο *B-RAF* σχετίζεται με την απορύθμιση του αποπτωτικού μηχανισμού στα κύτταρα όγκων Κ.Π.Ε.<sup>31</sup>. Όσον αφορά την επίδραση του ογκογονιδίου *B-RAF* στην καρκινογένεση μέσω κυτταροσκελετικών διαδικασιών καθώς και στη κυτταρική μετανάστευση και διείσδυση, τα ευρήματα είναι ακόμη λιγότερα. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι το ογκογονίδιο  $B-RAF^{V600E}$  ρυθμίζει την αναδιοργάνωση του

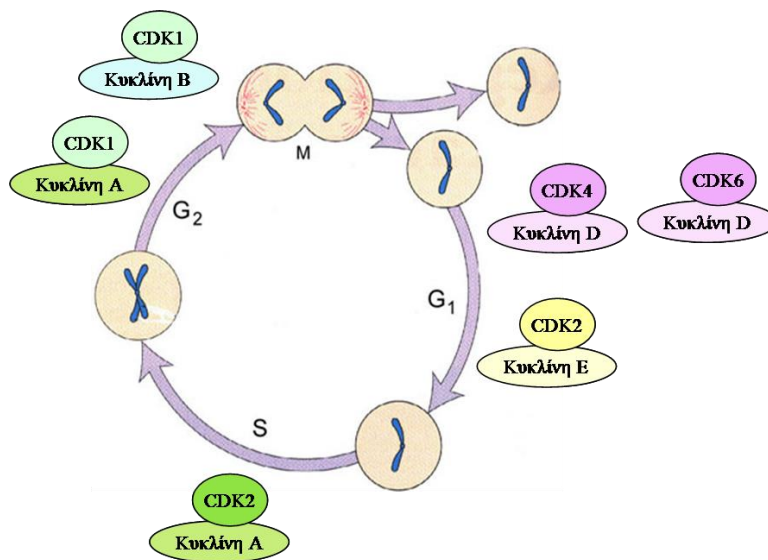
κυτταροσκελετού και επάγει την κυτταρική μετανάστευση στο ανθρώπινο μελάνωμα, μέσω μιας μικρής Rho GTPάσης, της Rnd3<sup>32,33</sup>. Στην παρούσα μελέτη γίνεται προσπάθεια προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της συγκεκριμένης μετάλλαξης στον Κ.Π.Ε. και επιπλέον να διευκρινιστούν οι τυχόν αλλαγές που επιφέρει στη μορφολογία και τον κυτταροσκελετό καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου.

## 1.5 Τα ογκογονίδια *K-RAS* και *B-RAF* και ο κυτταρικός κύκλος

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ένα από τα γνωρίσματα των καρκινικών κυττάρων είναι ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός, δηλαδή η απορύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Ο κυτταρικός κύκλος είναι ένα σύνολο σημαντικότητας επιμέρους κυτταρικών διεργασιών, με αποτέλεσμα να υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο από ένα σύνολο μορίων. Δηλαδή, ρυθμίζεται από μηνυματοφόρα μόρια του περιβάλλοντος, όπως αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες και άλλα, που διεγείρουν ή αναστέλλουν τη διαίρεση των κυττάρων. Η εξάρτηση του κυτταρικού κύκλου από ένα σύστημα ελέγχου υποδηλώνει ότι οποιαδήποτε βλάβη του συστήματος αυτού θα έχει αντίκτυπο και στην κυτταρική διαίρεση, η οποία θα είναι πλέον ανεξέλεγκτη και ίσως καταλήξει σε καρκινογένεση.

Μεταλλάξεις στα γονίδια *K-RAS* και *B-RAF* οδηγούν συνήθως στην υπερ-ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών, γεγονός που έχει άμεση επίδραση στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Για παράδειγμα απορυθμίζεται το στάδιο μετάβασης της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου προς την S, καθώς αλλάζουν τα επίπεδα έκφρασης άμεσα εμπλεκόμενων σε αυτή τη διαδικασία μορίων, όπως οι κυκλίνες D και E καθώς και οι αναστολείς p21<sup>Cip1</sup> και p27<sup>kip</sup><sup>34, 35</sup>. Η κυκλίνη D1 είναι υπεύθυνη για τη μετάβαση από G1 προς την S φάση (εικόνα 7). Είναι ιδιαίτερα σημαντική στην ανάπτυξη και εξέλιξη διαφόρων τύπων καρκίνου,

συμπεριλαμβανομένου του Κ.Π.Ε., όπου τα επίπεδα έκφρασής της έχουν βρεθεί αυξημένα και σχετιζόμενα με πιο επιθετικούς φαινοτύπους και κακή διάγνωση<sup>36, 37</sup>. Η κυκλίνη E, που είναι υπεύθυνη για την ολοκλήρωση της μετάβασης  $G1 \rightarrow S$  (εικόνα 7), έχει επίσης βρεθεί αυξημένη στον καρκίνο του ανθρώπου και έχει την ικανότητα να επάγει φωσφορυλίωση και άρα απενεργοποίηση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb), προάγοντας έτσι τον κυτταρικό κύκλο και την καρκινογένεση. Όλα τα παραπάνω έχουν ως κοινό γνώρισμα το ενεργοποιημένο μονοπάτι μεταγωγής σήματος RAS-RAF-MEK-ERK εξαιτίας των μεταλλαγμένων γονιδίων *B-RAF* και *K-RAS*.



**Εικόνα 7.** Ο κυτταρικός κύκλος. Το κύτταρο διέρχεται από συγκεκριμένες φάσεις προκειμένου να διαιρεθεί. Κάθε φάση του κύκλου ρυθμίζεται από συγκεκριμένες κυκλίνες.

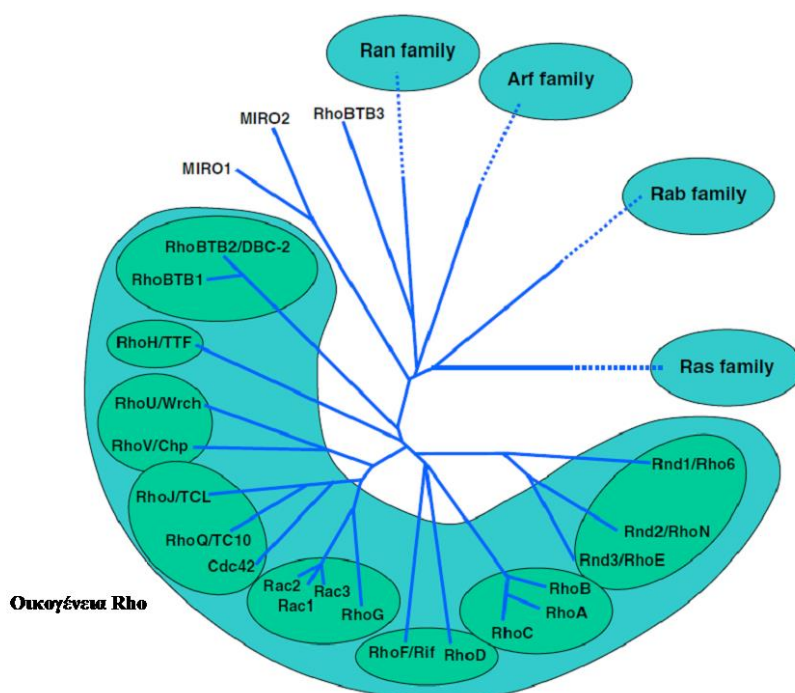


### 1.5.1 Ογκογονίδια και κυτταρική γήρανση (cellular senescence) / μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability)

Η μη φυσιολογική ενεργοποίηση της ERK μπορεί επίσης να οδηγήσει στην αντίθετη κατάσταση, δηλαδή στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου (cell cycle arrest) καθώς και στην κυτταρική γήρανση (cellular senescence). Η κυτταρική γήρανση θεωρείται ως ένα είδος απόκρισης σε παράγοντες στρες, όπως η μείωση του μήκους των τελομερών που συμβαίνει φυσιολογικά σε γερασμένα κύτταρα καλλιέργειας καθώς και σε σωματικά κύτταρα ηλικιωμένων ατόμων. Μελέτες όμως έχουν δείξει ότι έκφραση ογκογονιδίων μπορεί επίσης να προκαλέσει το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης, οδηγώντας έτσι στην παρεμπόδιση της καρκινογένεσης. Συγκεκριμένα όταν το ογκογονίδιο *H-RAS<sup>G12V</sup>* εκφράστηκε σε φυσιολογικούς ινοβλάστες ανθρώπου και τρωκτικών οδήγησε σε πρόωμη γήρανση, ενώ το ογκογονίδιο *B-RAF<sup>V600E</sup>* προκάλεσε χαρακτηριστικά κυτταρικής γήρανσης σε ανθρώπινα μελανοκύτταρα <sup>38, 39</sup>. Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός δράσης του ογκογονιδίου *BRAF* είναι η μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability, MSI). Η μικροδορυφορική αστάθεια προκύπτει από απενεργοποίηση του συστήματος επιδιόρθωσης μεταλλαγών λόγω αταίριαστου ζευγαρώματος βάσεων (MMR), φαινόμενο το οποίο έχει συσχετιστεί με μεταλλάξεις στο γονίδιο *B-RAF*. Μελέτες έχουν δείξει ότι το ογκογονίδιο *B-RAF* μεταλλάσσεται συχνά σε όγκους με μικροδορυφορική αστάθεια, παρόλο που ο μηχανισμός είναι άγνωστος <sup>28, 12</sup>. Σύμφωνα με τα παραπάνω είναι εμφανές ότι τα δύο ογκογονίδια, *B-RAF* και *K-RAS*, αν και ανήκουν στο ίδιο μονοπάτι μεταγωγής σήματος, εντούτοις φαίνεται να χρησιμοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς στη διαδικασία της καρκινογένεσης.

## 1.6 Οι Rho GTPάσες

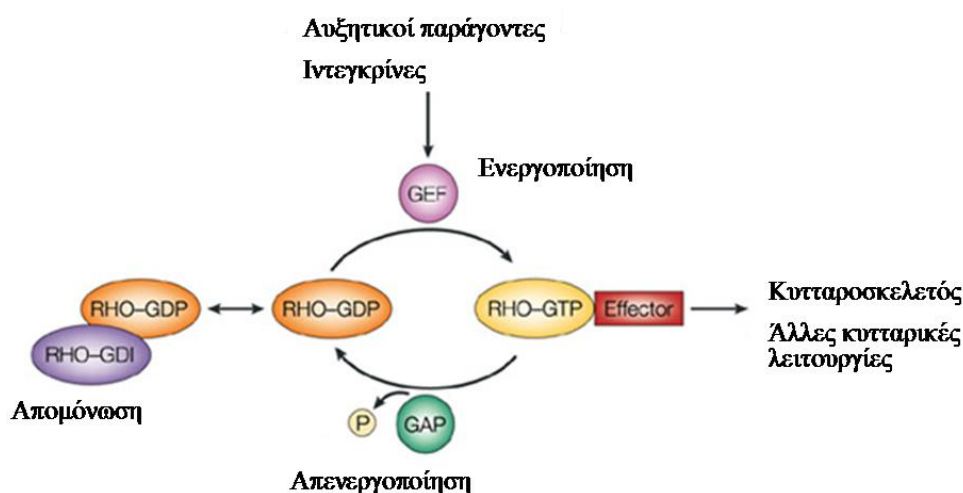
Οι Rho GTPάσες (**Rho=Ras homologous**) αποτελούν μια ξεχωριστή οικογένεια, η οποία ανήκει στην υπερ-οικογένεια των πρωτεϊνών που μοιάζουν με τις RAS (Ras-like proteins). Στην υπερ-οικογένεια αυτή περιλαμβάνονται επίσης οι οικογένειες Ras, Rab, Arf και Ran (εικόνα 8). Τα μέλη της οικογένειας Rho διαφέρουν από τις υπόλοιπες RAS-like πρωτεΐνες στην παρουσία μίας ειδικής αμινοξικής αλληλουχίας, η οποία εμπλέκεται στη δέσμευση κατάλληλων τελεστών και ρυθμιστών <sup>40</sup>. Οι πρωτεΐνες Rho είναι ιδιαίτερα διατηρημένες και εκφράζονται σε όλα τα είδη, από το ζυμομύκητα μέχρι τον άνθρωπο <sup>41</sup>. Στα θηλαστικά η οικογένεια αυτή απαρτίζεται από 20 μέλη, τα οποία είναι οργανωμένα σε 8 επιμέρους ομάδες (εικόνα 8).



**Εικόνα 8.** Φυλογενετικό δέντρο δείχνει την υπερ-οικογένεια Ras των θηλαστικών. Οι 20 Rho GTPάσες ομαδοποιούνται σε 8 ομάδες <sup>59</sup>

Τα περισσότερα μέλη της οικογένειας Rho δρουν ως μοριακοί διακόπτες, εναλλασσόμενοι μεταξύ μιας ανενεργής μορφής, προσδεμένης με GDP, και μιας ενεργής, προσδεμένης με GTP (εικόνα 9). Η ενεργότητά τους αυξάνεται από τη

δράση των GEFs, οι οποίοι επάγουν την απελευθέρωση του GDP και τη δέσμευση του GTP, και μειώνεται από τη δάση των GAPs, οι οποίοι επάγουν την υδρόλυση του GTP <sup>42</sup>. Μια άλλη ομάδα μορίων που ρυθμίζει την ενεργότητα των Rho GTPασών είναι οι GDIs, οι οποίοι δεσμεύονται στο καρβοξυτελικό τους άκρο και συγκεντρώνουν τις μικρές GTPάσες στο κυτταρόπλασμα, εμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή τους με τους τελεστές τους. Οι GDIs δεσμεύουν είτε ενεργές, είτε μη ενεργές RhoGTPάσες και το αποτέλεσμα είναι το ίδιο, καθώς και στις δύο περιπτώσεις είναι «απομονωμένες» και δεν μπορούν να ασκήσουν δράση μέσα στο κύτταρο. Η ενεργοποίηση υποδοχέων αυξητικών παραγόντων και ιντεγκρινών έχει ως αποτέλεσμα τη δέσμευση GTP από τις Rho GTPάσες και την ακόλουθη αλληλεπίδρασή τους με μια σειρά τελεστών, προκειμένου να ρυθμιστεί η δράση τους (εικόνα 9). Αρκετοί από τους τελεστές των Rho είναι κινάσες, που ρυθμίζουν κυτταρικές λειτουργίες μέσω φωσφορύλιωσης κατάλληλων μορίων. Οι πιο καλά μελετημένοι από αυτούς είναι οι p21-ενεργοποιούμενες κινάσες (p21-activated kinases, PAKs), που δεσμεύονται στις ενεργοποιημένες Cdc42 και Rac1, και οι RHO-σχετιζόμενες κινάσες (RHO-associated coiled-coil-forming kinases, ROCKs ή RHO kinases), οι οποίες δεσμεύουν την ενεργή RhoA <sup>24, 25, 43</sup>. Ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος έχει δείξει ότι αρκετές πρωτεΐνες φέρουν αλληλουχία GEF ή GAP, γεγονός που σημαίνει πως η ρύθμισή τους είναι ιδιαίτερα σημαντική σε αρκετές κυτταρικές λειτουργίες.



Εικόνα 9. Ρύθμιση των Rho πρωτεϊνών.

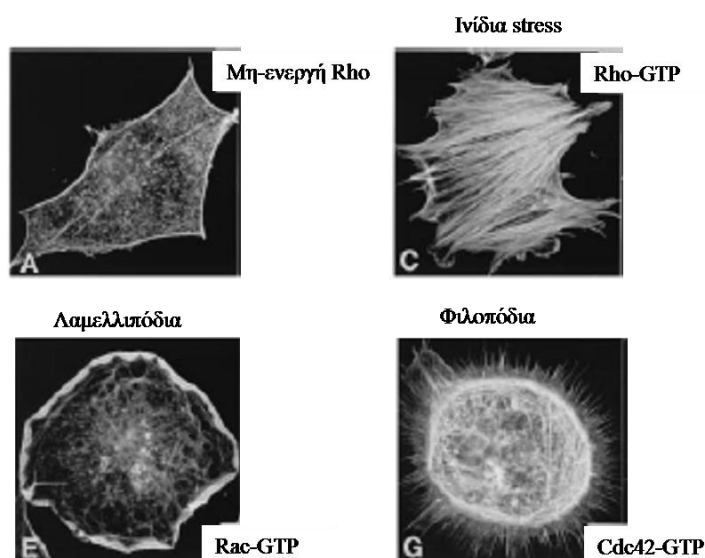
### 1.6.1 Ρόλος των Rho GTPασών μέσα στο κύτταρο

Αρχικά, θεωρούνταν ότι οι Rho GTPάσες ρυθμίζουν τη μορφολογία του κυττάρου και το κυτταροσκελετό της ακτίνης <sup>44</sup>. Σήμερα όμως, είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών λειτουργιών, όπως τον κυτταρικό κύκλο, τη γονιδιακή έκφραση και την επιβίωση <sup>45</sup>.

- Rho GTPάσες και κυτταροσκελετός

Η διαλεύκανση του ρόλου των μικρών GTPασών στον κυτταροσκελετό της ακτίνης άρχισε αρκετό καιρό πριν, με την ανάλυση της Rho ως ένα νέο μέλος της υπερ-οικογένειας των RAS-like πρωτεϊνών. Είχε παρατηρηθεί ότι στην κυτταρική σειρά Swiss 3T3 (ινοβλάστες ποντικού) η Rho μπορούσε να ενεργοποιηθεί με την επίδραση εξωκυτταρικών ουσιών (π.χ. λυσοφωσφατιδικό οξύ, LPA) και ότι αυτή η ενεργοποίηση οδηγεί στο σχηματισμό ενός δικτύου ινιδίων ακτίνης (*ινίδια stress*) καθώς και συμπλόκων εστιακής προσκόλλησης <sup>46</sup>. Είχε γίνει εμφανές ότι η Rho δρα ως ένας μοριακός διακόπτης προκειμένου να ρυθμίσει τη μεταγωγή σήματος από μεμβρανικούς υποδοχείς στον κυτταροσκελετό. Αργότερα, βρέθηκε ότι η Rac, ένα

άλλο μέλος της οικογένειας Rho, μπορούσε να ενεργοποιηθεί από έναν αριθμό διαφορετικών παραγόντων (π.χ. αυξητικός παράγοντας αιμοπαιταλίων (PDGF) ή ινσουλίνη) και να οδηγήσει στο σχηματισμό ενός δικτύου ινιδίων ακτίνης στην περιφέρεια του κυττάρου. Αυτό το δίκτυο ινιδίων δημιουργεί προεκβολές της μεμβράνης, γνωστές ως *λαμελλιπόδια* <sup>46</sup>. Αργότερα, ενεργοποίηση μιας άλλης μικρής GTPάσης, της Cdc42, παρατηρήθηκε ότι επάγει το σχηματισμό προεκβολών της κυτταρικής μεμβράνης, πλούσιων σε ακτίνη, γνωστά ως *φιλοπόδια* <sup>47</sup> (εικόνα 10). Μέσα από αυτές τις λειτουργίες οι Rho GTPάσες συμβάλλουν στην κυτταρική κίνηση και μετανάστευση, χαρακτηριστικά όχι μόνο των φυσιολογικών, αλλά και των καρκινικών κυττάρων.



**Εικόνα 10.** Οι πρωτεΐνες Rho, Rac και Cdc42 ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Χρώση ινοβλαστών ποντικού με φαλλοϊδίνη δείχνει το σχηματισμό ινιδίων stress από την ενεργή Rho, λαμελλιποδίων από την ενεργή Rac και φιλοποδίων από την ενεργή Cdc42. (Hall, *et al.*, 1998)

- Rho GTPάσες και κυτταρικός κύκλος

Όταν οι Rho, Rac και Cdc42 εκφράστηκαν σε ινοβλάστες ποντικού οδήγησαν στην ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου, προάγοντας τη μετάβαση στη G1 φάση καθώς και τη σύνθεση DNA. Επιπλέον, έκφραση μόνιμα ανενεργών μορφών αυτών

των GTPασών ή χρήση του αναστολέα των Rho πρωτεϊνών, C3 τρανσφεράση, παρεμπόδισε τη σύνθεση DNA. Ανάλυση των πιθανά εμπλεκόμενων μονοπατιών μεταγωγής σήματος έδειξε ότι η Rac και Cdc42, αλλά όχι η Rho, οδήγησαν στην ενεργοποίηση της c-jun κινάσης, JNK-SAPK και όχι των MAP κινασών <sup>48</sup>. Μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγμένες, μόνιμα ενεργές μορφές των Rho GTPασών, έδειξαν ότι η έκφραση της κυκλίνης D1 ρυθμίζεται από αυτές. Συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι ενεργή μορφή της Rac οδήγησε σε έκφραση της κυκλίνης D1 <sup>49, 50</sup> με αποτέλεσμα την επακόλουθη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος και την ενεργοποίηση του παράγοντα E2F <sup>51</sup>. Όμως, ο μηχανισμός δράσης των GTPασών σε σχέση με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου φαίνεται να διαφέρει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο οι Rho GTPάσες ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, είναι ο έλεγχος των επιπέδων των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, η ενεργή RhoA καταστέλλει τον αναστολέα p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε μετασχηματισμένα κύτταρα και επάγει την αποικοδόμηση του αναστολέα p27 προάγοντας έτσι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό <sup>52, 53, 54, 55</sup>.

### 1.6.2 Rho GTPάσες και καρκίνος

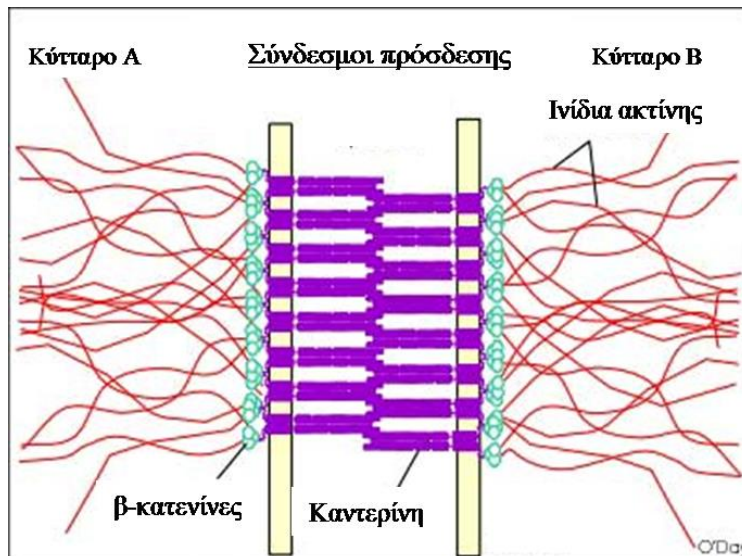
Σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες RAS και BRAF, δεν έχουν βρεθεί στον καρκίνο του ανθρώπου μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της οικογένειας Rho. Έχειδειχθεί όμως ότι οι μικρές αυτές GTPάσες συμμετέχουν στα περισσότερα βήματα της έναρξης και εξέλιξης του καρκίνου, και ότι τα επίπεδα έκφρασής τους αυξάνονται σε διάφορους τύπους καρκίνου. Συγκεκριμένα, έλεγχος των επιπέδων έκφρασης των GTPασών RhoA, Rac1 και Cdc42 σε δείγματα όγκων καρκίνου του

παχέος εντέρου, του μαστού και του πνεύμονα, έδειξε ότι και οι τρεις GTPάσες υπερ-εκφράζονται στους εξεταζόμενους όγκους όταν συγκρίνονται με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς <sup>56</sup>. Επιπρόσθετα, είναι πλέον γνωστό ότι οι πρωτεΐνες αυτές συμμετέχουν ενεργά στο μετασχηματισμό κυττάρων από το ογκογονίδιο *RAS*, καθώς έχει βρεθεί ότι και οι τρεις μικρές GTPάσες (*RhoA*, *Rac1*, *Cdc42*) είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό μετασχηματισμένων ινοβλαστών ποντικού από το ογκογονίδιο *H-RAS<sup>G12V</sup>* <sup>57</sup>, καθώς και ότι η *Cdc42* ρυθμίζει την ανάπτυξη σε μη στερεό υπόστρωμα ινοβλαστών αρουραίου που μετασχηματίστηκαν με το ίδιο ογκογονίδιο <sup>58</sup>. Πιο πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι η *Rac1* είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα σε ποντίκια από κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με το ογκογονίδιο *K-RAS<sup>G12D</sup>* <sup>59</sup>.

#### *Ο ρόλος των Rho GTPασών στη μεταστατική διαδικασία*

Παράλληλα με την απορύθμιση του κυτταρικού κύκλου και τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν αλλαγές στη μορφολογία τους και στην περίπτωση της μετάστασης, αποκτούν την ικανότητα να μεταναστεύουν και να διεισδύουν σε άλλους ιστούς. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι *Rho* GTPάσες εμπλέκονται τόσο στη μορφολογία, όσο και στην κινητικότητα των φυσιολογικών κυττάρων, καθώς ρυθμίζουν την οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Το γεγονός αυτό και σε συνδυασμό με τα ευρήματα που συνδέουν αυτές τις πρωτεΐνες με την εξέλιξη του καρκίνου, υποδηλώνει τη συμμετοχή τους στη διαδικασία της μετάστασης. Οι *Rho* πρωτεΐνες εμπλέκονται στην απώλεια της επιθηλιακής πολικότητας, που παρατηρείται ακόμα και σε πρώιμους όγκους, και πιστεύεται επίσης ότι παίζουν ρόλο στο φαινόμενο της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT) που εμφανίζεται σε πιο προχωρημένα στάδια του καρκίνου <sup>60</sup>. Τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα χαρακτηρίζονται από πολικότητα και από καλά οργανωμένες μεταξύ του συνδέσεις, γνωστές ως σύνδεσμοι πρόσδεσης (*adherens junctions*, *AJ*), οι οποίες

διασυνδέουν παρακείμενα κύτταρα και ενώνονται με ινίδια ακτίνης. Οι σύνδεσμοι πρόσδεσης περιλαμβάνουν δύο κατηγορίες πρωτεϊνών: α) διαμεμβρανικές πρωτεΐνες-συνδέσμους, που ανήκουν στην οικογένεια των καντερινών και β) ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες που διασυνδέουν τις διακυτταρικές καντερίνες των συνδέσμων πρόσδεσης με τα ινίδια της ακτίνης (κατενίνες) (εικόνα 11).



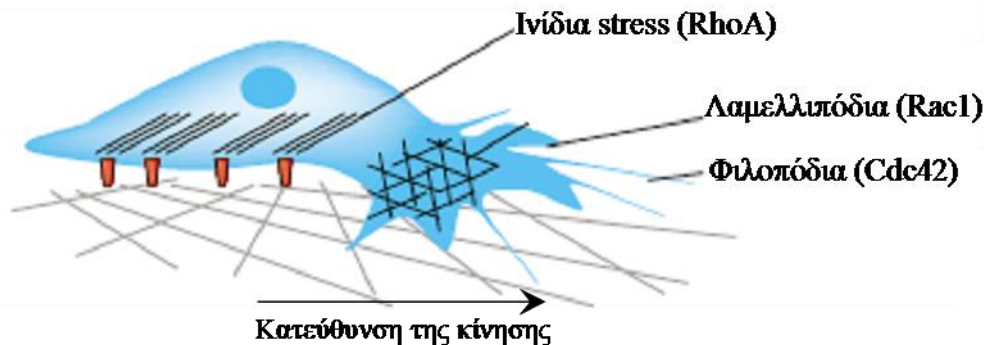
**Εικόνα 11.** Σχηματική απεικόνιση του συνδέσμου πρόσδεσης μεταξύ δύο γειτονικών κυττάρων.

Στην περίπτωση του καρκίνου, οι σύνδεσμοι αυτοί μειώνονται σημαντικά ή χάνονται, προκειμένου το καρκινικό κύτταρο να μεταναστεύσει και να διεισδύσει σε παρακείμενους ιστούς. Στη διαδικασία αυτή έχειδειχθεί ότι εμπλέκονται οι Rho GTPάσες, καθώς συμμετέχουν στις μεσολαβούμενες από τις ιντεγκρίνες επαφές των κυττάρων με την εξωκυττάρια ύλη. Συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι ενεργοποίηση της μικρής GTPάσης Rac οδηγεί σε καταστροφή των εξαρτώμενων από καντερίνες κυτταρικών επαφών σε ανθρώπινα φυσιολογικά κερατινοκύτταρα και ότι η GTPάση αυτή είναι απαραίτητη για την απώλεια των συνδέσμων πρόσδεσης που επάγεται από το ογκογονίδιο *RAS*<sup>61, 62</sup>. Μία άλλη μελέτη έδειξε ότι ο αυξητικός παράγοντας TGF-β προκάλεσε απώλεια των συνδέσμων πρόσδεσης των κυττάρων και επακόλουθη



επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση σε φυσιολογικά μαστικά κύτταρα ποντικού, μέσω ενεργοποίησης της RhoA <sup>63</sup>.

Επίσης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η Cdc42 είναι απαραίτητη για το σχηματισμό των φιλοποδίων, τα οποία εξυπηρετούν την κυτταρική κίνηση λειτουργώντας ως «αισθητήρες» του περιβάλλοντος και ως ρυθμιστές της κατεύθυνσης. Η Rac1 εμπλέκεται στο σχηματισμό των λαμελλιποδίων, σχηματισμοί πλούσιοι σε ακτίνη στο εμπρόσθιο μέρος του κινούμενου κυττάρου, ενώ η RhoA συμμετέχει στην παραγωγή συσταλτικής δύναμης και στην προώθηση της κίνησης στο οπίσθιο άκρο του κυττάρου (εικόνα 12) <sup>64</sup>. Στον ανθρώπινο καρκίνο, συμπεριλαμβανομένου και του Κ.Π.Ε., έχειδειχθεί ότι στο σχηματισμό των φιλοποδίων και κατ' επέκταση στην κυτταρική κίνηση, συμμετέχει η



**Εικόνα 12.** Αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τις Rho GTPάσες κατά την κυτταρική κίνηση. (προσαρμογή από Ridley et al., 2001) <sup>63</sup>

πρωτεΐνη Fascin, της οποίας η δράση ρυθμίζεται σε κάποιο βαθμό από τις Rho GTPάσες <sup>65, 66, 67</sup>. Η Fascin είναι μια πρωτεΐνη που συνδέεται με την ακτίνη και στο φυσιολογικό επιθήλιο εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα ή καθόλου. Έχειδειχθεί όμως ότι η έκφρασή της αυξάνεται σημαντικά σε αδενώματα κι αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου, όπου σχετίζεται με πιο επιθετικούς φαινότυπους. Πιστεύεται λοιπόν, ότι αποτελεί ένα προγνωστικό δείκτη για πιο επιθετικά αδενοκαρκινώματα

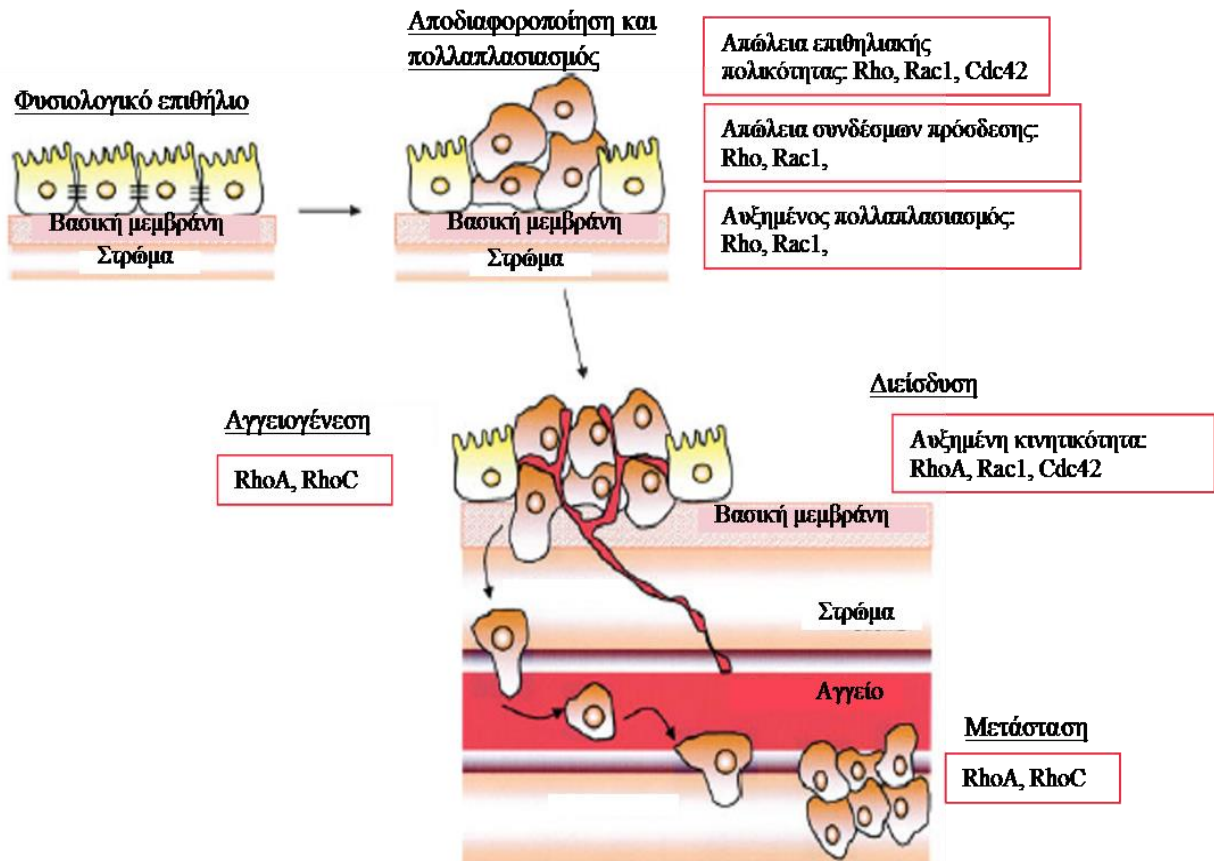
του παχέος εντέρου καθώς επίσης και ένα πιθανό στόχο για την ανάπτυξη θεραπευτικών παραγόντων <sup>68</sup>.

Η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος ή της λέμφου είναι απαραίτητη προκειμένου να ολοκληρωθεί η διαδικασία της μετάστασης. Έχειδειχθεί ότι η RhoA παίζει καθοριστικό ρόλο στην ικανότητα ανθρώπινων μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων να διαπερνούν και να μεταναστεύουν μέσα από στιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων <sup>69, 70</sup>. Επίσης, υπερ-έκφραση της πρωτεΐνης RhoC οδηγεί σε αυξημένη έκφραση αγγειογενετικών παραγόντων σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα, γεγονός που θα μπορούσε να προκαλέσει αυξημένη αγγειογένεση του όγκου και είσοδο των καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία <sup>71</sup>.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, είναι εμφανές ότι οι Rho GTPάσες συμμετέχουν σε όλα τα στάδια της καρκινογένεσης και ρυθμίζουν κυτταρικές λειτουργίες που οδηγούν στο σημαντικότερο ίσως πρόβλημα του καρκίνου, τη μετάσταση (εικόνα 13).

## **1.7 Επιθήλιο-Μεσεγχυματική μετάβαση (Epithelial - Mesenchymal Transition, EMT)**

Η επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) είναι ένας τύπος επιθηλιακής πλαστικότητας που χαρακτηρίζεται από φαινοτυπικές και μοριακές αλλαγές στο επιθηλιακό κύτταρο ως αποτέλεσμα μιας διαδικασίας διαφοροποίησης προς κύτταρο μεσεγχυματικής μορφολογίας. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη κατά την εμβρυογένεση, όπου το πρώιμο εμβρυϊκό επιθήλιο μετατρέπεται σε μεσοδερμικό ιστό. Στο στάδιο αυτό τα κύτταρα πρέπει να χάσουν τη μεταξύ τους επαφή, να διαχωριστούν, να αλλάξουν το σχήμα και την πολικότητά τους και να μεταναστεύσουν.



**Εικόνα 13.** Οι Rho GTPάσες εμπλέκονται σε όλα τα στάδια της καρκινογένεσης (προσαρμογή από Gomez del Pulgar T., *et al.*, 2005)<sup>72</sup>.

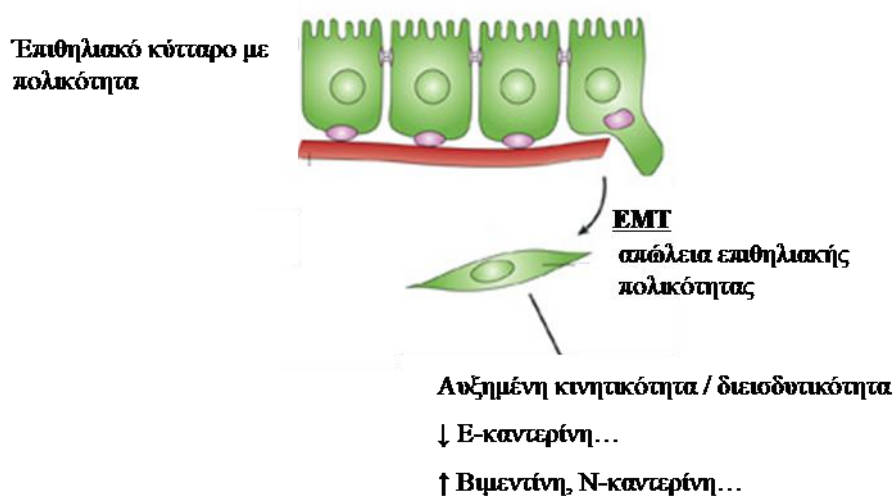
Το φαινόμενο κατά το οποίο συμβαίνουν όλες αυτές οι αλλαγές ονομάζεται επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάβαση. Στους ενήλικες, το φαινόμενο EMT και η δημιουργία νέων ινοβλαστών λαμβάνει χώρα κατά την επούλωση των πληγών και τη φλεγμονή. Όμως, οι διαδικασίες αυτές είναι δυνατό να διαταράξουν τη δομή του επιθηλίου και να οδηγήσουν στη δημιουργία συνδετικού ιστού ικανού να διεισδύσει στο στρώμα. Αν το ερέθισμα που οδηγεί το κύτταρο σε αυτή τη συμπεριφορά επιμένει, τότε νέοι ινοβλάστες δημιουργούνται μέσω EMT αποκτώντας μία μόνιμη πλέον μεσεγχυματική φύση και προκαλούν το φαινόμενο της ίνωσης<sup>73, 74</sup>.

### 1.7.1 Επιθήλιο-Μεσεγχυματική μετάβαση και καρκίνος

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η μετάσταση αποτελεί το κυριότερο πρόβλημα στην εξέλιξη του καρκίνου. Το πρώτο και καθοριστικό βήμα της διαδικασίας αυτής είναι η τοπική διείσδυση μέσω της επιθηλιακής βασικής μεμβράνης, κάτι το οποίο

απαιτεί αλλαγές στην αλληλεπίδραση κυττάρου-κυττάρου καθώς και κυττάρου-εξωκυττάριας ύλης, αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και αυξημένη κινητικότητα. Όμως αρκετοί τύποι καρκίνου, όπως ο Κ.Π.Ε., είναι καλά διαφοροποιημένοι και θεωρητικά ανίκανοι να επιτύχουν όλες αυτές τις αναγκαίες για τη μετάσταση αλλαγές. Για το λόγο αυτό, πιστεύεται ότι αυτό που συμβαίνει στον καρκίνο είναι το φαινόμενο EMT, κατά το οποίο μερικά καρκινικά κύτταρα χάνουν τα επιθηλιακά χαρακτηριστικά τους, αποδιαφοροποιούνται και αποκτούν νέες, μεσεγχυματικού τύπου ιδιότητες <sup>75</sup>. Πιο συγκεκριμένα, η επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάβαση είναι η διαδικασία κατά την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν την πολικότητά τους και τις μεσοκυττάριας εξειδικευμένες συνάψεις, αναδιοργανώνουν τον κυτταροσκελετό τους και αποκτούν μεσεγχυματικό φαινότυπο και αυξημένη ικανότητα μετανάστευσης και διείσδυσης. Κύρια χαρακτηριστικά της διεργασίας αυτής είναι η απώλεια των συνδέσμων πρόσδεσης λόγω μείωσης της έκφρασης της E-καντερίνης και η υπερέκφραση μεσεγχυματικών συστατικών του κυτταροσκελετού όπως η βιμεντίνη (εικόνα 14) <sup>76</sup>. Αφού το φαινόμενο της επιθήλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης προϋποθέτει κυτταροσκελετικές και μορφολογικές αλλαγές καθώς και αύξηση της κυτταρικής κίνησης, είναι πιθανό οι Rho GTPάσες να εμπλέκονται και σε αυτό το στάδιο της καρκινογένεσης. Πράγματι, έχει δειχθεί ότι ο αυξητικός παράγοντας TGF-β1 οδήγησε στην επαγωγή του φαινομένου EMT σε επιθηλιακά κύτταρα και σε ινοβλάστες ποντικού μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού της RhoA <sup>63, 77</sup>. Μία πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η επιθήλιο-μεσεγχυματική μετάβαση σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη συνδέεται με την αυξημένη ενεργοποίηση της Rac1 <sup>78</sup>. Μία άλλη πρωτεΐνη που συμμετέχει στο φαινόμενο EMT είναι η κινάση εστιακής προσκόλλησης (Focal Adhesion Kinase, FAK), η οποία εμπλέκεται επίσης στη ρύθμιση των Rho GTPασών. Η FAK είναι μια κινάση που σχετίζεται άμεσα με τις εστιακές προσκολλήσεις των κυττάρων και προωθεί την κυτταρική μετανάστευση και

διείσδυση σε μεγάλο βαθμό μέσω του μονοπατιού των Rho GTPασών <sup>79</sup>. Πιο συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί ότι σε ινοβλάστες που υπερ-εκφράζουν την πρωτεΐνη FAK, εμφανίζονται υψηλά επίπεδα ενεργοποίησης της Rac1, που οδηγεί στην αυξημένη δημιουργία λαμελλιποδίων και κυτταρική μετανάστευση <sup>80</sup>. Επιπρόσθετα, αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης FAK έχει βρεθεί σε διεισδυτικούς όγκους του παχέος εντέρου και του μαστού και φαίνεται να σχετίζεται με τα πρώτα στάδια της καρκινογένεσης <sup>81</sup>. Επίσης εκτός από τους αυξητικούς παράγοντες, όπως ο TGFβ-1, έχει δειχθεί ότι και η έκφραση ογκογονιδίου είναι δυνατό να προκαλέσει το φαινόμενο αυτό. Συγκεκριμένα, έκφραση του *H-RAS<sup>G12V</sup>* σε αδενοκαρκινωματικά κύτταρα του παχέος εντέρου οδήγησε σε μεσεγχυματικό φαινότυπο, μέσω δραματικής μείωσης της E-καντερίνης και έκφρασης της βιμεντίνης <sup>82, 76, 83</sup>.



**Εικόνα 14.** Επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση. Τα κύτταρα χάνουν την πολικότητά τους, αλλάζουν σχήμα, μειώνουν την έκφραση επιθηλιακών δεικτών (π.χ E-καντερίνη) και εκφράζουν μεσεγχυματικούς δείκτες (π.χ. βιμεντίνη, N-καντερίνη).

## Σκοπός της διδακτορικής διατριβής

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση της επίδρασης των ογκογονιδίων *KRAS*<sup>G12V</sup> και *BRAF*<sup>V600E</sup> στο σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου.

Προκειμένου να επιτευχθεί ο σκοπός αυτός, τα Caco-2 κύτταρα (ενδιάμεση κατάσταση αδενώματος παχέος εντέρου) μετασχηματίστηκαν ξεχωριστά με τα μεταλλαγμένα γονίδια *BRAF* & *KRAS* και μελετήθηκαν:

- ο μηχανισμός μετασχηματισμού τους από τα δύο αυτά ογκογονίδια
- η επίδραση των ογκογονιδίων στις κυτταροσκελετικές ιδιότητες των κυττάρων, που μεσολαβούνται από τις Rho GTPάσες.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τις κυτταροσκελετικές ιδιότητες, εξετάστηκε η μορφολογία των κυττάρων, καθώς και η μετανστευτική και διεισδυτική ικανότητα αυτών μέσω των Rho GTPασών, RhoA, Rac1 και Cdc42. Επίσης, εξετάστηκε εάν το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup> προκαλεί το φαινόμενο της επιθηλιακής προς μεσεγχυματικής μετάβασης στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου, όπως έχει δειχθεί ότι συμβαίνει με το ογκογονίδιο *HRAS*<sup>G12V</sup>.

Προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω και να συγκρίνουμε το ρόλο των *KRAS*<sup>G12V</sup> και *BRAF*<sup>V600E</sup> στο σποραδικό Κ.Π.Ε. τα Caco-2 κύτταρα ενδιάμεσου αδενώματος μετασχηματίστηκαν ξεχωριστά με τα δύο αυτά ογκογονίδια. Τα Caco-2 κύτταρα φέρουν ήδη μεταλλάξεις στα γονίδια APC, β-κατενίνη, Smad4, και p53. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι βασικές για την έναρξη και εξέλιξη του Κ.Π.Ε., και επομένως τα Caco-2 κύτταρα αποτελούν ένα ιδανικό σύστημα μελέτης αφού το γενετικό τους προφίλ ανταποκρίνεται στις πραγματικές συνθήκες και επιτρέπει ενδεχομένως το μετασχηματισμό τους από τα υπό μελέτη ογκογονίδια. Κυτταρικά μοντέλα αποσιώπησης των μεταλλαγμένων ογκογονιδίων *KRAS* και *BRAF* χρησιμοποιήθηκαν συμπληρωματικά για την επιβεβαίωση των ευρημάτων.

