



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

## **Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙ - ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ**

**ΓΙΑΝΝΗΣ Α. ΣΚΟΥΦΟΣ**  
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ, M. Sc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2004



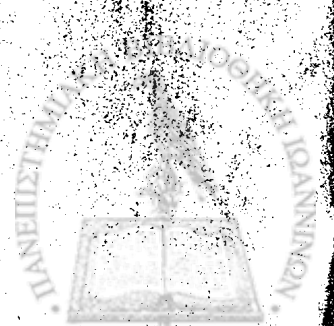
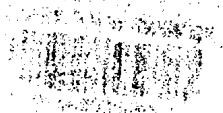
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000336957



Αρ. ΕΠ:..... 11020/ 2003





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

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ:  
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙ - ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ**

**ΓΙΑΝΝΗΣ Α. ΣΚΟΥΦΟΣ**  
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ, M. Sc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2004



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



Ημερομηνία αιτήσεως: 22-11-1998

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 379α/11-5-99

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Επιβλέπων:** Ευαγγέλου Άγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας

**Μέλη:** Καλφακάκου Βασιλική, Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας

Παπαδοπούλου Χρυσάνθη, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 22-6-1999

Ημερομηνία καταθέσεως διδακτορικής διατριβής: 25-6-2004

1) Ανασύσταση τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής: 5069/10-6-2003

**Επιβλέπων:** Ευαγγέλου Άγγελος, Καθηγητής Φυσιολογίας

**Μέλη:** Καλφακάκου Βασιλική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας

Κωλέπας Ευάγγελος, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας

2) Ανασύσταση τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής: 5349/8-6-2004

**Επιβλέπων:** Κωλέπας Ευάγγελος, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας

**Μέλη:** Ευαγγέλου Άγγελος, Καθηγητής Φυσιολογίας

Καλφακάκου Βασιλική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ:** Επαμεινώνδας Τσιάνος, Καθηγητής Παθολογίας



## ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Νίκη Αγκάντη, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καναβάρος Παναγιώτης, Καθηγητής Ανατομίας, Ιστολογίας, Εμβρυολογίας,

Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Άγγελος Ευαγγέλου, Καθηγητής Φυσιολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Φθενάκης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιοπαθολογίας της

Αναπαραγωγής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ταϊτζόγλου Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας, Αριστοτέλειο

Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Βασιλική Καλφακάκου, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Πανεπιστημίου

Ιωαννίνων

Ευάγγελος Κωλέπας, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Πανεπιστημίου

Ιωαννίνων

Η διδακτορική διατριβή έγινε αποδεκτή με βαθμό “Άριστα”

Η Γραμματέας

Ε. ΖΑΒΕΡΔΙΝΟΥ-ΤΣΑΓΓΑΛΑ



**Στη μητέρα μου  
Στην Αθηνά  
Στη Μαρία και το Στέλιο**





# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η φυσιολογία αποτελεί τη θεμέλια ουσία της κατανόησης των μηχανισμών της ζωής των έμβιων όντων. Η ουσιαστική μελέτη της εμβαθύνει τις γνώσεις μας για τη λειτουργία των οργανισμών, για τις αλληλεπιδράσεις των συστημάτων, ακόμα και για τις κυτταρικές αποκρίσεις σε ποικίλα ερεθίσματα. Η μοριακή φυσιολογία αποτελεί τομέα-πρόκληση, τόσο στο πεδίο της πρακτικής διάγνωσης, όσο και της ερευνητικής προσπάθειας και ο ρόλος της εξελίσσεται ανάλογα με την ανάπτυξη εργαστηριακών και βιολογικών μεθόδων, ώστε τα φυσιολογικά ή παθολογικά φαινόμενα να προσεγγίζονται και να εξηγούνται σε μοριακό επίπεδο.

Οι δυνατότητες που μου έδωσε το Εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων ήταν πολλαπλής εμβέλειας. Αφενός στήριζα τα ενδιαφέροντά μου με τον καρπό που μου παρείχε όλο το προσωπικό του εργαστηρίου, την υψηλή αφοσίωση στους στόχους του, στην επιστήμη και στον άνθρωπο, αφετέρου μυήθηκα σε ένα σύστημα αξιών και τεχνικών εργασίας και πειραματισμού που εμπλούτισαν όχι μόνο την επιστημονική μου επάρκεια, αλλά και την ψυχική και νοητική ισορροπία που διοχετεύεται μέσα από ένα ερευνητικό πρόγραμμα.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή ξεκίνησε στο τέλος του έτους 1999 και ολοκληρώθηκε στο έτος 2004, εκπονήθηκε δε αποκλειστικά στο Εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Σκοπός της ερευνητικής μας προσπάθειας ήταν να κατανοήσουμε την επίδραση μηχανισμών καταπόνησης σε κύτταρα θηλαστικών και να συσχετιστούν οι στρεσογόνοι παράγοντες με την επαγωγή ή αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (κυτταρική απόπτωση) και το ρόλο συγκεκριμένων αντι-αποπτωτικών γονιδίων (ApoJ και Bcl-2).

Κάτω από αυτό το πρίσμα η ανάγκη για διερεύνηση νέων χημειοθεραπευτικών ουσιών με δυνατότητα χρησιμοποίησής τους κατά νεοπλαστικών εξαλλαγών και η ενσωματωμένη εμπειρία του εργαστηρίου Φυσιολογίας για το ιχνοστοιχείο του βαναδίου μας οδήγησαν στη χρήση του θειικού βαναδύλιου ως πιθανού παράγοντα στρες, ο οποίος μπορεί να ενεργοποιήσει τη σφιγγομυελινάση οδηγώντας στην παραγωγή κεραμιδίων, βασική μονάδα λιπιδίων



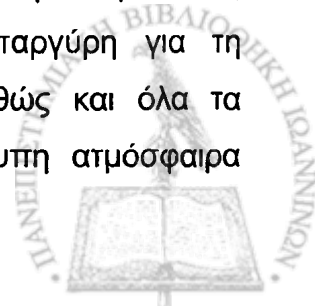
που ανευρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη και που η αυξημένη τους ενδοκυτταρική συγκέντρωση έχει τεκμηριωθεί ως παράγοντας αναστολής του κυτταρικού κύκλου, κυτταρικής διαφοροποίησης και κυρίως έναρξης της αποπτωτικής διαδικασίας.