Καθώς λοιπόν μεταλλάξεις στα ογκογονίδια *BRAF* και *KRAS* δε συνυπάρχουν σχεδόν ποτέ στον ίδιο όγκο, ανάλυση του τρόπου δράσης τους στον Κ.Π.Ε. ίσως βοηθήσει στην κατανόηση των εμπλεκόμενων μηχανισμών και να οδηγήσει στην ανάπτυξη εξειδικευμένων και πιο αποτελεσματικών θεραπειών.

## *ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ*



## 2.1 Υλικά

### 2.1.1 Χημικά / Αναλώσιμα

#### Υλικά για την κυτταροκαλλιέργεια

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium): Gibco, Invitrogen.

FBS (Fetal bovine serum): Gibco, Invitrogen

Πενικιλίνη, Στρεπτομυκίνη : Gibco, Invitrogen

Non-essential aminoacids: Gibco, Invitrogen

Διάλυμα θρυψίνης: Gibco, Invitrogen

PBS (Phosphate buffer saline) 10x: Gibco, Invitrogen

DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο): Fluka

MG132: TechnoBioChem (Biomol)

TGFβ-1: R&D Systems

UO126: Alexis Biochemical

Wortmannin: Alexis Biochemical

Y-27632: Sigma

Γενετισίνη: Sigma

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide (MTT): Sigma

Lipofectamine™: Invitrogen

#### Χημικά/αναλώσιμα για χρήση in vitro τεχνικών

BSA (albumin bovine serum): Biomol

Φαλλοϊδίνη: Molecular Probes

Hoechst 33258: Sigma

Ιωδιούχο προπίδιο (PI): Sigma

TRIZOL: Life Technologies, Invitrogen

Αντίστροφη μεταγραφάση: Invitrogen

Ταq πολυμεράση: Invitrogen

SYBR-Green I: Sigma

Αντιδραστήριο Bradford: Bio-Rad

Luminol, Coumaric acid: Sigma

Gelvatol/ DABCO: Sigma

TEMED: Invitrogen

APS: Bio-Rad

Tween-20: Sigma

Developer, fixer: AGFA

IPTG: Sigma

Bactotripton: Fluka

Bacto Yeast extract: Fluka

Gelvatol/ DABCO: Sigma

Fibronectin: Sigma

Matrigel: Becton Dickinson

### **Χημικά/αναλώσιμα για την παρασκευή διαλυμάτων**

Χλωριούχο νάτριο (NaCl), χλωριούχο κάλιο (KCl), Tris-base, χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl<sub>2</sub>), σακχαρόζη, αιθυλο-διάμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA), θειικό δωδεκυλικό νάτριο (SDS), φθοριούχο νάτριο (NaF), υδροχλωρικό οξύ (HCl), γλυκίνη, αιθανόλη, μεθανόλη, οξικό οξύ, βορικό οξύ :από **BDH** (British Drug Houses),.

BBS (borate saline buffer), DTT (διθειοθρεϊτόλη), PMSF (φαινυλ-μεθυλ-σουλφονυλο-φοθορίδιο), Aprotinin, Leupeptin, γλυκερόλη, Triton X-100, TEMED (τετραμεθυλ-αιθυλεν-διαμίνη): από **Sigma**

### 2.1.2 Αντισώματα

Πρωτογενή αντισώματα: K-Ras (sc-30), H-Ras (sc-29), RhoA (sc-418), cdc42 (sc-87), Τουμπουλίνη (sc-8035), pTyr<sup>204</sup>ERK (sc-7383), B-Raf (sc-5284), κυκλίνη D1 (sc-718), GAPDH (sc-47724), ERK2 (sc-1647), p-cofilin (hSer3) (sc-12912-R), Βιμεντίνη (sc-6260), Ε-καντερίνη (sc-7870) από **Santa Cruz Biotechnology**, pSer<sup>445</sup> B-Raf (2696), pSer<sup>473</sup> Akt (9271), pSer<sup>217/221</sup>MEK1/2 (9121) και pThr<sup>183/185</sup>SAPK/JNK (9251), από **Cell Signaling**, κυκλίνη E (3512-1), κυκλίνη A (3507-1), κυκλίνη B1 (3508-1) και κυκλίνη D3 (3571-1) από **Clontech**, C-Raf (610151), Rb (554136), p<sup>Y397</sup>FAK (611723) και Ral A (610221) από **BD** (Becton, Dickinson), pSer<sup>338</sup>Raf-1 (05-538), Rac1 (05-389), FAK (05-537) από **Upstate** (Lake Placid, NY, USA), το αντίσωμα έναντι της fascin ήταν μια ευγενική προσφορά από τον Prof. Erik Langhoff.

Δευτερογενή αντισώματα: Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοστύπωμα κατά Western ήταν παρασκευασμένα σε κατσίκια έναντι των ανοσοσφαιρινών IgG κουνελιού ή ποντικού και ήταν από την εταιρία **Jackson**. Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για πειράματα ανοσοφθορισμού ήταν τα Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (A11001) και anti-rabbit (A11008) από την εταιρία **Molecular Probes**.

## 2.1.3 Εκκινητές

Γονίδιο	Αλληλουχία	τύπος PCR	Μέγεθος (bp)
p19 <sup>Arf</sup>	F: 5'-CCCTCGTGCTGATGCTACTGA-3' R: 5'-ACCACCAGCGTGTCCAGGAA-3'	RT-PCR	200
p15 <sup>Ink4b</sup>	F: 5'-AGGGATATTTAGGAGTGTGTGAC-3' R: 5'-CCATCGGAAGATTCGTAGCC-3'	RT-PCR	114
p19 <sup>Ink4d</sup>	F: 5'-CAGTTTGTGGCTTATAGGTG-3' R: 5'-CCCTTCTCTGTCCAACAC-3'	RT-PCR	101
p21 <sup>Cip1/Waf1</sup>	F: 5'-GGAAGACCATGTGGACCTGT-3' R: 5'-GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA-3'	RT-PCR	146
p27 <sup>Kip1</sup>	F: 5'-CCACGAAGAGTTAACCCGGG-3' R: 5'-GTCTGCTCCACAGAACCGGC-3'	RT	PCR
p57 <sup>Kip2</sup>	F: 5'-CTGACCAGCTGCACTCGGGGATTTC-3' R: 5'-GCCGCCGGTTGCTGCTACATGA-3'	RT-PCR	424
RKIP	F: 5'-TCATTCCTGGTGGTCAAC-3' R: 5'-CCTGTCCTGCTCGTAAAC-3'	RT-PCR	133
KSR	F: 5'-CCTTCCTGCCACTAACTC-3' R: 5'-GGGTGCTCCTTCTTTGTC-3'	RT-PCR	210
Ku70	F: 5'-GATGCACCTGAAGAAACCTG-3' R: 5'-GATTCCTCAAAGTGAACCCT-3'	RT-PCR	101
XPC	F: 5'-CCCAGCCCGCTTTACCA-3' R: 5'-TGCATTAAGTGTAAATGTTCCAATGA-3'	RT-PCR	97
ERCC1-variant1	F: 5'-TGACCACATTTGGATCTCTG-3' R: 5'-CAACTCCTTGGGTTCTTTCC-3'	RT-PCR	114
ERCC3	F: 5'-TGCCATTTCTAAGACTGCTG-3' R: 5'-TTCATCCTTGTCCATTTGCT-3'	RT-PCR	123
BAT25	F: 5'-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT*-3' (TAMRA)	RT-PCR	124

	R: 5'-TCTGCATTTTAACTATGGCTC-3'		
BAT26	F: 5'-TGACTACTTTTGGACTTCAGCC-3' R: 5'-AACCATTCAACATTTTAAACCC*-3' (FAM)	RT-PCR	120
NR21	F: 5'-TAAATGTATGTCTCCCCTGG-3' R: 5'-ATTCCTACTCCGCATTCACA*-3' (JOE)	RT-PCR	103
NR22	F: 5'-GAGGCTTGTCAAGGACATAA-3' R: 5'-AATTCGGATGCATCCAGTT*-3' (FAM)	RT-PCR	142
NR24	F: 5'-CCATTGCTGAATTTTACCTC-3' R: 5'-ATTGTGCCATTGCATTCCAA*-3' (JOE)	RT-PCR	132
E-καντερίνη	F: 5'- GAACAGCACGTACACAGCCCT -3' R: 5'- GCAGAAGTTCCTGTTCCAG -3'	Real Time PCR	
N-καντερίνη	F: 5'- TATATGCCCAAGACAAAGAGAC -3' R: 5'- TTCTGCTGACTCCTTCACTG -3'	Real Time PCR	
RhoA	F: 5'- ATGGCTGCCATCCGGAAGAAAC -3' R: 5'- CTCCTGCTTCATCTTGGCTAGC -3'	RT-PCR	411
GAPDH	F: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3' R: 5'-CATGGGTGGAATCATATTGGAA-3'	RT-PCR / Real Time PCR	155

Όπου \*: ο εκκινητής που έχει σημειωθεί με το φθορίζοντα δείκτη FAM (μπλε), JOE (πράσινο) ή TAMRA (κίτρινο)

## 2.2 Διαλύματα

### Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

TBE 5x (1lt): 54gr Tris-base, 27,5gr βορικό οξύ και 20ml 0,5M EDTA pH8.

Πήκτωμα αγαρόζης 1,5%: 1,5gr αγαρόζης σε 100ml TBE 1x

### Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

Διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (resolving gel), για 10ml

	8%	10%	12,5%
ddH <sub>2</sub> O	4.78ml	4.1ml	3.4ml
Bis-acrylamide	2.72ml	3.4ml	4.1ml
4x Tris pH 8.8	2.5ml	2.5ml	2.5ml
APS	100μl	100μl	100μl
TEMED	10μl	10μl	10μl

Διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης (stacking gel), για 10ml

ddH <sub>2</sub> O	2.92ml
Bis-acrylamide	0.83ml
4x Tris pH 8.8	1.25ml
APS	50μl
TEMED	5μ

4x Tris HCl – SDS pH 8.8

Tris-base	91gr
SDS	2gr

HCl	έως pH 8.8
dH <sub>2</sub> O	~900ml(έως 1lt)

Διάλυμα ακρυλαμιδίου

Acrylamide	29gr
Bis-acrylamide	1gr
dH <sub>2</sub> O	έως 1lt

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer) 10x

Tris-base	30.2gr
Glycine	144gr
SDS	10gr
dH <sub>2</sub> O	έως 1lt

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer) 1x

Running Buffer 10x	100ml
dH <sub>2</sub> O	900ml

Διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer) 10x

Tris-base	30.2gr
Glycine	144gr
dH <sub>2</sub> O	έως 1lt

Διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer) 1x

Transfer Buffer 10x	100ml
---------------------	-------

dH <sub>2</sub> O	900ml
-------------------	-------

Διάλυμα TBS 10x

Tris-base	24.2gr
NaCl	80gr
HCl	έως pH 7.6
dH <sub>2</sub> O	έως 1lt

Διάλυμα TBS-T (1lt)

TBS buffer 10x	100ml
Tween-20	1ml
dH <sub>2</sub> O	900ml

Χρόση Ponceau-S

Χρωστική Ponceau-S	2gr
Τριγλωροξικό οξύ	30gr
Σουλφοσαλκυλικό οξύ	30gr
dH <sub>2</sub> O	έως 1lt

Διαλύματα ECL για την ανίχνευση των πρωτεϊνών με τη χρήση φωτογραφικών φιλμ

(για 10ml)

Διάλυμα I: 1ml Tris-HCl pH 8.5, 100μl luminol, 44μl cumaric

Διάλυμα II: 1ml Tris-HCl pH 8.5, 6.4μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



### Διαλύματα λύσης των κυττάρων για την ανάλυση πρωτεϊνών

Διάλυμα λύσης των κυττάρων για την προετοιμασία ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (ολικό buffer)

50mM Tris-HCl pH 7.4, 250mM σουκρόζη, 1mM EDTA, 10mM NaF, 1mM EGTA και Triton X-100. Στο διάλυμα λύσης προστίθενται λίγο πριν τη χρησιμοποίησή του αναστολείς προτεασών (1mM PMSF, 10μg/ml aprotinin, 10μg/ml leupeptin, 1mM sodium orthovanadate).

Διάλυμα λύσης των κυττάρων για τη μελέτη των πρωτεϊνών Ras (Ras buffer)

10% γλυκερόλη, 1% Nonidet P-40, 50mM Tris-HCl pH 7.4, 200mM NaCl, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>. Στο διάλυμα Στο διάλυμα λύσης προστίθενται λίγο πριν τη χρησιμοποίησή του αναστολείς προτεασών (1mM PMSF, 10μg/ml aprotinin, 10μg/ml leupeptin, 1mM sodium orthovanadate).

Διάλυμα λύσης των κυττάρων για τη μελέτη των Rho GTPασών και των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού (Rho buffer)

50mM Tris-HCl (pH 7.4), 0,5% sodium deoxycholate, 0,1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 500mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100. Στο διάλυμα λύσης προστίθενται λίγο πριν τη χρησιμοποίησή του αναστολείς προτεασών (1mM sodium orthovanadate, 10μg/ml aprotinin, 10μg/ml leupeptin και 0.2mM PMSF).

### Διαλύματα λύσης των κυττάρων για την ανίχνευση των ενεργών GTPασών (GST-pull down assay)

Διάλυμα λύσης των βακτηρίων

50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100. Λίγο πριν τη χρήση προστίθενται: 1mM DTT, 10μg/ml aprotinin, 10μg/ml leupeptin και 1mM PMSF

Διάλυμα πλύσεων (wash buffer) για μελέτη των ενεργών Rac1, Cdc42 και RalA

50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100. Λίγο πριν τη χρήση προστίθενται: 1mM DTT, 10μg/ml aprotinin, 10μg/ml leupeptin και 0.1mM PMSF

**Καλλιέργεια βακτηρίων (*E.coli*)**

Διάλυμα LB

Bactotripton	10gr
Bacto Yeast extract	5gr
NaCl	10gr
H <sub>2</sub> O	έως 1lt

Τρυβλία με LB+άγαρ

Σε 500ml διαλύματος LB προστίθενται 7gr άγαρ. Το μίγμα αποστειρώνεται και στη συνέχεια μεταφέρεται ορισμένη ποσότητα σε τρυβλία Petri (υπό άσηπτες συνθήκες), τα οποία τοποθετούνται στους 4°C.

## 2.3 Μέθοδοι

### 2.3.1 Μέθοδοι χειρισμού και μελέτης κυτταρικών συστημάτων

#### Καλλιέργεια κυττάρων

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο DMEM που περιέχει 10% v/v ορό (FBS) αντιβιοτικά (πενικυλλίνη, στρεπτομυκίνη) και αμινοξέα (non-essential amino-acids). Η καλλιέργεια γίνεται σε υγρό περιβάλλον, με 95% ατμοσφαιρικό αέρα και 5% CO<sub>2</sub>, στους 37°C. Οι συνθήκες και τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι αποστειρωμένα και οποιοσδήποτε χειρισμός των κυττάρων γίνεται σε εστία κάθετης ροής αέρος.

Όταν κριθεί απαραίτητη η ανακαλλιέργεια των κυττάρων, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα πλένονται με διάλυμα PBS 1x. Στη συνέχεια τα κύτταρα αποκολλώνται από τον πυθμένα του δοχείου καλλιέργειας με επώαση με διάλυμα τρυψίνης 5% στους 37°C για ~5min. Το εναιώρημα των κυττάρων τοποθετείται σε πλαστικούς σωλήνες τύπου universal (Greiner) και φυγοκεντρούνται στις 1500rpm για 5 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρηση το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε μικρό όγκο θρεπτικού μέσου και μοιράζεται σε κατάλληλο αριθμό φιαλών καλλιέργειας (φλάσκες) ή σε τρυβλία (Corning).

Για τη φύλαξη των κυττάρων η διαδικασία είναι ίδια. Το ίζημα όμως αναδιαλύεται σε διάλυμα κατάψυξης κυττάρων (70% DMEM, 20% FBS και 10% DMSO) και τα κύτταρα μεταφέρονται σε πλαστικά ειδικά για κατάψυξη φιαλίδια, τα οποία στη συνέχεια μεταφέρονται σε ειδικό δοχείο με ισοπροπανόλη (Cryo box, NALGENE) και τοποθετείται στους -80°C για 4-5 ώρες. Κατόπιν τα φιαλίδια με τα κύτταρα αποθηκεύονται σε υγρό άζωτο για μακροχρόνια φύλαξη. Για την απόψυξη των κυττάρων από το άζωτο, τα φιαλίδια μεταφέρονται σε υδατόλουτρο στους 37°C,

το περιεχόμενο μεταφέρεται σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρωσης, προστίθεται 1ml θρεπτικού υλικού και τα κύτταρα φυγοκεντρούνται. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε θρεπτικό μέσο και μεταφέρεται σε φλάσκα για περαιτέρω καλλιέργεια.

### Κυτταρικές σειρές

Οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου Caco-2, DLD-1, HT-29, SW620 και Colo-205 αγοράστηκαν από την ATCC. Τα DKO-4 κύτταρα, που προέκυψαν από την κυτταρική σειρά DLD-1 μετά από απαλοιφή του ογκογονιδίου *K-RAS<sup>G13D</sup>* με ομόλογο ανασυνδυασμό, ήταν μια ευγενική προσφορά του Dr Sasazuki T.<sup>84</sup> Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν επίσης τα κύτταρα HT-29 στα οποία αποσιωπήθηκε το μεταλλαγμένο γονίδιο *B-RAF*. Τα κύτταρα επιμολύνθηκαν μόνιμα με το πλασμίδιο pSUPER, στο οποίο είχαν προηγουμένως ενσωματωθεί τα μικρά ανασταλικά τμήματα RNA (siRNA) τα οποία ήταν σχεδιασμένα έναντι του μεταλλαγμένου *B-RAF<sup>V600E</sup>* και όχι του φυσιολογικού γονιδίου. Οι αλληλουχία του siRNA που χρησιμοποιήθηκε είναι η εξής: gatccccGCTACAGAGAAATCTCGATtcaagagaATCGAGATTTCTCTGTAGCtttttgaaa (sense)<sup>85</sup> και κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pSUPER με τη χρήση των ενζύμων περιορισμού *HindIII* και *BglII*. Τα HT-29 κύτταρα επιμολύνθηκαν και με το πλασμίδιο χωρίς την αλληλουχία siRNA (κενό) με τη μέθοδο φωσφορικού ασβεστίου (περιγράφεται παρακάτω) και τα ονόματα που δόθηκαν στα κύτταρα που προέκυψαν είναι: HTps (για το κενό πλασμίδιο) και HTshBR3 (για την αποσιώπηση του *BRAF<sup>V600E</sup>*). \* Η πειραματική διαδικασία για τη δημιουργία των HTps και HTshBR3 κυττάρων έγινε από τον Michal Koc.

**Μόνιμη επιμόλυνση των Caco-2 κυττάρων με πλασμίδια που φέρουν τα ογκογονίδια *BRAF*<sup>V600E</sup> και *KRAS*<sup>G12V</sup>**

Το πλασμίδιο pH8-*BRAF*<sup>V600E</sup>, που φέρει το ανασυνδυασμένο cDNA του μεταλλαγμένου *B-RAF* ογκογονιδίου, ήταν μια προσφορά από τον Dr Tsuneo Ikenoue<sup>86</sup>, και το πλασμίδιο pcDNA3-*KRAS*<sup>G12V</sup> δημιουργήθηκε από τον Dr Michael Roberts<sup>82</sup>. Τα εν λόγω πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν για τη μόνιμη επιμόλυνση των Caco-2 κυττάρων με τη μέθοδο φωσφορικού ασβεστίου (Calcium phosphate). Πιο αναλυτικά, σε ένα αποστειρωμένο φιαλίδιο (erppendorf) αναμειγνύονται το πλασμιδιακό DNA, διάλυμα CaCl<sub>2</sub> 2.5M (18.4gr σε 50ml H<sub>2</sub>O) και H<sub>2</sub>O. Το μίγμα αυτό προστίθεται σε άλλο φιαλίδιο που περιέχει διάλυμα BBS 2x (20mM BES pH 6.95, 280mM NaCl και 1.5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Οι συγκεντρώσεις των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση των Caco-2 κυττάρων είναι οι εξής: pH8-*BRAF*<sup>V600E</sup> [10ng], pcDNA3-*KRAS*<sup>G12V</sup> [15ng] και pcDNA3 [10ng]. Στη συνέχεια και αφού γίνει ανάμειξη με χρήση vortex, το τελικό αυτό μίγμα μεταφέρεται στα κύτταρα σταγόνα-σταγόνα και υπό ανάδευση. Τα κύτταρα τοποθετούνται στον κλίβανο επώασης και την επόμενη μέρα το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται από φρέσκο. Τα Caco-2 κύτταρα επιμολύνθηκαν επίσης με το πλασμίδιο pcDNA3 χωρίς την παρουσία των ογκογονιδίων (κενό), ώστε να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρας. 3 μέρες μετά την επιμόλυνση προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο 0.5 mg/ml γενετισίνης, προκειμένου να επιλεγούν οι κλώνοι οι οποίοι, έφεραν το πλασμίδιο. Οι επιλεγμένοι κλώνοι αναλύθηκαν στη συνέχεια α) με μέθοδο αλληλούχισης για την ύπαρξη της ειδικής μετάλλαξης και β) για τα επίπεδα έκφρασης της ογκοπρωτεΐνης ώστε να επιλεγούν για περαιτέρω ανάλυση εκείνοι που παρουσίασαν αύξηση έως 2 φορές, συγκρινόμενοι με τα Caco-2 που επιμολύνθηκαν με το άδειο πλασμίδιο και φέρουν τα ονόματα: Caco-BR# (ή εν συντομία BR#) και Caco-K (ή εν συντομία K#) για τα ογκογονίδια *BRAF*<sup>V600E</sup> και *KRAS*<sup>G12V</sup> αντίστοιχα.

Τα κύτταρα που φέρουν το κενό πλασμίδιο ονομάστηκαν Caco-NEO#. Όπου #: ο αριθμός του κλώνου. Τελικά επιλέχθηκαν οι κλώνοι Caco-BR13 και Caco-BR23, Caco-K6 και Caco-K15, καθώς και ο κλώνος Caco-H2 (για τη μελέτη του ογκογονιδίου *HRAS*<sup>G12V</sup>) (οι κλώνοι Caco-K15 και Caco-H2 δημιουργήθηκαν με την ίδια μεθοδολογία από τον Michael Roberts <sup>82</sup>).

### **Παροδική επιμόλυνση των κυττάρων με μικρά ανασταλτικά μόρια RNA (small inhibitory RNA, siRNA)**

Τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με ειδικά siRNAs για τις πρωτεΐνες RhoA, Rac1 και Cdc42 (ONTARGETplus SMART pool) καθώς και με siRNA το οποίο δε στοχεύει κάποιο γονίδιο (RISC-free siRNA) ως μάρτυρας. Η επιμόλυνση έγινε με τη χρήση του παράγοντα Lipofectamine<sup>TM</sup> σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τη μέρα πριν την επιμόλυνση τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο 6 θέσεων, ώστε να καλύπτουν ~70% της επιφάνειας του πηγαδιού. Το ποσό του siRNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 160pmol για τις πρωτεΐνες Cdc42 και Rac1 και 80pmol για τη RhoA. 48 ώρες μετά την επιμόλυνση έγινε ανάλυση κατά Western για να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου σε επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης.

### **Καλλιέργεια κυττάρων σε σύστημα 3 διαστάσεων (3D culture)**

Προκειμένου τα κύτταρα να καλλιεργηθούν σε σύστημα 3 διαστάσεων χρησιμοποιήθηκε η ουσία Matrigel. Το Matrigel είναι ένα μίγμα μορίων (κολλαγόνο, λαμινίνη, αυξητικοί παράγοντες κ. α.) που προσομοιάζει το εξωκυττάριο περιβάλλον και σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 4°C πήζει και μετατρέπεται σε gel.

Η διαδικασία είναι η εξής: ~10<sup>4</sup> κύτταρα αναμειγνύονται με θρεπτικό υλικό το οποίο περιέχει 5mg/ml Matrigel και το μίγμα αυτό, συνολικού όγκου 300μl,

τοποθετείται επάνω σε καλυπτρίδες (coverslips) σε τρυβλία 24 θέσεων. Η όλη διαδικασία γίνεται στον πάγο και αρκετά προσεχτικά, ώστε να αποφευχθεί η πήξη του Matrigel πριν την ανάμειξή του με τα κύτταρα και την επίστρωση στο πηγάδι. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 1 ώρα περίπου ώστε να στερεοποιηθεί το μίγμα και στη συνέχεια προστίθεται πάνω από αυτό θρεπτικό υλικό με 10% FBS, το οποίο ανανεώνεται κάθε 2 μέρες. Τα κύτταρα καλλιεργούνται για 12 μέρες και ακολουθεί παρατήρησή τους σε οπτικό μικροσκόπιο, καθώς και μελέτη με πείραμα ανοσοφθορισμού (περιγράφεται παρακάτω).

### **Μελέτη ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων**

Για τη μελέτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων, τα κύτταρα αναπτύσσονται σε τρυβλία 6 θέσεων. Σε κάθε θέση του τρυβλίου τοποθετούνται  $1 \times 10^5$  κύτταρα για κάθε κυτταρική σειρά και αφήνονται να πολλαπλασιαστούν για 5 μέρες. Κάθε 24 ώρες ακολουθεί η διαδικασία αραίωσης του αριθμού των κυττάρων και ακολουθεί μέτρηση αυτών με τη χρήση ειδικού μετρητή κυττάρων (coulter counter, model Z2; Coulter, Miami, FL).

### **Δημιουργία αποικιών σε μαλακό άγαρ**

Τα πειράματα σε μαλακό άγαρ δείχνουν την αποτελεσματικότητα των καρκινικών κυττάρων να πολλαπλασιαστούν δημιουργώντας αποικίες σε μη σταθερό υπόστρωμα. Με τη μέθοδο αυτή εξετάζεται η ικανότητα που έχουν τα κύτταρα να πολλαπλασιάζονται χωρίς την ανάγκη κάποιου υποστρώματος, ιδιότητα που χαρακτηρίζει τα καρκινικά κύτταρα. Σε τρυβλίο 6 θέσεων τοποθετείται θρεπτικό υλικό που περιέχει 0.5% αγαρόζη και πάνω σε αυτό το στρώμα τοποθετούνται  $10^3$  κύτταρα αναμεμειγμένα με θρεπτικό μέσο το οποίο περιέχει 0.3% κ.ο. αγαρόζη. Τα

κύτταρα αφήνονται να σχηματίσουν αποικίες σε συνθήκες 5% CO<sub>2</sub> και 37 °C. 24 ώρες μετά προστίθεται θρεπτικό υλικό χωρίς αγαρόζη, το οποίο ανανεώνεται κάθε 2 μέρες. 2 βδομάδες αργότερα γίνεται μονιμοποίηση των κυττάρων με επώασή τους με μεθανόλη για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα κύτταρα βάφονται με 0.01% κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet) και ακολουθεί μέτρηση των σχηματισθέντων αποικιών στο ανώτερο στρώμα αγαρόζης (0.3%) με παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων (Axiovert. 25, Zeiss, D-jena).

### **Δημιουργία όγκων σε άθυμα ποντίκια (SCID mice)**

Προκειμένου να μελετηθεί η *in vivo* ικανότητα των κυττάρων να δημιουργούν όγκους, χρησιμοποιήθηκαν άθυμα ποντίκια στα οποία ενέθηκαν τα υπό μελέτη κύτταρα.  $1 \times 10^6$  κύτταρα (Caco-2, Caco-NEO9, Caco-BR13, Caco-BR23, Caco-K6, Caco-K15, HT29 και DLD-1) διαλύθηκαν σε 100μl PBS και ενέθηκαν υποδερμικά στο κάθε πλευρό ενός θηλυκού άθυμου ποντικίου ηλικίας 5 εβδομάδων (Charles River Laboratories Inc., France). Τα ποντίκια παρακολουθούνταν για την εμφάνιση όγκων για μια περίοδο μέχρι 5 μηνών και στη συνέχεια θυσιάζονταν προκειμένου να αφαιρεθεί ο όγκος 2 εβδομάδες μετά την εμφάνισή του. Οι αφαιρούμενοι όγκοι ζυγίζονταν σε ζυγό και μετρούνταν με ηλεκτρονική καλύπτρα (Cage, Kroeplin GmbH) ώστε να καθοριστεί το βάρος και το μέγεθός τους. Οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν ήταν σύμφωνες με τις διεθνείς οδηγίες περί μεταχείρισης πειραματόζωων (United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research, UKCCCR).



Έλεγχος της επίδρασης του αναστολέα της MEK, UO126, στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με την τεχνική MTT

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση διαφόρων χημικών παραγόντων στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Είναι μία μέθοδος η οποία υπολογίζει έμμεσα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς μετρά τη μεταβολική δραστηριότητα, η οποία αντιστοιχεί σε ζωντανά κύτταρα με ενεργό κυτταρικό κύκλο. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πλακίδιο με 96 θέσεις (πηγάδια) σε συγκέντρωση  $2 \times 10^3$  κύτταρα / πηγάδι και αφέθηκαν να πολλαπλασιαστούν για 24 ώρες στον κλίβανο επώασης κυττάρων.
- Στα κύτταρα προστίθενται 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα UO126 (30 και 60μM) και ακολουθεί επώαση για άλλες 72 ώρες (κάθε συνθήκη γίνεται εις τριπλούν)
- Στα κύτταρα προστίθενται 100μl διαλύματος 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide (MTT) (10mg MTT σε 2ml PBS + 8 ml D-MEM 0% FBS) και ακολουθεί περαιτέρω επώαση για 4 ώρες στους 37°C και 5%CO<sub>2</sub>.
- Γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από τα πηγάδια και ξέπλυμα 2 φορές με PBS.
- Ακολουθεί προσθήκη 100μl ισοπροπανόλης και ήπια ανάδευση ώστε να διαλυθούν οι κρύσταλλοι φορμαζάνης στους οποίους έχει μετατραπεί το MTT λόγω μεταβολισμού των κυττάρων.
- Γίνεται φωτομέτρηση στα 560nm χρησιμοποιώντας ειδική συσκευή φωτομέτρησης (Tecan Safire2 Microplate Reader) και από τις απορροφήσεις υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων.

**Ανίχνευση ενεργότητας ενδογενούς β-γαλακτοσιδάσης σχετιζόμενης με την κυτταρική γήρανση (χρώση SA-β-gal)**

- Την προηγούμενη μέρα του πειράματος τα κύτταρα αφήνονται να αναπτυχθούν σε πλακίδια 6 πηγαδιών.
- Τα κύτταρα πλένονται 2 φορές με PBS και προστίθεται διάλυμα μονιμοποίησης 4% παραφολμαδεΐδης (PFA) σε PBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθεί πλύσιμο των κυττάρων 2 φορές με διάλυμα PBS και προστίθεται 1ml / πηγάδι από το διάλυμα χρώσης, X-Gal με pH 6 (διάλυμα χρώσης: 1 mg/ml X-Gal, 5 mM  $K_3Fe[CN]_6$ , 5 mM  $K_4Fe[CN]_6$ , 2 mM  $MgCl_2$ , 150 mM NaCl, 40 mM κιτρικού οξέος σε PBS)
- Γίνεται επώαση των κυττάρων στους 37°C υπό ελαφριά ανάδευση χωρίς την παρουσία  $CO_2$ , έτσι ώστε να επιτευχθεί η χρώση των κυττάρων.
- Τα κύτταρα παρατηρούνται με μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων (Nikon Eclipse T-200) και φωτογραφήθηκαν με τη χρήση φωτογραφικής μηχανής (Sony).

**Κυτταρομετρία ροής (Fluorescence Activated Cell Sorting-FACS analysis)**

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου των υπό μελέτη κυττάρων. Η διαδικασία είναι η εξής :

- Τα κύτταρα πλένονται με PBS και  $\sim 5 \times 10^6$  από αυτά μονιμοποιούνται με την προσθήκη κρύας αιθανόλης 70% στους -20 °C για μία νύχτα.
- Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε 1.200rpm για 5 λεπτά στους 4°C και ακολουθεί πλύσιμο με PBS.

- Ακολουθεί χρώση των κυττάρων με 1 mg/ml ιωδιούχο προπίδιο (PI) σε PBS το οποίο περιέχει 20 μg/ml RNάση-A και τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C για 20 λεπτά.
- Τα κύτταρα αναλύονται με κυτταρομετρία ροής σε ειδική συσκευή (Calibur, Becton Dickinson).

\*\* Για πιο λεπτομερή ανάλυση του κυτταρικού κύκλου τα κύτταρα επωάστηκαν με 0.1 μM Nocodazole, 2, 8 και 16 ώρες και στη συνέχεια ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία.

\*\*\* Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το Εργαστήριο της Dr Lesley Probert, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ)

### **In vitro έλεγχος της κυτταρικής μετανάστευσης και διείσδυσης**

Κυτταρική μετανάστευση: Η εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης των πηγαδιών ειδικών τρυβλίων 24 θέσεων (Transwell chambers, Costar) η οποία φέρει πόρους διαμέτρου 8μm, επιστρώνεται με φιμπρονεκτίνη (fibronectin) (10μg/ml σε θρεπτικό υλικό D-MEM) για 2 ώρες στους 37 °C. Η φιμπρονεκτίνη χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο του εξωκυττάρου χώρου των κυττάρων. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέγονται με τρυψινοποίηση και αφού πλυθούν 3 φορές με θρεπτικό υλικό που περιέχει 1% FBS αναδιαλύονται έτσι ώστε 10<sup>4</sup> κύτταρα να προστεθούν στο εσωτερικό μέρος της μεμβράνης κάθε πηγαδιού, ενώ το κατώτερο (εξωτερικό) μέρος της μεμβράνης καλύπτεται σε θρεπτικό μέσο με 10% FBS. Τα κύτταρα επωάζονται για 30 ώρες σε συνθήκες 37°C και 5% CO<sub>2</sub>, μονιμοποιούνται με μεθανόλη για 5 λεπτά, χρωματίζονται με 0.5% κρυσταλλικό ιώδες για 10 λεπτά και τα κύτταρα που δεν πέρασαν μέσα από τους πόρους της μεμβράνης απομακρύνονται με τη βοήθεια

μπατονέτας. Γίνονται αρκετές πλύσεις με νερό ώστε να φύγει η περίσσεια της χρώσης και ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων που μετανάστευσαν με την παρατήρηση σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων.

Κυτταρική διείσδυση: η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια με την εξής διαφοροποίηση: το εσωτερικό μέρος της μεμβράνης, όπου τοποθετούνται τα κύτταρα, επιστρώνεται με Matrigel. Στην περίπτωση αυτή τα κύτταρα αφήνονται να μεταναστεύσουν διεισδύοντας μέσα από αυτό το gel που έχει δημιουργηθεί από το Matrigel.

Wound healing («Μέθοδος επούλωσης πληγών»): στο πείραμα αυτό τα κύτταρα τοποθετούνται σε τρυβλία 24 θέσεων. Ο αριθμός των κυττάρων είναι κατάλληλος ώστε να καλύψουν την επιφάνεια του πηγαδιού κατά 100%. Με τη βοήθεια ενός κίτρινου tip χαράσσεται μια γραμμή (wound). Τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS, προστίθεται θρεπτικό υλικό και επωάζονται για 4-8 ώρες. Ακολουθεί μικροσκοπική παρατήρηση και η κυτταρική μετανάστευση υπολογίζεται από τη μείωση του εύρους της γραμμής.

### **2.3.2 Ανάλυση πρωτεϊνών**

#### **Παρασκευή ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων**

Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών τα κύτταρα τοποθετούνται σε πάγο και τα εκχυλίσματα παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας το κατάλληλο διάλυμα λύσης. Για την K-RAS και τις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα ειδικά διαλύματα λύσης, ενώ για όλες τις άλλες πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκε απλό διάλυμα λύσης (περιγράφηκαν παραπάνω). Πιο συγκεκριμένα, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα πλένονται με κρύο PBS. Στη συνέχεια προστίθεται σε αυτά κατάλληλος όγκος από το διάλυμα λύσης και το

μίγμα αυτό μεταφέρεται σε φιαλίδια erpendorfs και ακολουθεί επώαση 20 λεπτών στον πάγο και φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 13.000rpm στους 4°C. Το υπερκείμενο που περιέχει τις συνολικές πρωτεΐνες, φυλάσσεται στους -80°C.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών γίνεται με τη μέθοδο Bradford. Συγκεκριμένα, 1μl πρωτεΐνης προστίθεται σε μίγμα που αποτελείται από 800μl νερό και 200μl διάλυμα Bradford και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 595nm. Η τιμή της φωτομέτρησης ανάγεται σε πρότυπη καμπύλη κατασκευασμένη με γνωστές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης BSA και προσδιορίζεται η πρωτεϊνική συγκέντρωση κάθε δείγματος.

### **Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωμα κατά Western**

#### **1. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου**

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια κλασική τεχνική διαχωρισμού των πρωτεϊνών. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται το ανιονικό απορρυπαντικό θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο (SDS) σε συνδυασμό με κάποιον αναγωγικό παράγοντα και θέρμανση για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών πριν την ηλεκτροφόρηση. Τα αποδιαταγμένα πολυπεπίδια προσδένουν το SDS και αποκτούν αρνητικό φορτίο. Με αυτό τον τρόπο, κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, τα συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίων μετακινούνται στο πήκτωμα ανάλογα με το μέγεθός τους. Ανάλογα με το μοριακό βάρος της υπό μελέτης πρωτεΐνης, δημιουργείται πήκτωμα με την κατάλληλη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου, ώστε να γίνει ο βέλτιστος διαχωρισμός. Το πήκτωμα αποτελείται από ένα τμήμα όπου γίνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών (πηκτή διαχωρισμού), πάνω από το οποίο τοποθετείται ένα άλλο διάλυμα, το διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης και το οποίο χρησιμεύει στη συμπύκνωση του δείγματος έτσι ώστε όλα τα πολυπεπίδια να εισέλθουν ταυτόχρονα στο πήκτωμα διαχωρισμού.

Συνήθως χρησιμοποιούνται 30-50μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Στο δείγμα προστίθεται 3x SDS διάλυμα φόρτωσης, στο οποίο έχει προστεθεί DTT σε αναλογία 1:10 (DTT : διάλυμα φόρτωσης) και πριν γίνει η φόρτωση στο πήκτωμα, τα δείγματα θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 100°C. Παράλληλα, φορτώνεται και ειδικός δείκτης που περιέχει πρωτεΐνες γνωστών μοριακών βαρών και ο οποίος είναι χρωματισμένος, έτσι ώστε να εμφανίζονται στο πήκτωμα ζώνες που χρησιμεύουν για την αναγνώριση του μεγέθους των δειγμάτων. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση στα ~120 Volts για περίπου 2 ώρες σε κατάλληλη συσκευή (Bio-Rad). Ο χρόνος ηλεκτροφόρησης μπορεί να ποικίλει ανάλογα με την πυκνότητα του πηκτώματος και το μέγεθος της υπό μελέτης πρωτεΐνης.

## 2. Μεταφορά πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωμα κατά Western

Στο στάδιο αυτό και αφού έχει ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Whatman), ώστε να ακολουθήσει ανοσοαποτύπωση. Μετά την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα τοποθετείται σε επαφή με φύλλο νιτροκυτταρίνης ως εξής: ξεκινώντας από το θετικό πόλο της συσκευής, με τη βοήθεια πλέγματος, χαρτί Whatman- πήκτωμα- νιτροκυτταρίνη- χαρτί Whatman. Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται στη νιτροκυτταρίνη με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου, σε κατάλληλη συσκευή και με τη χρήση ειδικού διαλύματος μεταφοράς. Κατά τη διαδικασία, εφαρμόζεται ρεύμα έντασης 330mA για 90 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C.

Μετά τη μεταφορά, οι πρωτεΐνες μπορούν να γίνουν ορατές με προσθήκη χρώσης Ponceau-S για μερικά δευτερόλεπτα. Με τον τρόπο αυτό διαπιστώνεται αν έχει γίνει σωστά η ηλεκτροφόρηση καθώς και η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ακολουθεί κατάληψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης με επώαση της μεμβράνης με διάλυμα σκόνης γάλακτος 5% σε TBS-T (blocking) για μία ώρα. Στη συνέχεια η μεμβράνη πλένεται με TBS-T και γίνεται επώαση με ειδικά πρωτογενή αντισώματα σε τελική αραιώση η οποία ποικίλει ανάλογα με το αντίσωμα

(1:500-1:1000). Το αντίσωμα αραιώνεται με διάλυμα TBST-T το οποίο περιέχει 2% ή 5% BSA για χρονικές περιόδους 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή ένα βράδυ στους 4°C. Ακολουθεί πλύσιμο της μεμβράνης με TBS-T και επώασή της με το κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα σε αραιώση 1: 15.000 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια η μεμβράνη πλένεται για να απομακρυνθεί η περίσσεια αντισώματος.

Τέλος, γίνεται η ανίχνευση του συμπλέγματος πρωτεΐνης-αντισώματος με χημειοφωταύγεια. Οι μεμβράνες επωάζονται για μερικά δευτερόλεπτα με διάλυμα που προκύπτει από ανάμειξη ίσων όγκων διαλυμάτων I και II ECL, έτσι ώστε να καλύπτεται όλη η επιφάνεια της μεμβράνης και ακολουθεί έκθεσή της σε φιλμ ακτίνων-X (Fuji).

### **Ανίχνευση των ενεργών GTPασών με τη μέθοδο GST-pull down**

Με την τεχνική αυτή καθίσταται δυνατή η μελέτη της ενεργού μορφής των GTPασών, καθώς τελικά ανιχνεύεται μόνο η πρωτεΐνη που είναι συνδεδεμένη με GTP. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

#### **1. Προετοιμασία βακτηρίων που εκφράζουν το ενωμένο με GST υπόστρωμα (PAK για τις ενεργές Cdc42 και Rac1 και RalBP για την ενεργή RalA)**

- Γίνεται μετασηματισμός βακτηρίων (E.coli) με το κατάλληλο πλασμίδιο που περιέχει το ενωμένο με GST υπόστρωμα σε τρυβλία Petri, τα οποία περιέχουν αμικιλίνη. Τα τρυβλία τοποθετούνται στους 37°C για μια νύχτα.
- Επιλέγεται μια αποικία από το τρυβλίο και μεταφέρεται σε 5ml διαλύματος LB Broth (LB) που περιέχει αμικιλίνη. Γίνεται επώαση για μία νύχτα στους 37°C, υπό ανάδευση.

- 50 ml από την καλλιέργεια αυτή μεταφέρονται σε 200ml LB με αμπικιλίνη. Ακολουθεί επώαση για μια νύχτα στους 37°C, υπό ανάδευση.
- Προστίθενται 1800ml LB με 2ml αμπικιλίνης και ακολουθεί επώαση στους 37°C έως ότου η οπτική πυκνότητα (O.D.<sub>600</sub>) της καλλιέργειας είναι περίπου 0.5
- Προστίθενται 2ml IPTG και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 3ώρες, υπό ανάδευση
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 4.000rpm για 15 λεπτά στους 4 °C και το ίζημα αναδιαλύεται σε 20ml διαλύματος λύσης βακτηρίων (κρύο)
- Ακολουθεί κατεργασία με υπερήχους 6 x 15 δευτερόλεπτα σε πάγο, στη μέγιστη συχνότητα.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε 10.000rpm για 40 λεπτά στους 4°C
- Κρατείται το υπερκείμενο (~20ml) στο οποίο στη συνέχεια θα προστεθούν σφαιρίδια γλουταθιόνης

## 2. Ένωση των GST-υποστρώματων με τα σφαιρίδια γλουταθιόνης

(σε ~20ml GST-υποστρώματος προστίθεται ~1ml διαλύματος σφαιριδίων γλουταθιόνης)

- Τα σφαιρίδια γλουταθιόνης πλένονται πριν από τη χρήση 4 φορές με PBS και στη συνέχεια αναδιαλύονται σε 500μl.
- Ακολουθεί επώαση με το υπόστρωμα-GST (το υπερκείμενο από το προηγούμενο στάδιο) για 1 ώρα στους 4°C σε συσκευή κυκλικής ανάδευσης.
- Τα σφαιρίδια γλουταθιόνης είναι πλέον ενωμένα με το σύμπλοκο υπόστρωμα-GST και ακολουθεί πλύσιμο αυτών με διάλυμα πλύσης x 4 φορές (φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα σε 1000rpm, στους 4°C).



- Τα σφαιρίδια επαναδιαλύονται σε 2ml διαλύματος πλύσης στο οποίο έχει προστεθεί 10% γλυκερόλη και μεταφέρονται στους -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

### 3. Ανίχνευση της ενεργής GTPάσης

- ~200μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος αναμειγνύονται με ~30μg σφαιριδίων και επωάζονται για 1 ώρα στους 4°C σε συσκευή κυκλικής ανάδευσης.
- Ακολουθεί πλύσιμο με διάλυμα πλύσης x 4 φορές (φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα σε 1000rpm, στους 4°C).
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και στα σφαιρίδια προστίθενται ~ 30μl διαλύματος φόρτωσης 3x SDS με 10% DTT.
- Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση και ανοσοστύπωμα κατά Western.
- Για την ανίχνευση της ενεργής RhoA πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα σφαιρίδια γλουταθιόνης ενωμένα με GST-RBD (Rho-binding domain of Rhotekin) και η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Rho Assay Reagent, Upstate).