Ταυτόχρονα εξετάστηκε μια σειρά πρωτεϊνικών στόχων ή πορειών, στις οποίες συμβάλλουν ο μεταγραφικός παράγοντας AP-1 (v-fos, c-fos), το καλά μελετημένο αντι-αποπτωτικό γονίδιο της Bcl-2 και το υπό μελέτη αντι-αποπτωτικό γονίδιο της κλαστρίνης/ApoJ. Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 είναι αποτελεσματικός αναστολέας του κυτταρικού πολλαπλασιασμού προκαλώντας αποπτωτικό θάνατο. Η πρωτεΐνη p53 εμπλέκεται στις αποκρίσεις κυττάρων σε γονοτοξικό στρες γι' αυτό και μελετήσαμε μέρος του μηχανισμού με τον οποίο η p53 ευαισθητοποιεί τα κύτταρα στο κεραμιδίο, όπως και τη συσχέτιση έκφρασης της p53 και των δύο αντι-αποπτωτικών γονιδίων ApoJ και Bcl-2.

Επειδή στο δέρμα και πιο ειδικά στα κύτταρα της επιδερμίδας (κερατινοκύτταρα, ινοβλάστες), η οποία είναι και ο πλέον εκτεθειμένος ιστός σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (ακτινοβολία, χημικοί στρέσορες), η απόπτωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση κυττάρων ή στην αναγέννησή τους κατά τη διάρκεια επίδρασης ενός παράγοντα στρες, οι επιδράσεις του θειικού βαναδύλιου και του κεραμιδίου μελετήθηκαν σε κερατινοκύτταρα HaCaT και ινοβλάστες MRC-5.

Ηθική και πρακτική ενίσχυση παράλληλα με την απόκτηση του θεωρητικού υπόβαθρου για την εκπόνηση της διατριβής, μου παρασχέθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας και γι' αυτό είμαι ευγνώμων στον Επίκουρο καθηγητή Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής κ. Ευάγγελο Κωλέττα, ενώ η αγκαλιά του εργαστηρίου παρέμενε ανοικτή, όπως και η ολόψυχη συμπαράσταση και η συμβουλευτική καθοδήγηση καθόλη τη διάρκεια της εργασίας, από τον Καθηγητή Φυσιολογίας και Διευθυντή του Εργαστηρίου κ. Άγγελο Ευαγγέλου, γεγονός που συνέβαλε στην πραγματοποίησή της. Χωρίς την άοκνη και πολύπλευρη βοήθειά τους, σημαντικά τμήματα της διατριβής θα ήταν ουτοπική επιθυμία.

Θεωρώ υποχρέωση να μνημονεύσω για τη φιλική και επιστημονική της συνεργασία την Αναπληρωτή Καθηγητή της Φυσιολογίας κ. Βασιλική Καλφακάκου, το μεταπτυχιακό φοιτητή της Φυσιολογίας κ. Ευάγγελο Κονταργύρη για τη συνεπικουρία του στη διεξαγωγή των μοριακών τεχνικών, καθώς και όλα τα ακαδημαϊκά μέλη του Εργαστηρίου Φυσιολογίας για την πρότυπη ατμόσφαιρα



επικοινωνίας και αίσθησης οικογενειακού περιβάλλοντος που πηγάζει από την άψογη συμπεριφορά και την απρόσκοπτη διάθεση κατανόησης και υποστήριξης σε όλα τα επίπεδα του υποψηφίου διδάκτορα.

Εκφράζω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για τις εύστοχες παρατηρήσεις και τη συμβολή τους στην επεξεργασία της τελικής μορφής της διατριβής. Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω ιδιαίτερα το φίλο και συνάδελφο Δρ. Γιώργο Παπαδόπουλο για τη διηνεκή του συμβουλευτική συμβολή, όπως και τον κ. Ανδρέα Φλώρο και κ. Γιάννη Αναστασίου για την τεχνική αρτιότητα του τελικού κειμένου.

Η αμέριστη συμπαράσταση της μητέρας μου, όπως και το ακραίο πάθος της συζύγου μου για την προαγωγή του άριστου στη ζωή και η ουσιαστική της στήριξη, αποτέλεσαν τον κινητήριο μοχλό για την επιστημονική μου ανάδειξη και την ευόδωση στην εκπόνηση της παρούσας διατριβής.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΕΝΟΤΗΤΑ I: ΒΑΝΑΔΙΟ

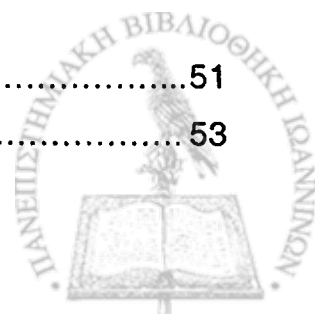
1.1 Βανάδιο: Ιστορική αναδρομή-Από τη Vanadis στην Άτροπος.....	1
2.1 Χημικές και βιοχημικές ιδιότητες του βαναδίου.....	3
3.1 Βιοκινητική, κατανομή και μεταβολισμός του βαναδίου.....	5
4.1 Τοξικότητα των ενώσεων βαναδίου σε θηλαστικά.....	7
5.1 Αντι-καρκινικές και αποπτωτικές δράσεις των ενώσεων βαναδίου στην πειραματική καρκινογένεση σε ζώα.....	9
6.1 Κυτταρικοί μηχανισμοί των αντικαρκινικών δράσεων των ενώσεων του βαναδίου.....	13
7.1 Επίδραση του βαναδίου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.....	13
8.1 Κυτταρικός θάνατος και σύμπλοκα βαναδίου.....	14
9.1 Επίδραση του βαναδίου σε διαφορετικές πορείες απόπτωσης.....	16

### ΕΝΟΤΗΤΑ II: ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΕΡΑΜΙΔΙΟΥ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

10.1 Εισαγωγή στο ρόλο του κεραμιδίου στον πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση των κερατινοκυττάρων.....	20
11.1 Μεταβολισμός του κεραμιδίου.....	21
12.1 Σχηματισμός του κεραμιδίου.....	25
13.1 Κυτταρικοί στόχοι του κεραμιδίου.....	26
14.1 Κυτταρικές αποκρίσεις στο κεραμίδιο.....	28
15.1 Απόπτωση και αντι- αποπτωτικά γονίδια.....	31
16.1 Η υπεροικογένεια του Bcl-2 στην απόπτωση.....	34
17.1 Κλαστρίνη/Απολιποπρωτεΐνη J (ApoJ) : Ένα δυνητικό αντι-αποπτωτικό γονίδιο.....	39

### ΕΝΟΤΗΤΑ III : ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΚΑΙ ΚΕΡΑΜΙΔΙΟ

18.1 Κεραμίδιο και απόκριση σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες.....	48
19.1 Μεταβολισμός του κεραμιδίου και πολλαπλή ανθεκτικότητα σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες.....	51
20.1 Βανάδιο και κεραμίδιο.....	53



## **ΕΝΟΤΗΤΑ IV: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ AP-1 ΣΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ**

21.1 Έκφραση του AP-1 στο δέρμα.....	57
22.1 Ρύθμιση και δράση των πρωτεϊνών fos και jun στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων.....	59
22.1.A Πορείες σήματος και γονιδιακοί στόχοι του AP-1 στο δέρμα.....	59
22.1.B Ο ρόλος του AP-1 στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό κυττάρων θηλαστικών.....	60
22.1.Bi Γονίδια-στόχοι του AP-1 που εμπλέκονται στην αποπτωτική πορεία των κυττάρων.....	63
22.1. Bii Η αλληλεπίδραση του c-Fos στην έκφραση του γονιδίου της κλαστρίνης/ApoJ.....	64
22.1.Γ Ο ρόλος του AP-1 στο μετασχηματισμό και την αύξηση των κυττάρων.....	65

### **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

#### **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

**ΥΛΙΚΑ**.....69

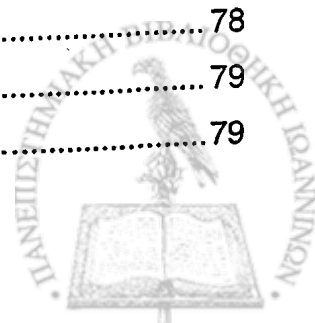
**ΜΕΘΟΔΟΙ**..... 71

#### **ΕΝΟΤΗΤΑ I : ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ**

1.2 Παρασκευή L-Broth και τρυβλίων με L-άγαρ.....	71
2.2 Παρασκευή βακτηρίων επιδεκτικών προς μετασχηματισμό.....	71
3.2 Μετασχηματισμός βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA.....	73
4.2 Ανάπτυξη υγρών καλλιιεργειών βακτηρίων.....	73
5.2 Παρασκευή βακτηριακών αποθεμάτων γλυκερόλης.....	74
6.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρούς όγκους.....	74
7.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλους όγκους.....	75

#### **ΕΝΟΤΗΤΑ II: ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ**

8.2 Κυτταρικές σειρές και καλλιέργεια.....	76
9.2 Ανακαλλιέργεια κυττάρων.....	77
10.2 Διατήρηση κυττάρων-Πάγωμα κυττάρων.....	78
11.2 Ανασύσταση κυττάρων-Ξεπάγωμα κυττάρων.....	79
12.2 Καταμέτρηση κυττάρων με το αιμοκυτταρόμετρο.....	79



13.2 Χρώση κυττάρων με κρυσταλλικό ιώδες.....	79
14.2 Καμπύλες αύξησης.....	80
15.2 Επεξεργασία κυττάρων HaCaT με C <sub>2</sub> -κεραμίδιο και ανάλυση της αύξησής τους.....	80
16.2 Επεξεργασία κυττάρων HaCaT με θειικό βαναδύλιο και ανάλυση της αύξησής τους.....	81
17.2 Προσδιορισμός αποκλεισμού της trypan blue.....	82

### **ΕΝΟΤΗΤΑ III: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ**

18.2 Απομόνωση χαμηλού μοριακού βάρους γενωμικού DNA.....	84
19.2 Απομόνωση οξικού RNA με τη μέθοδο του χλωριούχου λιθίου-ουρίας.....	85
20.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	88
21.2 Ηλεκτροφόρηση RNA.....	89
22.2 Κοπή πλασμιδίων με περιοριστικά ένζυμα.....	90
23.2 Ανάκτηση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης με ηλεκτροδιήθηση.....	90
24.2 Παρασκευή μεμβρανών διαπίδυσης.....	91
25.2 Αποφωσφορυλίωση του DNA.....	92
26.2 Σύνδεση τμημάτων DNA.....	92
27.2 Ανάλυση RNA.....	93
28.2 Παρασκευή ανιχνευτή με ιχνηθέτη του DNA.....	94
29.2 Αποτύπωμα κατά Northern .....	94
30.2 Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων για την ανάλυση πρωτεϊνών.....	97
31.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.....	98
32.2 Χρώση της πηκτής SDS-πολυακρυλαμίδιου.....	100
33.2 Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσο-αποτύπωμα κατά Western.....	100
34.2 Φορείς έκφρασης.....	102
35.2 Ρετροϊικοί φορείς.....	104
36.2 Διαμόλυνση κερατινοκυττάρων HaCaT.....	109
37.2 Παραγωγή ρετροϊών με διαμόλυνση DNA.....	110



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### ΕΝΟΤΗΤΑ I

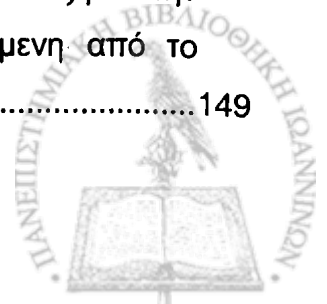
**Οι επιδράσεις του θειικού βαναδύλιου στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κερατινοκυττάρων HaCaT: Ο ρόλος των αντι-αποπτωτικών γονιδίων κλαστρίνης/ApoJ και Bcl-2**

1.3 Το θειικό βαναδύλιο αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HaCaT καταστέλλοντας την έκφραση του πρωτο-ογκογονιδίου c-Fos.....	113
2.3 Το θειικό βαναδύλιο επάγει την απόπτωση των κυττάρων HaCaT.....	115
3.3 Η υπερέκφραση του ογκογονιδίου v-Fos, αλλά όχι του c-Fos, παρεμποδίζει την απόπτωση των κυττάρων HaCaT που επάγεται από το θειικό βαναδύλιο.....	118
4.3 Υπερέκφραση της κλαστρίνης/ApoJ και της ογκοπρωτεΐνης Bcl-2 στους διαμολυσμένους κλώνους HaCaT.....	121
5.3 Bcl-2 και κλαστρίνη (ApoJ) καταστέλλουν την απόπτωση των κυττάρων HaCaT που επάγεται από το θειικό βαναδύλιο σε διαφορετικό βαθμό.....	123

### ΕΝΟΤΗΤΑ II

**Οι επιδράσεις του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση κερατινοκυττάρων και ινοβλαστών: Ο ρόλος των αντι-αποπτωτικών γονιδίων κλαστρίνης/ApoJ και Bcl-2**

6.3 Το κεραμίδιο αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και επάγει την απόπτωση των κερατινοκυττάρων HaCaT και των ινοβλαστών MRC-5.....	128
7.3 Έκφραση της κλαστρίνης/ApoJ και της Bcl-2 σε φυσιολογικά κύτταρα MRC-5 και HaCaT μετά τη χορήγηση C <sub>2</sub> -κεραμιδίου.....	131
8.3 Κατασκευή και χαρακτηρισμός κυττάρων HaCaT και MRC-5 που υπερεκφράζουν Bcl-2 ή κλαστρίνη ApoJ.....	133
9.3 Έκφραση της κλαστρίνης/ApoJ και της Bcl-2 στα επιμολυσμένα κύτταρα MRC-5 μετά τη χορήγηση C <sub>2</sub> -κεραμιδίου.....	138
10.3 Αποκρίσεις των κυττάρων HaCaT και MRC-5 μετά τη χορήγηση C <sub>2</sub> -κεραμιδίου.....	140
11.3 Η υπερέκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου p53 <sup>143ala</sup> επαύξησε την ευαισθησία των φυσιολογικών ινοβλαστών MRC-5 στην επαγόμενη από το C <sub>2</sub> -κεραμίδιο απόπτωση.....	149