### Ανοσοφθορισμός

Τα κύτταρα επιστρώνονται σε καλυπτρίδες (coverslips) σε τρυβλία 24 θέσεων και επωάζονται στους 37°C για 24 ώρες τουλάχιστον, ώστε να έχουν κολλήσει πλήρως πάνω σε αυτές. Ακολουθεί μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδης (PFH) σε PBS για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ή με κρύο διάλυμα μεθανόλης/ακετόνης (8:1) για 10 λεπτά στους -20°C. Τα κύτταρα που μονιμοποιήθηκαν με PFH επώαστηκαν με 0.1% Triton X-100 για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση, προκειμένου να γίνουν διαπερατές οι μεμβράνες. Ακολουθεί δέσμευση των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης με 5% FBS σε

PBS (blocking) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα για ~12 ώρες στους 4 °C. Γίνεται πλύσιμο με PBS και επώαση με το αντίστοιχο δευτερογενές αντίσωμα το οποίο είναι σημασμένο με φθορίζουσα ουσία (Alexa Fluor 488). Για την ανάλυση του κυτταροσκελετού της ακτίνης τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 4% PFH και επώαστηκαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με φαλλοϊδίνη (Alexa fluor phalloidin). Οι πυρήνες γίνονται ορατοί ύστερα από επώαση με το ειδικό φθορίζον αντιδραστήριο Hoechst No. 33342 για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος οι καλυπτρίδες επικολλώνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες (slides) με τη βοήθεια ειδικού διαλύματος (Gelvatol/DABCO) και τα κύτταρα παρατηρούνται σε συνεστιακό μικροσκόπιο (Leica Lasertechnik). Για την απόκτηση των φωτογραφιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα LAS AF.

### **2.3.3 Μέθοδοι μελέτης DNA, RNA**

#### **Απομόνωση DNA από τα κύτταρα**

Η απομόνωση DNA γίνεται με λύση των κυττάρων με τη χρήση ειδικού διαλύματος λύσης TE pH: 9 που περιέχει 1% SDS (10mM Tris, 1mM EDTA). Σε 1ml του διαλύματος αυτού προστίθενται 100μl πρωτεΐνάση K 10mg/ml και ακολουθεί επώαση για 5 ώρες στους 48°C υπό ήπια ανάδευση. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση (με vortex) για πλήρη λύση των κυττάρων και απελευθέρωση του DNA και ακολουθεί καθαρισμός αυτού με μίγμα φενόλη/χλωροφόρμιο. Μετά τον καθαρισμό γίνεται κατακρήμνιση του DNA με επώαση για 2 ώρες στους -20°C με οξικό νάτριο και αιθανόλη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4.000rpm για 10 λεπτά στους 4°C και το ίζημα πλένεται στη συνέχεια με 70% αιθανόλη 2 φορές και στεγνώνεται στον πάγο για 2 ώρες. Το ίζημα τελικά διαλύεται σε νερό και υπολογίζεται η συγκέντρωσή του

μελετώντας την απορρόφηση στα 260nm. Ο τύπος υπολογισμού της συγκέντρωσης είναι :  $C = A_{260} \times 50 \times \text{βαθμό διάλυσης}$

### **Έλεγχος αστάθειας μικροδορυφορικού DNA**

Τα κύτταρα που εξετάστηκαν για την παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας ήταν τα Caco-2 ως αρνητικός δείκτης (δεν έχουν μικροδορυφορική αστάθεια), οι κυτταρικές σειρές DLD-1 και HCT116 ως θετικοί δείκτες (έχουν μικροδορυφορική αστάθεια) και τα Caco-BR, τα οποία θέλαμε να εξετάσουμε. Ο έλεγχος έγινε εξετάζοντας 5 μονονουκλεοτιδικούς δείκτες μικροδορυφορικού DNA που χρησιμοποιούνται ευρέως για το σκοπό αυτό. Οι δείκτες είναι οι εξής: NR-21, NR-22, NR-24, BAT-25 και BAT-26<sup>87</sup>.

Συγκεκριμένα, ο ένας από τους 2 εκκινητές για κάθε δείκτη σημάνθηκε με κάποιο από τα φθορίζοντα μόρια FAM, TAMRA ή JOE (πίνακας εκκινητών) και κάθε μονονουκλεοτιδικός δείκτης ενισχύθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας DNA από τα υπό μελέτη κύτταρα. Τα προϊόντα της αντίδρασης καθαρίστηκαν με τη χρήση ειδικού kit (Gene Clean Turbo PCR Kit, QBiogene), ώστε να απαλλαγούν από την περίσσεια των αντιδραστηρίων, και στη συνέχεια το καθαρό πλέον ειδικό προϊόν στάλθηκε στην εταιρία MWG για ανάλυση της αλληλουχίας σε ειδική συσκευή ανάλυσης αλληλουχιών (ABI PRISM 3100 genetic analyzer).

### **Απομόνωση mRNA και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία *in vitro* ενζυμική σύνθεση τμημάτων DNA με τη βοήθεια 2 ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών που βρίσκονται

εκατέρωθεν της περιοχής του δίκλωνου DNA που πρόκειται να επιμηκυνθεί. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

### 1. Απομόνωση του RNA:

Η διαδικασία που ακολουθείται γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Invitrogen και είναι η εξής:

- Τα κύτταρα που βρίσκονται σε πλαστικά 6 θέσεων (πηγαδιών) πλένονται με PBS και συλλέγονται φιαλίδιο erpendorf με αναδιάλυση σε 300μl του αντιδραστηρίου TRIZOL, όπου επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προστίθενται 200μl χλωροφόρμιο, ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 12.000g για 15 λεπτά στους 4°C και προκύπτουν 2 φάσεις.
- Η ανώτερη φάση (περιέχει το RNA) μεταφέρεται σε άλλο φιαλίδιο και προστίθενται 150μl ισοπροπανόλης και γίνεται επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να γίνει κατακρήμνιση του RNA.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 12.000g για 10 λεπτά στους 4°C.
- Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα πλένεται 2 φορές με 75% αιθανόλη με φυγοκέντρηση σε 7.500g για 5 λεπτά στους 4°C.
- Αφαιρείται η αιθανόλη και το ίζημα του RNA αφήνεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου να στεγνώσει και αναδιαλύεται σε αποστειρωμένο νερό.
- Γίνεται επώαση του RNA στους 55-60°C για 10 λεπτά, ώστε να διευκολυνθεί η αναδιάλυση του και φωτομετρείται στα 260nm για τον υπολογισμό της συγκέντρωσής του. Ο τύπος υπολογισμού της συγκέντρωσης είναι :  $C = A_{260} \times 40 \times \text{βαθμό διάλυσης}$

2. Αντίστροφη μεταγραφή: Η αντίστροφη μεταγραφή και η σύνθεση του cDNA (complementary DNA) πραγματοποιείται ως εξής:

- Το RNA επωάζεται στους 50 °C για 2 λεπτά και στη συνέχεια μεταφέρονται στον πάγο για 5 λεπτά.
- Στη συνέχεια δημιουργείται το ακόλουθο μίγμα: 1 μl από oligo-deoxythymidine εκκινήτη (oligo-dT) (διάλυμα stock: 500 μg/ml), 1μl από μίγμα dNTPs (deoxynucleotide triphosphate), 3μg RNA και νερό το οποίο δεν περιέχει RNAάσες τόσο ώστε ο όγκος να φτάσει τα 12μl.
- Το μίγμα επωάζεται στους 65 °C για 5 λεπτά και στη συνέχεια μεταφέρεται στον πάγο για 8 λεπτά.
- Σε άλλο φιαλίδιο δημιουργείται το ακόλουθο μίγμα: 4 μl of First-Strand Buffer (5X), 2 μl DTT (0.1 M) και 1 μl RNaseOUT™ (40 U/μl), το οποίο προστίθεται στο φιαλίδιο με το RNA
- Γίνεται ανάμειξη και επώαση στους 42 °C για 2 λεπτά
- Προστίθεται 1 μl του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (SuperScript™ II RT) και ακολουθεί θέρμανση στους 42°C για 60 λεπτά και στη συνέχεια στους 70 °C για 15 λεπτά.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο και αραιώνονται με την προσθήκη νερού.

3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR): μετά την αντίστροφη μεταγραφή και τη σύνθεση των αντίστοιχων μορίων cDNA, ακολουθεί αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, αφού αναμειχθούν τα ακόλουθα συστατικά:

- 5 μl από το cDNA
- 3 μl από κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (10X)
- 2.5 μl MgCl<sub>2</sub>, (25 mM)
- 0.75 μl από μίγμα των dNTPs (10 mM)

- 1.5 μl από τον κάθε εκκινητή (Forward και Reverse) (20μM)
- 0.1μl από το ένζυμο *Taq* DNA πολυμεράση (5U/μl)
- κατάλληλο όγκο ddH<sub>2</sub>O ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 25μl
- ακολουθεί η αντίδραση σε ειδική συσκευή (MJ thermocycler PTC-200) και οι συνθήκες που επιλέγονται (κύκλοι και θερμοκρασίες) είναι συγκεκριμένες για τα ζευγάρια των εκκινητών.
- Μετά το τέλος της αντίδρασης τα προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης και παρατηρούνται με τη χρήση UV λάμπας.

### **Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης**

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι η κύρια τεχνική που χρησιμοποιείται στη βιοχημεία και τη μοριακή βιολογία για την ανάλυση των νουκλεϊκών σύμφωνα με το μέγεθός τους. Αυτό επιτυγχάνεται με το να μετακινούνται τα αρνητικά φορτισμένα μόρια RNA ή DNA μέσα σε ένα στρώμα αγαρόζης και με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, με αποτέλεσμα τα μικρότερα μόρια να μετακινούνται γρηγορότερα από τα μεγαλύτερα. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Δημιουργείται το πήκτωμα αγαρόζης η συγκέντρωση του οποίου ποικίλει συνήθως από 1% έως 2%, ανάλογα με το μέγεθος των υπό μελέτη μορίων. Το πήκτωμα παρασκευάζεται προσθέτοντας την κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης σε διάλυμα TBE 1x, καθώς και μικρή ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου προκειμένου να είναι δυνατή η παρατήρηση των σχηματισθέντων ζωνών με τη χρήση UV ακτινοβολίας. Το μίγμα αυτό τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου αφήνεται να πήξει και στη συνέχεια τα δείγματα, τα οποία έχουν αναμειχθεί με διάλυμα φόρτωσης, φορτώνονται στις ειδικές θέσεις του πηκτώματος και

ηλεκτροφορούνται από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου (~100Volt). Το πήκτωμα μεταφέρεται σε UV λάμπα και φωτογραφίζεται με τη χρήση ψηφιακής κάμερας. Τα επίπεδα της έντασης των ζωνών μετρώνται με τη βοήθεια του προγράμματος Molecular Dynamics ImageQuant Software (Amersham Biosciences). Όλα τα προϊόντα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που ηλεκτροφορούνται και στη συνέχεια ποσοτικοποιούνται έχουν ως γονίδιο αναφοράς την δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH).

### **Real Time – PCR**

Αυτή η παραλλαγή της PCR είναι η διαδικασία ενίσχυσης μιας DNA αλληλουχίας με τη μέθοδο της PCR και ταυτόχρονα της ανίχνευσης του παραγόμενου προϊόντος σε πραγματικό χρόνο καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ειδικό για PCR πλακίδιο με 96 θέσεις. Σε κάθε θέση προστίθενται τα ακόλουθα:

- 5μl cDNA
- 12.5μl κατάλληλου διαλύματος (iQ SYBR Green Supermix)
- 150nmol/L από τον κάθε εκκινητή (forward και reverse)
- όγκος H<sub>2</sub>O ώστε ο όγκος της αντίδρασης να είναι 25μl

Το πλακίδιο τοποθετείται σε ειδικό μηχάνημα (Bio-Rad iCycler) και γίνεται η ανάλυση. Το γονίδιο που χρησιμοποιείται ως σημείο αναφοράς για την ποσοτικοποίηση είναι ο GAPDH.

### Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων στα πειράματα ανάλυσης πρωτεϊνών κατά Western αλλά και mRNA με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, αναλύθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος ImageQuant. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων στα *in vitro* πειράματα κυτταρικής μετανάστευσης και διείσδυσης αναλύθηκαν επίσης με το πρόγραμμα Excel και οι διαφορές αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας το Student's *t*-test. Τιμές με  $P < 0.05$  θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.



## *ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ*

Η μελέτη χωρίζεται και παρουσιάζεται σε δύο τμήματα. Στο πρώτο τμήμα, 3.1, αναλύονται τα νέα συστήματα μελέτης των ογκογονιδίων *KRAS*<sup>G12V</sup> και *BRAF*<sup>V600E</sup>. Στο δεύτερο τμήμα, 3.2, παρουσιάζονται η διαφορετική επίδραση των ογκογονιδίων *KRAS*<sup>G12V</sup>, *BRAF*<sup>V600E</sup> και *HRAS*<sup>G12V</sup> (EMT) στον κυτταροσκελετό και η συγκριτική μελέτη των ογκογονιδίων στη ρύθμιση ιδιοτήτων κυτταρικής μετανάστευσης μέσω μελών της οικογένειας των μικρών GTPασών Rho.

## ΜΕΡΟΣ 'Α

### 3.1 Δημιουργία και χαρακτηρισμός κυτταρικών συστημάτων έκφρασης των ογκογονιδίων *BRAF*<sup>V600E</sup> και *KRAS*<sup>G12V</sup>

Σε αυτό το τμήμα της μελέτης, 3.1, παρουσιάζεται η δημιουργία κυτταρικών συστημάτων έκφρασης των ογκογονιδίων *BRAF* και *KRAS* και ο χαρακτηρισμός των ιδιοτήτων τους σχετικά με το κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κυτταρικό κύκλο, διαφορική ρύθμιση κυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης, δημιουργία όγκων *in vivo*, κυτταρικής γήρανσης και μικροδορυφορικής αστάθειας<sup>88</sup>.

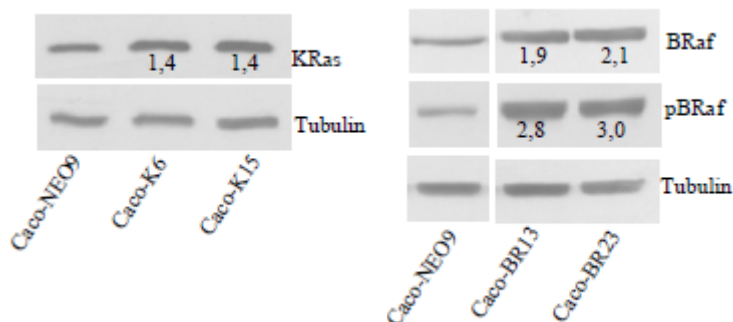
#### 3.1.1 Δημιουργία και επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων που εκφράζουν τις ογκοπρωτεΐνες *BRAF*<sup>V600E</sup> και *KRAS*<sup>G12V</sup>

Οι συγκεντρώσεις των πλασμιδίων (pH8-*BRAF*<sup>V600E</sup> [10ng], pcDNA3-*KRAS*<sup>G12V</sup> [15ng] και pcDNA3 [10ng]) επιλέχθηκαν έτσι ώστε να παρέχουν μια ικανοποιητική έκφραση των ογκοπρωτεϊνών *BRAF*<sup>V600E</sup> και *KRAS*<sup>G12V</sup> στα Caco-2 κύτταρα, που επιμολύνθηκαν. Μετά από επώαση των κυττάρων με γενετισίνη, επιλέχθηκαν οι «επιτυχείς» κλώνοι, οι οποίοι στη συνέχεια ελέγχθηκαν για την έκφραση της αντίστοιχης ογκοπρωτεΐνης με τη χρήση της μεθόδου ανοσοαποτύπωμα κατά Western (Σχήμα 1).



**Σχήμα 1.** Ανάλυση των κυτταρικών κλώνων που προέκυψαν ύστερα από επιμόλυνση με τα πλασμίδια pH8-*BRAF*<sup>V600E</sup> (αριστερά) και pcDNA3-*KRAS*<sup>G12V</sup> (δεξιά). Ανοσοστύπωμα κατά Western επιβεβαιώνει την επιτυχή επιμόλυνση των κυττάρων δείχνοντας αυξημένα επίπεδα των αντίστοιχων ογκοπρωτεϊνών.

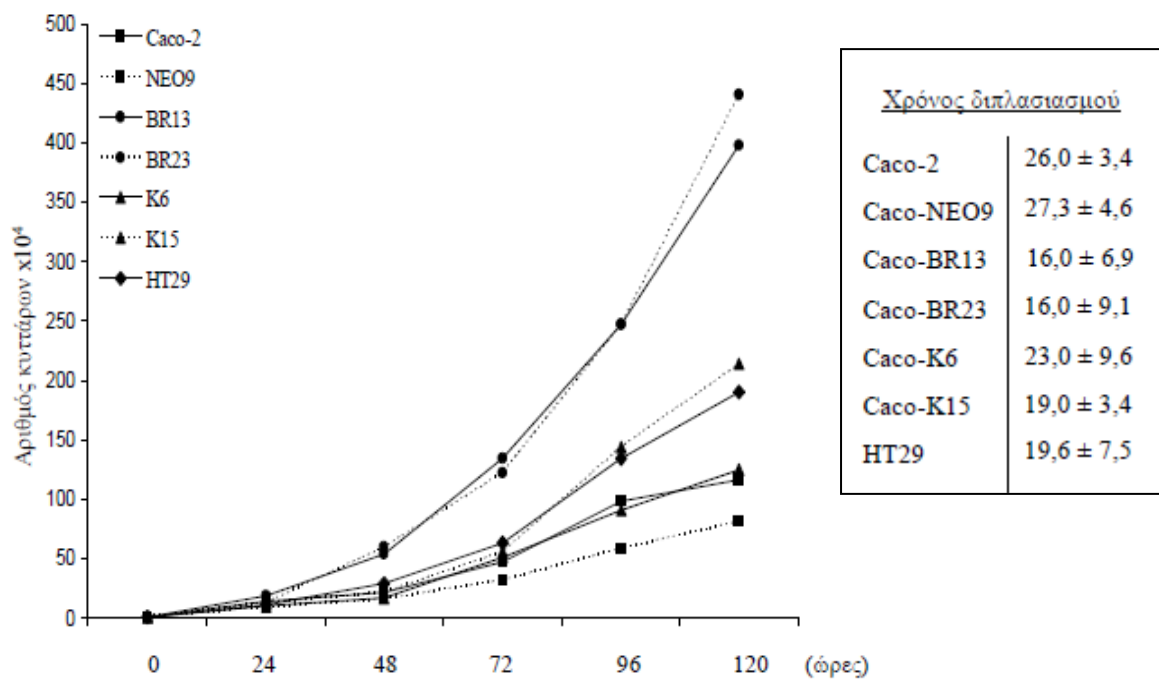
Πρέπει να σημειωθεί ότι ο κλώνος Caco-K15 είχε δημιουργηθεί από τον Michael Roberts <sup>82</sup> και χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας για την περίπτωση των μετασχηματισμένων με το *KRAS*<sup>G12V</sup> ογκογονίδιο. Η ονοματολογία των κυττάρων που προέκυψε για τα κύτταρα που επιμολύνθηκαν είναι η εξής: Caco-BR# για το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup>, Caco-K# για το ογκογονίδιο *KRAS*<sup>G12V</sup> και Caco-NEO# για το πλασμίδιο-μάρτυρα pcDNA3 (όπου #: ο αριθμός που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο κυτταρικό κλώνο). Μετά από τον έλεγχο αυτό επιλέχθηκαν για περαιτέρω πειράματα 2 κυτταρικοί κλώνοι για την κάθε περίπτωση, με βάση τα σχετικά χαμηλά επίπεδα έκφρασης των εξωγενώς υπερεκφρασμένων ογκοπρωτεϊνών *BRAF*<sup>V600E</sup> και *KRAS*<sup>G12V</sup>. Αν και απομονώθηκαν κλώνοι με διάφορα επίπεδα έκφρασης των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών, αποφύγαμε την περαιτέρω ανάλυση των κλώνων που εκφράζουν πολύ υψηλά ή πολύ χαμηλά επίπεδα (έναντι των μαρτύρων). Οι κλώνοι που επιλέχθηκαν για τη μελέτη του ογκογονιδίου *KRAS*<sup>G12V</sup> είναι ο Caco-K6 και ο ήδη υπάρχων Caco-K15 <sup>82</sup> ενώ για το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup>, οι Caco-BR13 και Caco-BR23 (Σχήμα 2).



**Σχήμα 2:** Caco-KRAS<sup>G12V</sup> και Caco-BRAF<sup>V600E</sup>- μετασχηματισμένα κύτταρα που επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη, σύμφωνα με τα επίπεδα έκφρασης των αντίστοιχων ογκοπρωτεϊνών.

### 3.1.2 Το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup> ενισχύει το ρυθμό πολλαπλασιασμού των Caco-2 κυττάρων και οδηγεί στο μετασχηματισμό τους αποτελεσματικότερα από ότι το *KRAS*<sup>G12V</sup>.

Μελέτη του ρυθμού αύξησης έδειξε ότι τα κύτταρα που επιμολύνθηκαν και με τα δύο ογκογονίδια (*KRAS*<sup>G12V</sup> and *BRAF*<sup>V600E</sup>) παρουσιάζουν αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού συγκριτικά με τα Caco-2 κύτταρα από τα οποία προήλθαν (Σχήμα 3). Όπως φαίνεται στο σχήμα 3, τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup> πολλαπλασιάζονται πολύ πιο γρήγορα και εμφανίζουν αρκετά μικρότερο χρόνο διπλασιασμού. Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε και η κυτταρική σειρά HT29 η οποία φέρει ενδογενή μετάλλαξη *BRAF*<sup>V600E</sup> προκειμένου να συγκριθεί με τα Caco-BR κύτταρα και δείχνουμε ότι ο χρόνος διπλασιασμού των *BRAF*<sup>V600E</sup> - μετασχηματισμένων κυττάρων είναι παρόμοιος με εκείνον των κυττάρων HT29.



**Σχήμα 3.** Ρυθμός αύξησης των Caco-2, Caco-NEO9, Caco-BR13, Caco-BR23, Caco-K6, Caco-K15 και HT29 κυττάρων. Στον πίνακα δεξιά παρουσιάζεται ο χρόνος διπλασιασμού (ώρες) για την κάθε κυτταρική σειρά. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο από 3 διαφορετικά πειράματα.

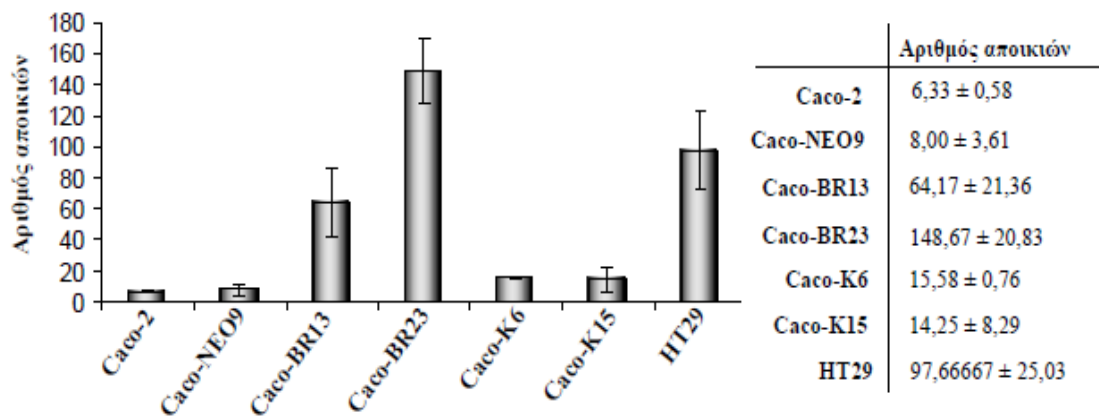
Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι καρκινικές ιδιότητες των μετασχηματισμένων με τα ογκογονίδια κυττάρων τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*. Η δυνατότητα των Caco-BR και Caco-K κυττάρων να προκαλούν όγκους σε άθυμα ποντίκια (SCID mice) εξετάστηκε και όπως φαίνεται στον πίνακα 1, τα Caco-BR κύτταρα οδήγησαν, σε σημαντικά λιγότερο χρόνο, στο σχηματισμό περισσότερων και μεγαλύτερων όγκων από ότι τα Caco-K, ενώ τα πατρικά κύτταρα Caco-2 καθώς και τα κύτταρα που επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο-μάρτυρα, Caco-NEO9, δεν οδήγησαν στο σχηματισμό όγκων για το διάστημα των 5 μηνών που διήρκεσε το πείραμα. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν επίσης οι κυτταρικές σειρές HT29 και DLD-1 προκειμένου να συγκριθούν με τα αντίστοιχα μετασχηματισμένα κύτταρα (Caco-BR, Caco-K). Όπως φαίνεται στον πίνακα, τα HT29 κύτταρα οδήγησαν σε σχηματισμό όγκων στο ίδιο χρονικό διάστημα με τα Caco-BR και επιπλέον είχαν παρόμοιο μέγεθος, γεγονός που υποδηλώνει πως το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup>

			<i>BRAF<sup>V600E</sup></i>		<i>KRAS<sup>G12V</sup></i>		Κυτταρικές σειρές ΚΠΕ	
	Caco-2	Caco-NEO9	Caco-BR13	Caco-BR23	Caco-K6	Caco-K15	HT29	DLD-1
Σχηματισμός όγκου (μέρες)	MA	MA	11.5±2.1	10±0.01	140±0.01	40±14	11.3±1.5	24±0.03
Αριθμός σχηματιζόμενων όγκων	-	-	14/14	14/14	2/10	3/10	16/16	4/4
Μέγεθος όγκου (cm)	-	-	1.17±0.32	1.31±0.50	0.28±0.04	0.8±0.02	1.37±0.40	1.27±0.77
Μάζα όγκου (g)	-	-	0.38±0.20	0.36±0.21	0.23±0.19	0.3±0.03	0.51±0.50	1.70±0.24

**Πίνακας 1.** Η ικανότητα σχηματισμού όγκων των Caco-BR και Caco-K κυττάρων καθώς και κυτταρικών σειρών ΚΠΕ αξιολογήθηκε σε άθυμα ποντίκια (SCID mice) για μία περίοδο 5 μηνών ύστερα από έγχυση των αντίστοιχων κυττάρων. Ο αριθμός όγκων αντιπροσωπεύει τον αριθμό των εγχύσεων που οδήγησαν σε δημιουργία όγκου για την κάθε κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε. Το μέγεθος όγκου (εκατοστόμετρα) και το βάρος (γραμμάρια) περιγράφουν τους απομονωμένους όγκους 2 εβδομάδες μετά από την εμφάνισή τους. Για το πείραμα, δύο ή τρία θηλυκά ποντίκια ηλικίας 5 εβδομάδων χρησιμοποιήθηκαν ανά κυτταρική σειρά. Οι μετρήσεις αποτελούν μέσο όρο τριών μεμονωμένων πειραμάτων που έγιναν εις διπλούν ή εις τριπλούν. MA: Μη Ανιχνεύσιμο

*in vivo* καρκινικές ιδιότητες στα Caco-2 κύτταρα. Στην περίπτωση των DLD-1 κυττάρων ο χρόνος εμφάνισης αλλά και το μέγεθος των όγκων ήταν αρκετά διαφορετικός συγκριτικά με τα Caco-K κύτταρα και συγκεκριμένα τα DLD-1 παρουσιάζονται πιο «επιθετικά» αφού δημιούργησαν μεγαλύτερους όγκους και σε μικρότερο χρονικό διάστημα. Μία εξήγηση για αυτό το αποτέλεσμα είναι ίσως το γεγονός ότι τα DLD-1 έχουν διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο μεταλλάξεων (KRAS: G13D+/-, p53: C241T, APC: 1417, PI3KCA: E545K+/-) συγκριτικά με τα Caco-2 (p53: G204T, APC: G1367 stop APC1, β-catenin: G245C+/-, SMAD4: D351H) εκ των οποίων προέκυψαν οι Caco-K κλώνοι, με αποτέλεσμα να έχουν και διαφορετικές ιδιότητες. Επίσης, τα DLD-1 κύτταρα φέρουν τη μετάλλαξη G13D και όχι την G12V, όπως τα Caco-K. Τα κύτταρα Caco-K δεν δείχνουν αυξημένες καρκινικές ιδιότητες *in vivo*, διότι δεν έχουν σημαντικά αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, που οφείλεται μερικώς σε ιδιότητες κυτταρικής γήρανσης, όπως θα παρουσιαστεί στο τμήμα 3.1.4 της μελέτης.

Στην *in vitro* μελέτη (δημιουργία αποικιών σε μαλακό άγαρ), και τα δύο ογκογονίδια ( $BRAF^{V600E}$  και  $KRAS^{G12V}$ ) αύξησαν σημαντικά την ικανότητα των Caco-2 κυττάρων να αναπτύσσονται σε μαλακό άγαρ (Σχήμα 4). Αυτό σημαίνει πως τα κύτταρα αυτά δεν έχουν ανάγκη την ύπαρξη στερεού υποστρώματος για να αναπτυχθούν, ιδιότητα που χαρακτηρίζει τα καρκινικά κύτταρα. Τα Caco-BR κύτταρα ήταν πιο αποτελεσματικά από ότι τα Caco-K, αφού δημιούργησαν περισσότερες και μεγαλύτερες αποικίες. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ιδιότητα των  $BRAF^{V600E}$ -μετασηματισμένων κυττάρων (Caco-BR) να αναπτύσσονται σε μη στερεή επιφάνεια είναι παρόμοια με εκείνη των HT29, τα οποία όπως έχει ήδη αναφερθεί φέρουν την ίδια μετάλλαξη για το  $BRAF$  γονίδιο.



**Σχήμα 4.** Ικανότητα δημιουργίας αποικιών ύστερα από 2 εβδομάδες καλλιέργειας σε μαλακό άγαρ για τα μετασηματισμένα Caco-2 κύτταρα καθώς και για την κυτταρική σειρά HT29. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο από 2 ανεξάρτητα πειράματα, που έγιναν εις τριπλούν.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, το ογκογονίδιο  $BRAF^{V600E}$  μετασηματίζει πιο αποτελεσματικά τα Caco-2 κύτταρα σε σύγκριση με το  $KRAS^{G12V}$ , προσδίδοντάς τους καρκινικές ιδιότητες τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*.



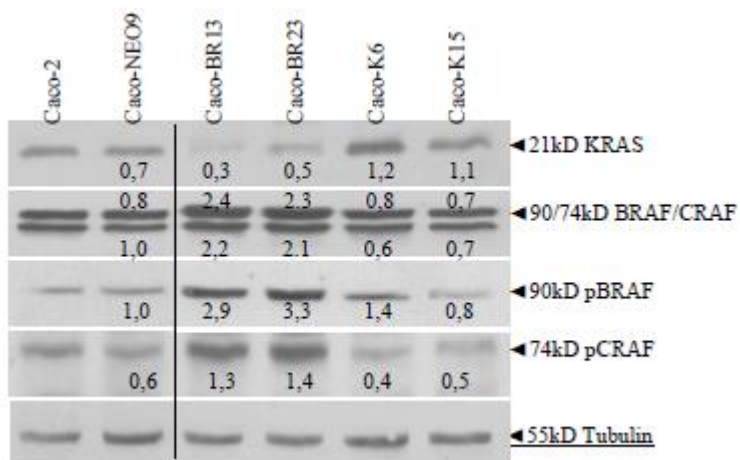
### 3.1.3 Μονοπάτια μεταγωγής σήματος από τις ογκοπρωτεΐνες BRAF<sup>V600E</sup> και KRAS<sup>G12V</sup>

Προκειμένου να διαπιστωθεί ποια μονοπάτια μεταγωγής σήματος ενεργοποιούνται στην κάθε περίπτωση ογκογονιδίου, ελέγχθησαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western η φωσφορυλιωμένη και άρα η ενεργή μορφή των κινασών MEK και ERK του μονοπατιού μεταγωγής σημάτων MEK-ERK, της AKT του μονοπατιού PI3K και της JNK για το stress μονοπάτι.

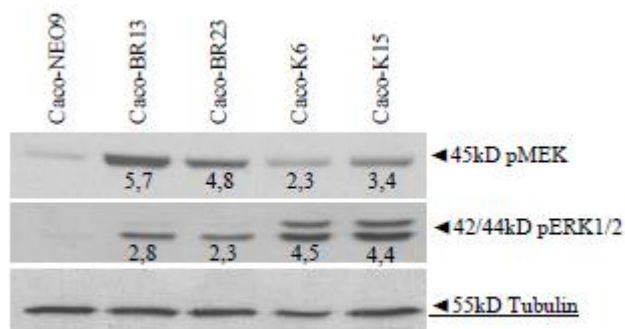
Στο σχήμα 5A είναι εμφανές ότι οι κινάσες BRAF και CRAF είναι ιδιαίτερα ενεργοποιημένες στα BRAF<sup>V600E</sup>-μετασχηματισμένα (Caco-BR) κύτταρα, αλλά ανάλυση του μονοπατιού RAS-RAF-MEK-ERK έδειξε ότι το ογκογονίδιο KRAS<sup>G12V</sup> ενεργοποιεί την ERK πιο αποτελεσματικά από ότι στην περίπτωση του BRAF<sup>V600E</sup> (Σχήμα 5B). Αξίζει να σημειωθεί ότι στα Caco-BR κύτταρα είναι ιδιαίτερα αισθητή η ενεργοποίηση της ERK2 (χαμηλότερη ζώνη) ενώ στα Caco-K κύτταρα είναι ενεργοποιημένες και οι δύο ισομορφές της ERK (ERK1 και ERK2). Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει με την ERK1/2, ο ενεργοποιητής της, MEK, είναι περισσότερο ενεργοποιημένος στα Caco-BR κύτταρα (σχήμα 5B). Προκειμένου να ερμηνευθεί η διαφορετική ενεργοποίηση της ERK από τα δύο ογκογονίδια, αναλύθηκαν μόρια που ρυθμίζουν την ενεργοποίησή της. Διαπιστώθηκε ότι στα Caco-BR κύτταρα (και όχι στα Caco-K) η έκφραση της πρωτεΐνης KSR σε επίπεδο mRNA (Kinase Suppressor of RAS), ένας θετικός ρυθμιστής της ERK, ήταν σημαντικά μειωμένη (σχήμα 5Γ).

Σχήμα 5

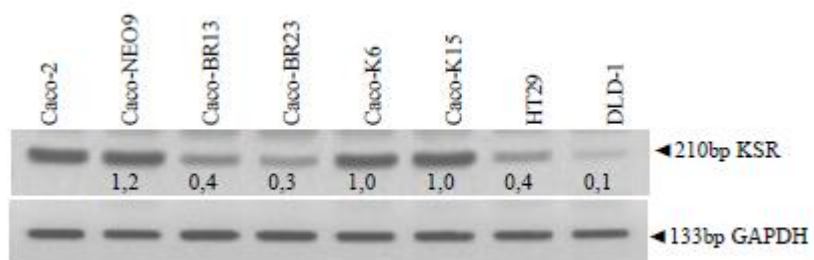
(A)

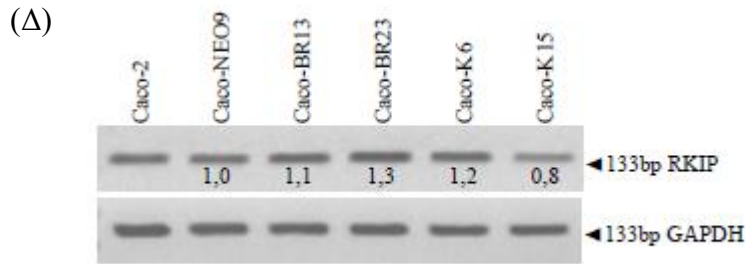


(B)



(Γ)



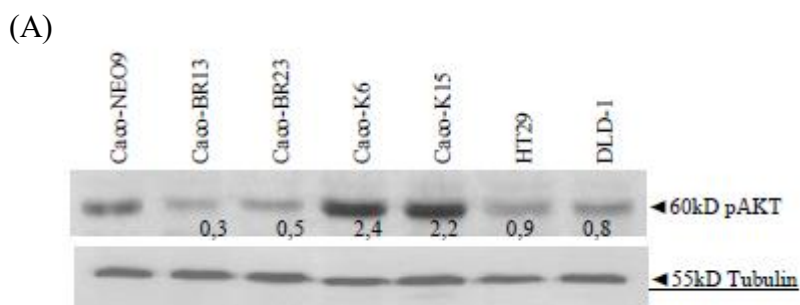


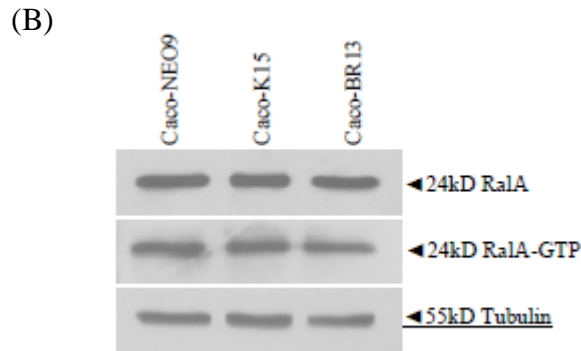
**Σχήμα 5.** Το MAPK μονοπάτι είναι ενεργοποιημένο στα Caco-BR και Caco-K κύτταρα. (Α) Ανάλυση έκφρασης των KRAS/RAF πρωτεϊνών και βιοχημική ανίχνευση των ενεργών RAF. (Β) Ενεργοποίηση των κινασών MEK/ERK από τις ογκοπρωτεΐνες KRAS<sup>G12V</sup> και BRAF<sup>V600E</sup>, (Γ) έκφραση του KSR σε επίπεδο mRNA και (Δ) RT-PCR ανάλυση των επιπέδων mRNA για το γονίδιο RKIP, τον αρνητικό ρυθμιστή της pERK. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Από την άλλη, καμία σημαντική αλλαγή δεν παρατηρήθηκε στο γονίδιο RKIP (RAF-1 Kinase Inhibitory Protein) υποδηλώνοντας τη μη συμμετοχή του μορίου αυτού στο συγκεκριμένο μονοπάτι (σχήμα 5Δ). Επομένως, η περιορισμένη διαθεσιμότητα της KSR στο σύστημα BRAF<sup>V600E</sup> μπορεί να είναι υπεύθυνη για τη μέτρια αύξηση στην ενεργοποίηση της ERK, ανεξάρτητα από την αυξημένη BRAF-MEK ενεργότητα.

Ανάλυση άλλων μονοπατιών μεταγωγής σήματος που επηρεάζονται από την πρωτεΐνη RAS έδειξε ότι το μονοπάτι επιβίωσης PI3K ήταν σημαντικά ενεργό στα Caco-K κύτταρα, ενώ ήταν αρνητικά ρυθμισμένο στα Caco-BR κύτταρα (σχήμα 6Α). Στο σχήμα 6Α προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης AKT,

### Σχήμα 6

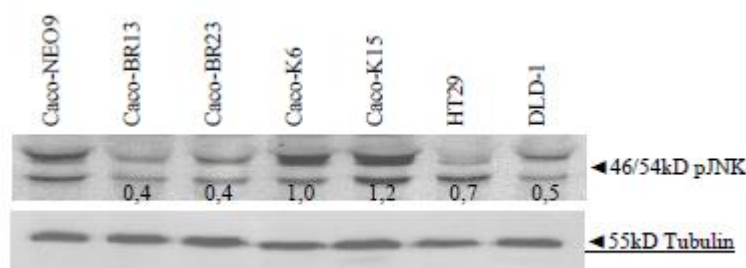




**Σχήμα 6.** Ανάλυση των μονοπατιών-τελεστών της πρωτεΐνης RAS. (A) Το PI3K μονοπάτι είναι ενεργοποιημένο στα Caco-K κύτταρα και υπορυθμισμένο στα Caco-BR. (B) Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ral δεν επηρεάζεται από τα ογκογονίδια  $BRAF^{V600E}$  και  $KRAS^{G12V}$ .

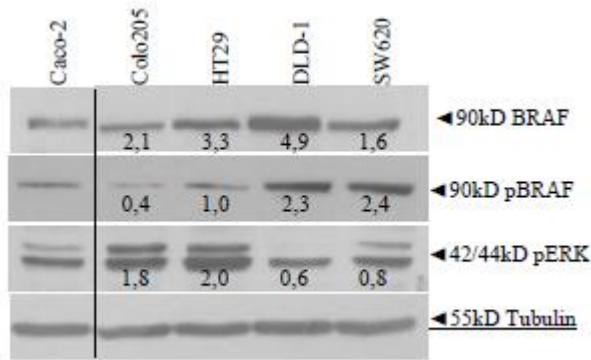
ως ένδειξη της ενεργοποίησης της PI3K κινάσης. Η πρωτεΐνη PI3K εμπλέκεται στη ρύθμιση κυτταρικών λειτουργιών, όπως αναστολή της απόπτωσης, αύξηση της κινητικότητας του κυττάρου και μετάσταση, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή της στη διαδικασία της καρκινογένεσης<sup>89</sup>. Ένας τρόπος για να εξετασθεί εάν το μονοπάτι αυτό είναι ενεργό είναι μέσω φωσφορυλίωσης της κινάσης AKT (PKB, πρωτεϊνική κινάση B), που αποτελεί ίσως τον πιο καλά χαρακτηρισμένο τελεστή της κινάσης PI3K. Στη συνέχεια εξετάστηκε το Ral μονοπάτι, αφού αποτελεί έναν από τους κύριους τελεστές της πρωτεΐνης RAS. Η πρωτεΐνη Ral είναι μια G πρωτεΐνη, δηλαδή όταν ενεργοποιείται αποδεσμεύει GDP και δεσμεύει GTP. Για το λόγο αυτό η ενεργοποίησή της ελέγχθηκε με την τεχνική συγκαθίζησης με GST (GST-pull down) όπου τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων επώαστηκαν με GST-Ral Binding Protein (GST-RalBP) με αποτέλεσμα να ανιχνεύεται μόνο η ενεργή μορφή της Ral (Ral-GTP). Όπως φαίνεται στο σχήμα 6B η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ral δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τα 2 ογκογονίδια,  $BRAF^{V600E}$  και  $KRAS^{G12V}$ , γεγονός που σημαίνει πως το μονοπάτι αυτό δεν εμπλέκεται σε καμία από τις δύο περιπτώσεις

ογκογονικού μετασχηματισμού. Τέλος, εξετάστηκε το μονοπάτι της JNK (Jun amino-terminal kinase) κινάσης (stress pathway), διότι έχει δειχθεί ότι στο ανθρώπινο μελάνωμα το μονοπάτι αυτό ρυθμίζεται θετικά από την ERK <sup>90</sup>. Ο έλεγχος έγινε ανιχνεύοντας τη φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης JNK (pThr<sup>183/185</sup> SAPK/JNK) και βρέθηκε ότι το μονοπάτι αυτό είναι αρνητικά ρυθμισμένο στα Caco-BR κύτταρα (σχήμα 7).



**Σχήμα 7.** Το JNK μονοπάτι ρυθμίζεται αρνητικά στα Caco-BR κύτταρα.

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών (MAPK) ελέγχθηκε επίσης στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου HT29 και Colo205 που φέρουν τη μετάλλαξη V600E για το γονίδιο *BRAF*, καθώς και στις DLD-1 και SW620 που φέρουν τις μεταλλάξεις G13D και G12V αντίστοιχα για το γονίδιο *KRAS*. Η ανάλυση αποκάλυψε ότι τα επίπεδα της pBRAF ήταν υψηλότερα στα *KRAS*-μεταλλαγμένα κύτταρα (DLD-1, SW620), αλλά η p-ERK ήταν περισσότερο ενεργοποιημένη στα *BRAF*-μεταλλαγμένα κύτταρα (HT29, Colo205 (σχήμα 8).



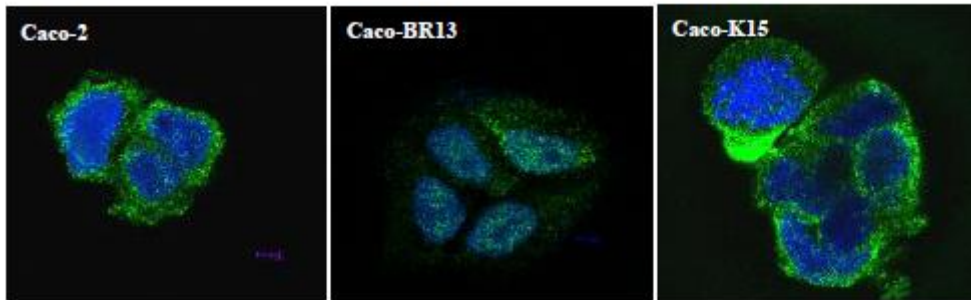
**Σχήμα 8.** Βιοχημική ανίχνευση της ενεργοποιημένης BRAF και της ERK σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου.