12.3 Η αυξημένη ευαισθησία των ινοβλαστών MRC-5 που εκφράζουν τη μεταλλαγμένη μορφή p53 <sup>143a/a</sup> συνδέεται με μεταβολές στην έκφραση της κλαστρίνης/ApoJ και της Bcl-2.....	151
--	-----

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

1.4 Επίδραση του βαναδίου στον πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση κυττάρων θηλαστικών: ο ρόλος των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών κλαστρίνης/ApoJ και Bcl-2 και του μεταγραφικού παράγοντα AP-1.....	155
2.4 Επίδραση του κεραμιδίου στον πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση κυττάρων θηλαστικού: Ο ρόλος των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών κλαστρίνης/ApoJ και Bcl-2.....	163
3.4 Ο ρόλος της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 στην απόπτωση που επηρεάζεται από κυτταροτοξικούς παράγοντες.....	173
4.4 Ο ρόλος του βαναδίου και του κεραμιδίου στη χημειοθεραπεία.....	177

<b>1.5 ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΛΗΠΤΙΚΗ ΠΑΡΑΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ.....</b>	<b>185</b>
--	------------

<b>1.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>195</b>
------------------------------	------------





# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### ΕΝΟΤΗΤΑ Ι: ΒΑΝΑΔΙΟ

#### 1.1. Βανάδιο: Ιστορική αναδρομή - Από τη Vanadis στην Άτροπος

Η κεντρική ιδέα της ομορφιάς και του θανάτου έχει καταστεί μοτίβο έμπνευσης για αμφότερες την τέχνη και την επιστήμη. Δημιουργίες στις περιοχές αυτές αποκτούν αξία για το πνεύμα ενώ καθίστανται πολύπλοκες στη συσχέτισή τους. Η απεικόνιση των ενώσεων του βαναδίου με τους πανέμορφους χρωματισμούς τους και τον μακάβριο χορό τους με τα κύτταρα αποτελεί ένα από παράδειγμα επιβεβαίωσης του διπόλου ομορφιάς-θανάτου. Η Νορβηγίδα θεά Vanadis αναπαριστά την ομορφιά ενώ η Άτροπος μια από τις τρεις Μοίρες της Ελληνικής μυθολογίας κόβει το νήμα της ζωής ώστε να είναι συνώνυμη του θανάτου. Εμπνευσμένοι από την παλέτα των χρωμάτων που δημιουργείται από το μέταλλο σε διαλύματά του, οι Sofstrom και Benrelius το 1830 ονόμασαν το νέο στοιχείο «vanadium» δηλαδή «Βανάδιο» προς τιμή της θεάς Vanadis. Το ιχνοστοιχείο ανευρίσκεται παντού κυρίως στο φλοιό της γης σε περιεκτικότητα 0,02%, στα έμμορφα συστατικά του αίματος των θαλάσσιων βατράχων, στις υπεροξυδάσες των θαλάσσιων φυκών, σε ορισμένες νιτρογενάσες αζωτοβακτηρίων και σε ιστούς θηλαστικών. (Morinville et. al., 1998).

Στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα το βανάδιο συνταγογραφήθηκε για ποικιλία κλινικών συνδρόμων ή νοσημάτων, όπως η αναιμία, η φυματίωση και ο διαβήτης. Το 1899 ανακοινώθηκε ότι άλατα του βαναδίου ελάττωναν τη γλυκοζουρία σε διαβητικούς ασθενείς. Το ενδιαφέρον για παράγωγα βαναδίου αναζωπυρώθηκε στις αρχές του 1980 λόγω της ύπαρξης στοιχείων πως τα διαλύματα πεντασθενούς βαναδίου ( $V^{5+}$ ) χορηγούμενα εμφανίζουν ομοιότροπα αποτελέσματα με αντίστοιχη χορήγηση ινσουλίνης σε διαφράγματα ποντικών και σε απομονωμένα λιποκύτταρα *in vitro* (Shechter and Karlsh, 1980), ενώ ταυτόχρονα μειώνονται οι συγκεντρώσεις γλυκόζης στο αίμα διαβητικών ζώων (Heylinger et al., 1985).

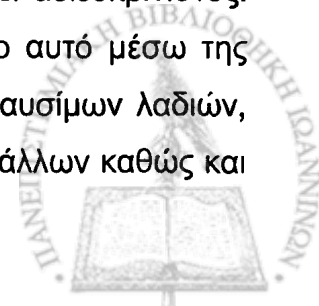
Οι δράσεις των ενώσεων βαναδίου δεν εξαντλούνται στις ινσουλινομιμητικές τους ιδιότητες, αλλά επεκτείνονται και στη δράση τους ως αναστολείς των



πρωτεϊνικών φωσφατασών της τυροσίνης (protein tyrosine phosphatases; PTPs). Οι μηχανισμοί διαφοροποίησης και ανάπτυξης των νευριτών σε κύτταρα φαιοχρωμοκυτώματος μύος (PC12) όπως και υπερ-ανάπτυξης νευριτών σε ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος (SH-SY5Y) έχουν ως υπόβαθρο την αναστολή των PTPs και παρατηρήθηκαν μετά τη χορήγηση ορθοβαναδικού άλατος του νατρίου (Rogers, 1994). Επιπλέον τα άλατα βαναδίου επιδεικνύουν μιτογόνες ιδιότητες σε κύτταρα μετασχηματισμένα με SV40 (Henkart, 1995). Χορήγηση υπεροξυβαναδίου *in situ* αποδείχθηκε πως ενώ διεγείρει τον πολλαπλασιασμό ινοβλαστών ποντικού C3410T1/3 (Henkart, 1995), καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό νευρικών βλαστικών κυτταρικών σειρών (νευροβλάστωμα NB41 και γλοίωμα C<sub>6</sub>) (Faure et al., 1995). Η ελάττωση του ρυθμού αύξησης των κυτάρων προκλήθηκε λόγω αναστρέψιμης αναστολής του κυτταρικού κύκλου στο στάδιο G<sub>2</sub>-M, ενώ η διακοπή χορήγησης των συμπλόκων επανέφερε το φυσιολογικό κυτταρικό κύκλο (Faure et al., 1995). Αυτή η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στη φάση G<sub>2</sub>-M βρέθηκε να σχετίζεται με τη συγκέντρωση του μετάλλου και να είναι κυτταροεξαρτημένη.