Για να ερευνηθεί περαιτέρω η σηματοδότηση από την ERK, αναλύθηκε ο εντοπισμός της φωσφορυλιωμένης (ενεργής) μορφής με συνεστιακή μικροσκοπία και βρέθηκε ότι στα Caco-BR κύτταρα η pERK εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα, ενώ στα Caco-K κύτταρα βρέθηκε κυρίως στο κυτταρόπλασμα (σχήμα 9A). Το γεγονός αυτό ίσως σημαίνει ότι στα Caco-BR κύτταρα η επίδραση της pERK είναι πιο αποτελεσματική από ότι στα Caco-K, καθώς είναι γνωστό πως η ενεργοποιημένη ERK μετατοπίζεται στον πυρήνα προκειμένου να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων-στόχων (π.χ. κυκλίνη D1) και τον κυτταρικό κύκλο <sup>91</sup>.

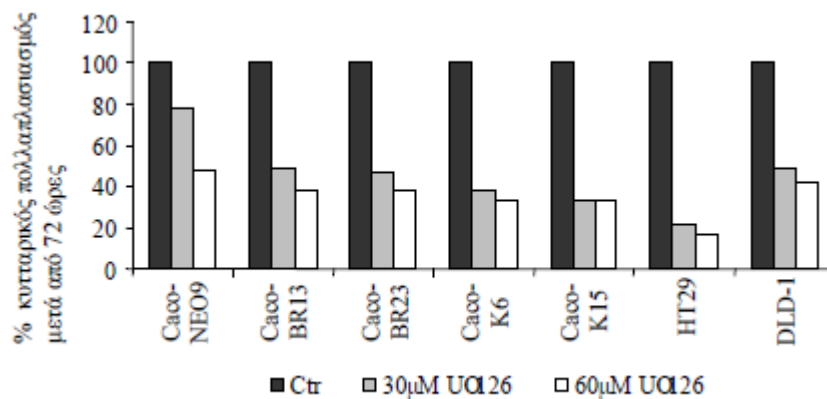
Φαρμακολογική παρεμπόδιση της ενεργοποιημένης ERK, που προκλήθηκε από τα ογκογονίδια *BRAF<sup>V600E</sup>* και *KRAS<sup>G12V</sup>* επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας τον ειδικό για τη MEK αναστολέα UO126. Παρουσία του αναστολέα ο πολλαπλασιασμός τόσο των Caco-BR όσο και των Caco-K κυττάρων μειώθηκε σημαντικά σε ποσοστό 50-60% αντίστοιχα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν με τη χρήση της μεθόδου MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (σχήμα 9Γ). Ο αναστολέας της MEK εμπόδισε το κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της μείωσης των επιπέδων της pERK μέσα σε μια ώρα και έδειξε ότι η κυκλίνη D1 είναι στόχος του ογκογονιδίου *KRAS<sup>G12V</sup>*. Εντούτοις, ο UO126 φάνηκε ανεπαρκής ώστε να μειώσει την έκφραση της κυκλίνης D1 στα Caco-BR κύτταρα, στα οποία η

pERK εμφανίστηκε να έχει μια δυναμική απόκριση στον αναστολέα, καθώς ανακτά γρήγορα τα αρχικά επίπεδά της (σχήμα 3Γ).

(A)



(B)



(Γ)



**Σχήμα 9.** Εντοπισμός της ERK και φαρμακολογική αναστολή του MAPK μονοπατιού. (A) Πυρηνικός εντοπισμός της pERK στα Caco-2, Caco-BR13 και Caco-K15 κύτταρα. Αντιπροσωπευτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας, όπου οι πυρήνες εμφανίζονται μπλε με τη χρήση της χρωστικής Hoechst και η pERK με πράσινο χρώμα, με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος. Μεγέθυνση 63x. (B) Φαρμακολογική παρεμπόδιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μετά από χρήση του αναστολέα της MEK, UO126, σε συγκεντρώσεις 30 και 60 μM για 72 ώρες και ανάλυση με τη μέθοδο MTT στα Caco-BR και

Caco-K κύτταρα. Ο αναστολέας αντικαθίσταται κάθε 24 ώρες και τα αποτελέσματα, που έγιναν εις τριπλούν, ομαλοποιήθηκαν με τον αρνητικό μάρτυρα. (Γ) Προσδιορισμός της ανασταλτικής επίδρασης 60μM του αναστολέα UO126 στα επίπεδα της pERK και της κυκλίνης D1 (σε πρωτεϊνικό επίπεδο) για διάφορα χρονικά διαστήματα. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

### 3.1.4 Το ογκογονίδιο *KRAS<sup>G12V</sup>* οδήγησε στην εμφάνιση χαρακτηριστικών κυτταρικής γήρανσης (senescence) στα Caco-2 κύτταρα

Η έκφραση του ογκογονιδίου *KRAS<sup>G12V</sup>* αλλά όχι του *BRAF<sup>V600E</sup>* στα Caco-2 κύτταρα οδήγησε στην απόκτηση δεικτών σχετικών με την πρόωρη κυτταρική γήρανση (premature senescence). Για τη μελέτη της κυτταρικής γήρανσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανίχνευσης της λυσοσωμικής ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης SA-β-Gal assay), καθώς έχει γίνει ευρέως αποδεκτή ως σημαντικός δείκτης για την κυτταρική γήρανση. Φυσιολογικά, τα κύτταρα εμφανίζουν λυσοσωμική ενεργότητα β-γαλακτοσιδάσης σε pH 4.0, ενώ τα κύτταρα που βρίσκονται σε φάση γήρανσης εμφανίζουν λυσοσωμική ενεργότητα β-γαλακτοσιδάσης σε pH 6.0 με αποτέλεσμα τα κύτταρα να εμφανίζουν μπλε χρώση σε αυτές τις συνθήκες pH<sup>92</sup>. Όπως φαίνεται στο σχήμα 10A τα Caco-K6 και Caco-K15 κύτταρα εμφανίζουν το χαρακτηριστικό για την κυτταρική γήρανση μπλε χρώμα, το οποίο είναι συγκρίσιμο με το θετικό μάρτυρα για το πείραμα αυτό (γερασμένοι ανθρώπινοι εμβρυϊκοί ινοβλάστες πνεύμονα, HFL). Στην περίπτωση των Caco-BR κυττάρων καθώς και των κυτταρικών σειρών (HT29 και DLD-1) δεν εμφανίζεται μπλε χρώση, που σημαίνει πως είναι αρνητικά ως προς την εμφάνιση κυτταρικής γήρανσης, ενώ η χρώση που εμφανίζεται στα Caco-2 και Caco-NEO9 κύτταρα δε θεωρείται δείκτης κυτταρικής γήρανσης αφού δεν είναι συγκρίσιμη με το θετικό μάρτυρα. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα αυτό, εξετάστηκε επίσης ο αριθμός των PML σωματιδίων (Promyelocytic Leukemia bodies) με τη χρήση



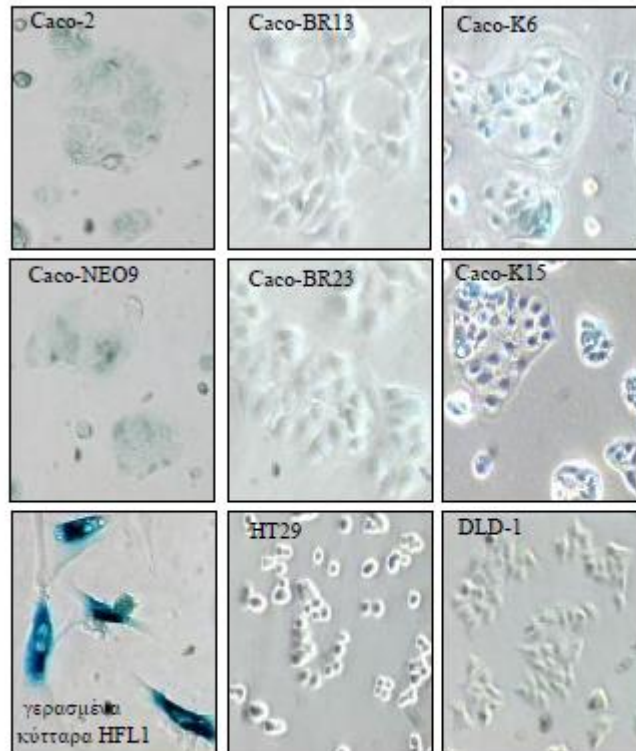
συνεστιακής μικροσκοπίας, καθώς έχουν συνδεθεί στο παρελθόν με την RAS-επαγόμενη κυτταρική γήρανση<sup>93</sup>. Στο σχήμα 10B είναι εμφανές ότι τα κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με το ογκογονίδιο *KRAS*<sup>G12V</sup> έχουν αυξημένο αριθμό PML σωματιδίων, ενισχύοντας έτσι το προηγούμενο αποτέλεσμα. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα Caco-K κύτταρα αν και εμφάνισαν χαρακτηριστικά κυτταρικής γήρανσης δε σταμάτησαν να πολλαπλασιάζονται, όπως έχει ήδη δειχθεί στο σχήμα 3. Για να εξακριβωθεί εάν τα χαρακτηριστικά κυτταρικής γήρανσης οφείλονται στο MAPK μονοπάτι, χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας της MEK, UO126. Αναστολή του μονοπατιού για 48 ώρες στα Caco-K κύτταρα οδήγησε στην αναστολή της κυτταρικής γήρανσης (σχήμα 10Γ), γεγονός που υποδεικνύει τη συμμετοχή της pERK στο φαινόμενο.

Παράλληλα, μελετήθηκε η κυτταρική αύξηση ύστερα από αφαίρεση των αυξητικών παραγόντων (αφαίρεση του ορού) από το θρεπτικό μέσο των κυττάρων για 3-5 μέρες. Μικροσκοπική παρατήρηση έδειξε ότι τα Caco-K κύτταρα οδηγήθηκαν σε αποπτωτικό θάνατο, όταν τα Caco-2 και τα Caco-BR κύτταρα συνέχισαν να πολλαπλασιάζονται (σχήμα 10Δ). Αυτό είναι ενδιαφέρον, λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι τα Caco-2 κύτταρα μετά από το μετασχηματισμό τους με το ογκογονίδιο *KRAS*<sup>G12V</sup>, απέκτησαν χαρακτηριστικά κυτταρικής γήρανσης. Συγχρόνως η βιωσιμότητά τους εξαρτάται από αυξητικούς παράγοντες. Στο σχήμα 10E είναι εμφανείς οι αποπτωτικοί πυρήνες των νεκρών Caco-K κυττάρων με χρώση Hoechst υπό την απουσία αυξητικών παραγόντων στο υλικό ανάπτυξης. Παράλληλα δείξαμε ότι τα πατρικά κύτταρα Caco-2 δεν πεθαίνουν υπο τη απουσία αυξητικών παραγόντων (σχήμα 10Δ). Συνεπώς το ογκογονίδιο *KRAS* προκαλεί ιδιότητες κυτταρικής γήρανσης στα κύτταρα Caco-2 υπό την παρουσία ορού, αλλά απουσία αυξητικών παραγόντων προκαλεί κυτταρικό θάνατο στα ίδια κύτταρα.

Τα πειράματα αυτά παρουσιάζουν τη διαφορά των δύο ογκογονιδίων ( $BRAF^{V600E}$  και  $KRAS^{G12V}$ ) στην ικανότητα να επάγουν σημάδια κυτταρικής γήρανσης, γεγονός που πιθανώς επηρεάζει εντυπωσιακά τη βιωσιμότητα των κυττάρων ελλείψει αυξητικών παραγόντων.

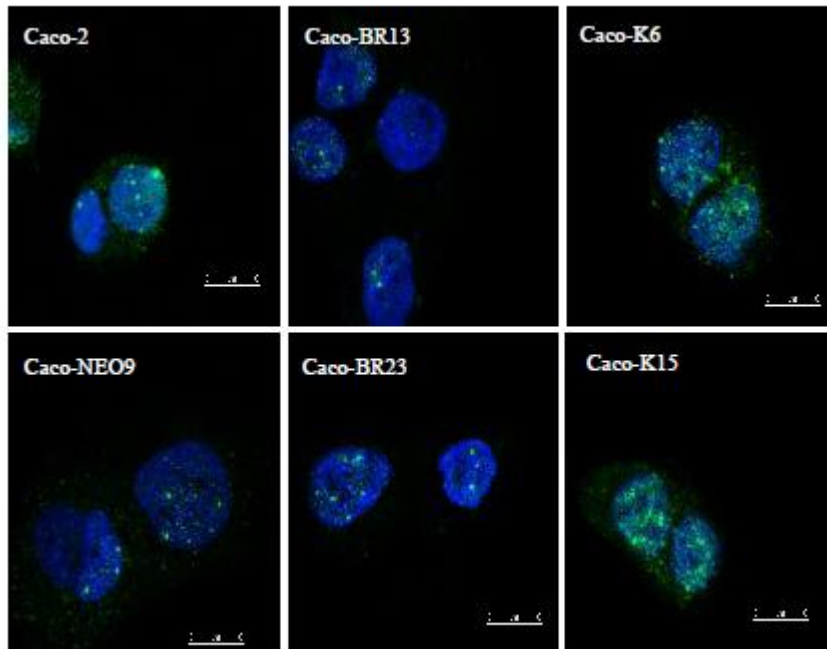
**Σχήμα 10**

(A)

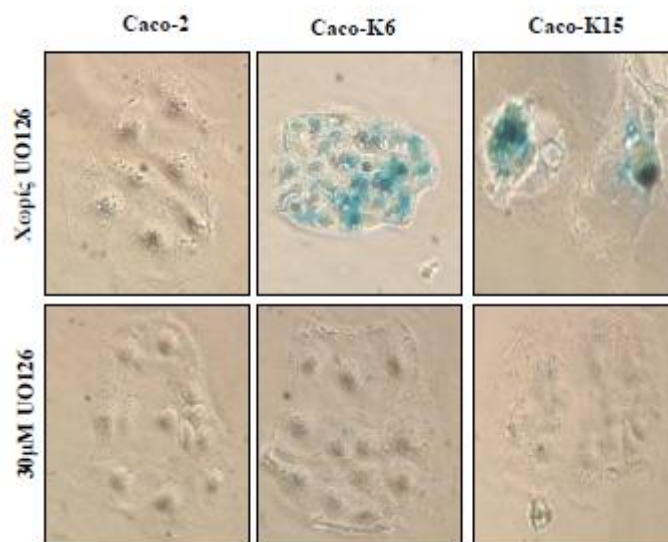


Σχήμα 10

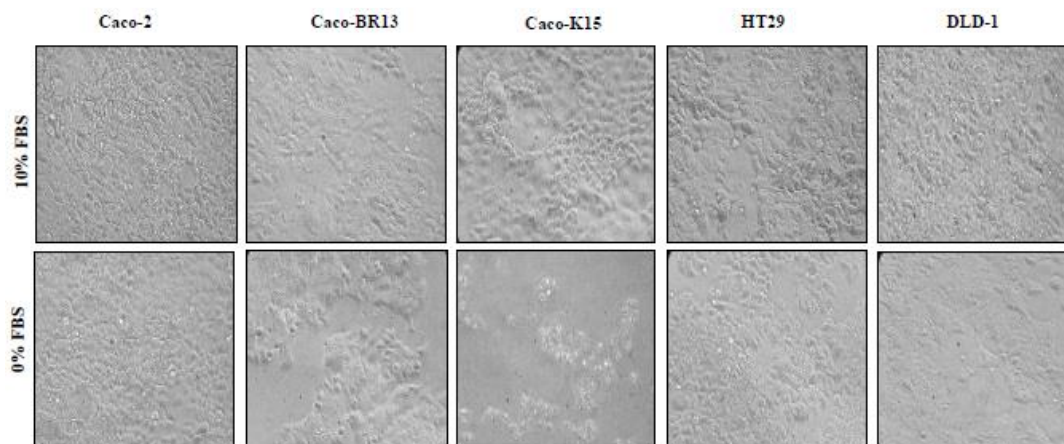
(B)



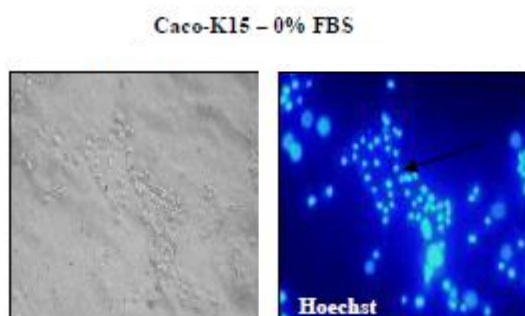
(Γ)



(Δ)



(E)



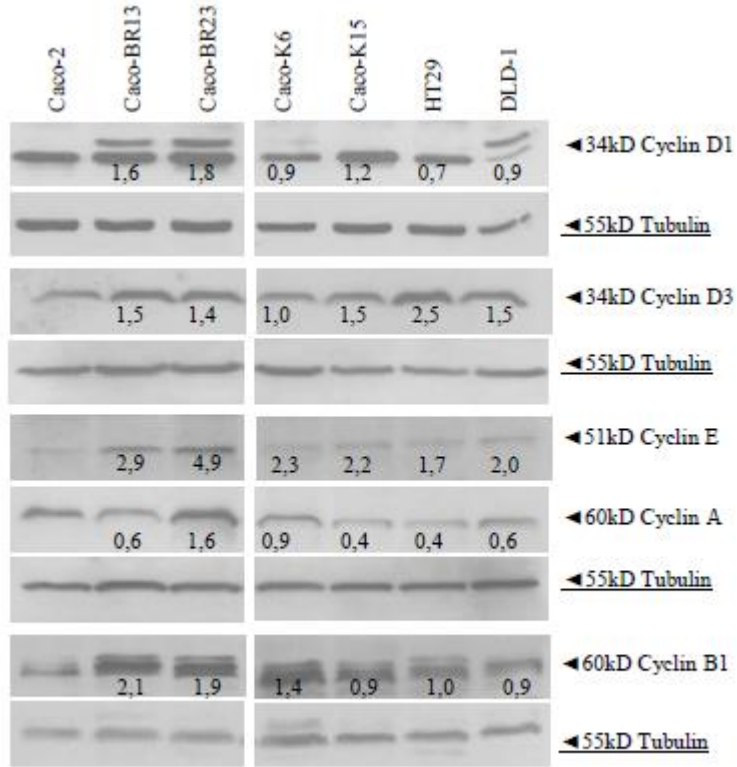
**Σχήμα 10.** Το ογκογονίδιο  $KRAS^{G12V}$  προκάλεσε την εμφάνιση δεικτών κυτταρικής γήρανσης στα Caco-2 κύτταρα. (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο ύστερα από χρώση με X-Gal (μέθοδος SA-β-Gal), μεγέθυνση: 20x, (B) Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανασοφθορισμού των PML σωματιδίων (πράσινο) και των πυρήνων (μπλε) από συνενστικακό μικροσκόπιο μεγέθυνση 63x. (Γ) Αναστολή της ERK1/2 με χρήση 30μM του αναστολέα U0126 για 48 ώρες οδήγησε στην απώλεια του χαρακτηριστικού για κυτταρική γήρανση μπλε χρώματος στα Caco-K κύτταρα. Ο αναστολέας αντικαθίσταται κάθε 24 ώρες. μεγέθυνση 20x. (Δ) Κυτταρική αύξηση απουσία αυξητικών παραγόντων. Σημαντικός κυτταρικός θάνατος παρατηρήθηκε μικροσκοπικά στα Caco-K κύτταρα μετά από 5 ημέρες χωρίς την παρουσία ορού (FBS), ενώ τα Caco-BR, Caco-2, HT29 και DLD-1 συνέχισαν να πολλαπλασιάζονται κανονικά. Όλα τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν εις τριπλούν με 0% και 10% FBS και το θρεπτικό μέσο ανανεωνόταν κάθε μέρα. (E) Χρώση με Hoechst έδειξε αποπτωτικούς πυρήνες (βέλος) στα Caco-K κύτταρα απουσία ορού. Μεγέθυνση: 20x.

**3.1.5 Η αδρανοποίηση (απενεργοποίηση) του Rb μονοπατιού και του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου, p19<sup>ARF</sup>, σχετίζονται με το ογκογονίδιο *BRAF<sup>V600E</sup>* στο μετασχηματισμό των Caco-2 κυττάρων.**

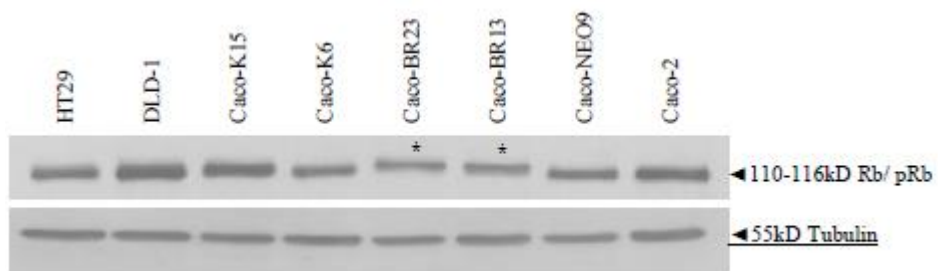
Στην προσπάθεια να αναλυθεί εκτενέστερα η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στα μετασχηματισμένα κύτταρα, ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης μορίων που παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία αυτή. Η ανάλυση έδειξε ότι οι κυκλίνες τύπου D (D1, D3) (κυκλίνες της G1 φάσης) ήταν σημαντικά υπερεκφρασμένες στα Caco-BR κύτταρα (σχήμα 11A). Τα μόρια αυτά προετοιμάζουν τα χρωμοσώματα για την αντιγραφή και ξεκινούν τη διαδικασία φωσφορυλίωσης/απενεργοποίησης της πρωτεΐνης Rb (Retinoblastoma protein), αναστολέα του κυτταρικού κύκλου. Επιπρόσθετα, οι κυκλίνες A και η E (κυκλίνες της S φάσης) βρέθηκαν σημαντικά αυξημένες στα Caco-BR κύτταρα. Αυτές οι κυκλίνες σε συνεργασία με τους παράγοντες E2Fs είναι υπεύθυνες για την έναρξη της S φάσης και της αντιγραφής του DNA απενεργοποιώντας την πρωτεΐνη Rb. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται να υποστηρίξουν το εύρημα ότι η Rb είναι υπερφωσφορυλιωμένη και συνεπώς απενεργοποιημένη στα Caco-BR και όχι στα Caco-K κύτταρα (σχήμα 11B). Η ανίχνευση της μη φωσφορυλιωμένης μορφής της Rb στα Caco-K κύτταρα είναι σύμφωνη με την εμφάνιση χαρακτηριστικών κυτταρικής γήρανσης σε αυτά, όπως περιγράψαμε νωρίτερα (σχήμα 10A, B).

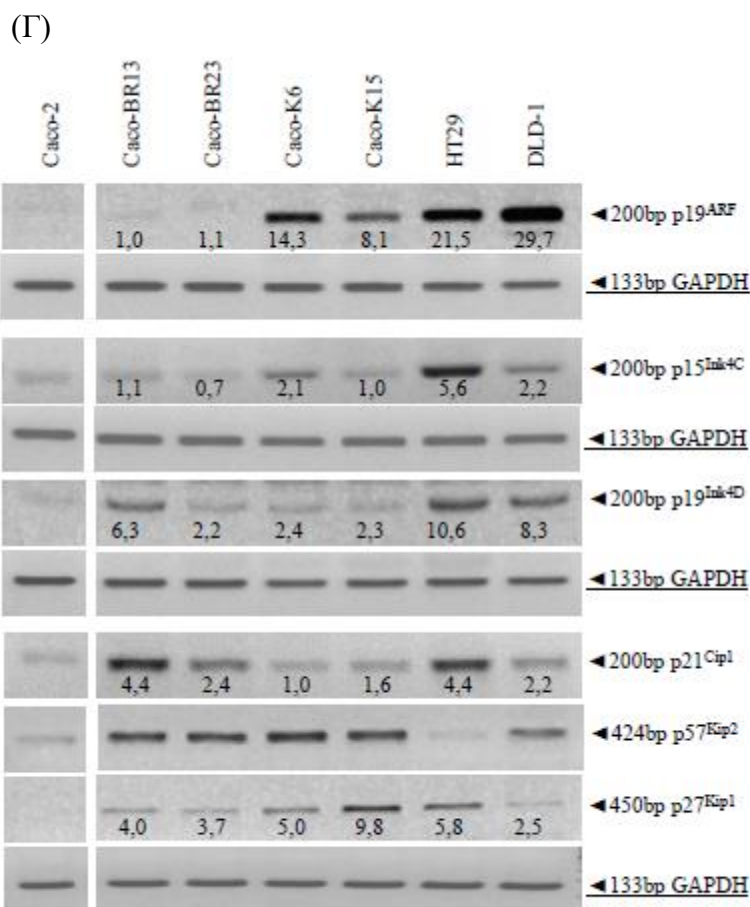
Σχήμα 11

(A)



(B)





**Σχήμα 11.** Έλεγχος έκφρασης των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου στα Caco-BR και Caco-K κύτταρα. (Α) πρωτεϊνική ανάλυση των κυκλινών A, B1, D1, D3 και E1, (Β) έλεγχος φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Rb στα BRAF<sup>V600E</sup> και KRAS<sup>G12V</sup> κύτταρα καθώς και στις κυτταρικές σειρές HT29 και DLD-1. (Γ) Έκφραση σε επίπεδο mRNA των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου με RT-PCR. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού RAS-RAF είναι γνωστό ότι εκτελεί εν μέρει το ρόλο του μέσω της ενεργοποίησης των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου, p16<sup>Ink4A</sup> και p19<sup>ARF</sup> <sup>94</sup>. Αφού το γονίδιο για τον αναστολέα p16<sup>Ink4A</sup> είναι υπερμεθυλιωμένο (άρα δεν εκφράζεται) στα Caco-2 κύτταρα <sup>95</sup>, η ανάλυση έγινε για τον αναστολέα p19<sup>ARF</sup> που προκύπτει από εναλλακτικό πλαίσιο ανάγνωσης (alternative reading frame) του ίδιου γονιδίου, καθώς και για άλλους ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου σε μεταγραφικό επίπεδο (σχήμα 11Γ). Δύο μέλη της Ink οικογένειας (p19<sup>ARF</sup> και p15<sup>Ink4C</sup>) βρέθηκαν θετικά ρυθμισμένα μόνο στα Caco-K

κύτταρα, ενώ ο p27<sup>Kip1</sup>, μέλος της Cip/Kip οικογένειας ήταν θετικά ρυθμισμένος και στις δύο περιπτώσεις ογκογονικού μετασχηματισμού. Είναι ενδιαφέρον ότι τα μόρια p21<sup>Cip1</sup> και p19<sup>Ink4D</sup> εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα στα Caco-BR κύτταρα, ενώ ο αναστολέας του κυτταρικού κύκλου, p57<sup>Kip2</sup> ήταν το μόνο γονίδιο που δεν άλλαξε μεταξύ των δύο ογκογονιδίων σε σύγκριση με τα πατρικά κύτταρα, Caco-2 (σχήμα 11Γ). Οι κυτταρικές σειρές HT29 και DLD-1 αναλύθηκαν επίσης.

### 3.1.6 Το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup> προκαλεί αστάθεια μικροδορυφορικού DNA (Microsatellite Instability, MSI) στα Caco-2 κύτταρα

Η επίδραση των ογκογονιδίων *BRAF*<sup>V600E</sup> και *KRAS*<sup>G12V</sup> στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου των Caco-2 κυττάρων εξετάστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο κυτταρομετρίας ροής (Flow Cytometry analysis, FACS). Το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup> προκάλεσε σημαντικές αλλαγές στον κυτταρικό κύκλο των Caco-2 κυττάρων όταν αυτά συγκρίθηκαν με τα μη-μετασχηματισμένα κύτταρα, ενώ καμμία σημαντική αλλαγή δεν παρατηρήθηκε παρουσία του μεταλλαγμένου *KRAS* (σχήμα 12Α). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι από το μετασχηματισμό με το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup>, ένας νέος πληθυσμός κυττάρων εμφανίστηκε, ο οποίος φαίνεται να περιέχει υποδιπλοειδικό αριθμό χρωμοσωμάτων και συνεπώς μικρότερη ποσότητα DNA. Αυτό απεικονίζεται από μια μετατόπιση προς τα αριστερά (στον άξονα FL2) της κορυφής που αντιστοιχεί στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, και στους δύο Caco-BR κλώνους (-BR13, -BR23) (σχήμα 12Α). Προκειμένου να αποκλειστεί το ενδεχόμενο αυτός ο νέος πληθυσμός κυττάρων να είναι αποπτωτικός, τα κύτταρα επωάστηκαν με τη χημική ουσία Nocodazole, η οποία χρησιμοποιείται συχνά για το συγχρονισμό των κυττάρων. Τα κύτταρα στα οποία έχει χορηγηθεί η Nocodazole σταματούν στη φάση



G2 ή M, περιέχουν δηλαδή ποσότητα DNA που αντιστοιχεί στις φάσεις αυτές του κυτταρικού κύκλου, όταν αναλύονται με κυτταρομετρία ροής. Στο πείραμα αυτό τα κύτταρα επωάστηκαν με την ουσία για διάφορα χρονικά διαστήματα (2, 8, 16 ώρες) και παρατηρήθηκε μια χρονικά εξαρτώμενη μείωση της μετατοπισμένης κορυφής των Caco-BR κυττάρων (σχήμα 12B). Επίσης η κορυφή αυτή (που αντιπροσωπεύει το νέο πληθυσμό κυττάρων) εμφάνισε μια σταδιακή μετατόπιση προς τα δεξιά στον FL2 άξονα (σχήμα 12B). Η μετατόπιση αυτή υποδηλώνει ότι πρόκειται για κύτταρα με φυσιολογικό κυτταρικό κύκλο και όχι για αποπτωτικά. Μπορούμε λοιπόν, να συμπεράνουμε πως πρόκειται για κύτταρα με χαμηλότερη περιεκτικότητα σε DNA γεγονός που ίσως οφείλεται στην επαγωγή μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI) από το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup>.

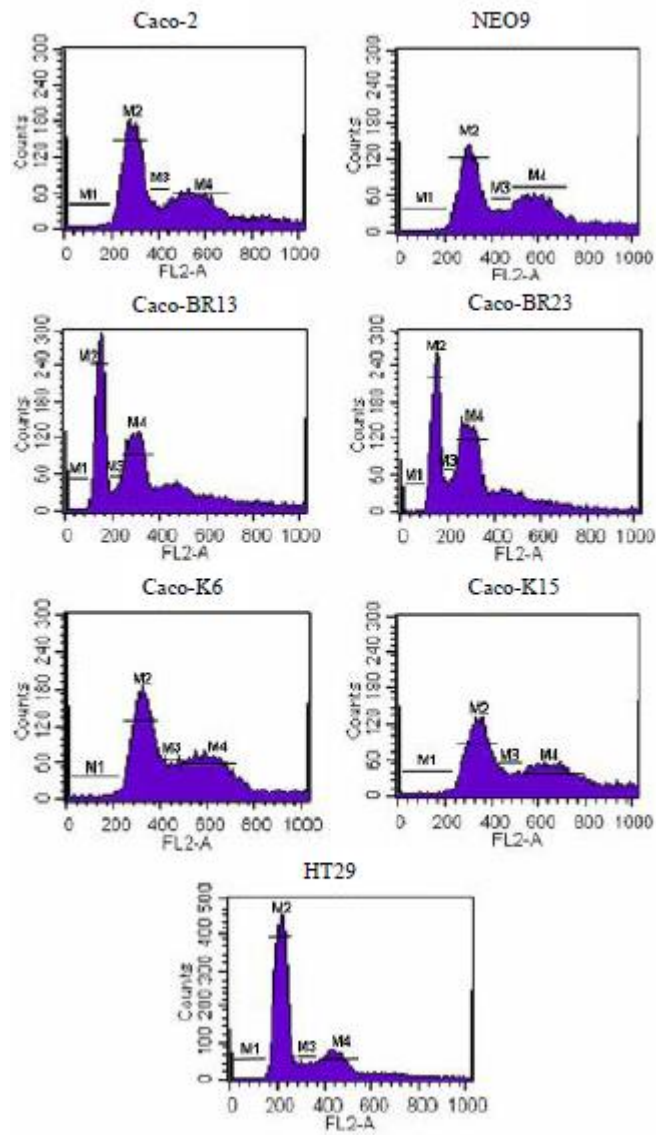
Αποτελέσματα που προέκυψαν από ανάλυση μικροσυστοιχιών (Microarrays) ενισχύουν ακόμη περισσότερο την υπόθεση της μικροδορυφορικής αστάθειας από το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup>. Συγκεκριμένα, γονίδια επιδιόρθωσης DNA (MSH2 and Ku70) καθώς και γονίδια απομάκρυνσης λανθασμένων νουκλεοτιδίων (Nucleotide Excision Repair, NER) (ERCC1-variant 1, ERCC3 και XPC), βρέθηκαν να έχουν σημαντικά μειωμένη έκφραση στα Caco-BR κύτταρα, κάτι το οποίο επαληθεύθηκε σε επίπεδο mRNA με ανάλυση RT-PCR (σχήμα 12 B).

Ο ρόλος του ογκογονιδίου *BRAF*<sup>V600E</sup> στην επαγωγή μικροδορυφορικής αστάθειας μελετήθηκε εκτενέστερα αναλύοντας μια σειρά μονο-νουκλεοτιδικών μικροδορυφορικών δεικτών (NR-21, NR-22, NR-24, BAT-25 και BAT-26). Στο σχήμα 12Δ, όπου φαίνονται τα ηλεκτοφορογραφήματα της ανάλυσης, είναι εμφανές ότι στα Caco-BR κύτταρα τα μονο-νουκλεοτιδία NR-21, NR-22 και NR-24 εμφανίζουν τμήματα μικρότερου μοριακού βάρους, τα οποία παρουσιάζονται ως κορυφές μετατοπισμένες προς τα αριστερά σε σχέση με τις αντίστοιχες κορυφές των Caco-2 κυττάρων. Πρέπει να αναφερθεί ότι το μέγεθος αυτών των τμημάτων διαφέρει

από τα αντίστοιχα των Caco-2 κυττάρων κατά  $\geq 3$  ζευγάρια βάσεων (bp) (πίνακας 2), γεγονός που αποκλείει το ενδεχόμενο πολυμορφισμού <sup>96</sup>. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν επίσης οι κυτταρικές σειρές DLD-1 και HCT116, ως θετικοί μάρτυρες για τη μικροδορυφορική αστάθεια (βάση δεδομένων COSMIC). Στην περίπτωση των DLD-1 κυττάρων τα μονο-νουκλεοτίδια NR-21 και NR-24, αντιπροσωπεύονται από δύο ευδιάκριτους πληθυσμούς κυττάρων, όπου ο ένας αποτελείται από φυσιολογικό μέγεθος των εξεταζόμενων αλληλουχιών και ο άλλος από κορυφές μετατοπισμένες προς τα αριστερά, ενώ στα κύτταρα HCT116 υπάρχουν μόνο μετατοπισμένες κορυφές που αντιστοιχούν σε μικρότερου μοριακού βάρους αλληλουχίες (σχήμα 12Δ). Αντίθετα, η μετατόπιση που παρατηρήθηκε για τα BAT-25 και BAT-26 στα Caco-BR23 (αλλά όχι στα Caco-BR13) αντιστοιχεί σε μέγεθος 3bp και θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει πολυμορφισμό ή σωματική αλλαγή. Στα κύτταρα HCT116 και DLD-1 τα μονο-νουκλεοτίδια BAT-25 και BAT-26 εμφανίζουν μετατοπίσεις προς τα αριστερά, οι οποίες αντιστοιχούν σε μείωση  $\geq 3$ bp και άρα είναι θετικά για μικροδορυφορική αστάθεια (σχήμα 12Δ). Σύμφωνα με τα παραπάνω τα κύτταρα που μετασηματίστηκαν με το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup> απέκτησαν μικροδορυφορική αστάθεια για περισσότερους από δύο από τους εξεταζόμενους δείκτες, με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζονται ως MSI-High <sup>97</sup>

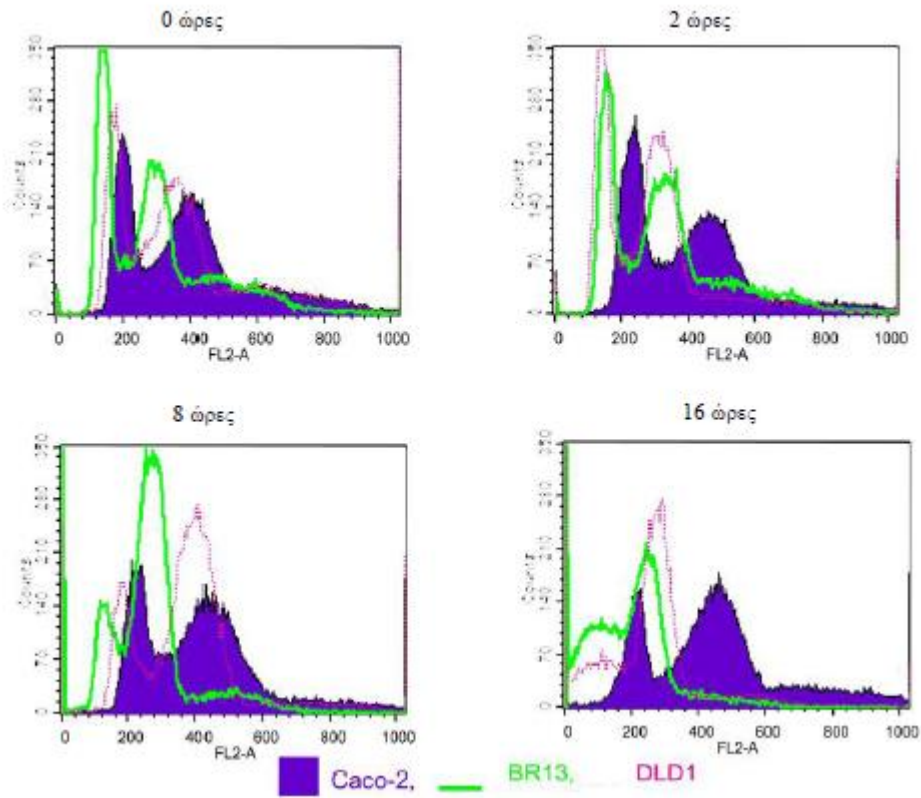
Σχήμα 12

(A)

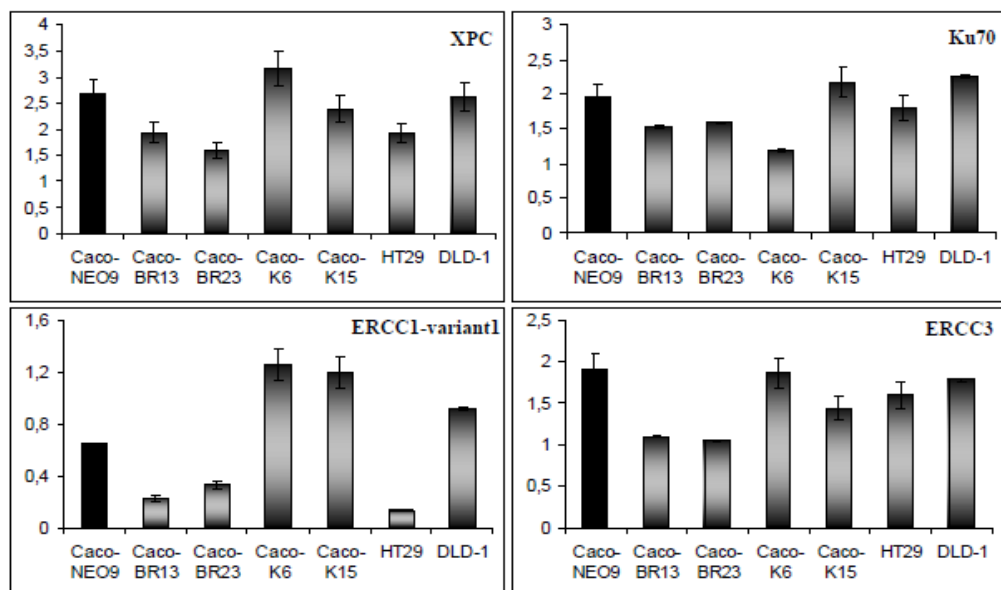


Σχήμα 12

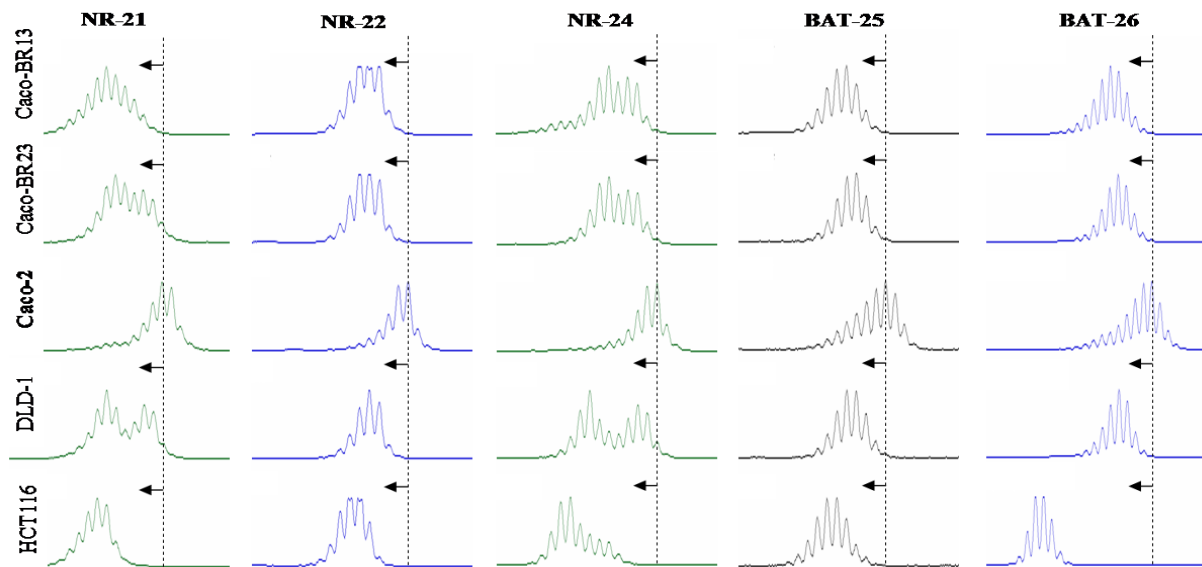
(B)



(Γ)



(Δ)



**Σχήμα 12.** Το ογκογονίδιο  $BRAF^{V600E}$  επάγει μικροδορυφορική αστάθεια στα Caco-2 κύτταρα. (Α) Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής των κυττάρων ύστερα από χρώση με propidium iodide έδειξε αλλαγές στον κυτταρικό κύκλο των Caco-BR κυττάρων. (Β) Τα κύτταρα επώστηκαν με 0.1  $\mu$ M Nocodazole για 2, 8 και 16 ώρες και ελέγχθηκε ο κυτταρικός κύκλος, προκειμένου να αποκλειστεί το ενδεχόμενο αποπτωτικών κυττάρων. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. (Μ1: προ-G1φάση, Μ2: G1 φάση, Μ3: S φάση, Μ4: G2/M φάση). (Γ) Έλεγχος των επιπέδων RNA για γονίδια επιδιόρθωσης του DNA στα Caco-BR και Caco-K κύτταρα καθώς και στις κυτταρικές σειρές HT29 και DLD-1 με τη χρήση RT-PCR. Η ανάλυση έγινε εις τριπλούν και στο σχήμα φαίνεται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση. Τα γονίδια επιδιόρθωσης DNA ρυθμίζονται αρνητικά στα  $BRAF^{V600E}$ -μετασηματισμένα κύτταρα. Τα επίπεδα RNA των γονιδίων ομαλοποιήθηκαν σύμφωνα με το γονίδιο GAPDH. (Δ) Ανάλυση μικροδορυφορικής αστάθειας: Ηλεκτροφορογράφημα των μονο-νουκλεοτιδίων NR-21, NR-22, NR-24, BAT-25 και BAT-26 στα  $BRAF^{V600E}$ - μετασηματισμένα κύτταρα, την πατρική κυτταρική σειρά Caco-2 και τις θετικές για μικροδορυφορική αστάθεια κυτταρικές σειρές DLD-1 και HCT116. Η εμφάνιση επαναλήψεων μονο-νουκλεοτιδίων μικρότερου μοριακού βάρους στα Caco-BR κύτταρα (συγκρητικά με τα Caco-2) σε περισσότερους από δύο δείκτες χαρακτηρίζει τα Caco-BR κύτταρα θετικά για μικροδορυφορική αστάθεια.

Κυτταρική σειρά	Μονο-νουκλεοτίδιο	κορυφή 1 (bp)	κορυφή 2 (bp)	κορυφή 3 (bp)
-----------------	-------------------	---------------	---------------	---------------

Caco-BR13	BAT25	118	119	
Caco-BR23	BAT25	119	120	
Caco-2	BAT25	122	123	
DLD-1	BAT25	118	119	
HCT116	BAT25	117	118	
Caco-BR13	BAT26	107	108	
Caco-BR23	BAT26	108	109	
Caco-2	BAT26	111	112	
DLD-1	BAT26	108	109	
HCT116	BAT26	98	99	
Caco-BR13	NR21	89	90	91
Caco-BR23	NR21	90	91	92
Caco-2	NR21	95	96	96
DLD1	NR21	89	90	91
HCT116	NR21	88	89	90
Caco-BR13	NR22	131	132	133
Caco-BR23	NR22	131	132	133
Caco-2	NR22	135	136	
DLD1	NR22	131	132	133
HCT116	NR22	129	130	131
Caco-BR13	NR24	119	120	121
Caco-BR23	NR24	120	121	122
Caco-2	NR24	124	125	126
DLD-1	NR24	118	119	120
HCT116	NR24	117	118	119

**Πίνακας 2.**

Μέγεθος  
 χαρακτηριστικών  
 κορυφών για το κάθε  
 μονο-νουκλεοτίδιο σε  
 bp. Σύγκριση των Caco-  
 BR κυττάρων με τα  
 Caco-2 δείχνει μείωση  
 $\geq 3bp$  για όλους τους  
 εξεταζόμενους δείκτες  
 στην περίπτωση των  
 Caco-BR13, ενώ στα  
 Caco-BR23 η μείωση  
 για τους δείκτες BAT-25  
 και BAT-26 είναι ίση με  
 3bp. Συνεπώς, τα Caco-  
 BR κύτταρα είναι θετικά  
 για μικροδορυφορική  
 αστάθεια για  
 περισσότερους από δύο  
 δείκτες.