Η εμπλοκή του κυτταρικού κύκλου στο στάδιο G<sub>2</sub>-M φαίνεται να συνδέεται με τον κυτταρικό θάνατο (Whitmarsh and Davis, 2000). Μελέτες σε αποπτωτικά μοντέλα νευρώνων έδειξαν ότι παράγοντες που αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο στις φάσεις S, G<sub>2</sub> και M δεν αναστέλλουν τον κυτταρικό θάνατο, ενώ παράγοντες που παρεμποδίζουν τον κυτταρικό κύκλο πριν το G<sub>1</sub>- S μεταβατικό στάδιο αναστέλλουν την απόπτωση (Whitmarsh and Davis, 2000). Επιπρόσθετα η έκφραση της κυκλίνης D<sub>1</sub>, η οποία είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση της μετάβασης από την G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> φάση στη φάση S επάγεται από την πρωτεϊνική κινάση ERK και αναστέλλεται από την p38, αμφότερες μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνικών κινασών MAPK (Lavoie et al., 1996). Τα σύμπλοκα του υπεροξυβαναδίου επηρεάζουν την ενεργότητα αυτών των κινασών, με αποτέλεσμα να ασκούν τη δράση τους στον κυτταρικό κύκλο κατά τη μετάβαση από τη G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> προς την S φάση του κυτταρικού κύκλου.

Το βανάδιο είναι ένα ιχνοστοιχείο το οποίο είναι αποδεδειγμένα απαραίτητο για ένα αριθμό βιολογικών ειδών, με ευρεία κατανομή στον πλανήτη. Όμως, ο ρόλος του ως θρεπτικού ιχνοστοιχείου στον άνθρωπο και στα ζώα παραμένει αδιευκρίνιστος. Οι άνθρωποι και τα ζωικά είδη μπορεί να εκτίθενται στο μέταλλο αυτό μέσω της ατμόσφαιρας, η οποία ρυπαίνεται από την καύση βαναδιούχων καυσίμων λαδιών, από ατμούς και σκόνη που δημιουργείται από την επεξεργασία μετάλλων καθώς και



από την τροφή. Οι τροφές περιέχουν χαμηλές συγκεντρώσεις βαναδίου (κάτω από 1ng/g), όμως η υπολογιζόμενη μέση ημερήσια πρόσληψη βαναδίου στον αμερικανικό πληθυσμό κυμαίνεται από 10 έως 60μg (Barceloux, 1999). Το βανάδιο εισέρχεται στον οργανισμό από την αναπνοή, το γαστρεντερικό σωλήνα και το δέρμα, και αποθηκεύεται ειδικά σε συγκεκριμένα όργανα, κυρίως στο ήπαρ, στους νεφρούς και στα οστά (Cortizo et al., 2000).

Παρ' όλο που κυκλοφορούσαν πολλές υποθέσεις για την αντικαρκινική δράση συμπλόκων μετάλλων από τις αρχές του εικοστού αιώνα και εμφανίστηκε μια ανασκόπηση της αντικαρκινικής δράσης ανόργανων ουσιών το 1931, οι ενδείξεις για τις αντι-νεοπλασματικές δράσεις του βαναδίου καταδείχτηκαν για πρώτη φορά το 1965, ενώ αργότερα το 1967, το βανάδιο ελέγχθηκε για δραστικότητα εναντίον πολλών αυθόρμητα εμφανιζόμενων όγκων σε ποντίκια, χωρίς να δειχθεί το παραμικρό (Djordjevitc, 1995). Η αντι-καρκινική δράση των μετάλλων έγινε αξιοπρόσεκτη μετά την ανακάλυψη της αντικαρκινικής δράσης του  $cis-PtCl_2(NH_3)_2$  (cisplatin). Η έρευνα για το βανάδιο πήρε ιδιαίτερη ώθηση μετά τα ευρήματα του English και συνεργατών (English et al., 1983) για το ρόλο των μετάλλων ως αναστολέων της τελικής διαφοροποίησης των ερυθρολευχαιμικών κυττάρων των ποντικών, καθώς και αυτών του Thompson και συνεργατών (Thompson et al., 1984), σχετικά με την αναστολή της χημικά επαγόμενης καρκινογένεσης του μαστού από θειικό βαναδύλιο. Επιπλέον, οι βιολογικές δράσεις των ενώσεων βαναδίου, όπως η ινσουλινομιμική δράση του και η μείωση της υπερλιπιδαιμίας και της υπέρτασης, σε σχέση με τις λίγες μόνον παρενέργειες, αποδεικνύουν το εν δυνάμει θεραπευτικό δυναμικό αυτών των ενώσεων. Τα συσσωρευμένα τεκμήρια της τελευταίας δεκαπενταετίας, υποδεικνύουν ότι το βανάδιο θα μπορούσε να θεωρηθεί ως αντιπροσωπευτικό μιας νέας κατηγορίας μεταλλικών αντικαρκινικών ενώσεων (Evangelou, 2002).

## 2.1. Χημικές και βιοχημικές ιδιότητες του βαναδίου

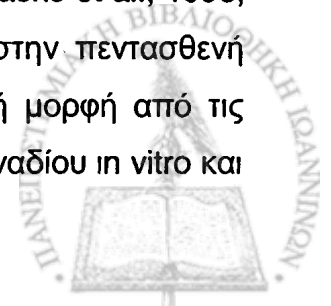
Το βανάδιο είναι μεταλλικό στοιχείο της ομάδας μετάπτωσης 5d του περιοδικού πίνακα, με συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες. Έως σήμερα έχει συντεθεί μια ποικιλία ενώσεων βαναδίου, σε μια προσπάθεια να επιτευχθεί καλύτερη ανοχή, δυναμικότερη ισχυρότερη φαρμακολογικά δράση, μεγαλύτερη επιλεκτικότητα και μικρότερη τοξικότητα σε αντικαρκινικές αγωγές. Τα χημικά και βιολογικά



χαρακτηριστικά των ενώσεων βαναδίου, προσδιορίζουν τα αντικαρκινικά χαρακτηριστικά τους.