## ΜΕΡΟΣ 'Β

Συγκριτική επίδραση των ογκογονιδίων  $BRAF^{V600E}$ ,  $KRAS^{G12V}$  &  $HRAS^{G12V}$  στα μονοπατία μεταγωγής σημάτων, των  $RhoA$ ,  $Rac1$  και  $Cdc42$  και τη κυτταρική διεισδυτικότητα και μεταναστευτικότητα

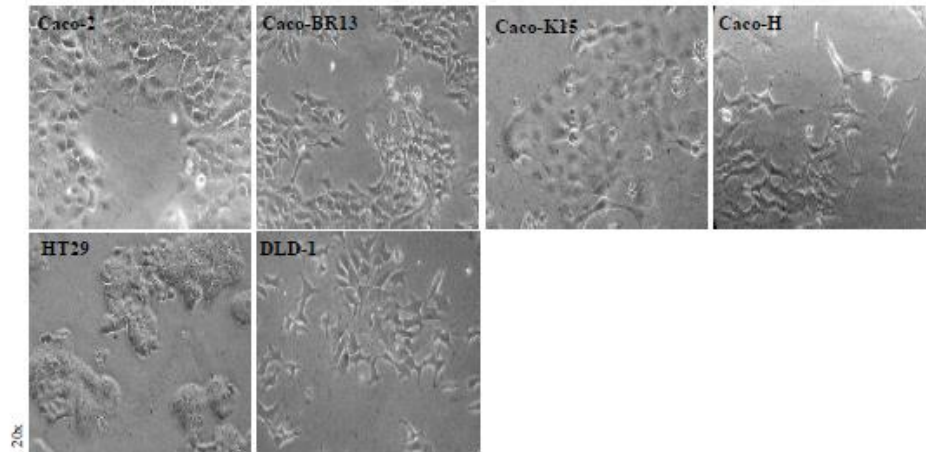
**3.2.1 Το ογκογονίδιο  $BRAF^{V600E}$  προκάλεσε μορφολογικές αλλαγές στα Caco-2 κύτταρα σε σύγκριση με το  $KRAS^{G12V}$  καθώς και απώλεια της επιθηλιακής αρχιτεκτονικής τους σε καλλιέργεια τριών διαστάσεων (3D), παρόμοια με αυτή του  $HRAS^{G12V}$**

Παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο, έδειξε ότι το ογκογονίδιο  $BRAF^{V600E}$  άλλαξε την επιθηλιακή μορφολογία των Caco-2 κυττάρων και οδήγησε στο σχηματισμό πιο «επιθετικού» φαινοτύπου (σχήμα 13A). Τα Caco-BR κύτταρα έγιναν πιο επιμήκη, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιότητα με τα  $HRAS^{G12V}$ -μετασχηματισμένα κύτταρα (Caco-H), από ότι με τα Caco-2 από τα οποία προέκυψαν. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα Caco-H κύτταρα έχουν υποστεί Επιθήλιο - Μεσεγχυματική μετάβαση (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) <sup>82</sup> και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται στα πειράματα ως μοντέλο μελέτης του φαινομένου αυτού. Όπως φαίνεται στο σχήμα 13 (A,B,Γ) τα Caco-H κύτταρα έχουν αποκτήσει μεσεγχυματικό φαινότυπο, είναι επιμήκη και εμφανίζουν μεγάλο μήκος κυτταροπλασματικές προεκβολές. Αντίθετα, το ογκογονίδιο  $KRAS^{G12V}$  δεν άλλαξε σημαντικά τη μορφολογία των Caco-2 κυττάρων. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι ο φαινότυπος των Caco-BR κυττάρων είναι παρόμοιος με εκείνον των DLD-1, ενδεχομένως λόγω των υψηλών επιπέδων p-BRAF στα κύτταρα αυτά (σχήμα 8). Χρώση φαλλοϊδίνης επιβεβαίωσε αυτές τις μορφολογικές αλλαγές και αποκάλυψε

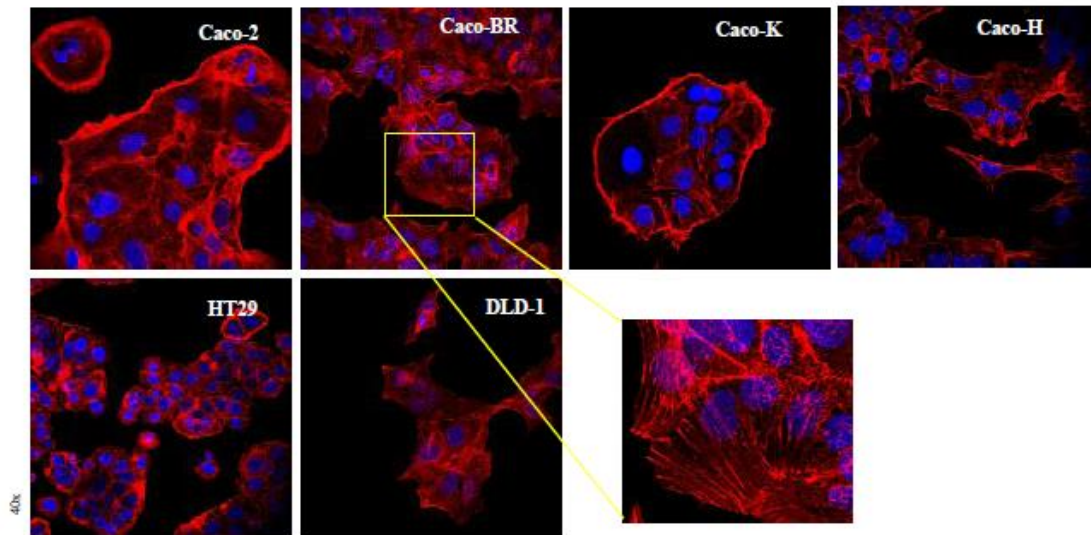
περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τις αλλαγές στον κυτταροσκελετό της ακτίνης (σχήμα 13B,Γ) <sup>98</sup>.

**Σχήμα 13**

(A)

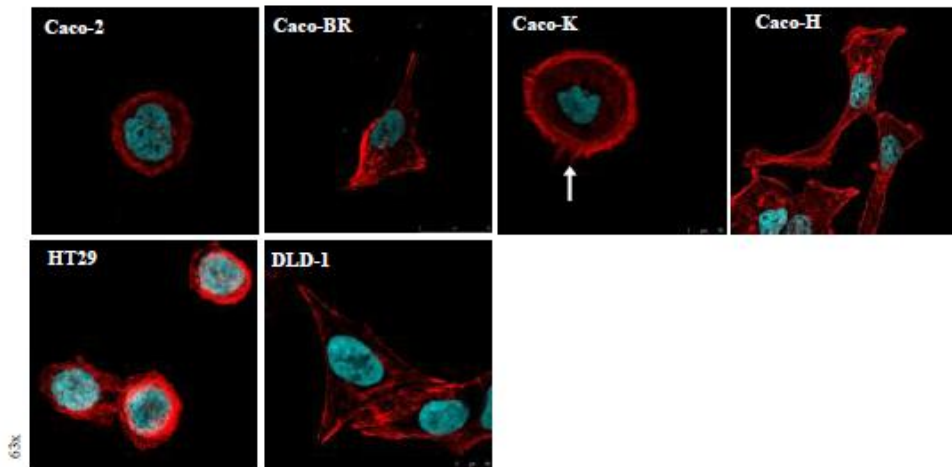


(B)

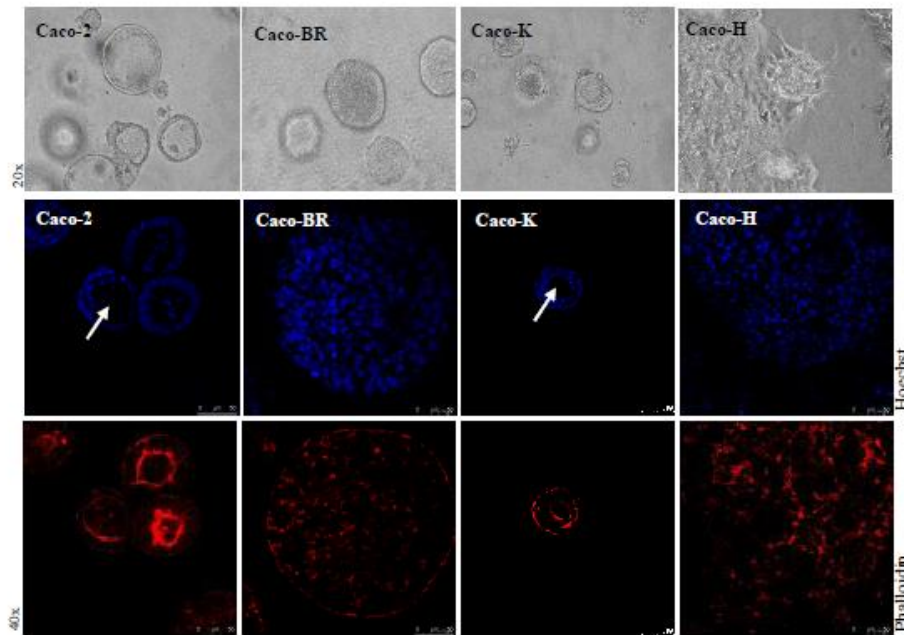




(Γ)



(Δ)



**Σχήμα 13.** Το ογκογονίδιο  $BRAF^{V600E}$  επάγει αλλαγές στη μορφολογία των αδενοκαρκινοματικών κυττάρων του παχέος εντέρου. (Α) Φωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου και (Β,Γ) εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας ύστερα από χρώση των κυττάρων με φαλλοϊδίνη δείχνουν ότι τα Caco-BR έγιναν πιο επιμήκη, ενώ τα Caco-K κύτταρα δημιούργησαν φιλοπόδια (βέλος). (Δ) Αντίστοιχες εικόνες σε συνθήκες καλλιέργειας 3D δείχνουν την αρχιτεκτονική των κυττάρων μετά από 12 ημέρες καλλιέργειας σε Matrigel. Τα Caco-2 και Caco-K κύτταρα δημιούργησαν σφαιρικούς σχηματισμούς (spheroids) με αυλό στο εσωτερικό τους (βέλος), ενώ τα Caco-BR και Caco-H κύτταρα όχι. Οι πυρήνες (μπλε χρώμα) είναι ορατοί μέσω της ειδικής χρώσης με Hoechst.

Πιο συγκεκριμένα, τα Caco-BR κύτταρα εμφανίζουν αυξημένο αριθμό ινιδίων stress συγκριτικά με τα Caco-2 κύτταρα (σχήμα 13B, μεγέθυνση), ενώ παρόλο που τα Caco-

Κ κύτταρα δε δείχνουν σημαντικές μορφολογικές αλλαγές συγκριτικά με τα Caco-2, είναι εμφανές ότι δημιούργησαν μεμβρανικές προεκβολές (σχήμα 13Γ, βέλος) πλούσιες σε ακτίνη, γνωστές σαν φιλοπόδια και τα Caco-H κύτταρα έχουν επίμηκες σχήμα, χαρακτηριστικό των μεσεγχυματικών κυττάρων. Όλες οι παραπάνω εικόνες προέρχονται από πειράματα που έγιναν σε συνθήκες δύο διαστάσεων (2D). Προκειμένου να παρατηρηθεί η μορφολογία και η αρχιτεκτονική των κυττάρων σε συνθήκες που προσομοιάζουν το περιβάλλον των ιστών, χρησιμοποιήθηκε σύστημα καλλιέργειας τριών διαστάσεων (3D), όπου τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 12 μέρες σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε matrigel. Το matrigel αποτελεί ένα ζελατινώδες μίγμα πρωτεϊνών και άλλων παραγόντων και η σύστασή του είναι παρόμοια με εκείνη του εξωκυττάρου περιβάλλοντος πολλών ιστών. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται συχνά ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια κυττάρων. Είναι γνωστό από προηγούμενη μελέτη <sup>99</sup> ότι όταν τα Caco-2 κύτταρα αναπτύσσονται σε συνθήκες 3D συμπεριφέρονται όπως τα φυσιολογικά κύτταρα του παχέος εντέρου και οργανώνονται σε σφαιρικούς σχηματισμούς με την παρουσία αυλού. Στο σχήμα 13Δ παρουσιάζονται φωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου αλλά και εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας ύστερα από χρώση των κυττάρων με φαλλοϊδίνη, όπου είναι εμφανές ότι τα μη μετασχηματισμένα Caco-2 κύτταρα καθώς και τα Caco-K αναπτύχθηκαν σχηματίζοντας αυτές τις δομές, δηλαδή σφαίρες στο εσωτερικό των οποίων δημιουργήθηκε αυλός (βέλος). Οι σφαιρικοί σχηματισμοί που δημιουργήθηκαν στην περίπτωση των Caco-BR κυττάρων ήταν πολύ μεγαλύτερες και συμπαγείς, ενώ τα Caco-H (EMT) κύτταρα αναπτύχθηκαν σχηματίζοντας μεγάλες δομές ακανόνιστου σχήματος και χωρίς αυλό. Η εικόνα αυτή είναι χαρακτηριστική των καρκινικών κυττάρων καθώς έχει δειχθεί ότι τα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα που αναπτύσσονται σε καλλιέργεια 3 διαστάσεων, δημιουργούν συσσωματώματα με περιορισμένη διαφοροποίηση <sup>100, 101</sup>. Επομένως, είναι προφανές τόσο σε συνθήκες 2D

όσο και σε συνθήκες 3D, ότι το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup> άλλαξε τη μορφολογία των κυττάρων του παχέος εντέρου ενδιάμεσου αδενώματος, Caco-2, παρέχοντάς τους μερικά χαρακτηριστικά μεσεγχυματικού κυττάρου, ενώ στη περίπτωση του ογκογονιδίου *KRAS*<sup>G12V</sup> διατηρήθηκαν τα επιθηλιακά χαρακτηριστικά των Caco-2 κυττάρων και το *HRAS*<sup>G12V</sup> προσέδωσε πλήρη μεσεγχυματικό φαινότυπο στα ίδια κύτταρα.

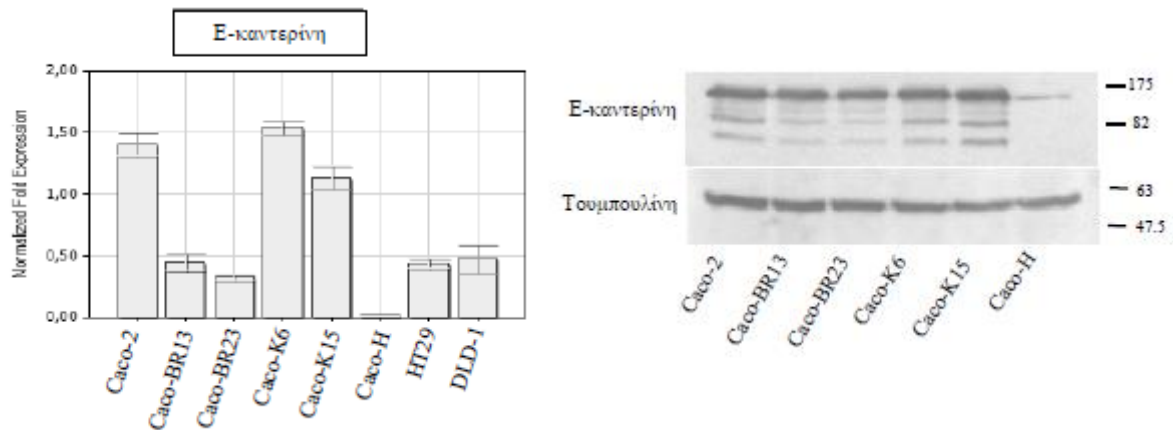
### **3.2.2 Το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup> μείωσε τα επίπεδα mRNA της E-καντερίνης και αλλοίωσε τη χαρακτηριστική επιθηλιακή κατανομή της στα Caco-2 κύτταρα.**

Σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη, το ογκογονίδιο *HRAS*<sup>G12V</sup> προκαλεί στα Caco-2 κύτταρα Επιθηλιακής-Μεσεγχυματική μετάβαση, μέσω απώλειας έκφρασης της E-καντερίνης (επιθηλιακός δείκτης) και υπερ-έκφρασης της βιμεντίνης (μεσεγχυματικός δείκτης) <sup>75</sup>. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν το *BRAF*<sup>V600E</sup> έχει προκαλέσει αντίστοιχο φαινόμενο, ελέγχθηκε η έκφραση της E-καντερίνης στα μετασχηματισμένα και μη- κύτταρα σε επίπεδο RNA και πρωτεΐνης με τη χρήση των μεθόδων Real-Time PCR και ανοσοαποτύπωμα κατά Western αντίστοιχα, καθώς και ο εντοπισμός της με συνεστιακή μικροσκοπία τόσο σε συνθήκες 2D όσο και σε συνθήκες 3D (σχήμα 14). Η ανάλυση έδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης της E-καντερίνης σε επίπεδο mRNA μειώθηκαν σημαντικά στα Caco-BR κύτταρα συγκρινόμενα με τα Caco-2, ενώ σε πρωτεϊνικό επίπεδο δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στα κύτταρα αυτά (σχήμα 14A, αριστερά και δεξιά αντίστοιχα). Ωστόσο, πειράματα ανοσοφθορισμού έδειξαν επίσης σημαντική μείωση όταν τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε συνθήκες δύο ή τριών διαστάσεων, με την E-καντερίνη να εμφανίζει ασυνεχή κατανομή στα σημεία κυτταρικών επαφών (σχήμα 14B). Στα

πειράματα αυτά περιλαμβάνονται και τα HRAS<sup>G12V</sup>-μετασχηματισμένα κύτταρα (Caco-H), στα οποία η έκφραση της Ε-καντερίνης είναι πολύ χαμηλή, καθώς και οι κυτταρικές σειρές HT29 και DLD-1, στις οποίες όπως φαίνεται στο σχήμα 14Α (αριστερά) παρατηρείται μείωση, αντίστοιχη με εκείνη των Caco-BR κυττάρων. Παρόλο που η έκφραση αυτού του επιθηλιακού δείκτη μειώθηκε στα κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με το *BRAF*<sup>V600E</sup> ογκογονίδιο, όταν ελέγχθηκε η έκφραση της βιμεντίνης στα Caco-BR κύτταρα, δεν παρουσιάστηκε καμία διαφορά σε σχέση με τα Caco-2 κύτταρα (σχήμα 15Α)

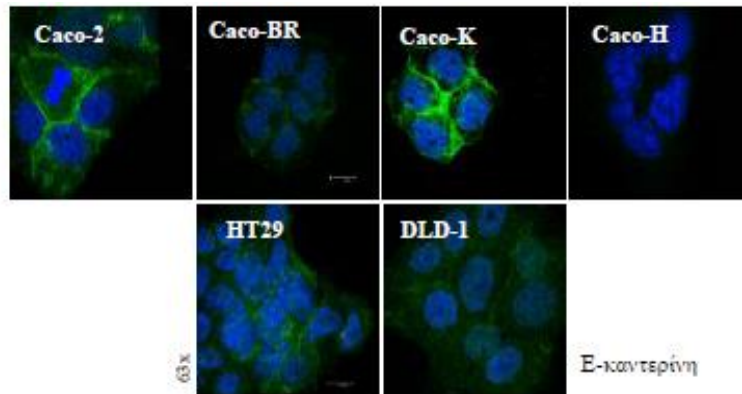
Σχήμα 14

(Α)

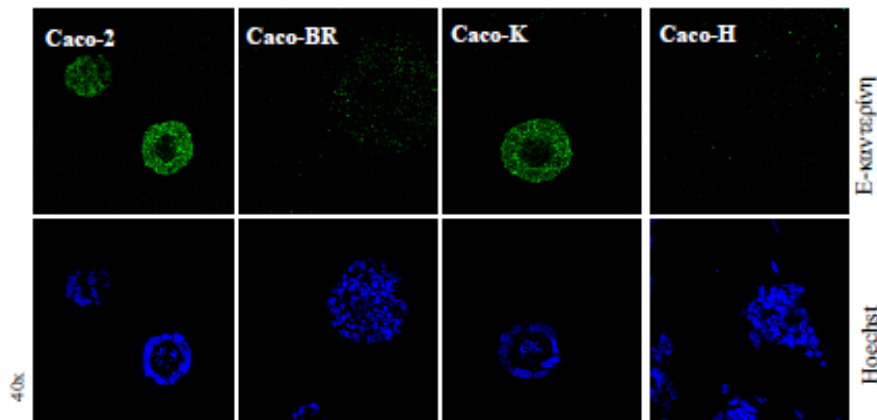


(B)

(i)



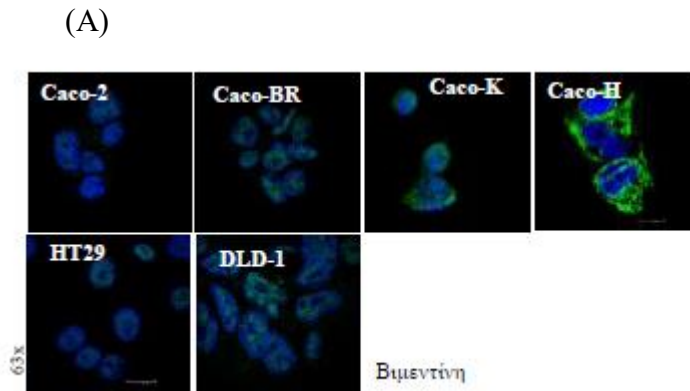
(ii)



**Σχήμα 14.** Το ογκογονίδιο  $BRAF^{V600E}$  αλλοίωσε τον επιθηλιακό χαρακτήρα των Caco-2 κυττάρων. (A) Real time PCR ανάλυση και ανοσοαποτύπωμα κατά Western για την E-καντερίνη δείχνουν μείωση σε επίπεδο mRNA, αλλά όχι σε επίπεδο πρωτεΐνης. (B) Πειράματα ανοσοφθορισμού παρουσιάζουν σημαντική μείωση της E-καντερίνης στα Caco-BR κύτταρα. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες 2 (i) και 3 διαστάσεων (ii) και ο εντοπισμός της E-καντερίνης παρατηρήθηκε με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου.

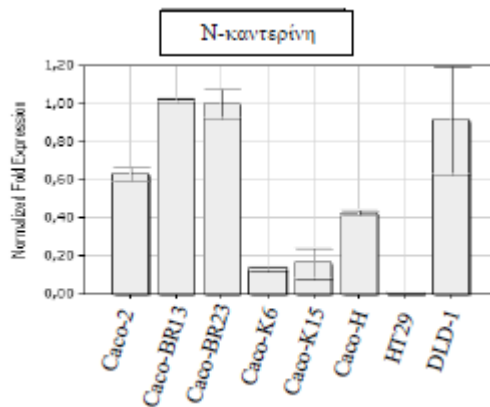
Μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερ-έκφραση της N-καντερίνης, ενός άλλου μορίου που σχετίζεται με την κυτταρική προσκόλληση, σε κύτταρα καρκίνου του μαστού οδηγεί σε αυξημένη μεταναστευτικότητα και διεισδυτικότητα καθώς και ότι μείωση της E-καντερίνης συνοδεύεται από αύξηση της N-καντερίνης κατά την καρκινική εξέλιξη<sup>102, 103</sup>. Ανάλυση σε επίπεδο mRNA έδειξε ότι η N-καντερίνη αυξήθηκε σε μικρό ποσοστό στα Caco-BR, ενώ μειώθηκε σημαντικά στα Caco-K κύτταρα (σχήμα 15B).

Θα μπορούσαμε λοιπόν να συμπεράνουμε ότι το μεταλλαγμένο *BRAF* γονίδιο αν και δεν προκάλεσε στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση, εντούτοις οδήγησε στην απώλεια τυπικών επιθηλιακών χαρακτηριστικών τους.



**Σχήμα 15.** Έλεγχος μεσεγχυματικών δεικτών. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας για τη βιμεντίνη δεν έδειξαν αύξηση στα Caco-BR κύτταρα (A), ενώ Real time PCR ανάλυση για την N-καντερίνη έδειξε μικρή αύξηση (B).

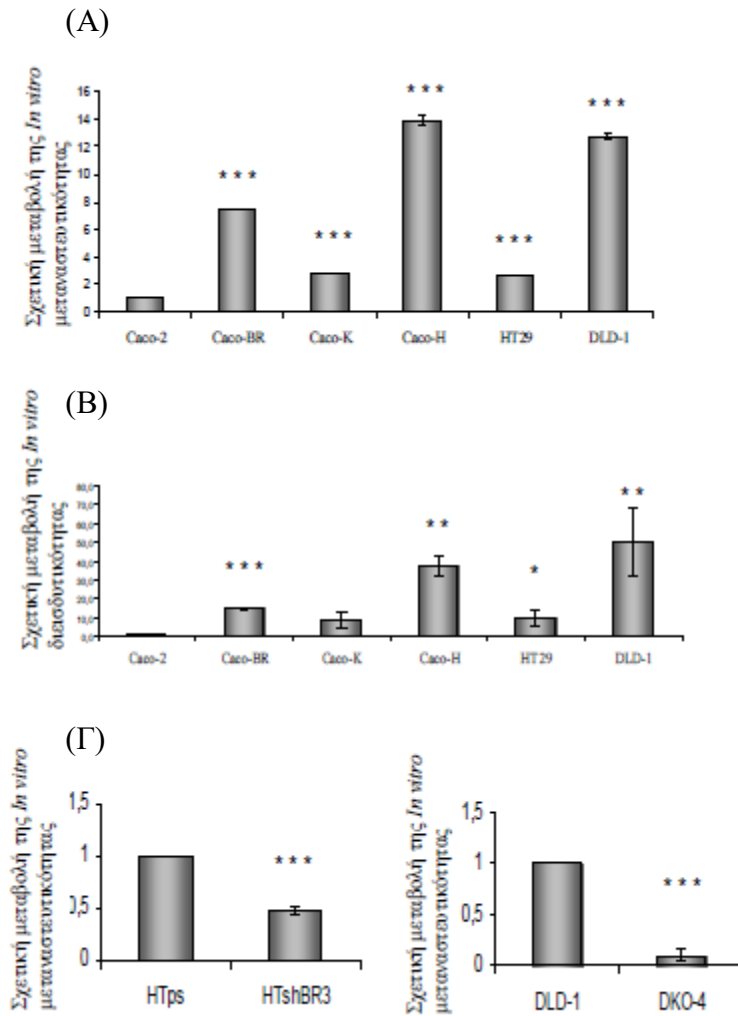
(B)



### 3.2.3 Διαφορική ενίσχυση της μεταναστευτικής και διεισδυτικής ικανότητας των κυττάρων από τα ογκογονίδια *BRAF<sup>V600E</sup>*, *KRAS<sup>G12V</sup>* και *HRAS<sup>G12V</sup>* (EMT)

Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση των ογκογονιδίων στις μεταναστευτικές και διεισδυτικές ιδιότητες των κυττάρων ως άμεση συνέπεια των παραπάνω

κυτταροσκελετικών αλλαγών. Παρατηρήθηκε ότι και τα τρία ογκογονίδια (*KRAS*<sup>G12V</sup>, *BRAF*<sup>V600E</sup> και *HRAS*<sup>G12V</sup>) ενίσχυσαν την ικανότητα των Caco-2 κυττάρων να μεταναστεύουν και να διεισδύουν *in vitro*, αλλά σε διαφορετικό βαθμό (σχήμα 16A,B). Τα Caco-BR κύτταρα παρουσίασαν υψηλή μεταναστευτικότητα και διεισδυτικότητα, γεγονός που είναι σε συμφωνία με την επιμηκυσμένη μορφολογία τους, ενώ τα Caco-K κύτταρα που διατήρησαν τα επιθηλιακά χαρακτηριστικά των πατρικών κυττάρων, ήταν λιγότερο αποτελεσματικά ως προς αυτές τις ιδιότητες. Εξ άλλου, τα Caco-H κύτταρα εμφάνισαν πολύ μεγαλύτερη μεταναστευτικότητα και διεισδυτικότητα συγκριτικά με τα μη-μετασχηματισμένα Caco-2 καθώς και με τα Caco-BR και Caco-K κύτταρα. Τα παραπάνω πειράματα έδειξαν την επίδραση των εξωγενώς εκφρασμένων ογκογονιδίων στην κυτταρική μετανάστευση. Προκειμένου να εξετασθεί η επίδραση αυτή όταν τα ογκογονίδια εκφράζονται ενδογενώς, χρησιμοποιήθηκαν τα HT29 (HTps) και τα DLD-1 κύτταρα καθώς και παράγωγα αυτών στα οποία έχει αποσιωπηθεί η έκφραση των μεταλλαγμένων γονιδίων (HTshBR3-κύτταρα που προέκυψαν από τη μόνιμη μείωση της έκφρασης του *BRAF*<sup>V600E</sup> στα κύτταρα HT29) και (DKO-4 κύτταρα που προέκυψαν από τη μόνιμη αποσιώπηση του *KRAS*<sup>G13D</sup> στα κύτταρα DLD-1) <sup>84</sup> Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όταν το μεταλλαγμένο *BRAF* αποσιωπείται, η κυτταρική μετανάστευση μειώνεται σε ποσοστό περίπου 50%, ενώ στην περίπτωση του μεταλλαγμένου *KRAS* η μείωση είναι ακόμα μεγαλύτερη, περίπου 90% (σχήμα 16Γ).



**Σχήμα 16.** Διαφορική επίδραση των ογκογονιδίων *KRAS*<sup>G12V</sup>, *BRAF*<sup>V600E</sup> και *HRAS*<sup>G12V</sup> στην *in vitro* μεταναστευτική και διεισδυτική ικανότητα των Caco-2 κυττάρων. Κάθε κυτταρική σειρά εξετάσθηκε για τη μεταναστευτική (Α) και διεισδυτική (Β) τους ικανότητα. (Γ) Έλεγχος της κυτταρικής μετανάστευσης για τα κύτταρα: HTps, HTshBR3, DLD-1 και DKO-4. \*:  $P \leq 0,05$ , \*\*:  $P \leq 0,01$ , \*\*\*:  $P \leq 0,001$ , σύμφωνα με την ανάλυση Student *t*-test.

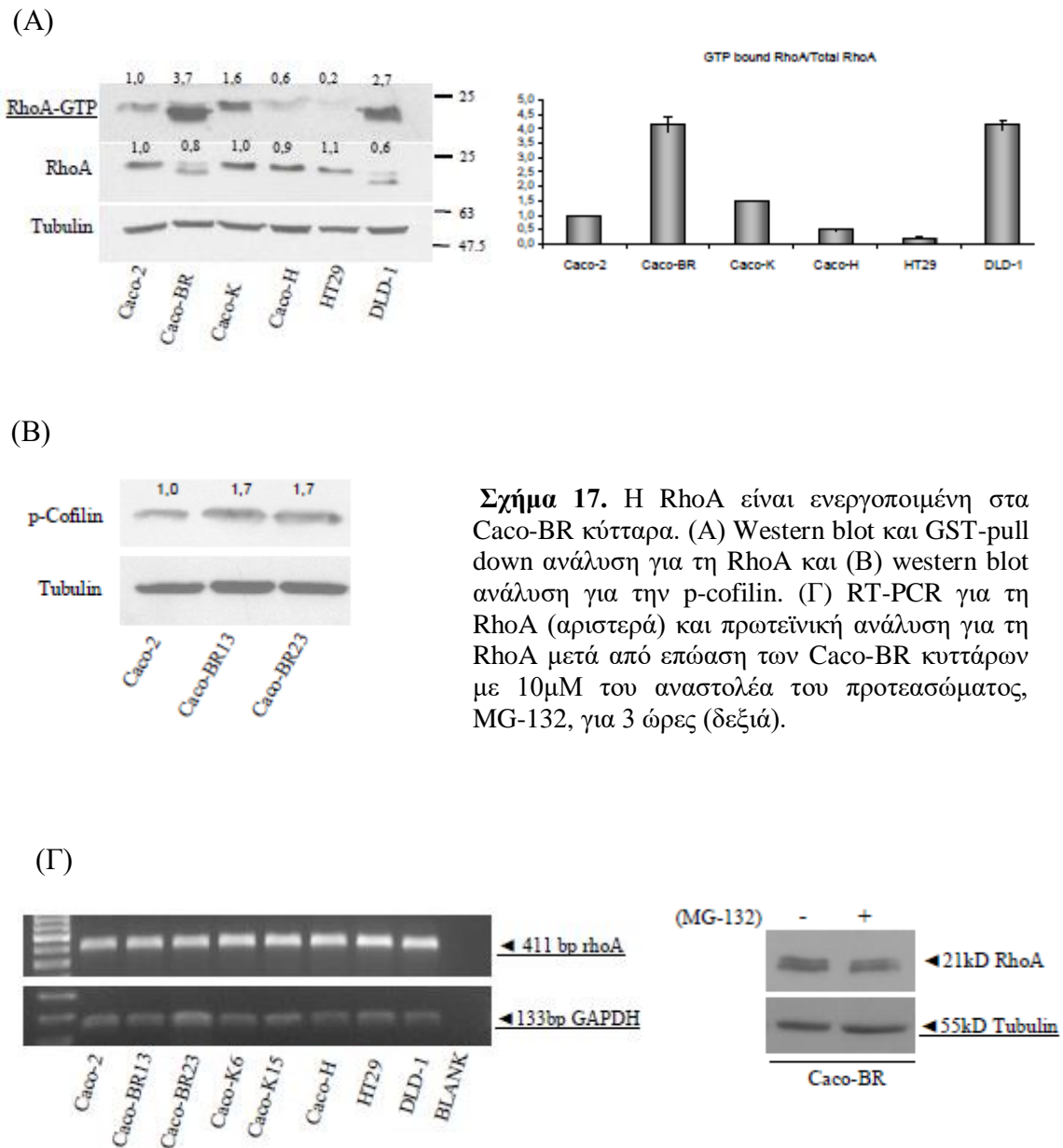
Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, τα ογκογονίδια *BRAF*, *KRAS* και *HRAS* επιδρούν θετικά στην ικανότητα των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου να μεταναστεύουν και να διεισδύουν *in vitro*, και αυτό ισχύει είτε πρόκειται για εξωγενή υπερέκφραση τους (Caco-BR, Caco-K, Caco-H κύτταρα), είτε για μείωση της έκφρασης (HTshBR3, DKO-4 κύτταρα) των ενδογενών ογκογονιδίων.



### 3.2.4 Το ογκογονίδιο *BRAF<sup>V600E</sup>* ενισχύει την ικανότητα των Caco-2 κυττάρων να μεταναστεύουν και να διεισδύουν *in vitro* μέσω ενεργοποίησης της RhoA GTPάσης εξαρτώμενης από τη MEK.

Έλεγχος δραστηριότητας της RhoA έδειξε ότι στα Caco-BR κύτταρα τα επίπεδα της ενεργοποιημένης RhoA είναι ιδιαίτερα αυξημένα συγκριτικά με τα Caco-2 κύτταρα (σχήμα 17A) ενώ η Cdc42 και η Rac1 δεν είναι ενεργοποιημένες στα κύτταρα αυτά (σχήμα 19A και 20A αντίστοιχα). Την ενεργοποίηση της RhoA στα Caco-BR κύτταρα επιβεβαιώνει και ο αυξημένος αριθμός ινιδίων stress στα κύτταρα αυτά (σχήμα 13B), καθώς και αύξηση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης cofilin, η οποία συμμετέχει στο σχημασμό των ινιδίων stress από τη RhoA (σχήμα 17B). Μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι τόσο στα Caco-BR όσο και στα DLD-1 κύτταρα μια δεύτερη ζώνη μικρότερου μοριακού βάρους εμφανίζεται κατά την ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα κατά Western για τη RhoA. Αυτή η επιπλέον ζώνη φαίνεται να αποτελεί την κυρίως ενεργή μορφή της μικρής GTPάσης (σχήμα 17A). Το ίδιο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί σε προηγούμενες μελέτες, όπου αναφέρεται μία επιπλέον ζώνη σε δείγματα όγκων καρκίνου του παχέος εντέρου και του μαστού, ενώ κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται στους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς<sup>55, 104</sup>. Είναι γνωστό ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη RhoA δεν υφίσταται εναλλακτικό μάτισμα, που σημαίνει ότι παράγεται μόνο μία μορφή του αντίστοιχου πρωτεϊνικού μορίου. Για να επιβεβαιωθεί αυτό, έγινε αντίστροφη PCR και όπως φαίνεται στο σχήμα 17Γ (αριστερά) παράγεται μόνο ένα μετάγραφο που αντιπροσωπεύεται από μία ζώνη. Το ενδεχόμενο προτεασωμικής αποικοδόμησης αποκλείστηκε επίσης, καθώς ύστερα από επώαση των Caco-BR κυττάρων με τον αναστολέα του προτεασώματος, MG-132, δεν εξαφανίστηκε η μικρότερου μοριακού βάρους ζώνη (σχήμα 17Γ, δεξιά). Σύμφωνα με τα παραπάνω, η ζώνη αυτή

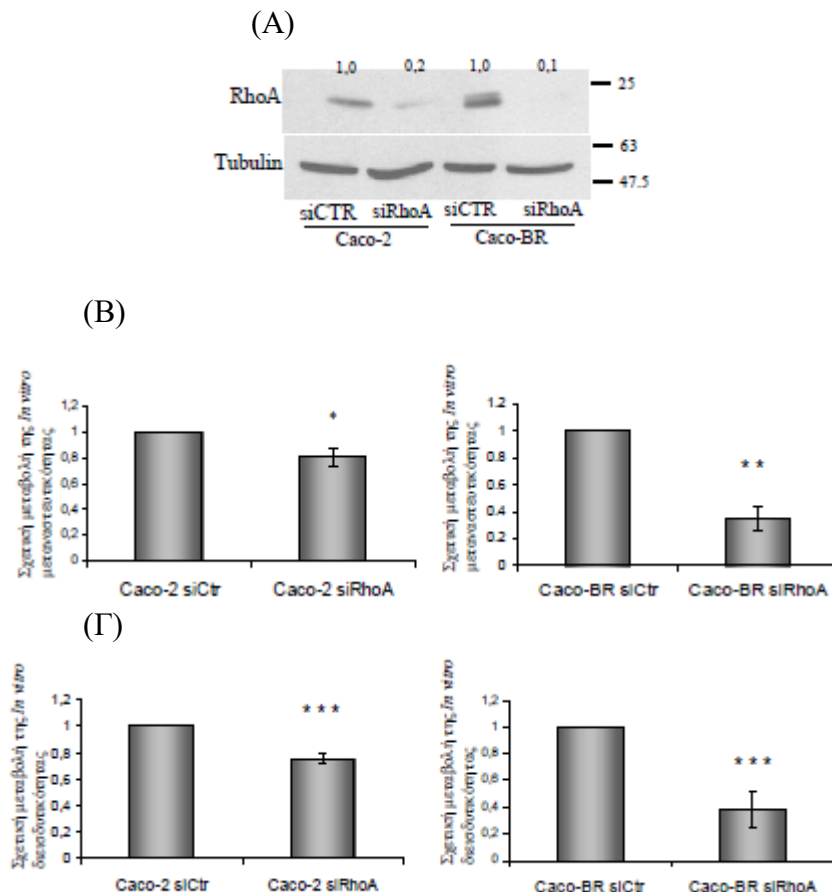
αντιπροσωπεύει πιθανώς κάποιου είδους μετα-μεταφραστική τροποποίηση της RhoA, η οποία όμως συμβαίνει επιλεκτικά στα Caco-BR και DLD-1 κύτταρα.



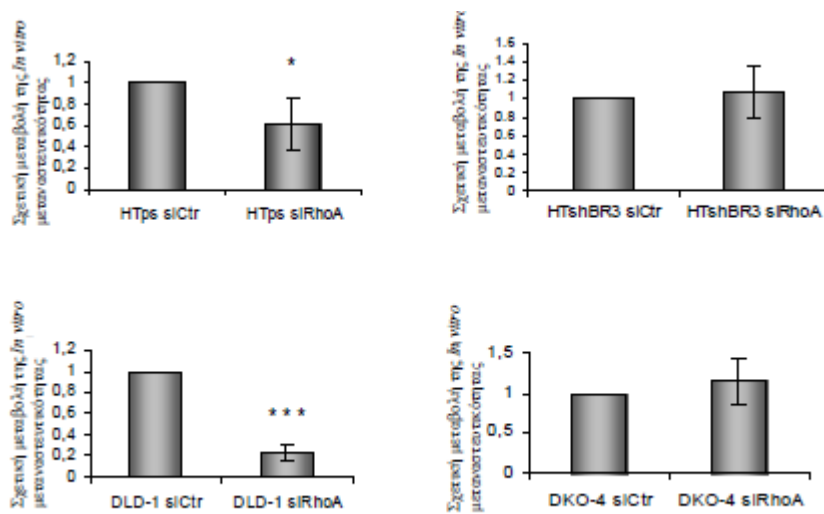
Προκειμένου να διαπιστωθεί ο ρόλος της ενεργοποιημένης RhoA στην ικανότητα μετανάστευσης και διείσδυσης των Caco-BR κυττάρων, έγινε αποσιώπηση του γονιδίου με τη χρήση μικρών ανασταλτικών RNA (siRNA) στα Caco-2 και Caco-BR κύτταρα. Η αποσιώπηση του γονιδίου οδήγησε σε αρκετά μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης όπως φαίνεται στο σχήμα 18A και αυτό είχε σα συνέπεια τη σημαντική

μείωση της μεταναστευτικής και διεισδυτικής ικανότητας των Caco-BR κυττάρων (σχήμα 18B, Γ). Ένα άλλο σημαντικό στοιχείο που προκύπτει από το πείραμα αυτό, είναι ότι μετά από την εφαρμογή της τεχνολογίας siRNA μειώθηκαν εξίσου και οι δύο ζώνες της RhoA στα Caco-BR κύτταρα, αποκλείοντας έτσι την περίπτωση του μη ειδικού σήματος. Στην περίπτωση των Caco-2 κυττάρων, η αποσιώπηση του γονιδίου της RhoA προκάλεσε πολύ μικρότερη μείωση στην κυτταρική μετανάστευση και διείσδυση, γεγονός που υποδηλώνει ότι το μεταλλαγμένο γονίδιο *BRAF* δρα μέσω αυτής της μικρής GTPάσης για να ενισχύσει την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου να μεταναστεύουν και να διεισδύουν *in vitro*.

Σχήμα 18



(Δ)

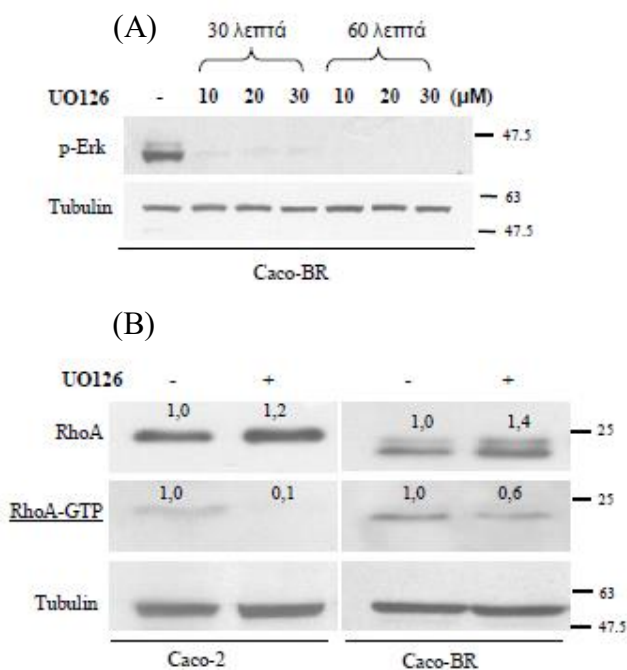


**Σχήμα 18.** Το ογκογονίδιο  $BRAF^{V600E}$  ενισχύει την κυτταρική μετανάστευση και διείσδυση μέσω της RhoA. (Α) Τα Caco-2 και Caco-BR κύτταρα επιμολύνθηκαν με 80pmol siRNA για τη RhoA και 48 ώρες αργότερα πρωτεϊνική ανάλυση επιβεβαιώνει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Αποσιώπηση της RhoA οδήγησε σε σημαντική μείωση της *in vitro* μετανάστευσης (Β) και διείσδυσης (Γ) των Caco-BR κυττάρων. (Δ) Επίδραση του siRNA για τη RhoA στην ικανότητα μετανάστευσης των HTps, HTshBR3, DLD-1 και DKO-4 κυττάρων. \*:  $P \leq 0,05$ , \*\*:  $P \leq 0,01$ , \*\*\*:  $P \leq 0,001$ , σύμφωνα με την ανάλυση Student *t*-test.