Το βανάδιο είναι ένα μέταλλο με καλά καθορισμένη γεωμετρία της εσωτερικής του σφαίρας συναρμογής, σχετικά με τις συνηθισμένες καταστάσεις οξειδωσης του μετάλλου [V(III), V(IV), και V(V)] (Djordjevitc et al., 1995). Έχει βρεθεί σχέση μεταξύ της χημικής σύστασης και της τοξικότητας των υπεροξυδοβαναδικών ενώσεων. Αυτή η σχέση εξαρτάται από τον τύπο του προσδέτη στο υπεροξυδοβαναδικό σύμπλοκο (Morinville et al., 1998). Σε μη-τοξικές συγκεντρώσεις η ταυτότητα του προσδέτη στο υπεροξυδοβαναδικό σύμπλοκο μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου που επιτελείται από τέτοια σύμπλοκα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές (Morinville et al., 1998). Η ταυτόχρονη έκθεση σε βαναδικό (IV) άλας και υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) ενισχύει τις διάφορες δράσεις του μετάλλου επί διαφόρων κυτταρικών σειρών, ίσως εξ αιτίας του σχηματισμού υπεροξυδοβαναδικού. Έχει αποδειχθεί ότι η έκθεση διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών [ηπατώματος επίμυος, βασηοφιλικής λευχαιμίας επίμυος, μυϊκών κυτάρων μυών και κυτάρων ωοθηκών, του κινέζικου κρικητού (χάμστερ)] σε βαναδικό (V) και  $H_2O_2$  αύξησε σημαντικά την τυροσυλο-φωσφορυλίωση πρωτεϊνών κατά δόσο-εξαρτώμενο προς το βανάδιο τρόπο, και πιθανότατα ανέστειλε επιλεκτικά τη δραστηριότητα της τυροσυλο-φωσφατάσης *in vitro* (Morinville et al., 1998).

Τα βαναδοκαΐνια (vanadocenes) είναι οργανομεταλλικά σύμπλοκα που περιέχουν βανάδιο (IV), και ανήκουν στην τάξη των μεταλλοκαϊνικών αντικαρκινικών ενώσεων (Djordjevitc, 1995; Harding and Moksdi, 2000; D' Cruz and Uckum, 2000; Ghosh et al., 2000). Αυτά τα οργανομεταλλικά σύμπλοκα, όπου το βανάδιο (IV) ενώνεται με οργανικούς προσδέτες με άμεσο δεσμό άνθρακα-μετάλλου, παρουσιάζουν σημαντική αντικαρκινική δράση *in vitro* και *in vivo* (Evangelou et al., 1997; Harding and Moksdi, 2000; D' Cruz and Uckum, 2000). Το βανάδιο μπορεί να βρίσκεται και σε καταστάσεις χαμηλού βαθμού οξειδωσης ως τρισθενές V(III) και δισθενές V(II) ιόν. Βανάδιο που είναι στην τρισθενή κατάσταση, όπως σε δύο νεοσυντεθέντα σύμπλοκα με το ψευδοπεπτιδίο N-(2-μερκαπτο-προπιονυλ-γλυκίνη), που περιέχει σουλφυδρυλική ομάδα και το αμινοξύ κυστεΐνη, σε υδατικά διαλύματα οξειδώνεται αργά στην κατάσταση V(IV) (Evangelou et al., 1997; Liasko et al., 1998; Liasko et al., 2000). Σε φυσιολογικό pH το βανάδιο βρίσκεται στην πεντασθενή κατάσταση, ως βαναδικό ανιόν, η οποία είναι και η πιο σταθερή μορφή από τις διάφορες καταστάσεις οξειδωσής του. Ο βαθμός οξειδωσης του βαναδίου *in vitro* και



in vivo σχετίζεται με μια ποικιλία βιολογικών του δράσεων, ανάμεσα στις οποίες είναι και η συμμετοχή σε αντιδράσεις ελεύθερων ριζών. Αυτές ενέχονται είτε στη δυνατότητα συμμετοχής σε καρκινογένεση ή/και τις ρυθμιστικές και τοξικές του δράσεις σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα, καθώς και σε ζώα.

Η κατάσταση οξειδωσης του βαναδίου φαίνεται επίσης να προσδιορίζει μερικές διαφορές στη βιολογική δράση των ενώσεων βαναδίου. Τα σύμπλοκα του βαναδικού (V) και οξυβαναδικού (IV), είναι, για παράδειγμα, και τα δύο αναστολείς πρωτεϊνικών τυροσυλο-φωσφατασών (PTP) σε πολλά κύτταρα, δρώντας όμως με διαφορετικούς μηχανισμούς (Bevan, et al., 1995). Τα σύμπλοκα υπεροξυβαναδικού και τα υδατικά διαλύματα υπεροξυβαναδικού είναι μη αντιστρεπτοί και πιο ισχυροί αναστολείς των PTP (Morinville et al., 1998). Το υπερβαναδικό, ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος αναστολέας των PTP, είναι ένωση του υπεροξυβαναδικού που προκύπτει από αντίδραση  $H_2O_2$  με ορθοβαναδικό, τόσο in vitro όσο και in vivo. Το υπερβαναδικό έχει δειχθεί ως πιο ισχυρός αναστολέας των PTPs από το συνδυασμό  $Na_3VO_4$  και  $H_2O_2$ . Τα σύμπλοκα υπεροξυβαναδικού φαίνονται να είναι 100-1000 φορές πιο αποτελεσματικοί αναστολείς των PTPs in vitro από το ορθοβαναδικό νάτριο (Bevan, et al., 1995).

Η κατάσταση οξειδωσης του βαναδίου μπορεί επίσης να παίξει ρόλο στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων πορειών μεταγωγής σήματος, οι οποίες ρυθμίζουν την ενεργοποίηση κυτταροπλασματικών πρωτεϊνικών τυροσινω-κινασών.

### 3.1. Βιοκινητική, κατανομή και μεταβολισμός του βαναδίου

Η είσοδος του βαναδίου στον οργανισμό εξαρτάται από την οδό χορήγησής του. Άπαξ και εισέλθει, το βαναδικό (V) ανάγεται σε βαναδυλο-ένωση (IV) από το γλουταθείο των ερυθροκυττάρων ή από το ασκορβικό οξύ και άλλες αναγωγικές ουσίες του πλάσματος. Στη συνέχεια μεταφέρεται από την λευκωματίνη και την τρανσφερρίνη, μια από τις σιδηροδεσμευτικές πρωτεΐνες στις οποίες πιθανώτατα το βανάδιο προσδένεται επιλεκτικά (Sabbioni and Mafarante, 1981).