Εφ' όσον η RhoA βρέθηκε επίσης ενεργοποιημένη στα DLD-1 κύτταρα, εφαρμόστηκε σε αυτά, καθώς και στα HT29 κύτταρα για τη RhoA η τεχνική αποσιώπησης γονιδιακής έκφρασης με siRNA και εξετάστηκε η μεταναστευτική τους ικανότητα. Τα κύτταρα HTshBR3 και DKO-4 περιλήφθηκαν επίσης σε αυτό το πείραμα προκειμένου να αποκαλυφθεί η σύνδεση των δύο ογκογονιδίων με τη μικρή GTPάση. Όπως φαίνεται στο σχήμα 18Δ, η αποσιώπηση του γονιδίου της RhoA οδήγησε σε σημαντική μείωση της μεταναστευτικότητας στα DLD-1 ( $KRAS^{G13D}$ ) κύτταρα, ενώ στα κύτταρα DKO-4, όπου το ογκογονίδιο  $KRAS^{G13D}$  είναι απόν, δεν παρατηρήθηκε μείωση. Η μείωση της κυτταρικής μετανάστευσης ήταν πολύ μικρότερη στα HTps ( $BRAF^{V600E}$ ) κύτταρα, ενώ καμία μεταβολή δεν παρατηρήθηκε

στα HTshBR3 κύτταρα. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η RhoA παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική μετανάστευση που επάγεται από το μεταλλαγμένο και όχι το φυσιολογικό *KRAS* γονίδιο.

Προκειμένου να εντοπιστεί το μονοπάτι μεταγωγής σήματος που συμμετέχει στην ενεργοποίηση της RhoA στα Caco-BR κύτταρα, χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας της MEK κινάσης (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase) UO126, που είναι ενεργοποιημένη στα κύτταρα αυτά <sup>88</sup> (σχήμα 19). Για να καθοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες επώασης των κυττάρων με τον αναστολέα, ο UO126 επώαστηκε για διαφορετικές συγκεντρώσεις και χρονικά σημεία στα Caco-BR κύτταρα (σχήμα 19A). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των επιπέδων της p-ERK, επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 10 $\mu$ M για το χρονικό διάστημα των 30 λεπτών. Χρησιμοποιήθηκαν τα Caco-2 και Caco-BR κύτταρα, στα οποία μετά την επώαση με τον αναστολέα της MEK εξετάστηκαν τα επίπεδα της ενεργής RhoA (σχήμα 19B). Παρατηρήθηκε ότι τόσο στα Caco-2 όσο και στα Caco-BR κύτταρα τα επίπεδα της ενεργοποιημένης RhoA μειώθηκαν, χωρίς αυτή η μείωση να συνοδεύεται από αντίστοιχη στα συνολικά επίπεδα της μικρής GTPάσης.

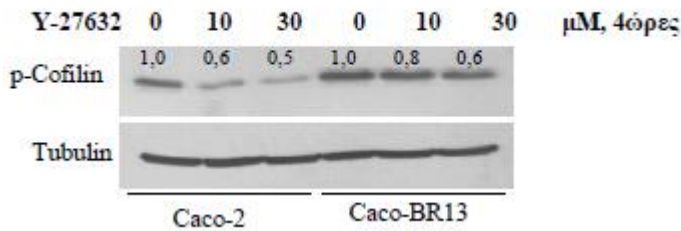


**Σχήμα 19.** Συμμετοχή του MAPK μονοπατιού στην ενεργοποίηση της RhoA. (A) Τα Caco-BR κύτταρα επώαστηκαν με τον αναστολέα της MEK UO126 σε συγκεντρώσεις 10, 20 και 30 $\mu$ M για 30 και 60 λεπτά, προκειμένου να καθοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες αναστολής του μονοπατιού. (B) Μετά από επώαση των Caco-2 και Caco-BR κυττάρων με 10 $\mu$ M του αναστολέα UO126 για 30 λεπτά εξετάστηκαν τα επίπεδα της ενεργής RhoA.

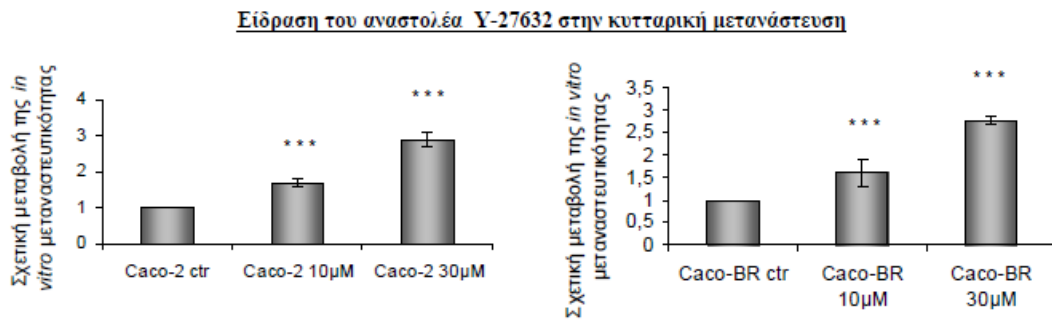
Τα παραπάνω συμπεράσματα υποδηλώνουν ότι στα αδenoκακρινωματικά κύτταρα του παχέος εντέρου η ενεργοποίηση της RhoA εξαρτάται από το μονοπάτι των MEK-ERK κινασών και ότι το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup> χρησιμοποιεί το συγκεκριμένο μονοπάτι για να ενεργοποιήσει τη RhoA.

Δεδομένου ότι η RhoA είναι απαραίτητη για τη μετανάστευση των Caco-BR κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε ειδικός αναστολέας για το μονοπάτι RhoA-Rho κινάση (ROCK), ώστε να διαπιστωθεί αν θα αναστραφεί η αυξημένη μεταναστευτική ικανότητα που απέκτησαν τα κύτταρα αυτά. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας Y-27632 της ROCK (Rho-associated coiled coil forming protein serine/threonine kinase) και εξετάστηκε η ικανότητα μετανάστευσης των Caco-2 και Caco-BR κυττάρων χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της *in vitro* μετανάστευσης με transwells (σχήμα 20). Ο αναστολέας χρησιμοποιήθηκε σε 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις για 4 ώρες και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της p-cofilin, ώστε να επιλεγούν οι καλύτερες συνθήκες αναστολής του μονοπατιού (σχήμα 20A). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι επώαση με 30μM Y-27632 για 4 ώρες οδήγησε σε μια μέτρια μείωση των επιπέδων της p-cofilin τόσο στα Caco-2 όσο και στα Caco-BR κύτταρα (Σχήμα 20A). Σε αυτές τις συνθήκες εξετάστηκε η επίδραση του αναστολέα της ROCK στη μεταναστευτικότητα των κυττάρων αυτών (σχήμα 20B). Παροδόξως, όπως φαίνεται στο σχήμα 20B, η μετανάστευση των κυττάρων μετά από επώαση 4 ωρών με 30μM Y-27632 αυξήθηκε σημαντικά. Προηγούμενες μελέτες έχουν επίσης αποδείξει ότι επεξεργασία ανθρώπινων ενδομήτριων κυττάρων (hESCs) καθώς και ινοβλαστών ποντικών (NIH 3T3) με Y-27632, οδήγησε σε ενίσχυση της κυτταρικής κίνησης<sup>105,106</sup>. Μια πιθανή εξήγηση για αυτό το αντιφατικό αποτέλεσμα είναι ότι ο αναστολέας Y27632 παρεμποδίζοντας την ανασταλτική δράση της ROCK ως προς την ενεργοποίηση της Rac1, οδηγεί σε ενεργοποίηση αυτής της GTPάσης, γεγονός που ενισχύει την κυτταρική μετανάστευση<sup>107</sup>.

(A)



(B)



**Σχήμα 20.** Επίδραση του αναστολέα του μονοπατιού RhoA-Rho κινάση στη μεταναστευτική ικανότητα των Caco-BR κυττάρων. (A) Η αποτελεσματικότητα του αναστολέα Y-27632 εξετάστηκε στα Caco-2 και Caco-BR κύτταρα για διάφορες συγκεντρώσεις μέσω των επιπέδων της p-cofilin (B) Τα Caco-2 και Caco-BR κύτταρα επώαστηκαν με 30 μM Y-27632 για 4 ώρες και εξετάστηκε η μεταναστευτική τους ιδιότητα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο κυτταρικής μετανάστευσης με transwells \*:  $P \leq 0,05$ , \*\*:  $P \leq 0,01$ , \*\*\*:  $P \leq 0,001$ , σύμφωνα με την ανάλυση Student *t*-test.

### 3.2.5 Το ογκογονίδιο *KRAS*<sup>G12V</sup> επάγει την *in vitro* ικανότητα μετανάστευσης και διείσδυσης των Caco-2 κυττάρων μέσω ενεργοποίησης της Cdc42 από το μονοπάτι PI3K.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες οι μικρές GTPάσες RhoA, Rac1 και Cdc42 είναι απαραίτητες για το μετασχηματισμό ινοβλαστών ποντικού και αρουραίου από το ογκογονίδιο *RAS*<sup>108, 57</sup>. Στην περίπτωση των Caco-K κυττάρων, όπου

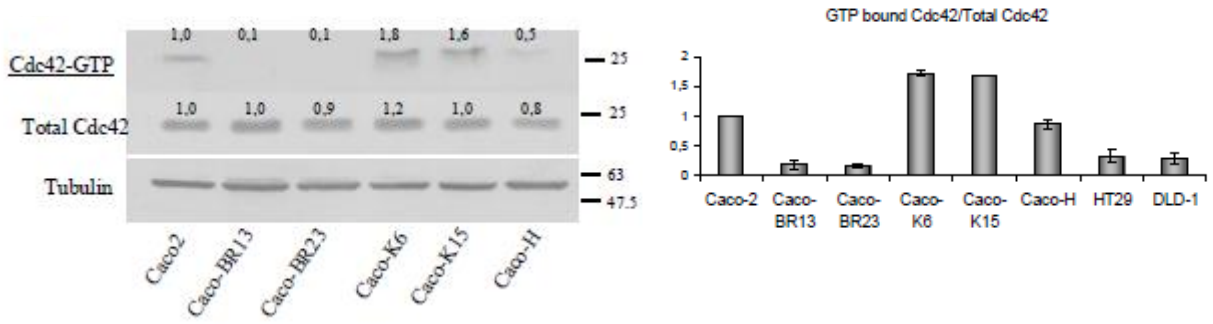
εκφράζεται η ογκοπρωτεΐνη KRAS<sup>G12V</sup>, παρατηρήθηκε σημαντική ενεργοποίηση των Cdc42 και Rac1 συγκριτικά με τα πατρικά Caco-2 κύτταρα (σχήμα 21A και 23A αντίστοιχα). Σε συμφωνία με την υψηλή ενεργοποίηση της Cdc42 είναι η παρουσία μεγάλου αριθμού φιλοποδίων στα Caco-K κύτταρα, όπως έδειξε πείραμα ανοσοφθορισμού για την πρωτεΐνη Fascin, η οποία αποτελεί δείκτη για αυτούς τους κυτταροσκελετικούς σχηματισμούς (σχήμα 21B αριστερά, βέλος). Αν και τα επίπεδα έκφρασης της Fascin δε φαίνεται να άλλαξαν στα Caco-K κύτταρα συγκριτικά με τα Caco-2, (σχήμα 21B, δεξιά), παρ' όλα αυτά απέκτησαν μεγάλο αριθμό φιλοποδίων σχετικά μικρού μήκους, ενώ στα Caco-BR και Caco-H κύτταρα δημιουργήθηκαν λιγότερα και μεγαλύτερου μεγέθους φιλοπόδια, τα οποία φαίνεται να ακολουθούν την κατεύθυνση της κίνησης (σχήμα 21B, βέλη). Οι παρατηρήσεις αυτές καθώς και η ιδιαίτερα αυξημένη κινητικότητα των Caco-BR και Caco-H κυττάρων οδηγούν στο συμπέρασμα ότι είναι πιθανό το μήκος και η θέση των φιλοποδίων να σχετίζονται με την κυτταρική κίνηση και όχι ο αριθμός τους.

Ο ρόλος της Cdc42 στη μεταναστευτικότητα και τη διεισδυτικότητα των Caco-K κυττάρων εξετάσθηκε αποσιωπώντας αυτήν τη GTPάση με τη χρήση κατάλληλου siRNA. Στο σχήμα 21Γ φαίνεται η μείωση της Cdc42 σε πρωτεϊνικό επίπεδο τόσο στα Caco-K όσο και στα Caco-2 κύτταρα. Αν και η μείωση των επιπέδων της Cdc42 στα Caco-2 κύτταρα ήταν μεγαλύτερη από αυτή στα Caco-K (σχήμα 21Γ), εντούτοις η μείωση της *in vitro* μετανάστευσης και διείσδυσης ήταν σαφώς μεγαλύτερη στα Caco-K κύτταρα (σχήμα 21Δ,Ε). Τα παραπάνω ευρήματα δείχνουν ότι το ογκογονίδιο KRAS<sup>G12V</sup> ρυθμίζει τις δύο αυτές κυτταρικές ιδιότητες μέσω ενεργοποίησης της Cdc42 GTPάσης.

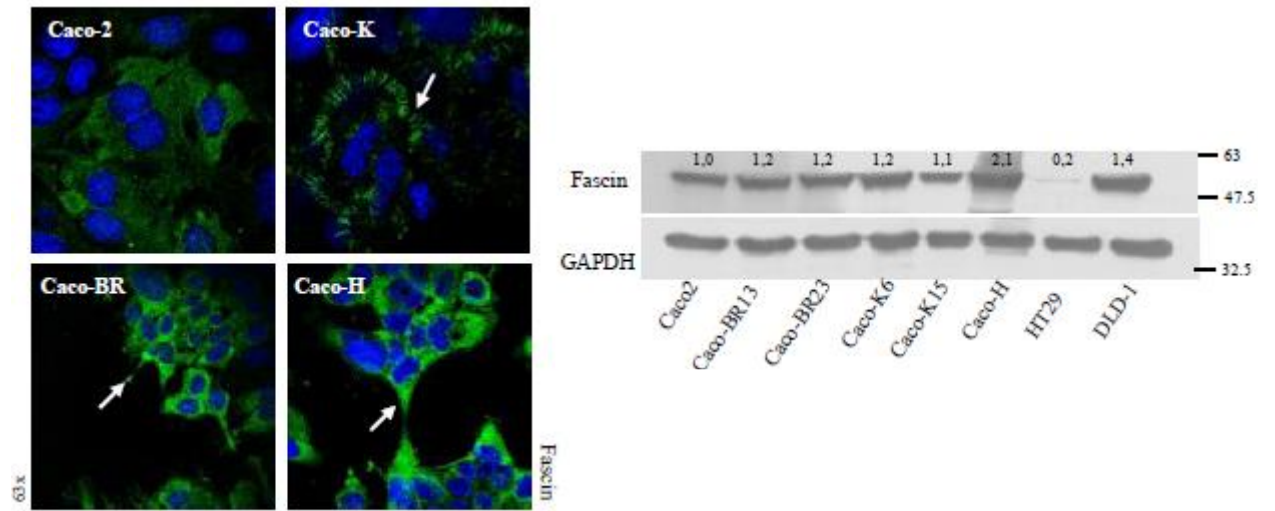


Σχήμα 21

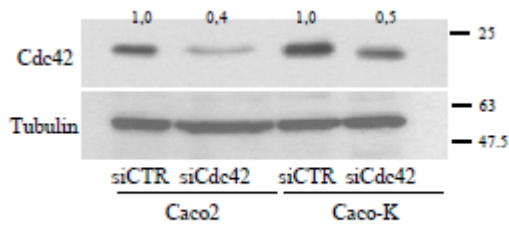
(A)

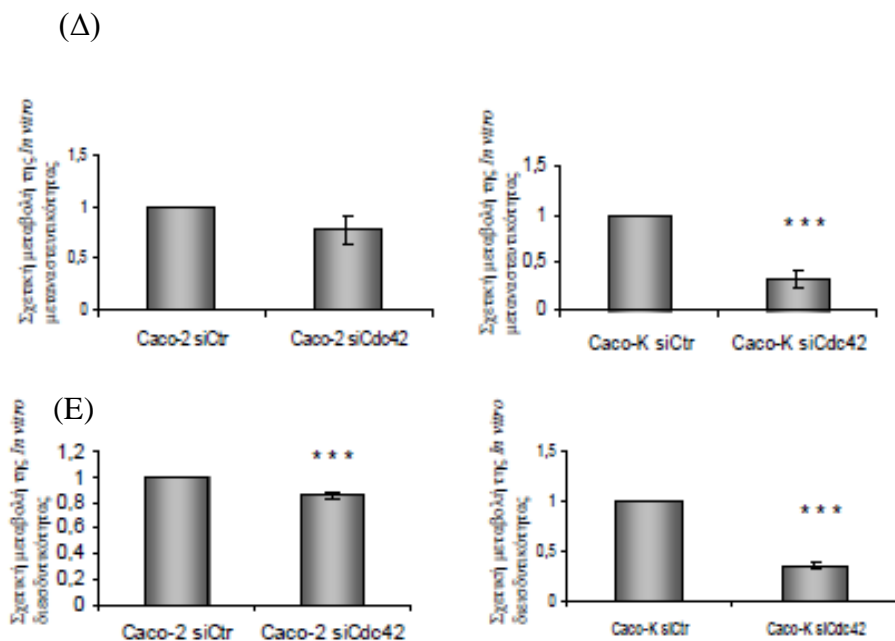


(B)



(Γ)

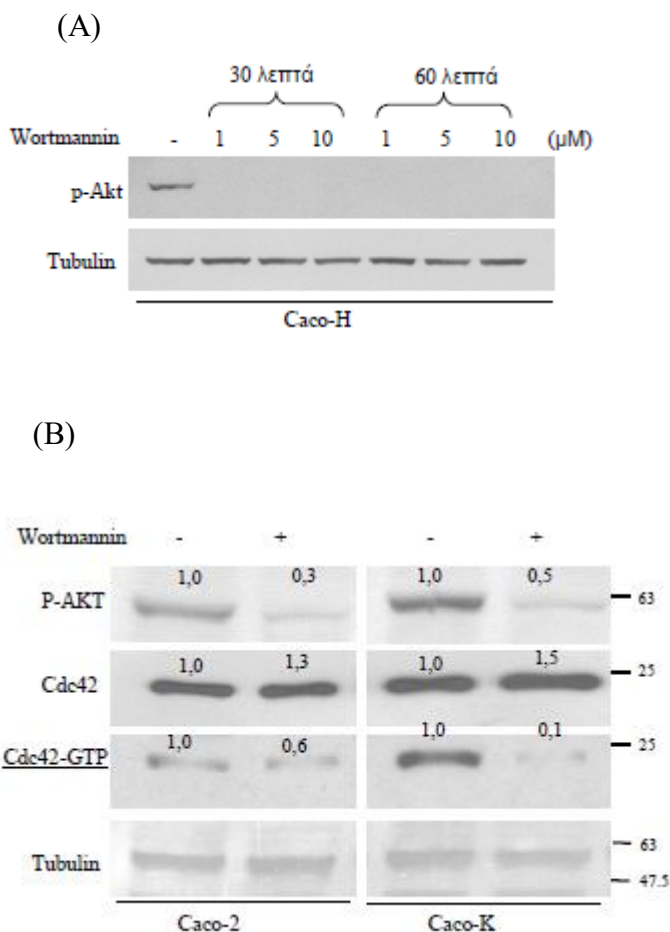




**Σχήμα 21.** Το ογκογονίδιο  $KRAS^{G12V}$  ρυθμίζει τη μεταναστευτικότητα και διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου μέσω ενεργοποίησης της Cdc42 GTPάσης. (A) Western blot και GST-pull down ανάλυση για τη Cdc42. (B) Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας από πείραμα ανοσοφθορισμού για την πρωτεΐνη Fascin, δείκτη των φιλοποδίων (αριστερά) και πρωτεϊνική ανάλυση της Fascin (δεξιά). (Γ) Τα Caco-2 και Caco-K κύτταρα επιμολύνθηκαν με 160pmol siRNA για τη Cdc42 και 48 ώρες αργότερα πρωτεϊνική ανάλυση επιβεβαιώνει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Μείωση των επιπέδων της Cdc42 οδήγησε σε σημαντική μείωση της *in vitro* μετανάστευσης (Δ) και διείσδυσης (E) των Caco-K κυττάρων. \*:  $P \leq 0,05$ , \*\*:  $P \leq 0,01$ , \*\*\*:  $P \leq 0,001$ , σύμφωνα με την ανάλυση Student *t*-test.

Προκειμένου να βρεθεί ο μηχανισμός μεταγωγής σήματος που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της Cdc42 στα Caco-K κύτταρα, πραγματοποιήθηκε αναστολή του PI3K μονοπατιού, το οποίο είναι ενεργό στα κύτταρα αυτά<sup>81, 88</sup>. Χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας της PI3K, Wortmanin, του οποίου η αποτελεσματικότητα ελέγχθηκε στα Caco-H κύτταρα, καθώς σε αυτά τα κύτταρα το μονοπάτι είναι ιδιαίτερα ενεργό<sup>81</sup> (σχήμα 22A). Στη συνέχεια, τα Caco-2 και Caco-K κύτταρα επωάστηκαν με Wortmanin σε συγκέντρωση 1μM για μισή ώρα και εξετάστηκε η ενεργοποίηση της Cdc42 (σχήμα 22B). Αναστολή του PI3K μονοπατιού οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων της ενεργής Cdc42 κυρίως στα Caco-K κύτταρα, προτείνοντας πως στα  $KRAS^{G12V}$ -μετασηματισμένα κύτταρα το μονοπάτι αυτό είναι ίσως σημαντικό για τις Cdc42-εξαρτώμενες μεταναστευτικές

και διεισδυτικές ικανότητές τους. Είναι ενδιαφέρον ότι το ογκογονίδιο *KRAS* προσδίδει στα Caco-2 κύτταρα χαρακτηριστικά κυτταρικής γήρανσης, ενώ παράλληλα επάγει την ικανότητα μετανάστευσης και διείσδυσης.



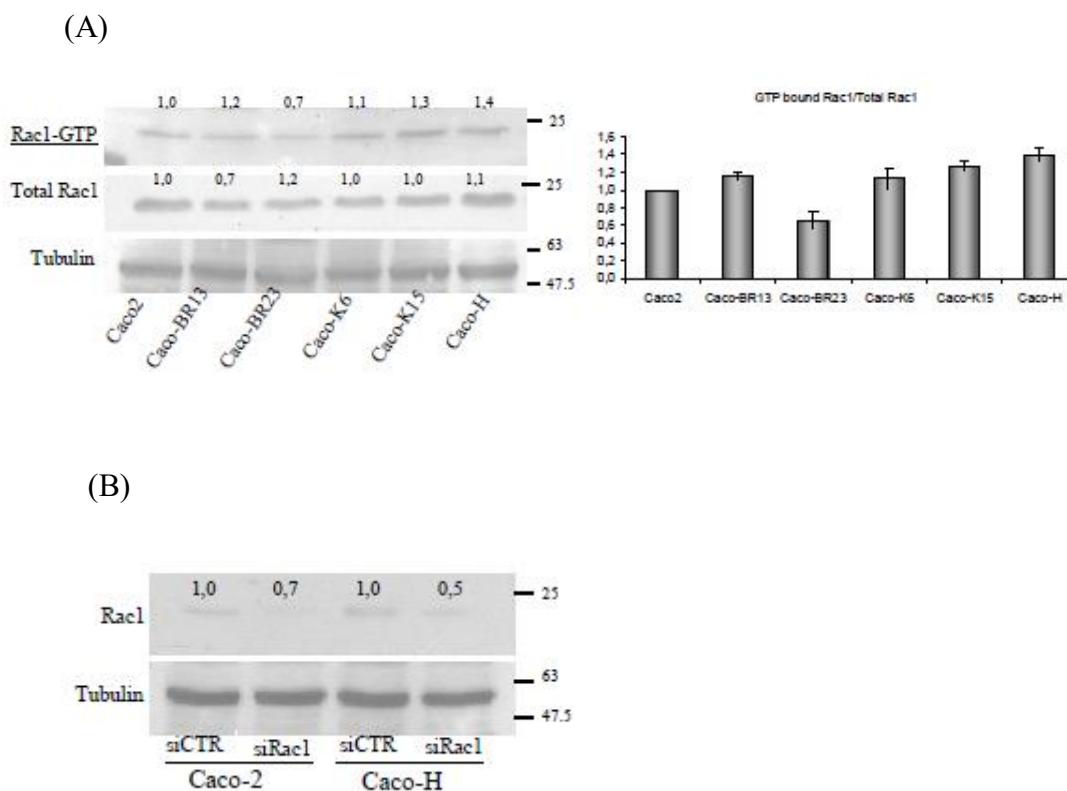
**Σχήμα 22.** Συμμετοχή του PI3K μονοπατιού στην ενεργοποίηση της Cdc42. (A) Τα Caco-H κύτταρα επωάστηκαν με τον αναστολέα της κινάσης PI3K, Wortmannin σε συγκεντρώσεις 1, 5 και 10μM για 30 και 60 λεπτά, προκειμένου να καθοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες αναστολής του μονοπατιού. (B) Μετά από επώαση των Caco-2 και Caco-K κυττάρων με 1μM του αναστολέα Wortmannin για 30 λεπτά εξετάστηκαν τα επίπεδα της ενεργής Cdc42.

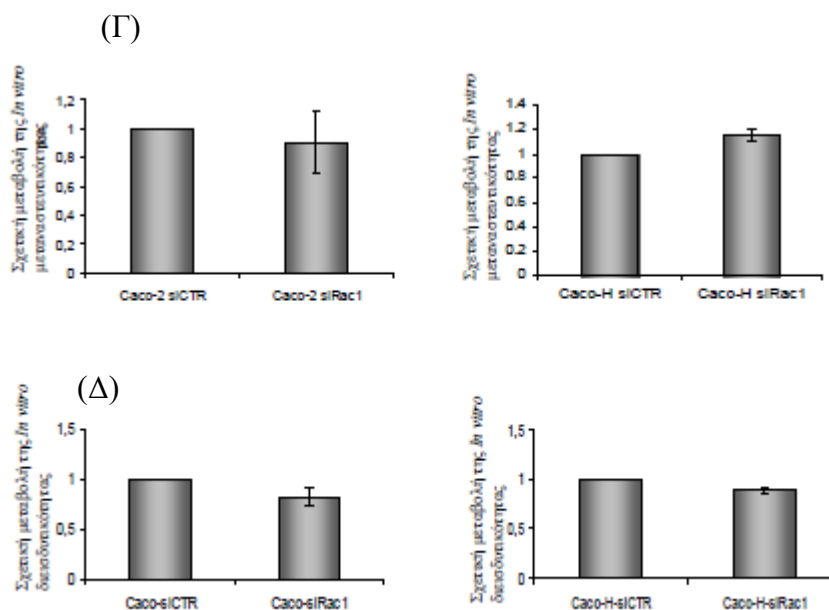
### 3.2.6 Το ογκογονίδιο *HRAS<sup>G12V</sup>* ενεργοποιεί τη Rac1 GTPάση και αυξάνει σημαντικά την έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την Επιθηλιακή-Μεσεγχυματική μετάβαση (EMT).

Όπως έχει δειχθεί στο παρελθόν, η Rac1 GTPάση συμμετέχει στην επαγωγή του φαινομένου επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση σε μαστικά κύτταρα ποντικού<sup>109, 110</sup>. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η ενεργοποίηση της Rac1 και

βρέθηκε ενεργοποιημένη στα Caco-K και Caco-H κύτταρα, όχι όμως και στα Caco-2 (σχήμα 23A). Προκειμένου να διαπιστωθεί ο ρόλος αυτής της GTPάσης στη μεταναστευτικότητα και τη διεισδυτικότητα των Caco-H κυττάρων, εφαρμόστηκε η τεχνολογία siRNA και επιτεύχθηκε μείωση της έκφρασης της Rac1 σε πρωτεϊνικό επίπεδο (σχήμα 23B). Η μείωση της έκφρασης της Rac1 όμως, δεν επηρέασε την ικανότητα των κυττάρων αυτών να μεταναστεύουν και να διεισδύουν *in vitro* (σχήμα 23Γ, Δ), που σημαίνει ότι στα Caco-H κύτταρα η Rac1 δεν είναι απαραίτητη για τις λειτουργίες αυτές, ή ότι και άλλα μόρια εμπλέκονται. Επιπρόσθετα, η μερική (50%) μείωση των επιπέδων της Rac1 που επιτεύχθηκε με την τεχνολογία siRNA, ίσως ευθύνεται για το αποτέλεσμα αυτό.

**Σχήμα 23**

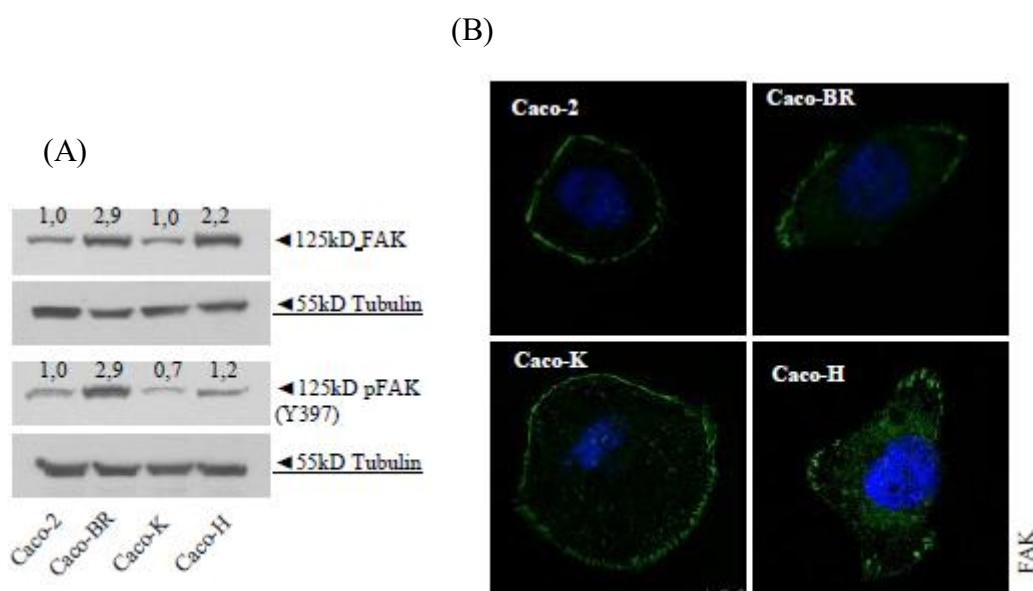




**Σχήμα 23.** Το ογκογονίδιο *HRAS*<sup>G12V</sup> ενεργοποιεί τη Rac1 GTPάση. (Α) Πρωτεϊνική ανάλυση και GST-pull down ανάλυση για τη Rac1. (Β) Τα Caco-2 και Caco-H κύτταρα επιμολύνθηκαν με 160pmol siRNA για τη Rac1 και 48 ώρες αργότερα η πρωτεϊνική ανάλυση επιβεβαιώνει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Μείωση των επιπέδων της Rac1 δεν προκάλεσε μείωση της *in vitro* μετανάστευσης (Γ) και διείσδυσης (Δ) των Caco-H κυττάρων. \*:  $P \leq 0,05$ , \*\*:  $P \leq 0,01$ , \*\*\*:  $P \leq 0,001$ , σύμφωνα με την ανάλυση Student *t*-test.

Προκειμένου να εντοπιστούν άλλα μόρια που συμμετέχουν στην *HRAS*<sup>G12V</sup>-επαγόμενη επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση, εξετάσθηκε η κινάση εστιακής προσκόλλησης (Focal Adhesion Kinase, FAK), καθώς είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στη διαδικασία αυτή μέσω ρύθμισης της Rac1<sup>111</sup>. Τα επίπεδα έκφρασης της κινάσης αυτής βρέθηκαν αυξημένα στα Caco-H κύτταρα καθώς και στα Caco-BR. Όταν όμως ελέγχθηκε η φωσφορυλίωση Y397 (τυροσίνη 397) της πρωτεΐνης FAK, η οποία είναι σημαντική για την κυτταρική επιβίωση και μετανάστευση<sup>78</sup>, βρέθηκε αυξημένη στα Caco-BR και όχι στα Caco-H κύτταρα (σχήμα 21Α). Ανάλυση με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας έδειξε ότι οι εστιακές προσκολλήσεις (focal adhesions) κατανέμονται στα Caco-H κύτταρα με τρόπο που πιθανώς να εξυπηρετεί την κυτταρική κίνηση, καθώς πρόκειται για λίγες μεγάλες εστιακές προσκολλήσεις, οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στο πρόσθιο και οπίσθιο άκρο του κυττάρου (σχήμα

21B). Πρέπει να σημειωθεί ότι η ίδια εικόνα παρατηρείται και στα Caco-BR κύτταρα, τα οποία όπως αναφέρθηκε παραπάνω, εμφανίζουν αρκετά αυξημένη κινητικότητα. Οι εστίες προσκόλλησης είναι δυναμικές δομές και δημιουργούνται όταν το κύτταρο προσκολλάται σε μία επιφάνεια και αποδιοργανώνονται κατά την κυτταρική κίνηση, με αποτέλεσμα η κινητικότητα των κυττάρων να είναι αντιστρόφως ανάλογη του αριθμού των εστιακών προσκολλήσεων <sup>112</sup>. Στο σχήμα 21B φαίνεται ότι στα Caco-2 και Caco-K κύτταρα, τα οποία εμφανίζουν μικρότερη κινητικότητα συγκριτικά με τα Caco-BR και Caco-H κύτταρα, οι εστίες προσκόλλησης είναι πολύ περισσότερες και κατανέμονται σε όλη την περιφέρεια του κυττάρου.



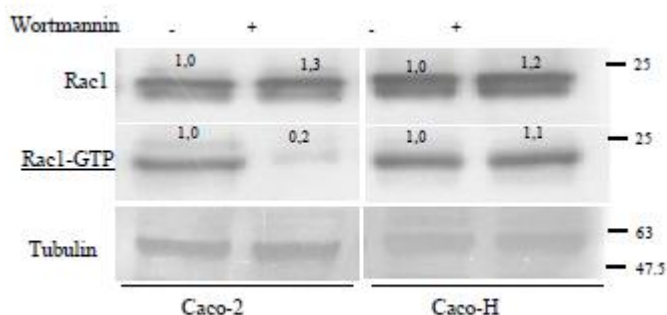
**Σχήμα 24.** Το ογκογονίδιο *HRAS<sup>G12V</sup>* αυξάνει την έκφραση της κινάσης εστιακών προσκολλήσεων (FAK) (A) Πρωτεϊνική ανάλυση της κινάσης εστιακών προσκολλήσεων και της φωσφορυλίωσής της Y397. (B) Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας δείχνουν την κατανομή των εστιών προσκόλλησης στα Caco-2, Caco-BR, Caco-K και Caco-H κύτταρα.

Επιπρόσθετα, στα Caco-H κύτταρα βρέθηκε αυξημένη η έκφραση της πρωτεΐνης Fascin (σχήμα 21B), η οποία έχει δείχθει ότι μπορεί να χρησιμεύει ως δείκτης για πιο επιθετικά αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου <sup>67</sup>. Είναι λοιπόν εμφανές ότι τα Caco-H κύτταρα έχουν αποκτήσει μια πληθώρα μεσεγχυματικών χαρακτηριστικών, αλλάζοντας τη ρύθμιση καθοριστικών μορίων όπως E-καντερίνη, βιμεντίνη, Fascin,

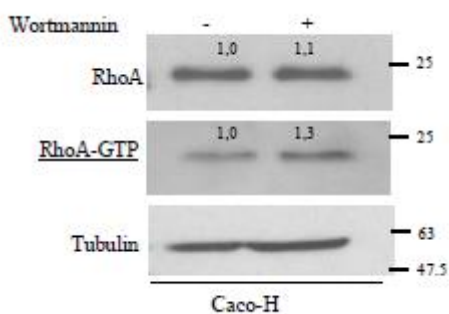
κινάση εστιακών προσκολλήσεων και Rac1. Ίσως για το λόγο αυτό η μερική αποσιώπηση της GTPάσης Rac1 δεν ήταν αρκετή για να μειώσει την κυτταρική μετανάστευση και διείσδυση στα κύτταρα αυτά, κάτι το οποίο μπορεί να επιτευχθεί αν περισσότερα από αυτά τα μόρια-κλειδιά ανασταλούν.

Το μονοπάτι της PI3K κινάσης παρεμποδίστηκε στα Caco-H κύτταρα με τη χρήση του ειδικού αναστολέα wortmanin, ώστε να ελεγχθεί η συμμετοχή του μονοπατιού στην ενεργοποίηση της Rac1 στα κύτταρα αυτά (σχήμα 25). Παρατηρήθηκε ότι έπειτα από αναστολή του PI3K μονοπατιού, η ενεργή μορφή της Rac1 μειώθηκε σημαντικά στα Caco-2 κύτταρα, ενώ στα Caco-H η ενεργοποίηση της μοκρής GTPάσης δε μεταβλήθηκε (σχήμα 25A). Παράλληλα, ελέγχθηκε στα Caco-H κύτταρα εάν η αναστολή του μονοπατιού της PI3K οδηγεί σε ενεργοποίηση της RhoA, η οποία στα κύτταρα αυτά είναι σχεδόν καθόλου ενεργοποιημένη (σχήμα 17A). Όπως φαίνεται στο σχήμα 25B, η ενεργή RhoA είναι ελάχιστα αυξημένη μετά τη χρήση του αναστολέα wortmanin. Όπως είναι γνωστό οι GTPάσες Rac1 και RhoA έχουν ανταγωνιστική δράση<sup>113, 114</sup> και ίσως το γεγονός ότι στα Caco-H κύτταρα η Rac1 εξακολουθεί να είναι ενεργή ακόμα και μετά την αναστολή του PI3K μονοπατιού, να ευθύνεται για αυτή την ελάχιστη ενεργοποίηση της RhoA.

(A)



(B)



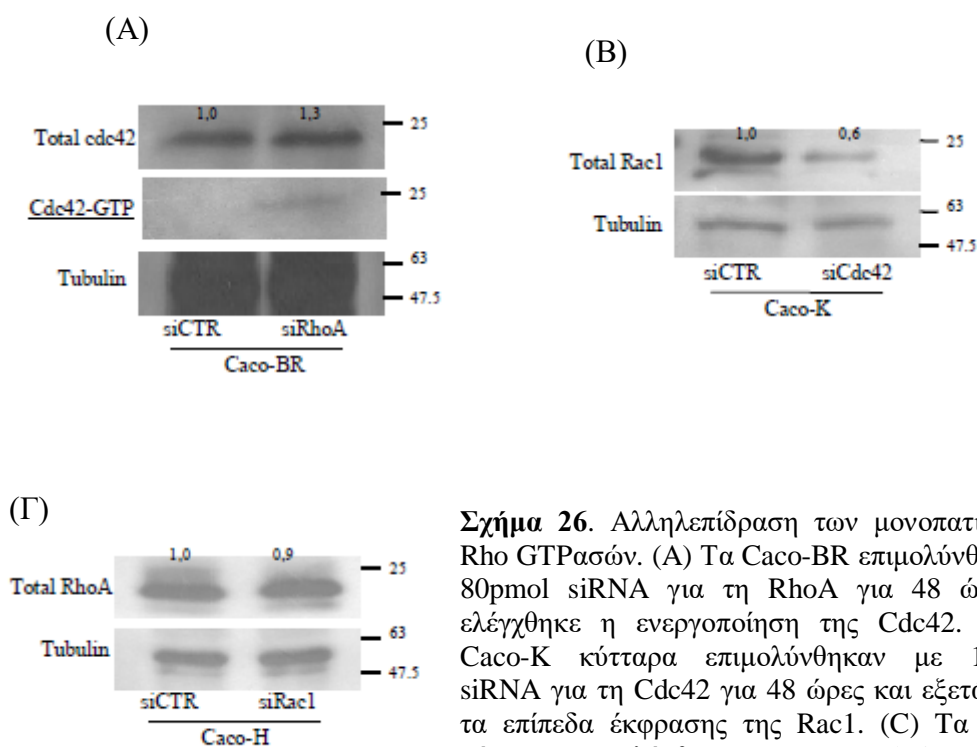
**Σχήμα 25.** Συμμετοχή του PI3K μονοπατιού στην ενεργοποίηση της Rac1. (A) Τα Caco-2 και Caco-H κύτταρα επωάστηκαν με τον αναστολέα της κινάσης PI3K, Wortmannin σε συγκεντρώση 1μM για 30 λεπτά και εξετάστηκαν τα επίπεδα της ενεργής Rac1. (B) Η ίδια διαδικασία έγινε στα Caco-H κύτταρα και στη συνέχεια εξετάστηκε η ενεργοποίηση της RhoA.

### 3.2.7 Αλληλεπίδραση και επικοινωνία μεταξύ των μονοπατιών των Rho GTPασών

Είναι γνωστό ότι οι Rho GTPάσες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σε πολλά κυτταρικά συστήματα, ώστε να επιτευχθεί μια συγκεκριμένη ισορροπία, απαραίτητη τόσο για τα φυσιολογικά όσο και για τα καρκινικά κύτταρα. Η επίδραση της αποσιώπησης συγκεκριμένων μικρών GTPασών στη ρύθμιση της έκφρασης και ενεργοποίησης των άλλων μελών της οικογένειας ελέγχθηκε στο σύστημά μας (σχήμα 26). Συγκεκριμένα, επιμόλυνση των Caco-BR κυττάρων με siRNA για τη RhoA οδήγησε σε σημαντική αύξηση της ενεργής μορφής της Cdc42 (σχήμα 26A), προτείνοντας μια ανταγωνιστική σχέση ανάμεσα στις δύο αυτές GTPάσες στα



κύτταρα αυτά. Επιπλέον, αποσιώπηση της Cdc42 στα Caco-K κύτταρα οδήγησε σε μείωση των επιπέδων έκφρασης της Rac1 (σχήμα 26B), ενώ μείωση της Rac1 στα Caco-H κύτταρα δεν επηρέασε την έκφραση της RhoA στα κύτταρα αυτά (σχήμα 26Γ). Τα παραπάνω αποτελέσματα φανερώνουν αλληλεπίδραση ανάμεσα στα μονοπάτια των 3 GTPασών, η οποία ενδεχομένως να επηρεάζεται από τα τρία υπό μελέτη ογκογονίδια.



**Σχήμα 26.** Αλληλεπίδραση των μονοπατιών των Rho GTPασών. (A) Τα Caco-BR επιμολύνθηκαν με 80pmol siRNA για τη RhoA για 48 ώρες και ελέγχθηκε η ενεργοποίηση της Cdc42. (B) Τα Caco-K κύτταρα επιμολύνθηκαν με 160pmol siRNA για τη Cdc42 για 48 ώρες και εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης της Rac1. (C) Τα Caco-H κύτταρα επιμολύνθηκαν με 160pmol siRNA για τη Rac1 και εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης της RhoA

### 3.2.8 Τα ογκογονίδια *BRAF<sup>FV600E</sup>* και *KRAS<sup>G12V</sup>* συνεργάζονται με τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού β-1 (Transforming Growth Factor β-1, TGFβ-1) για να ενισχύσουν το μετασχηματισμό των Caco-2 κυττάρων.

Αφού το ογκογονίδιο *KRAS<sup>G12V</sup>* δεν κατόρθωσε να μετασχηματίσει πλήρως τα Caco-2 κύτταρα, εξετάστηκε η υπόθεση της συνεργασίας του ογκογονιδίου με τον αυξητικό παράγοντα TGFβ-1 (σχήμα 27). Τα μετασχηματισμένα (Caco-BR και Caco-K) καθώς και τα πατρικά κύτταρα (Caco-2) επώαστηκαν με τον παράγοντα αυτό για 14 μέρες και στη συνέχεια παρατηρήθηκε η μορφολογία των κυττάρων με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας και έπειτα από χρώση με φαλλοϊδίνη. Στο σχήμα 27Α φαίνεται ότι ο TGFβ-1 προκάλεσε αλλαγές στη μορφολογία των Caco-K αλλά όχι των Caco-2 και Caco-BR κυττάρων (τα οποία ήδη έχουν αλλάξει μορφολογία συγκριτικά με τα πατρικά Caco-2). Επιπρόσθετα, ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης και ο εντοπισμός της E-καντερίνης. Στο σχήμα 27B παρουσιάζεται η ανάλυση της πρωτεϊνική της έκφρασης, όπου έχει γίνει διαμερισματοποίηση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε κυτταροπλασματικά (Soluble, S) και σε μεμβρανικά (Insoluble, I), ώστε να προσδιοριστεί και να διαχωριστεί η πιθανή επίδραση του αυξητικού παράγοντα TGFβ-1 στην κατανομή της E-καντερίνης. Όπως φαίνεται η μεμβρανική (I) E-καντερίνη μειώθηκε στα Caco-2 και Caco-K κύτταρα μετά από κατεργασία με TGFβ-1, αλλά στα Caco-K κύτταρα η μείωση είναι πιο έντονη. Αν και δεν άλλαξαν τα επίπεδα έκφρασης της E-καντερίνης σε επίπεδο συνολικής πρωτεΐνης στα Caco-BR κύτταρα, εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας με αντίσωμα για την E-καντερίνη, έδειξαν μείωση στα διακυτταρικά σημεία επαφής καθώς και αποικοδόμησή της (σχήμα 27B, βέλη).

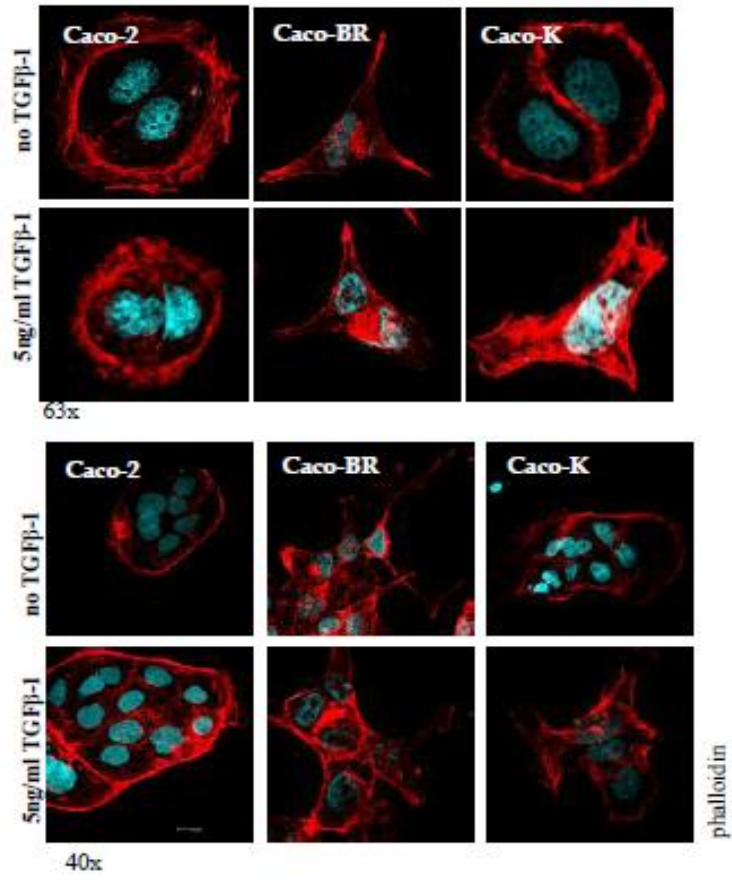
Έγινε έλεγχος της επίδρασης του TGFβ-1 στην *in vitro* μεταναστευτική και διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων (σχήμα 27Γ και Δ). Ο αυξητικός παράγοντας αύξησε την ικανότητα των Caco-BR κυττάρων να διεισδύουν, ενώ δεν είχε κάποια

επίδραση στην κυτταρική μετανάστευση. Τα Caco-2 και Caco-K κύτταρα δεν επηρεάστηκαν από τον TGFβ-1 όσον αφορά αυτές τις δύο κυτταρικές ιδιότητες, παρόλο που στα Caco-K επέφερε μορφολογικές αλλαγές. Η ενίσχυση της διεισδυτικής ικανότητας των Caco-BR κυττάρων από τον αυξητικό παράγοντα είναι ανεξάρτητη από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς επώαση των κυττάρων με αυτόν δεν επιδρά στον πολλαπλασιασμό τους (σχήμα 27Δ). Συνολικά, αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι διαφορετική συνεργασία του αυξητικού παράγοντα TGFβ-1 με τα ογκογονίδια *KRAS*<sup>G12V</sup> και *BRAF*<sup>V600E</sup> μπορεί να οδηγήσει σε πιο αποτελεσματικό μετασχηματισμό των Caco-2 κυττάρων.

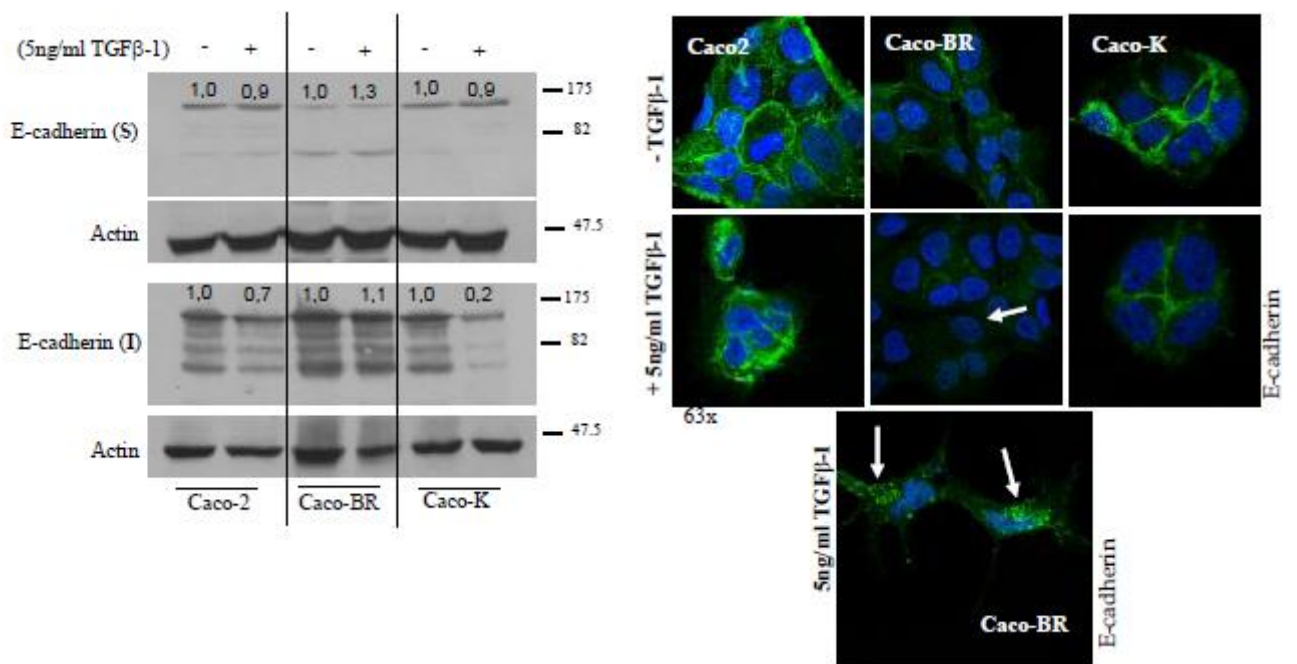
Σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη, η μετάλλαξη D351H στο καρβοξυτελικό άκρο της Smad4 πρωτεΐνης, που εντοπίζεται στα Caco-2 κύτταρα, οδηγεί στην πλήρη έλλειψη δραστηριότητας της Smad4 σε αυτά τα κύτταρα <sup>115</sup>. Εντούτοις, εκτός από το μονοπάτι μεταγωγής σήματος μέσω των Smad πρωτεϊνών, ο αυξητικός παράγοντας TGF-β1, έχει αποδειχθεί ότι δρα μέσω εναλλακτικών μονοπατιών, όπως οι Rho GTPάσες και οι MAP Κινάσες <sup>116, 117, 118</sup>. Προκειμένου να ελεγχθεί εάν αυτό συμβαίνει στο σύστημά μας, τα Caco-2, Caco-BR και Caco-K κύτταρα επώαστηκαν με τον TGF-β1 και εξετάστηκε η ενεργοποίηση της RhoA (σχήμα 27ΣΤ). Διαπιστώθηκε ότι παρουσία του αυξητικού παράγοντα, ενισχύθηκε η ενεργοποίηση της RhoA καθώς και η φωσφορυλίωση της ERK, γεγονός που υποδηλώνει πως στο σύστημά μας ο TGF-β1 δρα μέσω αυτών των μονοπατιών. Πρέπει να σημειωθεί ότι στα Caco-2 κύτταρα, παρόλο που τα μονοπάτια αυτά ενεργοποιήθηκαν παρουσία του TGF-β1, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στη μορφολογία και τη μεταναστευτική και διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων. Αυτό σημαίνει πως είναι απαραίτητη η συνεργασία αυξητικού παράγοντα και ογκογονιδίου προκειμένου τα κύτταρα να αποκτήσουν πιο «επιθετικό» φαινότυπο.

Σχήμα 27

(A)

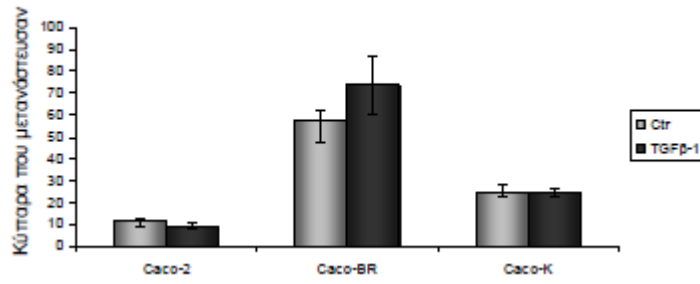


(B)

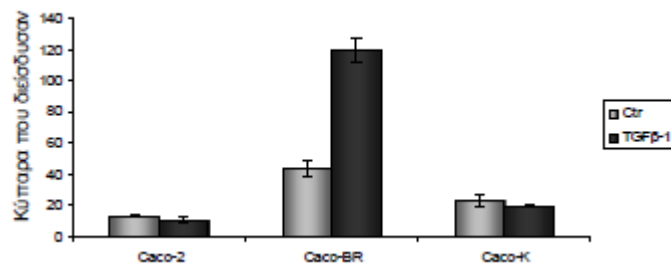


Σχήμα 27

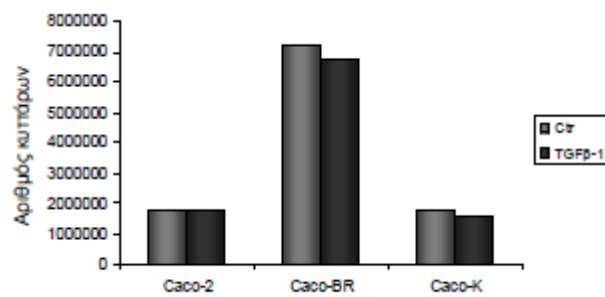
(Γ)



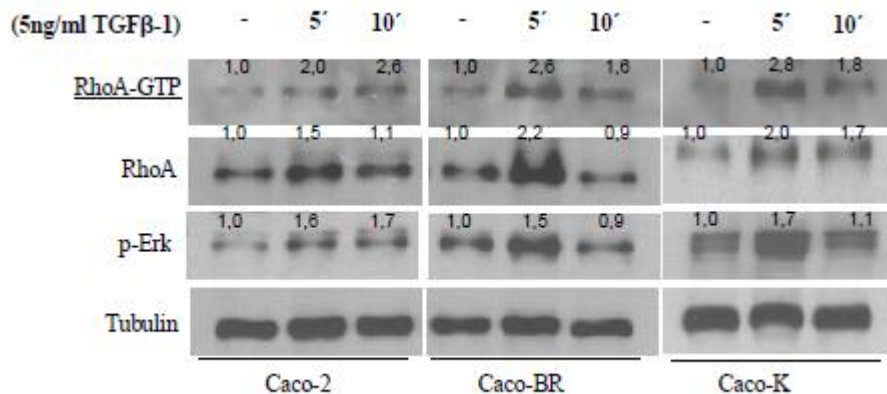
(Δ)



(E)



(ΣΤ)



**Σχήμα 27.** Συνεργασία του αυξητικού παράγοντα TGFβ-1 με τα ογκογονίδια *BRAF<sup>V600E</sup>* και *KRAS<sup>G12V</sup>* στο μετασχηματισμό των Caco-2 κυττάρων. (Α) Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας με χρώση φαλλοιδίνης δείχνουν ότι μετά από 14 μέρες επώασης των κυττάρων με 5ng/ml TGFβ-1, τα Caco-K απέκτησαν πιο «επιθετικό» φαινότυπο. (Β) Πρωτεϊνική ανάλυση της κυτταροπλασματικής E-καντερίνης (Soluble, S) και της μεμβρανικής (Insoluble, I) (αριστερά) και εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας (αριστερά) μετά από 14 μέρες επώασης με 5ng/ml TGFβ-1 δείχνουν μείωση της έκφρασης της E-καντερίνης στα Caco-K κύτταρα και κατακερματισμός της στα Caco-BR. (Γ) Έλεγχος της μεταναστευτικής και (Δ) της διεισδυτικής ικανότητας των Caco-2, Caco-BR και Caco-K κυττάρων μετά από 14 μέρες επώασης με 5ng/ml TGFβ-1 με *in vitro* μελέτη της κυτταρικής μετανάστευσης και διείσδυσης. (Ε) Επίδραση του TGFβ-1 στον πολλαπλασιασμό των Caco-2, Caco-BR και Caco-K κυττάρων.  $10^4$  κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία καλλιέργειας και μετρήθηκε ο αριθμός τους μετά από επώαση με 5ng/ml TGFβ-1 για 6 μέρες (ο TGFβ-1 ανανεωνόταν κάθε 2 μέρες). (ΣΤ) Επίδραση του TGFβ-1 στην ενεργοποίηση της RhoA και τη φωσφορυλίωση της ERK. Τα Caco-2, Caco-BR και Caco-K κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 12 ώρες απουσία ορού και στη συνέχεια επώαστηκαν με 5ng/ml TGFβ-1 για 5 και 15 λεπτά και εφαρμόστηκε GST pull-down για τη RhoA. Κύτταρα στα οποία δεν προστέθηκε ο αυξητικός παράγοντας χρησιμοποιήθηκαν επίσης ως μαρτυρες (Ctr).

## *ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ*

## ΜΕΡΟΣ 'Α

### 4.1 Δημιουργία και χαρακτηρισμός νέων κυτταρικών συστημάτων έκφρασης των ογκογονιδίων

Τα τελευταία 30 χρόνια τα γονίδια *RAS* έχουν αποτελέσει αντικείμενο έντονης έρευνας στα πλαίσια της καρκινογένεσης, καθώς από πολύ νωρίς αναγνωρίστηκαν ως ογκογονίδια σε διάφορους τύπους του ανθρώπινου καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του Κ.Π.Ε <sup>119</sup>. Έκτοτε, πολλές μελέτες έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι ογκογονικές μεταλλάξεις στα γονίδια *RAS* εμφανίζονται περίπου στο 30% των περιπτώσεων καρκίνου του ανθρώπου. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι οι μεταλλάξεις του ογκογονιδίου *KRAS* στον Κ.Π.Ε. αποτελούν ένα φαινόμενο που συμβαίνει στα πρώτα στάδια εξέλιξης της νόσου, κατά τη μετάπτωση από αδένωμα σε αδеноκαρκίνωμα <sup>120</sup>. Πιο πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι ασθενείς με *KRAS* μεταλλάξεις δεν ωφελούνται από τη θεραπευτική αγωγή με cetuximab, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), ενώ η πλειοψηφία των ασθενών που δε φέρουν μεταλλάξεις στο συγκεκριμένο γονίδιο αποκρίνονται θετικά στη θεραπεία αυτή <sup>121, 122</sup>. Το γεγονός αυτό κάνει επιτακτική την ανάγκη εύρεσης αποτελεσματικής θεραπείας που θα στοχεύει μονοπάτια μεταλλαγμένων γονιδίων τα οποία είναι γνωστό ότι σχετίζονται με συγκεκριμένους τύπους καρκίνου.

Όσον αφορά το ογκογονίδιο *BRAF*, τα ευρήματα που το συσχετίζουν με τον καρκίνο του ανθρώπου προέκυψαν σχετικά πρόσφατα και δείχνουν ότι ενεργές μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού εντοπίζονται σε ποσοστό 70% στα κακοήθη μελανώματα και περίπου 15% στον σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου (Κ.Π.Ε.) Μεταλλάξεις του ανιχνεύθηκαν επίσης σε μικρότερα ποσοστά σε γλοιώματα, καρκίνο του πνεύμονα, σαρκώματα, καρκίνο των ωοθηκών, του μαστού και του ήπατος <sup>3</sup>. Το



γεγονός ότι τα ευρήματα αυτά είναι σχετικά πρόσφατα εξηγεί εν μέρει τη μη εκτεταμένη έρευνα για το ρόλο του ογκογονιδίου *BRAF* στον καρκίνο του ανθρώπου. Επίσης τα υψηλά ποσοστά εμφάνισής του στο μελάνωμα, εξηγούν γιατί οι περισσότερες από τις μελέτες που έχουν γίνει ως σήμερα εστιάζουν σε αυτό τον τύπο καρκίνου. Προκειμένου να μελετηθεί ο μηχανισμός με τον οποίο το *BRAF*<sup>V600E</sup> οδηγεί σε καρκινογένεση, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα πειραματικά μοντέλα (κυρίως ζωικά). Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup> οδηγεί στο μετασχηματισμό μελανοκυττάρων<sup>123</sup>, ωστόσο μετασχηματίζει ινοβλάστες ποντικού (κύτταρα NIH3T3) λιγότερο αποτελεσματικά από ότι το ογκογονίδιο *HRAS*<sup>G12V</sup><sup>3</sup>. Επιπρόσθετα, έκφραση της ογκοπρωτεΐνης *BRAF*<sup>V600E</sup> σε θυρεοειδικά κύτταρα αρουραίου επάγει τη σύνθεση DNA και την αποδιαφοροποίησή τους, αλλά προσδίδει σε αυτά χαμηλό πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού, καθώς επάγει το φαινόμενο της απόπτωσης<sup>124</sup>. Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν τη συμμετοχή του ογκογονιδίου *BRAF* στη διαδικασία του καρκίνου, αλλά δεν υπάρχουν στοιχεία για τον ακριβή ρόλο του στον Κ.Π.Ε. Η παρούσα μελέτη διερευνά το μηχανισμό δράσης του ογκογονιδίου αυτού και σε σύγκριση με το *KRAS*<sup>G12V</sup> στον ανθρώπινο καρκίνο του παχέος εντέρου και οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μετάλλαξη *BRAF*<sup>V600E</sup> είναι υπεύθυνη για τον πιο αποτελεσματικό μετασχηματισμό των Caco-2 κυττάρων.

#### **4.1.1 Μονοπάτια μεταγωγής σήματος επαγόμενα από το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup>**

Όπως παρατηρήθηκε από την ανάλυση των μονοπατιών μεταγωγής σήματος, το ογκογονίδιο *KRAS*<sup>G12V</sup> είναι πιο αποτελεσματικό στην ενεργοποίηση της ERK, αλλά το *BRAF*<sup>V600E</sup> ήταν εκείνο που οδήγησε στον πλήρη μετασχηματισμό των Caco-2 κυττάρων. Επίσης, παρόλο που η ενεργοποίηση της MEK ήταν ιδιαίτερα αυξημένη

στα Caco-BR κύτταρα, δεν οδήγησε σε αντίστοιχη αύξηση της p-ERK1/2<sup>88</sup>. Κάτι παρόμοιο παρατηρήθηκε σε πρόσφατη μελέτη η οποία συνέκρινε τις καρκινικές ιδιότητες των ογκογονιδίων *BRAF*<sup>V600E</sup>, *NRAS*<sup>Q61R</sup> και *HRAS*<sup>G12V</sup>, και έδειξε ότι τα επίπεδα της ενεργοποιημένης ERK είναι σχετικά χαμηλά στην περίπτωση του *BRAF*<sup>V600E</sup><sup>125</sup>. Πρέπει να σημειωθεί ότι το μονοπάτι μεταγωγής σήματος RAS-RAF-MEK-ERK είναι ιδιαίτερα πολύπλοκο, καθώς αρκετά μόρια εμπλέκονται στη ρύθμισή του. Για παράδειγμα, η μεταγωγή σήματος από την κινάση RAF στη MEK πιστεύεται ότι ρυθμίζεται από πρωτεΐνες «σκαλωσιές», όπως η KSR, καθώς και από ανασταλτικούς παράγοντες, όπως η πρωτεΐνη RKIP<sup>126</sup>. Η πρωτεΐνη KSR ρυθμίζει θετικά την ενεργοποίηση του μονοπατιού διευκολύνοντας την αλληλεπίδραση της MEK με την ERK<sup>127</sup>. Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης (mRNA) της KSR ήταν σημαντικά μειωμένα στα Caco-BR κύτταρα, κάτι το οποίο μπορεί να είναι η αιτία για την όχι ιδιαίτερα αυξημένη ενεργοποίηση της ERK στα κύτταρα αυτά. Μελέτες που συσχετίζουν την πρωτεΐνη KSR με την εξέλιξη του καρκίνου, δείχνουν ότι φαρμακολογική αναστολή του μορίου αυτού μπορεί να λειτουργήσει ως θεραπεία σε RAS-επαγόμενες κακοήθειες, όπως καρκίνος του παγκρέατος<sup>128</sup>.

Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι στα Caco-BR κύτταρα υπάρχει διαφορά ανάμεσα στις δύο ισομορφές της ERK, ERK1 και ERK2, καθώς φαίνεται η ERK2 (κατώτερη μάντα στην ανάλυση κατά Western) να είναι πιο ενεργή. Ο ρόλος της ERK2 στην καρκινογένεση, έχει δειχθεί πρόσφατα με τη χρήση της τεχνολογίας siRNA, όπου αναστολή της ERK2 αλλά όχι της ERK1, εμπόδισε την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων του ήπατος *in vitro* και *in vivo* καθώς και τον πολλαπλασιασμό των NIH3T3 κυττάρων<sup>129, 130</sup>. Λαμβάνοντας υπ'όψιν ότι τα Caco-BR κύτταρα έχουν αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού, αυτή η επιλεκτική ενεργοποίηση της ERK2 ίσως αποτελεί σημαντικό μηχανισμό ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου στα *BRAF*<sup>V600E</sup>-

μετασχηματισμένα κύτταρα, ανεξάρτητα από την όχι ιδιαίτερα ενεργοποιημένη ERK1/2. Επιπλέον, ο κύριος εντοπισμός της pERK στον πυρήνα των κυττάρων αυτών μπορεί να είναι μια εξήγηση για τον επιτυχή μετασχηματισμό των Caco-2 κυττάρων από το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup>, καθώς η ενεργοποιημένη ERK εισέρχεται στον πυρήνα και είναι σε θέση να φωσφορυλιώσει και να ενεργοποιήσει μόρια, όπως η κυκλίνη D1, η οποία βρέθηκε αυξημένη και υπερ-φωσφορυλιωμένη στα κύτταρα αυτά.

Αυξημένη ενεργοποίηση από την ογκοπρωτεΐνη BRAF παρατηρήθηκε επίσης και στην περίπτωση της κινάσης CRAF, κάτι το οποίο είναι σύμφωνο με προηγούμενες μελέτες, σύμφωνα με τις οποίες τόσο η φυσιολογική όσο και η μεταλλαγμένη BRAF πρωτεΐνη ενεργοποιεί τη CRAF κινάση, οδηγώντας τα κύτταρα σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό<sup>131, 132</sup> Μια άλλη εξήγηση για τη μέτρια, αλλά αποτελεσματική ενεργοποίηση της ERK ίσως είναι το γεγονός ότι υπερβολική αύξηση της pERK μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου ή κυτταρική γήρανση και όπως έχει δειχθεί, τα κύτταρα «επιλέγουν» τη μεταγωγή σήματος μέσω της CRAF και όχι της BRAF προκειμένου να αποφύγουν το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης<sup>133</sup>. Αυτή η ενεργοποίηση της κινάσης CRAF από τη μεταλλαγμένη BRAF πρωτεΐνη αποκτά ιδιαίτερη σημασία αν λάβουμε υπ' όψιν προηγούμενη μελέτη που αφορά στο ανθρώπινο μελάνωμα και σύμφωνα με την οποία, ο αναστολέας της CRAF, BAY43-9006, ανέστειλε τη δράση της BRAF<sup>V600E</sup> *in vitro* και *in vivo*, επιβραδύνοντας την ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων (xenografts)<sup>134</sup>. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν επίσης ότι ειδικοί αναστολείς του μεταλλαγμένου *BRAF* ογκογονιδίου δρουν ογκοκαταστακτικά στο μελάνωμα, αλλά φαίνεται να είναι έχουν αντίθετη δράση όταν το μεταλλαγμένο *BRAF* συνυπάρχει με το ογκογονίδιο *KRAS*<sup>135, 136</sup>. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, ο αναστολέας της CRAF θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί και στον καρκίνο του παχέος

εντέρου στοχεύοντας όμως τη μετάλλαξη BRAF<sup>V600E</sup>, εφόσον τα κύτταρα του ασθενούς φέρουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η σημαντική αύξηση και ενεργοποίηση της κινάσης BRAF στα DLD-1 και SW620 κύτταρα, ως αποτέλεσμα της μεταλλαγμένης KRAS πρωτεΐνης που εκφράζεται στα κύτταρα αυτά και η οποία ωστόσο δεν οδηγεί σε αύξηση της pERK. Από την άλλη, παρουσία της μετάλλαξης BRAF<sup>V600E</sup> στα HT29 και Colo205 κύτταρα οδηγεί σε ενεργοποίηση της ERK αλλά όχι της BRAF. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το γενετικό υπόβαθρο αυτών των κυτταρικών σειρών εκτός από μεταλλάξεις στα ογκογονίδια *KRAS* και *BRAF*, φέρουν και άλλες, όπως p53, APC, PI3K, SMAD4. Στην παρούσα μελέτη δείχνουμε τις διαφορετικές επιπτώσεις δύο πολύ συχνών μεταλλάξεων σε ένα συγκεκριμένο γενετικό υπόβαθρο (Caco-2 κύτταρα) και πώς αυτές οι επιπτώσεις διαφοροποιούνται ανάλογα με την ύπαρξη και άλλων μεταλλάξεων (π.χ. HT29, DLD-1 κυτταρικές σειρές). Τα ευρήματα αυτά ίσως έχουν εφαρμογές στο μέλλον στην ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπειών που θα λαμβάνουν υπ' όψιν το γενετικό υπόβαθρο του ασθενούς και την αλληλεπίδραση των μεταλλάξεων που αυτός φέρει.

#### **4.1.2 Το ογκογονίδιο KRAS<sup>G12V</sup> οδήγησε στην ενεργοποίηση παραγόντων και μηχανισμών κυτταρικής γήρανσης στα Caco-2 κύτταρα.**

Όπως αναφέρθηκε, τα κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με το ογκογονίδιο *KRAS<sup>G12V</sup>* εμφάνισαν σημάδια κυτταρικής γήρανσης, χωρίς όμως να σταματούν να πολλαπλασιάζονται. Προκειμένου να αναγνωριστεί ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει αυτό, πραγματοποιήθηκε φαρμακολογική αναστολή του μονοπατιού MEK-ERK στα Caco-2 κύτταρα, με αποτέλεσμα να μην εντοπίζονται πια σημάδια κυτταρικής γήρανσης. Αυτό σημαίνει πως η αύξηση της ενεργοποίησης της ERK που

επέφερε η παρουσία του ογκογονιδίου, οδήγησε στο φαινόμενο αυτό καθώς και στην εξαρτώμενη από αυξητικούς παράγοντες επιβίωση των κυττάρων (όπως έδειξε το πείραμα με αφαίρεση του ορού από το θρεπτικό μέσο), με αποτέλεσμα το μη αποτελεσματικό μετασχηματισμό των Caco-2 κυττάρων, ο οποίος αντιθέτως παρατηρείται στα Caco-BR κύτταρα.

Εφόσον στα πατρικά κύτταρα Caco-2 το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 είναι μεταλλαγμένο και το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον αναστολέα του κυτταρικού κύκλου, p16<sup>Ink4</sup>, είναι υπερμεθυλιωμένο, ο πιθανός μηχανισμός που εμπλέκεται στην κυτταρική γήρανση των Caco-K κυττάρων είναι το μονοπάτι Rb. Μελέτες έχουν δείξει ότι υπερ-έκφραση της ογκοπρωτεΐνης RAS<sup>G12V</sup> ή της πρωτεΐνης CRAF σε φυσιολογικούς ινοβλάστες ανθρώπου, οδήγησε στην απορύθμιση του μονοπατιού Rb<sup>137, 138</sup>. Στην παρούσα μελέτη, παρόλο που η πρωτεΐνη Rb βρέθηκε φωσφορυλιωμένη και άρα ανενεργή στα Caco-BR κύτταρα, είναι λειτουργική στα Caco-K γεγονός που σημαίνει ότι δεν έχει χαθεί η ογκοκατασταλτική του δράση. Στα κύτταρα αυτά βρέθηκε επίσης σημαντικά αυξημένη η έκφραση του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p19<sup>ARF</sup>. Ο συνδυασμός των ευρημάτων αυτών ίσως να δείχνει το μηχανισμό που εμπλέκεται στην εμφάνιση των σημαδιών κυτταρικής γήρανσης στα KRAS<sup>G12V</sup>-μετασχηματισμένα κύτταρα. Το γεγονός ότι τα κύτταρα αυτά συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται μπορεί να εξηγηθεί από το ιδιαίτερα ενεργοποιημένο μονοπάτι επιβίωσης, όπως φαίνεται από τα υψηλά επίπεδα της pAKT. Είναι αξιοσημείωτο ότι το ογκογονίδιο K-RAS ενεργοποιεί μηχανισμούς κυτταρικής γήρανσης στα κύτταρα Caco-2 και τα καθιστά ευαίσθητα στο κυτταρικό θάνατο με απόπτωση απουσία αυξητικών παραγόντων, ενώ τα πατρικά κύτταρα Caco-2 δεν αποπίπτουν απουσία αυξητικών παραγόντων.

### 4.1.3 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από τα ογκογονίδια $BRAF^{V600E}$ και $KRAS^{G12V}$

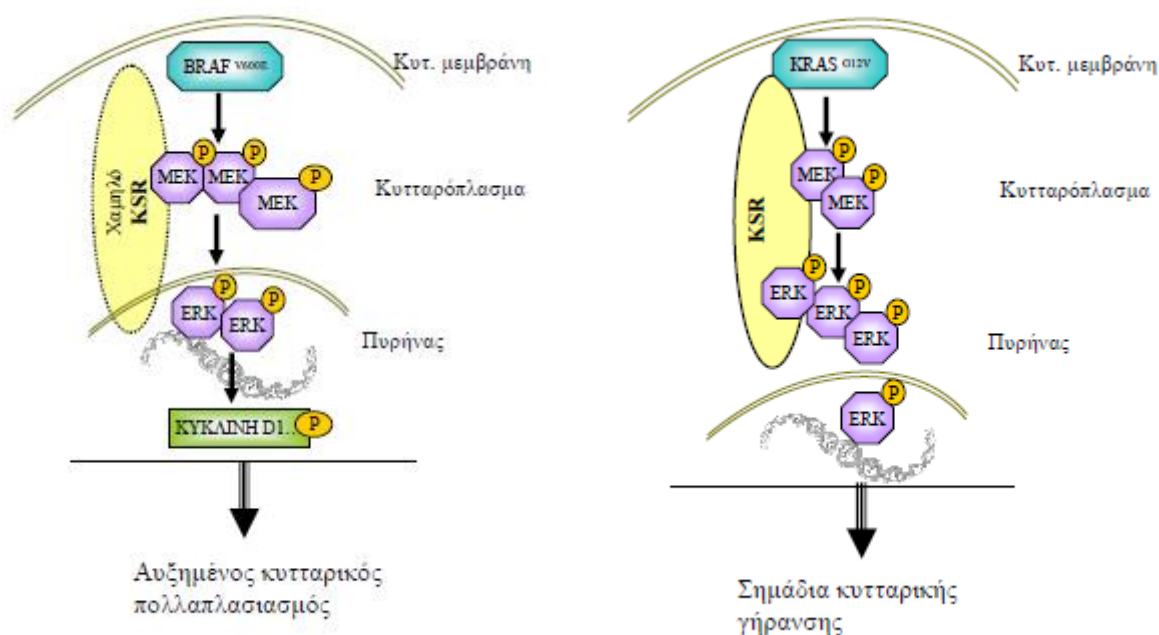
Μελέτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων έδειξε ότι το ογκογονίδιο  $BRAF^{V600E}$  ενίσχυσε τον κυτταρικό κύκλο των Caco-2 κυττάρων πιο αποτελεσματικά από ότι το  $KRAS^{G12V}$ . Το γεγονός αυτό μπορεί να ερμηνευθεί από τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης των περισσότερων κυκλινών (D1, D3, A και E) στα Caco-BR κύτταρα. Τα ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1 μπορεί να είναι η αιτία των επίσης αυξημένων επιπέδων  $p21^{Cip1}$  στα Caco-BR κύτταρα, καθώς έχει δειχθεί ότι η κυκλίνη αυτή αναστέλλει την αποικοδόμησή του <sup>139</sup>. Και τα δύο ογκογονίδια οδήγησαν στην αύξηση της κυκλίνης D1, η οποία όταν δημιουργεί σύμπλοκα με τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες Cdk4 και Cdk6 φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την πρωτεΐνη Rb, κάτι το οποίο δε φαίνεται να ισχύει στα Caco-K κύτταρα. Στα κύτταρα αυτά παρατηρήθηκε γονιδιακή ενίσχυση για τον αναστολέα του κυτταρικού κύκλου,  $p27^{Kip1}$  και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση του συμπλόκου κυκλίνη E/Cdk2 το οποίο δημιουργείται φυσιολογικά στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου.

*Το ογκογονίδιο  $BRAF^{V600E}$  προκάλεσε αστάθεια μικροδορυφορικού DNA στα Caco-2 κύτταρα*

Στην παρούσα μελέτη ανάλυση του κυτταρικού κύκλου έδειξε ότι τα κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με το ογκογονίδιο  $BRAF^{V600E}$  εμφάνισαν έναν πληθυσμό κυττάρων με μικρότερη περιεκτικότητα DNA συγκριτικά με τα πατρικά κύτταρα, Caco-2. Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι στα κύτταρα αυτά προκλήθηκε αστάθεια μικροδορυφορικού DNA και εφόσον αυτή η αστάθεια παρατηρείται για περισσότερους από 2 από τους εξεταζόμενους μονονουκλεοτιδικούς δείκτες (NR-21, NR-22, NR-24, BAT-25 και BAT-26), τα Caco-BR κύτταρα θεωρείται ότι έχουν

υψηλού βαθμού μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-H) <sup>140</sup>. Προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι υπερ-έκφραση της ογκοπρωτεΐνης BRAF<sup>V600E</sup> σε θυρεοειδικά κύτταρα αρουραίου (PCCL3) προκάλεσε μεταξύ άλλων χρωμοσωμική αστάθεια <sup>124</sup> γεγονός που δείχνει ότι το ογκογονίδιο BRAF<sup>V600E</sup> επηρεάζει το σύστημα επιδιόρθωσης βλαβών του DNA αφού η αστάθεια του γονιδιώματος προκύπτει από απενεργοποίηση του συστήματος αυτού. Πράγματι, στα Caco-BR κύτταρα βρέθηκαν να υπο-εκφράζονται γονίδια που συμμετέχουν στη διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA (ERCC1-variant 1, ERCC3, XPC και Ku70). Επίσης αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι οι BRAF μεταλλάξεις βρίσκονται περισσότερο συχνά στους καρκίνους που χαρακτηρίζονται από μικροδορυφορική αστάθεια ενώ κάτι τέτοιο δεν ισχύει για τις KRAS μεταλλάξεις <sup>28, 141, 142</sup>. Μελέτη του ρόλου του ογκογονιδίου BRAF<sup>V600E</sup> στη μικροδορυφορική αστάθεια μέσω ενός αριθμού μονονουκλεοτιδικών δεικτών (NR21, NR22, NR24, BAT-25 και BAT-26) έδειξε για πρώτη φορά ότι η ύπαρξη του συγκεκριμένου ογκογονιδίου είναι η αιτία για το φαινόμενο αυτό. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι κυτταρικές σειρές με αστάθεια μικροδορυφορικού DNA εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία και άρα καλύτερη απόκριση σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (π.χ. CPT-11) <sup>143</sup>, γεγονός που δίνει ιδιαίτερη σημασία στο εύρημα της μελέτης αυτής. Νεοπλασίες καρκίνου του παχέος εντέρου που φέρουν τη μετάλλαξη BRAF<sup>V600E</sup> ίσως αποτελέσουν στο μέλλον στόχους θεραπευτικών παραγόντων που έχουν σχεδιαστεί λαμβάνοντας υπ' όψιν την κατάσταση μικροδορυφορικής αστάθειας.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, το ογκογονίδιο  $BRAF^{V600E}$  είναι πιο αποτελεσματικό από ότι το  $KRAS^{G12V}$  στο μετασχηματισμό αδενωματικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Στα Caco-BR κύτταρα τα χαμηλά επίπεδα της πρωτεΐνης KSR έχουν ως αποτέλεσμα τη μέτρια ενεργοποίηση της ERK, η οποία όμως μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου ενεργοποιεί μόρια όπως η κυκλίνη D1 και οδηγεί έτσι σε αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού και τον περαιτέρω μετασχηματισμό των κυττάρων (σχήμα 1A). Από την άλλη, στα Caco-K κύτταρα η αυξημένη ενεργοποίηση της ERK οδήγησε στην εμφάνιση χαρακτηριστικών κυτταρικής γήρανσης και στο μη αποτελεσματικό μετασχηματισμό των κυττάρων (σχήμα 1B).



**Σχήμα 1.** Διαφορική επίδραση των ογκογονιδίων  $BRAF^{V600E}$  και  $KRAS^{G12V}$  στον κυτταρικό κύκλο των Caco-2 κυττάρων. (A) το  $BRAF^{V600E}$  οδηγεί σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και (B) το  $KRAS^{G12V}$  οδηγεί στην εμφάνιση χαρακτηριστικών κυτταρικής γήρανσης.



## ΜΕΡΟΣ 'B

### 4.2 Συγκριτική επίδραση των ογκογονιδίων *BRAF<sup>V600E</sup>*, *KRAS<sup>G12V</sup>* & *H-RAS<sup>G12V</sup>* στα μονοπατία μεταγωγής σημάτων των μικρών GTPασών *RhoA*, *Rac1* και *Cdc42* και τη κυτταρική διεισδυτικότητα και μεταναστευτικότητα

#### 4.2.1 Το ογκογονίδιο *BRAF<sup>V600E</sup>* μεταβάλλει τα επιθηλιακά χαρακτηριστικά των αδενωματικών κυττάρων του παχέος εντέρου.

Όπως έδειξαν πειράματα μελέτης έκφρασης σε επίπεδο mRNA (Real Time-PCR) και πρωτεΐνης (ανοσοφθορισμός), το ογκογονίδιο *BRAF<sup>V600E</sup>* οδηγεί σε μείωση της έκφρασης της E-καντερίνης στα Caco-2 κύτταρα. Επίσης τα Caco-BR κύτταρα εμφανίζουν διαφορετική μορφολογία από τα πατρικά κύτταρα, και φαίνεται να έχουν αποκτήσει φαινότυπο που πλησιάζει σε εκείνον των μεσεγχυματικών κυττάρων. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση της E-καντερίνης μειώνεται σε επιθηλιακούς όγκους μέσω διαφόρων μηχανισμών, γεγονός που συμβάλει στο φαινόμενο της επιθηλιακής προς μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT) <sup>144, 145</sup>. Έχει δειχθεί επίσης, ότι μετασχηματισμός κυττάρων καρκίνου παχέος εντέρου με το ογκογονίδιο *H-RAS<sup>G12V</sup>* οδηγεί σε δραματική μείωση των επιπέδων της E-καντερίνης και παράλληλη αύξηση της βιμεντίνης, οδηγώντας στο παραπάνω φαινόμενο <sup>146</sup>. Στην παρούσα μελέτη τα Caco-BR κύτταρα δεν εκφράζουν το μεσεγχυματικό δείκτη, βιμεντίνη, αλλά παρουσιάζουν μια αύξηση της τάξεως του ~40% στην έκφραση της N-καντερίνης. Μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερ-έκφραση της N-καντερίνης, ενός άλλου μορίου που σχετίζεται με την κυτταρική προσκόλληση, σε κύτταρα καρκίνου του μαστού οδηγεί σε αυξημένη μεταναστευτικότητα και διεισδυτικότητα καθώς και ότι μείωση της E-καντερίνης συνοδεύεται από αύξηση της N-καντερίνης κατά την

καρκινική εξέλιξη<sup>102, 103</sup>. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα Caco-BR κύτταρα εμφάνισαν μειωμένη έκφραση της E-καντερίνης και σε συνθήκες καλλιέργειας 3D, όπου τα κύτταρα αναπτύσσονται σε συνθήκες που προσομοιάζουν το εξωκυττάριο περιβάλλον, γεγονός που δίνει μεγαλύτερη βαρύτητα στα αποτελέσματα. Σύμφωνα με τα παραπάνω, το ογκογονίδιο  $BRAF^{V600E}$  οδηγεί στη μείωση των κυτταρικών διασυνδέσεων μειώνοντας τα επίπεδα έκφρασης της E-καντερίνης και προσδίδει στα κύτταρα μερικά χαρακτηριστικά Επιθηλιακής-Μεσεγχυματικής μετάβασης.