Σε κυτταρικό επίπεδο όμως, το βαναδικό (V) είναι η κυρίαρχη μορφή επειδή το pH είναι ουδέτερο. Το βανάδιο (V) εισέρχεται στα κύτταρα μέσω του μηχανισμού μεταφοράς ανιόντων. Στη συνέχεια το βαναδικό (V) μετατρέπεται σε βαναδυλο-ένωση (IV) κυρίως από το ενδοκυττάριο γλουταθείο και στη συνέχεια προσδένεται σε πρωτεΐνες. Αυτή η αναγωγή ρυθμίζεται από κυτταρικούς οξειδοαναγωγικούς



μηχανισμούς οι οποίοι και ελέγχουν τις ισορροπίες μεταξύ των οξειδωτικών καταστάσεων των ενώσεων βαναδίου (Hansen et al., 1982). Μελέτες σε ερυθροκύτταρα δείχνουν ότι υπάρχουν δύο φάσεις στο μηχανισμό εισόδου του βαναδίου στο κύτταρο. Στην αρχική φάση το βανάδιο (V) εξισορροπεί μεταξύ του εξωτερικού και του εσωτερικού του ερυθροκυττάρου εισδύοντας μέσω του συστήματος ανταλλαγής ανιόντων. Η δεύτερη και πιο αργή φάση, εξαρτάται από την αναγωγή του V(V) σε V(IV) (Heinz et al., 1982; Hansen et al., 1982). Η πρόσληψη του ραδιενεργού βαναδίου (V)-48 από κύτταρα βόειου νεφρού (MDBK) αποκάλυψε ότι συσσωρεύεται στα κύτταρα γραμμικά μεταξύ συγκεντρώσεων 20 και 200  $\mu\text{M}$  και σε αναλογία με την εξωκυττάρια συγκέντρωσή του. Επίσης έχει καταδειχθεί μια καμπύλη σχέση γραφικής παράστασης του κυτταρικού περιεχομένου σε βανάδιο και του βαθμού της επαγόμενης από το βανάδιο τοξικότητας.

Στα κύτταρα το βανάδιο κατανέμεται στον πυρήνα και στα διαλυτά κλάσματα του υπερκείμενου κυτταρικών εκχυλισμάτων (Neckay et al., 1986). Έχει αναφερθεί ότι το βανάδιο στα κύτταρα MDBK κατανέμεται σχεδόν κατά 90% στο κλάσμα του υπερκείμενου. Το υπόλοιπο, είναι κυρίως στα μιτοχόνδρια, τα κυτταρικά και πυρηνικά απόβλητα, και τα μικροσώματα (Bracken et al., 1985). Σε πιο πρόσφατη μελέτη το βανάδιο που χορηγήθηκε σε επίμυς σε τετρασθενή και πεντασθενή κατάσταση οξείδωσης, κατανεμήθηκε ενδοκυττάρια κυρίως στο πυρηνικό κλάσμα (30-40%), και το υπόλοιπο κατά σειρά στο κυτταροδιάλυμα και τα μιτοχόνδρια. Χρωματογραφία διήθησης σε πηκτική από κυτταροδιάλυμα κυττάρων πνεύμονα έδειξε επίσης, δύο βιοχημικά διακριτές δεξαμενές βαναδίου: η μια αντιστοιχούσε σε πρωτεΐνο-σύνδετο βανάδιο και η άλλη στις διαχεόμενες μορφές βαναδίου (Edel and Sabbioni, 1988). Η χορήγηση διχλωριούχου βαναδοκαϊνίου σε επίμυες που φέρουν όγκους (μεταμοσχευμένους ασκητικούς όγκους Erlich), καθώς και σε κύτταρα όγκων Erlich έχουν αποκαλύψει ότι το βανάδιο κυρίως συσσωρεύεται σε πυρηνική ετεροχρωματίνη και σε μικρότερο βαθμό στον πυρήνα και τα κυτταροπλασματικά ριβοσώματα των καρκινικών κυττάρων (Kopf-Maier 1994).

Διάφορες μελέτες σε ζωικά πρότυπα έχουν δείξει ότι το βανάδιο συσσωρεύεται κυρίως στους νεφρούς, στο σπλήνα, στα οστά, στο ήπαρ και σε μικρότερη έκταση στους πνεύμονες και στους όρχεις ως βαναδυλο-ένωση (IV) (Edel and Sabbioni, 1988; Domingo et al., 1995) με τα οστά να είναι μάλλον ο κύριος ιστός συσσώρευσης βαναδίου (Tsiani and Fantus, 1997). Το βανάδιο αποβάλλεται



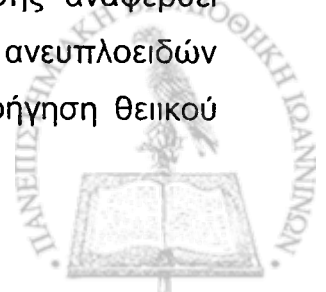
γρήγορα από τους νεφρούς στα ούρα με βιολογική ημιπερίοδο ζωής τις 20-40 ώρες (Barceloux, 1999).

Υπάρχουν επίσης τεκμήρια ότι το βανάδιο συσσωρεύεται περισσότερο στα καρκινικά κύτταρα και ιστούς παρά στα αντίστοιχα φυσιολογικά. Τα επίπεδα βαναδίου, όπως εκτιμώνται από φθορισμό ακτίνων Χ, βρέθηκαν ιδιαίτερα υψηλά σε καρκινικά κύτταρα μαστικού αδένου, σε σύγκριση με φυσιολογικό ιστό. Υπάρχουν επίσης τεκμήρια ότι το βανάδιο που χορηγείται σε καρκινικές σειρές, όπως οι λευχαιμικές P388 και L1120, παχέος εντέρου, καρκινώματος πνεύμονα κατά Lewis, μελανώματος B16, συμπαγείς και εναιωρημένους ασκητικούς όγκους κατά Erlich και καρκινώματα πνεύμονα μεταμοσχευμένα σε αθυμικούς μυς, συσσωρεύεται σε περιοχές των καρκινικών κυττάρων που είναι πλούσιες σε νουκλεϊκά οξέα (Harding and Moksdi, 2000).

#### **4.1. Τοξικότητα των ενώσεων βαναδίου σε θηλαστικά**

Η χορήγηση ενώσεων βαναδίου σε ανθρώπους και ζώα έδειξε ότι το βανάδιο μπορεί να έχει ποικίλες τοξικές δράσεις. Μελέτες σε πειραματόζωα (κυρίως επίμυες και μύες) έχουν δείξει ότι οι τοξικές δράσεις των ενώσεων βαναδίου σχετίζονται με το βιολογικό είδος, τη δόση, την οδό χορήγησης, τη διάρκεια χορήγησης, καθώς και την ίδια τη φύση της ένωσης (Fawcett et al., 1997). Μελέτες όπου χορηγήθηκαν άλατα βαναδίου σε ανθρώπους που έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη ή στεφανιαία νόσο, έδειξαν ότι στη βραχυχρόνια θεραπεία (έως τεσσάρων εβδομάδων) η πιο κοινή παρενέργεια ήταν οι ήπιες γαστρεντερικές διαταραχές. Η μακροχρόνια θεραπεία (για περίπου 5 μήνες με 125 mg/ημέρα άλατος βαναδίου) επέφερε στα μισά περίπου άτομα ανορεξία, απώλεια βάρους και κοιλιακούς πόνους (Fawcett et al., 1997).