#### **4.2.2 Το ογκογονίδιο $BRAF^{V600E}$ ενισχύει τη μεταναστευτική και διεισδυτική ικανότητα των αδενωματικών κυττάρων του παχέος εντέρου μέσω ενεργοποίησης της RhoA.**

Η μελέτη αυτή δείχνει ότι η RhoA GTPάση είναι ιδιαίτερα ενεργοποιημένη στα Caco-BR κύτταρα, τα οποία εμφανίζουν επίσης αυξημένη *in vitro* ικανότητα μετανάστευσης και διείσδυσης όταν συγκρίνονται με τα Caco-2 κύτταρα<sup>98</sup>. Έως τώρα, λίγα ευρήματα υπάρχουν για τις αλληλεπιδράσεις των RAF κινασών με τις Rho GTPάσες και το ρόλο τους στην εξέλιξη του καρκίνου. Δύο προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η κινάση RAF συνεργάζεται με τη RhoA GTPάση στο μετασχηματισμό επιθηλιακών κυττάρων και την καρκινική εξέλιξη του μελανώματος. Πιο συγκεκριμένα, συνεχής ενεργοποίηση της πρωτεΐνης CRAF και της RhoA είναι απαραίτητη για το μετασχηματισμό εντερικών κυττάρων αρουραίου, προσδίδοντάς τους πλέον επιμήκη μορφολογία, ικανότητα δημιουργίας αποικιών σε μαλακό άγαρ και ικανότητα να δημιουργούν όγκους σε άθυμα ποντίκια<sup>147</sup>. Στην παρούσα μελέτη είναι εμφανές ότι το ογκογονίδιο  $BRAF^{V600E}$  προσδίδει όλες αυτές τις ιδιότητες στα Caco-2 κύτταρα και επάγει επίσης την αύξηση και ενεργοποίηση της CRAF πρωτεΐνης<sup>88</sup>. Στην άλλη μελέτη που αφορά στο μεταστατικό μελάνωμα ανθρώπου, η

αποσιώπηση του ογκογονιδίου  $BRAF^{V600E}$  και της πρωτεΐνης Skp-2 (S-phase kinase-associated protein-2), ένας θετικός ρυθμιστής της RhoA, οδήγησε στην αναστολή της κυτταρικής μετανάστευσης και διείσδυσης, προτείνοντας ότι το μονοπάτι BRAF-MEK-ERK και Skp-2-RhoA συμβάλλουν στη διεισδυτική φύση του μελανώματος <sup>148</sup>. Επίσης, πρόσφατα δείχθηκε ότι ενεργοποίηση της RhoA είναι απαραίτητη για το μετασχηματισμό των NIH3T3 κυττάρων από τον αυξητικό παράγοντα TGF- $\beta$  <sup>116</sup>. Η παρούσα μελέτη δείχνει για πρώτη φορά ότι το ογκογονίδιο  $BRAF^{V600E}$  ενισχύει την ικανότητα αδενοκαρκινωματικών κυττάρων του παχέος εντέρου να μεναστεύουν και να διεισδύουν *in vitro*, μέσω ενεργοποίησης της RhoA. Πειράματα με τη χρήση του αναστολέα της MEK, UO126, έδειξαν ότι στα Caco-BR κύτταρα η ενεργοποίηση της RhoA εξαρτάται από το μονοπάτι μεταγωγής σήματος MEK-ERK, καθώς αναστολή του μονοπατιού οδήγησε σε μείωση των επιπέδων της ενεργής RhoA. Όμως, ο ακριβής μηχανισμός χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι οι Rho GTPάσες συμμετέχουν στη ρύθμιση της E-καντερίνης. Πιο συγκεκριμένα, ενεργές μορφές των Rac1 και Cdc42 επιδρούν θετικά στις κυτταρικές συνδέσεις από την E-καντερίνη, ενώ η RhoA φαίνεται να συμμετέχει λιγότερο στη ρύθμιση αυτή <sup>149</sup>. Είναι ενδιαφέρον επίσης το γεγονός ότι αποτελέσματα από ανάλυση μικροσυστοιχιών έδειξε κάποιο συσχετισμό ανάμεσα στο ογκογονίδιο  $BRAF^{V600E}$  και το Rho μονοπάτι, καθώς βρέθηκε ότι ειδικοί για τη RhoA GEFs, όπως GEF11 (PDZ-RhoGEF) και GEF18 (p114-rhoGEF) υπερ-εκφράζονται στα Caco-BR κύτταρα <sup>150, 151, 152</sup>. Αυτό σημαίνει ότι το ογκογονίδιο  $BRAF^{V600E}$  επηρεάζει θετικά τη RhoA, ρυθμίζοντας πιθανώς και την έκφραση παραγόντων ρυθμιστικών της ενεργοποίησής της. Αξίζει να σημειωθεί ότι πρόσφατη μελέτη έδειξε πως η ERK επάγει τη Rho-εξαρτώμενη δημιουργία εστιακών προσκολλήσεων, μέσω ρύθμισης της πρωτεΐνης p190A RhoGAP, ρυθμιστή της RhoA <sup>153</sup>. Επιπρόσθετα, ανάλυση αλληλεπίδρασης των υπό μελέτη Rho GTPασών έδειξε ότι η RhoA ίσως δρα

ανταγωνιστικά με τη Cdc42 στα Caco-BR κύτταρα. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω ανταγωνισμού των δύο GTPασών για κοινά ρυθμιστικά μόρια, όπως οι RhoGDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors) <sup>154</sup>. Σύμφωνα με τα παραπάνω, προτείνεται το εξής μοντέλο για τις κυτταροσκελετικές αλλαγές που επέφερε το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup> στα Caco-2 κύτταρα (σχήμα 2A): η ογκοπρωτεΐνη *BRAF*<sup>V600E</sup> επάγει την ενεργοποίηση της MEK, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί τη RhoA μέσω συγκεκριμένων GEFs και GAPs. Στα *BRAF*<sup>V600E</sup>-μετασχηματισμένα κύτταρα η RhoA ανταγωνίζεται τη Cdc42, ενώ την ίδια στιγμή τα επίπεδα της E-καντερίνης μειώνονται και οι διακυτταρικές συνδέσεις χαλαρώνουν, οδηγώντας σε ενίσχυση της κυτταρικής μετανάστευσης και διείσδυσης. Οι παραπάνω ιδιότητες που προσέδωσε το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup> στα αδενωματικά κύτταρα του παχέος εντέρου ενισχύονται μέσω συνεργασίας με τον αυξητικό παράγοντα TGFβ-1,

#### **4.2.3 Το ογκογονίδιο *KRAS*<sup>G12V</sup> ενισχύει τη μεταναστευτική και διεισδυτική ικανότητα των αδενωματικών κυττάρων του παχέος εντέρου μέσω ενεργοποίησης της Cdc42.**

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στα Caco-K κύτταρα και οι τρεις εξεταζόμενες GTPάσες (RhoA, Rac1 και Cdc42) είναι ενεργοποιημένες. Η Cdc42 είναι ιδιαίτερα ενεργοποιημένη στα κύτταρα αυτά συγκριτικά με τα Caco-BR και Caco-H. Τα *KRAS*<sup>G12V</sup>-μετασχηματισμένα κύτταρα έχουν επίσης αυξημένο αριθμό φιλοποδίων, επιμήκεις δομές πλούσιες σε ακτίνη, των οποίων ο σχηματισμός ρυθμίζεται από τη Cdc42 <sup>47</sup>. Τα φιλοπόδια είναι σημαντικά στην κυτταρική κίνηση, αφού καθορίζουν την πολικότητα των κυττάρων και την κατεύθυνση της κυτταρικής κίνησης. Σε αντίθεση με το ογκογονίδιο *BRAF*, το ογκογονίδιο *RAS* έχει μελετηθεί όσον αφορά τη συνεργασία του με τις Rho GTPάσες στην εξέλιξη του καρκίνου. Είναι γνωστό ότι οι

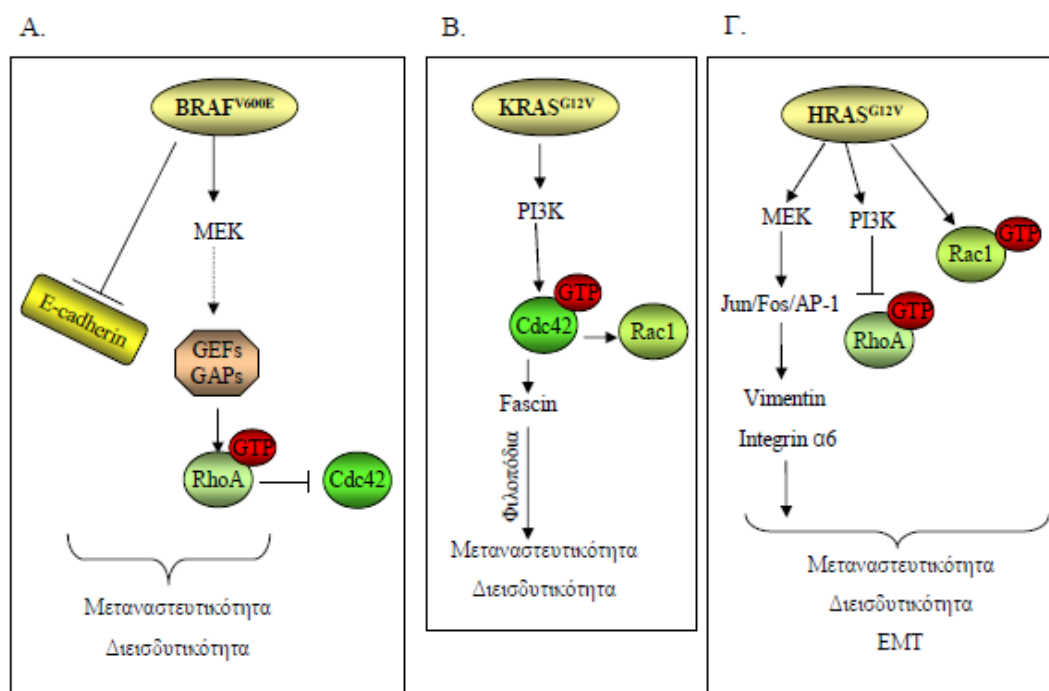
μικρές GTPάσες RhoA, Rac1 και Cdc42 είναι απαραίτητες για την ογκογονική δράση της πρωτεΐνης RAS<sup>108, 57</sup>. Στην παρούσα μελέτη, χρήση της τεχνολογίας siRNA έδειξε ότι η ενεργοποίηση της Cdc42 είναι απαραίτητη για τη μεταναστευτικότητα και διεισδυτικότητα των Caco-K κυττάρων, στα οποία τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος MAPK και PI3K είναι ενεργοποιημένα<sup>81, 88</sup>. Σύμφωνα με μια άλλη μελέτη, τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος PI3K/Cdc42 και PI3K/Rac1 είναι απαραίτητα στη μεταναστευτικότητα που επάγεται από τη δράση του λυσοφωσφατιδικού οξέος (LPA) σε κύτταρα γλοιώματος<sup>155</sup>). Επιπρόσθετα, αποτελέσματα από ανάλυση μικροσυτοιχιών έδειξε ότι ένας ειδικός για τις GTPάσες Rac1 και Cdc42 GEF, ο Asef2, υπερ-εκφράζεται σημαντικά στα Caco-K κύτταρα<sup>156</sup>. Επιπρόσθετα, στα κύτταρα αυτά η Cdc42 φαίνεται να ρυθμίζει θετικά την έκφραση της Rac1, καθώς μείωση της Cdc42 με siRNA οδηγεί σε μείωση της Rac1. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω, είναι εμφανές ότι η μετάλλαξη KRAS<sup>G12V</sup> ενισχύει τη μεταναστευτική και διεισδυτική ιδιότητα των Caco-2 κυττάρων μέσω ενεργοποίησης της μικρής GTPάσης Cdc42. Συνοψίζοντας, τελεστές της πρωτεΐνης RAS όπως η PI3K ή η AKT υπερ-ενεργοποιούνται στην περίπτωση της μετάλλαξης KRAS<sup>G12V</sup>, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της Cdc42 και Rac1 μέσω συγκεκριμένων GEFs. Οι ενεργές GTPases επάγουν το σχηματισμό φιλοποδίων, σχηματισμοί που συμβάλλουν στις μεταναστευτικές και διεισδυτικές ιδιότητες των κυττάρων (σχήμα 2B). Αν και το ογκογονίδιο KRAS<sup>G12V</sup> δε μεταβάλλει σημαντικά την επιθηλιακή μορφολογία των Caco-2 κυττάρων, η συνεργασία με τον αυξητικό παράγοντα TGFβ-1 δημιουργεί έναν πιο επιθετικό φαινότυπο, γεγονός που υποδηλώνει το ογκογονίδιο χρειάζεται τη δράση του αυξητικού παράγοντα, προκειμένου να επιτευχθεί ο ογκογονικός μετασχηματισμός. Είναι επίσης ενδιαφέρον, ότι το ογκογονίδιο KRAS<sup>G12V</sup> ενισχύει τη μεταναστευτική και διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων παράλληλα με την πρόκληση χαρακτηριστικών κυτταρικής γήρανσης.

#### 4.2.4 Το ογκογονίδιο *HRAS*<sup>G12V</sup> οδηγεί τα κύτταρα σε επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση, μια αρκετά πολύπλοκη διαδικασία.

Η παρούσα μελέτη δείχνει ότι το ογκογονίδιο *HRAS*<sup>G12V</sup> προσδίδει στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου μεσεγχυματικό φαινότυπο σε συνθήκες καλλιέργειας 2 και 3 διαστάσεων. Η μορφολογία των Caco-H κυττάρων έχει τη χαρακτηριστική επιμήκη εικόνα των μεσεγχυματικών κυττάρων και αυτό είναι εμφανές ακόμα και σε συνθήκες 3D καλλιέργειας, όπου σχηματίζουν μεγάλες, συμπαγείς μάζες με εμφανείς προεκβολές. Είναι επίσης φανερό ότι η πρωτεΐνη Rac1 είναι ενεργοποιημένη στα κύτταρα αυτά, αλλά χρήση της τεχνολογίας siRNA για τη μικρή αυτή GTPάση δε μειώνει τη μεταναστευτική και διεισδυτική ικανότητα των Caco-H κυττάρων. Σε συμφωνία με την υψηλή ενεργοποίηση της Rac1 είναι τα χαμηλά επίπεδα ενεργοποίησης της RhoA στα κύτταρα αυτά, πιθανόν λόγω της ανταγωνιστικής δράσης που έχουν αυτές οι 2 μικρές GTPάσες στην οργάνωση του κυτταροσκελετού <sup>157</sup>. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι στα Caco-H κύτταρα τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος MEK-ERK, PI3K και JNK είναι σημαντικά ενεργοποιημένα όταν συγκρίνονται με τα πατρικά Caco-2 κύτταρα <sup>81, 75</sup>. Έχει δειχθεί ότι στην κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού MCF10A η πρωτεΐνη HRAS ενεργοποιεί το μονοπάτι μεταγωγής σήματος PI3K μέσω της μικρής GTPάσης Rac1, καταλήγοντας σε έναν ιδιαίτερα διεισδυτικό φαινότυπο <sup>158</sup>. Σύμφωνα με άλλη μελέτη, αναστολή του μονοπατιού MEK-ERK αλλά όχι της Rac1 κατάφερε να επαναφέρει τις κυτταρικές συνδέσεις της E-καντερίνης και την επιθηλιακή μορφολογία σε *HRAS*<sup>D12</sup>-μετασχηματισμένα κύτταρα <sup>159</sup>. Επιπρόσθετα, μελέτη του ρόλου της Rac1 στη διατήρηση του κακοήθους φαινοτύπου σε καρκινικά κύτταρα του δέρματος ποντικού, έδειξε ότι αναστολή ενεργοποίησης της Rac1 μειώνει τη μεταναστευτικότητα, τη

διεισδυτικότητα και την αύξηση του όγκου μέσω αναστολής του μονοπατιού των MAP κινασών <sup>160</sup>. Πιο πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η μεταγωγή σήματος μέσω της κινάσης εστιακής προσκόλλησης (FAK) είναι απαραίτητη για την επαγόμενη από τον αυξητικό παράγοντα TGFβ επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση σε ηπατικά κύτταρα <sup>161</sup>. Στην παρούσα μελέτη η πρωτεΐνη FAK υπερ-εκφράζεται στα Caco-H κύτταρα και παρόλο που η Y397 φωσφορυλίωση της κινάσης αυτής δεν είναι ιδιαίτερα υψηλή στα κύτταρα αυτά, άλλες φωσφορυλιώσεις μπορεί να εμπλέκονται στο μετασχηματισμό τους από το ογκογονίδιο *HRAS<sup>G12V</sup>*. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η ενεργοποιημένη RAS πρωτεΐνη επάγει την από-φωσφορυλίωση και αναστολή της FAK, μέσω του μονοπατιού Fgd1-Cdc42-PAK1-MEK-ERK. Αυτή η αναστολή της FAK προωθεί τη RAS-επαγόμενη κυτταρική μετανάστευση, διείσδυση και μετάσταση <sup>162</sup>. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω, θα μπορούσαμε να προτείνουμε ότι το ογκογονίδιο *HRAS<sup>G12V</sup>* δρα μέσω διαφόρων μονοπατιών όπως MEK-ERK, PI3K και επάγει την ενεργοποίηση της Rac1 καθώς και την έκφραση άλλων μορίων που σχετίζονται με την επαγωγή του φαινομένου της επιθηλιακής προς μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT). Τελεστές των μονοπατιών αυτών όπως η βιμεντίνη και η ιντεγκρίνη α6 σχετιζόμενα με το φαινόμενο αυτό, έχειδειχθεί ότι παίζουν ρόλο στις μεταναστευτικές ιδιότητες των κυττάρων αυτών μέσω ρύθμισης από το μεταγραφικό παράγοντα AP-1 (activator protein-1-dependent regulation) <sup>163</sup>.

<sup>75</sup>. Τα παραπάνω συνοψίζονται στο σχήμα 1Γ.



**Σχήμα 2.** Προτεινόμενα μοντέλα για τις επαγόμενες από τα 3 ογκογονίδια κυτταροσκελετικές αλλαγές στα Caco-2 κύτταρα. (A) Το ογκογονίδιο  $BRAF^{V600E}$  ρυθμίζει τη RhoA, (B) Το ογκογονίδιο  $KRAS^{G12V}$  ρυθμίζει τη Cdc42 και (Γ) πιθανή συμμετοχή της Rac1 στο  $HRAS^{G12V}$ -επαγόμενο φαινόμενο EMT.

Αυτή η μελέτη δείχνει για πρώτη φορά ότι τα ογκογονίδια *BRAF* και *RAS* χρησιμοποιούν διαφορετικά Rho μονοπάτια προκειμένου να επάγουν μεταναστευτικές και διεισδυτικές ιδιότητες σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου. Επιπρόσθετα, τα ογκογονίδια συνεργάζονται με τον αυξητικό παράγοντα TGFβ-1 ώστε να μετασχηματίσουν τα Caco-2 κύτταρα πιο αποτελεσματικά. Τα ευρήματα και τα προτεινόμενα μοντέλα τη παρούσας μελέτης μπορεί να αποτελέσουν χρήσιμες πληροφορίες για μελλοντική, περαιτέρω μελέτη της επίδρασης των ογκογονιδίων μέσω συγκεκριμένων μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να συμβάλουν στο σχεδιασμό θεραπευτικών παραγόντων για τον καρκίνο του παχέος εντέρου στοχεύοντας σε συγκεκριμένο Rho μονοπάτι, ανάλογα με τις μεταλλάξεις που φέρει ο καρκινικός όγκος.



*ΠΕΡΙΛΗΨΗ*

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση της επίδρασης των ογκογονιδίων *KRAS*<sup>G12V</sup> και *BRAF*<sup>V600E</sup> στο σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε ο μηχανισμός μετασχηματισμού ανθρώπινων κυττάρων ενδιάμεσου αδενώματος του παχέος εντέρου (Caco-2) από τα δύο αυτά ογκογονίδια καθώς και η επίδρασή τους στις κυτταροσκελετικές ιδιότητες των κυττάρων μέσω των Rho GTPασών. Τα ευρήματα συγκρίνονται με το ρόλο των Rho GTPασών σε ένα μοντέλο επιθήλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT), το οποίο προέκυψε ύστερα από μετασχηματισμό των Caco-2 κυττάρων με το ογκογονίδιο *HRAS*<sup>G12V</sup>. Όσον αφορά το ρόλο του ογκογονιδίου *RAS* στον ανθρώπινο καρκίνο γενικά, αλλά και στον καρκίνο του παχέος εντέρου ειδικότερα, έχει γίνει εκτεταμένη μελέτη. Το ογκογονίδιο *B-RAF*, όμως άρχισε να μελετάται τα τελευταία χρόνια και οι περισσότερες μελέτες αφορούν στον καρκίνο του δέρματος, καθώς στο μελάνωμα τα ποσοστά εμφάνισης μεταλλάξεων του ογκογονιδίου είναι ιδιαίτερα υψηλά (~70%).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup> (κύτταρα Caco-BR) είναι πιο αποτελεσματικό από ότι το *KRAS*<sup>G12V</sup> (κύτταρα Caco-K) στο μετασχηματισμό αδενωματικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Στα Caco-BR κύτταρα τα χαμηλά επίπεδα της πρωτεΐνης KSR έχουν ως αποτέλεσμα τη μέτρια ενεργοποίηση της ERK, η οποία όμως μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου ενεργοποιεί μόρια όπως η κυκλίνη D1 και οδηγεί έτσι σε αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού και περαιτέρω το μετασχηματισμό των κυττάρων. Επιπλέον, το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup> ενίσχυσε ιδιαίτερα τις καρκινικές ιδιότητες των κυττάρων, καθώς τα μετασχηματισμένα με αυτό κύτταρα δημιούργησαν όγκους όταν ενέθηκαν σε ποντίκια σε αρκετά σύντομο χρονικό διάστημα. Από την άλλη πλευρά,

στα Caco-K κύτταρα η αυξημένη ενεργοποίηση της ERK οδήγησε στην ενεργοποίηση μηχανισμών κυτταρικής γήρανσης και στο μη αποτελεσματικό μετασχηματισμό των κυττάρων.

Μελέτη συσχέτισης των ογκογονιδίων με τις μικρές GTPάσες RhoA, Rac1, Cdc42, έδειξε για πρώτη φορά ότι τα ογκογονίδια *BRAF* και *RAS* χρησιμοποιούν διαφορετικά Rho μονοπάτια προκειμένου να επάγουν μεταναστευτικές και διεισδυτικές ιδιότητες σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (Caco-2). Συγκεκριμένα, το ογκογονίδιο *BRAF*<sup>V600E</sup> χρησιμοποιεί κυρίως τη RhoA, προκειμένου να ενισχύσει τη μεταναστευτική και διεισδυτική ιδιότητα των Caco-2 κυττάρων, ενώ το ογκογονίδιο *KRAS*<sup>G12V</sup>, κυρίως τη Cdc42. Από την άλλη πλευρά, το ογκογονίδιο *HRAS*<sup>G12V</sup> οδήγησε στο φαινόμενο της επιθήλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης, αλλάζοντας την έκφραση και ενεργοποίηση μορίων που σχετίζονται με το φαινόμενο αυτό. Επιπρόσθετα, τα ογκογονίδια συνεργάζονται με τον αυξητικό παράγοντα TGFβ-1 ώστε να μετασχηματίσουν τα Caco-2 κύτταρα πιο αποτελεσματικά.

Τα ευρήματα και τα προτεινόμενα μοντέλα τη παρούσας μελέτης μπορεί να αποτελέσουν χρήσιμες πληροφορίες για μελλοντική, περαιτέρω μελέτη της επίδρασης των ογκογονιδίων μέσω συγκεκριμένων μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να συμβάλουν στο σχεδιασμό θεραπευτικών παραγόντων για τον καρκίνο του παχέος εντέρου στοχεύοντας σε συγκεκριμένο Rho μονοπάτι, ανάλογα με τις γονιδιακές μεταλλάξεις που φέρει το κάθε νεόπλασμα.

*SUMMARY*

The purpose of this study was to investigate the effects of oncogenes *BRAF*<sup>V600E</sup> and *KRAS*<sup>G12V</sup> in sporadic colorectal cancer. In particular, it was studied the mechanism of transformation of human intermediate adenoma colon cells (Caco-2) by these two oncogenes and their effect on cytoskeletal properties of cells through Rho GTPases. The findings are compared with the role of Rho GTPases in a model of Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT), which resulted after transformation of Caco-2 cells with oncogene *HRAS*<sup>G12V</sup>. Regarding the role of *RAS* oncogene in human cancer in general and in colorectal cancer in particular, extensive study has been done. Studies about the role of oncogene *BRAF* in human cancer although, began in recent years and most of these are related to skin cancer, including melanoma, since the incidence of *BRAF* mutations are high (~ 70%) in this type of cancer.

According to the results of this study, *BRAF*<sup>V600E</sup> oncogene (Caco-BR cells) is more effective than *KRAS*<sup>G12V</sup> (Caco-K cells) in transformation of colon adenoma cells. In Caco-BR cells, low levels of KSR protein have resulted in modest activation of ERK, which accumulates into the nucleus, activating molecules such as cyclin D1, leading thus to an increase in proliferation rate and further cell transformation. Furthermore, *BRAF*<sup>V600E</sup> strengthened the carcinogenic properties of the cells, since Caco-BR cells managed to form tumors in short time, when injected into SCID mice. On the other hand, in Caco-K cells increased activation of ERK resulted in the appearance of cellular senescence characteristics and in inefficient transformation of cells.

Study of correlation of the two oncogenes with the small GTPases RhoA, Rac1, Cdc42, showed for the first time that *BRAF* and *RAS* oncogenes use different Rho pathways to induce migration and invasive properties of human colon cancer cells (Caco-2). Specifically, *BRAF*<sup>V600E</sup> is using mainly RhoA, in order to enhance the migratory and invasive capacity of Caco-2 cells and *KRAS*<sup>G12V</sup>, mainly Cdc42. On

the other hand, HRAS<sup>G12V</sup> led to the phenomenon of Epithelial to Mesenchymal Transition, altering the expression and activation of molecules involved in this phenomenon. In addition, oncogenes cooperate with the growth factor TGF- $\beta$ 1 to transform Caco-2 cells more efficiently.

Findings and proposed models of this study may provide useful information for future and further study of the effects of oncogenes through specific signal transduction pathways. The results could help in designing therapeutic agents for colorectal cancer by targeting specific Rho pathway, depending on the gene mutations that are present in the tumor.

*ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ*

1. Μαρμάρας Β. και Λαμπροπούλου-Μαρμάρα Μ. Βιολογία Κυττάρου, 4<sup>η</sup> έκδοση, 2000
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009;59(4):225-249.
3. Davies H, Bignell GR, Cox C et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892):949-954.
4. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61(5):759-767.
5. Cho KR, Vogelstein B. Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence. *Cancer* 1992;70(6 Suppl):1727-1731.
6. Wolthuis RM, Bos JL. Ras caught in another affair: the exchange factors for Ral. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9(1):112-117.
7. Gonzalez-Garcia A, Pritchard CA, Paterson HF, Mavria G, Stamp G, Marshall CJ. RalGDS is required for tumor formation in a model of skin carcinogenesis. *Cancer Cell* 2005;7(3):219-226.
8. Innocenti M, Frittoli E, Ponzanelli I et al. Phosphoinositide 3-kinase activates Rac by entering in a complex with Eps8, Abi1, and Sos-1. *J Cell Biol* 2003;160(1):17-23.
9. Harvey JJ. An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature* 1964;12(204):1104-1105.
10. Kirsten WH, Schauf V, McCoy J. Properties of a murine sarcoma virus. *Bibl Haematol* 1970;(36):246-249.
11. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49(17):4682-4689.
12. Nagasaka T, Sasamoto H, Notohara K et al. Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS, and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation. *J Clin Oncol* 2004;22(22):4584-4594.
13. Fransen K, Klintenas M, Osterstrom A, Dimberg J, Monstein HJ, Soderkvist P. Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 2004;25(4):527-533.
14. Brose MS, Volpe P, Feldman M et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 2002;62(23):6997-7000.
15. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 2003;3(6):459-465.
16. Bar-Sagi D, Feramisco JR. Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins. *Science* 1986;233(4768):1061-1068.



17. Pawlak G, Helfman DM. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11(1):41-47.
18. Campbell PM, Der CJ. Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2004;14(2):105-114.
19. Pollock CB, Shirasawa S, Sasazuki T, et al., K-RAS is required to maintain changes in cytoskeletal organization, adhesion, and motility in colon cancer cells. *Cancer Res.* 2005 15;65(4):1244-50.
20. Hagemann C, Rapp UR. Isoform-specific functions of Raf kinases. *Exp Cell Res* 1999;253(1):34-46.
21. Chong H, Vikis HG, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* 2003;15(5):463-469.
22. Morrison DK, Cutler RE. The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9(2):174-179.
23. Morice C, Nothias F, Konig S et al. Raf-1 and B-Raf proteins have similar regional distributions but differential subcellular localization in adult rat brain. *Eur J Neurosci* 1999;11(6):1995-2006.
24. Wang HG, Rapp UR, Reed JC. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* 1996;15(87):629-638.
25. Yuryev A, Ono M, Macaluso F, Wennogle LP. Isoform-specific localization of A-RAF in mitochondria. *Mol Cell Biol* 2000;20(13):4870-4878.
26. Jansen HW, Lurz R, Bister K, Bonner TI, Mark GE, Rapp UR. Homologous cell-derived oncogenes in avian carcinoma virus MH2 and murine sarcoma virus 3611. *Nature* 1984;25(307):281-284.
27. Rapp UR, Goldsborough MD, Mark GE et al. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80(14):4218-4222.
28. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002;418(6901):934.
29. Yuen ST, Chan TL, Ho JW et al. Germline, somatic and epigenetic events underlying mismatch repair deficiency in colorectal and HNPCC-related cancers. *Oncogene* 2002;21(49):7585-7592.
30. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006;38(7):787-793.
31. Ikehara N, Semba S, Sakashita M, Aoyama N, Kasuga M, Yokozaki H. BRAF mutation associated with dysregulation of apoptosis in human colorectal neoplasms. *Int J Cancer* 2005;115(6):943-950.

32. Klein RM, Spofford LS, Abel EV, Ortiz A, Aplin AE. B-RAF regulation of Rnd3 participates in actin cytoskeletal and focal adhesion organization. *Mol Biol Cell* 2008;19(2):498-508.
33. Klein RM, Aplin AE. Rnd3 regulation of the actin cytoskeleton promotes melanoma migration and invasive outgrowth in three dimensions. *Cancer Res* 2009;69(6):2224-2233.
34. Filmus J, Robles AI, Shi W, Wong MJ, Colombo LL, Conti CJ. Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. *Oncogene* 1994;9(12):3627-3633.
35. Chang F, Steelman LS, McCubrey JA. Raf-induced cell cycle progression in human TF-1 hematopoietic cells. *Cell Cycle* 2002;1(3):220-226.
36. Alao JP. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol Cancer* 2007;6:24.
37. Mermelshtein A, Gerson A, Walfisch S et al. Expression of D-type cyclins in colon cancer and in cell lines from colon carcinomas. *Br J Cancer* 2005;93(3):338-345.
38. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997;88(5):593-602.
39. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 2005;436(7051):720-724.
40. Freeman JL, Abo A, Lambeth JD. Rac "insert region" is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65. *J Biol Chem* 1996;271(33):19794-19801.
41. Boureux A, Vignal E, Faure S, Fort P. Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol* 2007;24(1):203-216.
42. Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 2007;129(5):865-877.
43. Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 2000;348 Pt 2:241-255.
44. Hall A. G proteins and small GTPases: distant relatives keep in touch. *Science* 1998;280(5372):2074-2075.
45. Sahai E, Marshall CJ. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2(2):133-142.
46. Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992;70(3):389-399.

47. Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 1995;81(1):53-62.
48. Olson MF, Ashworth A, Hall A., An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science*. 1995 Sep 1;269(5228):1270-2.
49. Gille H, Downward J. Multiple ras effector pathways contribute to G(1) cell cycle progression. *J Biol Chem* 1999;274(31):22033-22040.
50. Welsh CF, Roovers K, Villanueva J, Liu Y, Schwartz MA, Assoian RK. Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. *Nat Cell Biol* 2001;3(11):950-957.
51. Gjoerup O, Lukas J, Bartek J, Willumsen BM. Rac and Cdc42 are potent stimulators of E2F-dependent transcription capable of promoting retinoblastoma susceptibility gene product hyperphosphorylation. *J Biol Chem* 1998;273(30):18812-18818.
52. Auer KL, Park JS, Seth P et al. Prolonged activation of the mitogen-activated protein kinase pathway promotes DNA synthesis in primary hepatocytes from p21Cip-1/WAF1-null mice, but not in hepatocytes from p16INK4a-null mice. *Biochem J* 1998;336 ( Pt 3):551-560.
53. Adnane J, Bizouarn FA, Qian Y, Hamilton AD, Sebti SM. p21(WAF1/CIP1) is upregulated by the geranylgeranyltransferase I inhibitor GGTI-298 through a transforming growth factor beta- and Sp1-responsive element: involvement of the small GTPase rhoA. *Mol Cell Biol* 1998;18(12):6962-6970.
54. Olson MF, Paterson HF, Marshall CJ. Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature* 1998;394(6690):295-299.
55. Hu W, Bellone CJ, Baldassare JJ. RhoA stimulates p27(Kip) degradation through its regulation of cyclin E/CDK2 activity. *J Biol Chem* 1999;274(6):3396-3401.
56. Fritz G, Just I, Kaina B. Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer* 1999;81(5):682-687.
57. Sahai E, Olson MF, Marshall CJ. Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *EMBO J* 2001;20(4):755-766.
58. Qiu RG, Abo A, McCormick F, Symons M. Cdc42 regulates anchorage-independent growth and is necessary for Ras transformation. *Mol Cell Biol* 1997;17(6):3449-3458.
59. Kissil JL, Walmsley MJ, Hanlon L et al. Requirement for Rac1 in a K-ras induced lung cancer in the mouse. *Cancer Res* 2007;67(17):8089-8094.

60. Vega FM, Ridley AJ. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett* 2008;582(14):2093-2101.
61. Braga VM, Betson M, Li X, Lamarche-Vane N. Activation of the small GTPase Rac is sufficient to disrupt cadherin-dependent cell-cell adhesion in normal human keratinocytes. *Mol Biol Cell* 2000;11(11):3703-3721.
62. Quinlan MP. Rac regulates the stability of the adherens junction and its components, thus affecting epithelial cell differentiation and transformation. *Oncogene* 1999;18(47):6434-6442.
63. Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A et al. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 2001;12(1):27-36.
64. Ridley AJ. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 15):2713-2722.
65. Adams JC. Roles of fascin in cell adhesion and motility. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16(5):590-596.
66. Adams JC, Schwartz MA. Stimulation of fascin spikes by thrombospondin-1 is mediated by the GTPases Rac and Cdc42. *J Cell Biol* 2000;150(4):807-822.
67. Parsons M, Adams JC. Rac regulates the interaction of fascin with protein kinase C in cell migration. *J Cell Sci* 2008;121(Pt 17):2805-2813.
68. Hashimoto Y, Skacel M, Lavery IC, Mukherjee AL, Casey G, Adams JC. Prognostic significance of fascin expression in advanced colorectal cancer: an immunohistochemical study of colorectal adenomas and adenocarcinomas. *BMC Cancer* 2006;6:241.
69. Worthylake RA, Lemoine S, Watson JM, Burridge K. RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J Cell Biol* 2001;154(1):147-160.
70. Adamson P, Etienne S, Couraud PO, Calder V, Greenwood J. Lymphocyte migration through brain endothelial cell monolayers involves signaling through endothelial ICAM-1 via a rho-dependent pathway. *J Immunol* 1999;162(5):2964-2973.
71. van Golen KL, Wu ZF, Qiao XT, Bao L, Merajver SD. RhoC GTPase overexpression modulates induction of angiogenic factors in breast cells. *Neoplasia* 2000;2(5):418-425.
72. Gomez del PT, Benitah SA, Valeron PF, Espina C, Lacal JC. Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link. *Bioessays* 2005;27(6):602-613.
73. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139(5):871-890.
74. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003;112(12):1776-1784.

75. Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta* 2009;1796(2):75-90.
76. Andreolas C, Kalogeropoulou M, Voulgari A, Pintzas A. Fra-1 regulates vimentin during Ha-RAS-induced epithelial mesenchymal transition in human colon carcinoma cells. *Int J Cancer* 2008;122(8):1745-1756.
77. Vardouli L, Moustakas A, Stournaras C. LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 2005;280(12):11448-11457.
78. Sequeira L, Dubyk CW, Riesenberger TA, Cooper CR, van Golen KL. Rho GTPases in PC-3 prostate cancer cell morphology, invasion and tumor cell diapedesis. *Clin Exp Metastasis* 2008;25(5):569-579.
79. McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton VG, Frame MC. The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer* 2005;5(7):505-515.
80. Hsia DA, Mitra SK, Hauck CR et al. Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J Cell Biol* 2003;160(5):753-767.
81. Cance WG, Harris JE, Iacocca MV et al. Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin Cancer Res* 2000;6(6):2417-2423.
82. Roberts ML, Drosopoulos KG, Vasileiou I et al. Microarray analysis of the differential transformation mediated by Kirsten and Harvey Ras oncogenes in a human colorectal adenocarcinoma cell line. *Int J Cancer* 2006;118(3):616-627.
83. Oft M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Beug H, Reichmann E. TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev* 1996;10(19):2462-2477.
84. Shirasawa S, Furuse M, Yokoyama N, Sasazuki T. Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras. *Science* 1993;260(5104):85-88.
85. Hingorani SR, Jacobetz MA, Robertson GP, et al., Suppression of BRAF(V599E) in human melanoma abrogates transformation. *Cancer Res*. 2003 Sep 1;63(17):5198-202.
86. Ikenoue T, Hikiba Y, Kanai F et al. Functional analysis of mutations within the kinase activation segment of B-Raf in human colorectal tumors. *Cancer Res* 2003;63(23):8132-8137.
87. Suraweera N, Duval A, Reperant M, et al., Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology*. 2002 Dec;123(6):1804-11.

88. Oikonomou E, Makrodouli E, Evagelidou M, Joyce T, Probert L, Pintzas A. BRAF(V600E) efficient transformation and induction of microsatellite instability versus KRAS(G12V) induction of senescence markers in human colon cancer cells. *Neoplasia* 2009;11(11):1116-1131.
89. Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* 2005;5(12):921-929.
90. Lopez-Bergami P, Huang C, Goydos JS et al. Rewired ERK-JNK signaling pathways in melanoma. *Cancer Cell* 2007;11(5):447-460.
91. Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J* 1999;18(3):664-674.
92. Dimri GP, Lee X, Basile G et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(20):9363-9367.
93. Ferbeyre G, de SE, Querido E, Baptiste N, Prives C, Lowe SW. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* 2000;14(16):2015-2027.
94. Ferbeyre G. Barriers to Ras transformation. *Nat Cell Biol* 2007;9(5):483-485.
95. Herman JG, Merlo A, Mao L et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995;55(20):4525-4530.
96. Loukola A, Eklin K, Laiho P et al. Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res* 2001;61(11):4545-4549.
97. Laghi L, Bianchi P, Malesci A. Differences and evolution of the methods for the assessment of microsatellite instability. *Oncogene* 2008;27(49):6313-6321.
98. Makrodouli E, Oikonomou E, Miachal K et al. BRAF and RAS oncogenes differentially regulate Rho GTPase pathways to induce migration and invasion properties in human colon cancer cells. *Mol Cancer* 2010;Under Revision (Under Revision).
99. Jaffe AB, Kaji N, Durgan J, Hall A. Cdc42 controls spindle orientation to position the apical surface during epithelial morphogenesis. *J Cell Biol* 2008;183(4):625-633.
100. Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* 2003;30(3):256-268.
101. Petersen OW, Ronnov-Jessen L, Howlett AR, Bissell MJ. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation

- pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(19):9064-9068.
102. Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 2000;148(4):779-790.
  103. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *J Cell Sci* 2008;121(Pt 6):727-735.
  104. Fritz G, Brachetti C, Bahlmann F, Schmidt M, Kaina B. Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer* 2002;87(6):635-644.
  105. Darenfed H, Dayanandan B, Zhang T, Hsieh SH, Fournier AE, Mandato CA., Molecular Characterization of the Effects of Y-27632. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 2007, 64(2):97-109
  106. Grewal S, Carver JG, Ridley AJ, Mardon HJ., Implantation of the human embryo requires Rac1-dependent endometrial stromal cell migration. *PNAS* 2008, 105(42):16189-94
  107. Tsuji T, Ishizaki T, Okamoto M, Higashida C, Kimura K, Furuyashiki T, Arakawa Y, Birge RB, Nakamoto T, Hirai H, Narumiya S. ROCK and mDia1 antagonize in Rho-dependent Rac activation in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol.* 2002,157:819–830
  108. Khosravi-Far R, Solski PA, Clark GJ, Kinch MS, Der CJ. Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Mol Cell Biol* 1995;15(11):6443-6453.
  109. Bakin AV, Rinehart C, Tomlinson AK, Arteaga CL. p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 15):3193-3206.
  110. Shintani Y, Wheelock MJ, Johnson KR. Phosphoinositide-3 kinase-Rac1-c-Jun NH2-terminal kinase signaling mediates collagen I-induced cell scattering and up-regulation of N-cadherin expression in mouse mammary epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2006;17(7):2963-2975.
  111. Parsons JT. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 8):1409-1416.
  112. Μαρμάρας Β. και Λαμπροπούλου-Μαρμάρα Μ. Βιολογία Κυττάρου, 4<sup>η</sup> έκδοση, 2000
  113. van Leeuwen FN, van DS, Kain HE, van der Kammen RA, Collard JG. Rac regulates phosphorylation of the myosin-II heavy chain, actinomyosin disassembly and cell spreading. *Nat Cell Biol* 1999;1(4):242-248.
  114. Yamaguchi Y, Katoh H, Yasui H, Mori K, Negishi M. RhoA inhibits the nerve growth factor-induced Rac1 activation through Rho-associated kinase-

dependent pathway. *J Biol Chem* 2001;276(22):18977-18983.

115. De Bosscher K, Hill CS, Nicolás FJ. Molecular and functional consequences of Smad4 C-terminal missense mutations in colorectal tumour cells. *Biochem J*. 2004, 379:209-16.
116. Fleming YM, Ferguson GJ, Spender LC et al. TGF-beta-mediated activation of RhoA signalling is required for efficient (V12)HaRas and (V600E)BRAF transformation. *Oncogene* 2009;28(7):983-993.
117. Moustakas A and Heldin CH, Non-Smad TGF- $\beta$  signals, *Journal of Cell Science* 2005, 118:3573-84.
118. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research* 2009, 19:156-72.
119. Forrester K, Almoguera C, Han K, Grizzle WE, Perucho M. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 1987;327(6120):298-303.
120. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87(2):159-170.
121. Cappuzzo F, Ligorio C, Janne PA et al. Prospective study of gefitinib in epidermal growth factor receptor fluorescence in situ hybridization-positive/phospho-Akt-positive or never smoker patients with advanced non-small-cell lung cancer: the ONCOBELL trial. *J Clin Oncol* 2007;25(16):2248-2255.
122. De RW, Piessevaux H, De SJ et al. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol* 2008;19(3):508-515.
123. Wellbrock C, Ogilvie L, Hedley D et al. V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Res* 2004;64(7):2338-2342.
124. Mitsutake N, Knauf JA, Mitsutake S, Mesa C, Jr Zhang L, Fagin JA. Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. *Cancer Research* 2005;2465-2473.
125. Benjamin CL, Ananthaswamy HN. Oncogenic potential of BRAF versus RAS. *Cancer Lett* 2008;261(2):137-146.
126. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000;351 Pt 2:289-305.
127. Razidlo GL, Kortum RL, Haferbier JL, Lewis RE. Phosphorylation regulates KSR1 stability, ERK activation, and cell proliferation. *J Biol Chem* 2004;279(46):47808-47814.



128. Xing HR, Cordon-Cardo C, Deng X et al. Pharmacologic inactivation of kinase suppressor of ras-1 abrogates Ras-mediated pancreatic cancer. *Nat Med* 2003;9(10):1266-1268.
129. Bessard A, Fremin C, Ezan F, Fautrel A, Gailhouste L, Baffet G. RNAi-mediated ERK2 knockdown inhibits growth of tumor cells in vitro and in vivo. *Oncogene* 2008;27(40):5315-5325.
130. Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P. Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. *Mol Cell Biol* 2008;28(1):511-527.
131. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004;116(6):855-867.
132. Garnett MJ, Rana S, Paterson H, Barford D, Marais R. Wild-type and mutant B-RAF activate C-RAF through distinct mechanisms involving heterodimerization. *Mol Cell* 2005;20(6):963-969.
133. Dumaz N, Hayward R, Martin J et al. In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling. *Cancer Res* 2006;66(19):9483-9491.
134. Karasarides M, Chiloehes A, Hayward R et al. B-RAF is a therapeutic target in melanoma. *Oncogene* 2004;23(37):6292-6298.
135. Hatzivassiliou G, Song K, Yen I et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 2010;464(7287):431-435.
136. Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 2010;464(7287):427-430.
137. Lin AW, Barradas M, Stone JC, van AL, Serrano M, Lowe SW. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* 1998;12(19):3008-3019.
138. Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop JM. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev* 1998;12(19):2997-3007.
139. Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF. Ras promotes p21(Waf1/Cip1) protein stability via a cyclin D1-imposed block in proteasome-mediated degradation. *EMBO J* 2003;22(9):2036-2046.
140. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58(22):5248-5257.

141. Oliveira C, Velho S, Domingo E et al. Concomitant RASSF1A hypermethylation and KRAS/BRAF mutations occur preferentially in MSI sporadic colorectal cancer. *Oncogene* 2005;24(51):7630-7634.
142. Vilar E, Scaltriti M, Balmana J et al. Microsatellite instability due to hMLH1 deficiency is associated with increased cytotoxicity to irinotecan in human colorectal cancer cell lines. *Br J Cancer* 2008;99(10):1607-1612.
143. Bertagnolli MM, Niedzwiecki D, Compton CC et al. Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and Leukemia Group B Protocol 89803. *J Clin Oncology* 2009;27(11):1814-1821.
144. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007;7(6):415-428.
145. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2(6):442-454.
146. Andreolas C, Kalogeropoulou M, Voulgari A, Pintzas A. Fra-1 regulates vimentin during Ha-RAS-induced epithelial mesenchymal transition in human colon carcinoma cells. *Int J Cancer* 2008;122(8):1745-1756.
147. Du J, Jiang B, Coffey RJ, Barnard J. Raf and RhoA cooperate to transform intestinal epithelial cells and induce growth resistance to transforming growth factor beta. *Mol Cancer Res* 2004;2(4):233-241.
148. Sumimoto H, Hirata K, Yamagata S et al. Effective inhibition of cell growth and invasion of melanoma by combined suppression of BRAF (V599E) and Skp2 with lentiviral RNAi. *Int J Cancer* 2006;118(2):472-476.
149. Kuroda S, Fukata M, Nakagawa M et al. Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Science* 1998;281(5378):832-835.
150. Joyce T. et al. A molecular signature for oncogenic BRAF in human colon cancer cells is revealed by microarray analysis. *Genes, Chromosomes & Cancer* 2010;Submitted.
151. Blomquist A, Schworer G, Schabrowski H et al. Identification and characterization of a novel Rho-specific guanine nucleotide exchange factor. *Biochem J* 2000;352 Pt 2:319-325.
152. Oleksy A, Opalinski L, Derewenda U, Derewenda ZS, Otlewski J. The molecular basis of RhoA specificity in the guanine nucleotide exchange factor PDZ-RhoGEF. *J Biol Chem* 2006;281(43):32891-32897.
153. Pullikuth AK, Catling AD. Extracellular signal-regulated kinase promotes Rho-dependent focal adhesion formation by suppressing p190A RhoGAP. *Mol Cell Biol* 2010;30(13):3233-3248.

154. Boulter E, Garcia-Mata R, Guilluy C et al. Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1. *Nat Cell Biol* 2010;12(5):477-483.
155. Malchinkhuu E, Sato K, Horiuchi Y et al. Role of p38 mitogen-activated kinase and c-Jun terminal kinase in migration response to lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate in glioma cells. *Oncogene* 2005;24(44):6676-6688.
156. Joyce T, Cantarella D, Isella C, Medico E, Pintzas A. A molecular signature for Epithelial to Mesenchymal transition in a human colon cancer cell system is revealed by large-scale microarray analysis. *Clin Exp Metastasis* 2009;26(6):569-587.
157. Comunale F, Causeret M, Favard C et al. Rac1 and RhoA GTPases have antagonistic functions during N-cadherin-dependent cell-cell contact formation in C2C12 myoblasts. *Biol Cell* 2007;99(9):503-517.
158. Shin I, Kim S, Song H, Kim HR, Moon A. H-Ras-specific activation of Rac-MKK3/6-p38 pathway: its critical role in invasion and migration of breast epithelial cells. *J Biol Chem* 2005;280(15):14675-14683.
159. Li Q, Mattingly RR. Restoration of E-cadherin cell-cell junctions requires both expression of E-cadherin and suppression of ERK MAP kinase activation in Ras-transformed breast epithelial cells. *Neoplasia* 2008;10(12):1444-1458.
160. Kwei KA, Finch JS, Ranger-Moore J, Bowden GT. The role of Rac1 in maintaining malignant phenotype of mouse skin tumor cells. *Cancer Lett* 2006;231(2):326-338.
161. Cicchini C, Laudadio I, Citarella F et al. TGFbeta-induced EMT requires focal adhesion kinase (FAK) signaling. *Exp Cell Res* 2008;314(1):143-152.
162. Zheng Y, Xia Y, Hawke D et al. FAK phosphorylation by ERK primes ras-induced tyrosine dephosphorylation of FAK mediated by PIN1 and PTP-PEST. *Mol Cell* 2009;35(1):11-25.
163. Kalogeropoulou M, Voulgari A, Kostourou V et al. TAF4b and Jun/activating protein-1 collaborate to regulate the expression of integrin alpha6 and cancer cell migration properties. *Mol Cancer Res* 2010;8(4):554-568.