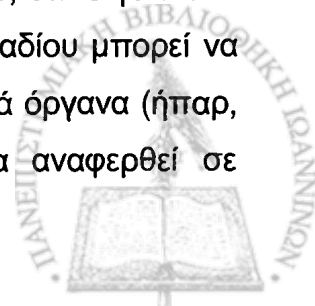
Μελέτες σε ζώα έδειξαν μια ποικιλία από τοξικές δράσεις οι οποίες επάγονται από ενώσεις βαναδίου. Οι πιο κοινές τοξικές παρενέργειες είναι οι λειτουργικές διαταραχές και ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις του ήπατος και των νεφρών. Η από στόματος χορήγηση  $\text{NaVO}_3$  (μεταξύ 5 και 10  $\mu\text{M}$  στο πόσιμο νερό) για τρεις μήνες είχε ως αποτέλεσμα ήπιες και δοσο-εξαρτώμενες ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στα νεφρά και τον σπλήνα, συνοδευόμενες από αυξημένες συγκεντρώσεις ουρίας και ουρικού οξέος στις ομάδες με την μεγαλύτερη δόση. Έχουν επίσης αναφερθεί χρωματοσωμικές ανωμαλίες λόγω λήψης βαναδίου και παραγωγή ανευπλοειδών κυττάρων στο μυελό των οστών μετά από ενδογαστρική χορήγηση θειικού



βαναδύλιου, ορθοβαναδικού νατρίου και θειικού αμμωνίου (Cirrani et al., 1995). Μελέτες σε νεαρούς και ενήλικες επίμους οι οποίοι δέχτηκαν ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις ορθοβαναδικού (10 mg/kg βάρους/ημέρα για 8 συνεχείς ημέρες), έδειξαν ότι το βανάδιο μπορεί να προκαλέσει νεφροτοξικότητα, η οξύτητά της οποίας σχετίζεται με την ηλικία των ζώων που υποβλήθηκαν στην αγωγή (Cirrani et al., 1995). Επίσης, έχουν παρατηρηθεί σημαντικές απώλειες στη γενική δραστηριότητα και ικανότητα εκμάθησης υγιών επίμους οι οποίοι έλαβαν από στόματος βανάδιο σε δόσεις 4,1 και 16,4 mg/kg βάρους/ημέρα για 8 εβδομάδες (Sanchez et al., 1998).

Τα τοξικά αποτελέσματα του βαναδίου στις αναπαραγωγικές και αναπτυξιακές παραμέτρους επίμους και μυών, όπως μείωση της συχνότητας σύλληψης και της εμβρυικής ανάπτυξης από χορήγηση ενώσεων βαναδίου, είναι επίσης καλά τεκμηριωμένα (Domingo et al., 1995). Μελέτες όμως σε υγιείς και διαβητικούς επίμους έδειξαν ότι δεν υπήρχαν σημαντικές αλλαγές στις αιματολογικές παραμέτρους, ηπατική και νεφρική λειτουργία ή τις χαρακτηριστικές μορφολογικές ανωμαλίες στα διάφορα όργανα. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η από στόματος χορήγηση θειικού βαναδύλιου και συμπλόκου V(III)-κυστεΐνης σε αρσενικούς επίμους Wistar για εννέα εβδομάδες, με καθημερινές δόσεις 14 mg/kg βάρους δεν επέφερε καμία αιματολογική, βιοχημική ή ιστοπαθολογική αλλοίωση. Οι επίμους που έλαβαν σύμπλοκο V(III)-κυστεΐνης έδειξαν ελαφρά αύξηση βάρους σε αντίθεση με αυτούς που έλαβαν θειικό βαναδύλιο και είχαν μικρή απώλεια βάρους, αλλά καμιά από τις δύο αυτές ομάδες δεν ήταν σημαντικά διαφορετική από τους μάρτυρες ίδιας ηλικίας και φύλου (Liasko et al., 2000). Επιπλέον, η μακροπρόθεσμη (μεταξύ 4 και 6 μηνών) χορήγηση βαναδίου (III και IV) από στόματος σε καθημερινές δόσεις 0,5mg/kg/ημέρα, δεν είχε κανένα τοξικό αποτέλεσμα σε επίμους με όγκο (Evangelou et al., 1997; Liasko et al., 1998; Evangelou, 2002).

Η οξεία τοξικότητα ενώσεων βαναδίου σε ζώα περιλαμβάνει καχεξία, απώλεια όρεξης, αφυδάτωση, σημαντική απώλεια βάρους, ρινορραγία, πνευμονική αιμορραγία, νέκρωση λεμφαδένων, νέκρωση νεφρικών σωληναρίων και θάνατο. Αυτές οι δράσεις είναι χρονο- και δοσο-εξαρτώμενες σε υποδόρια και ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση ενώσεων βαναδίου (Al-Bayati et al., 1989). Η φύση της ένωσης βαναδίου μπορεί επίσης να σχετίζεται με την τοξικότητά του, όπου γενικά οι ενώσεις (V) είναι πιο τοξικές (Domingo, 2000). Τα οξείδια του βαναδίου μπορεί να είναι πιο τοξικά από τα άλατά του. Γονοτοξική δράση σε διαφορετικά όργανα (ήπαρ, σπλήνα, καρδιά και μυελό των οστών) έχουν για παράδειγμα αναφερθεί σε





αρσενικούς μυς στους οποίους έχουν χορηγηθεί ενδοπεριτοναϊκές εγχύσεις πεντοξειδίου του βαναδίου (σε δόσεις μεταξύ 5,75 και 23,0mg/g βάρους) (Altamirano-Lozano et al., 1999). Επιπλέον, η τοξικότητα των αλάτων βαναδίου ήταν διαφορετική ανάλογα με το ανιόν. Οι βραχυχρόνιες και μακροχρόνιες παρενέργειες του βαναδίου σχετίζονται επίσης με την ταχύτητα συσσώρευσης του μετάλλου σε ορισμένα όργανα και ιστούς του εκτιθέμενου οργανισμού (Cortizo et al., 2000).

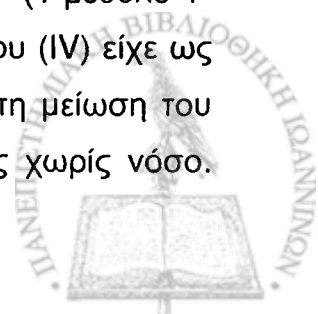
Η πλειονότητα των μελετών που έχουν γίνει σε διάφορους τύπους κυτάρων έδειξε μόνο δυνητική καρκινογόνο δράση των αλάτων βαναδίου. Τα δυνητικά μεταλλαξιογόνα αποτελέσματα του βαναδίου, σχετίζονται επίσης με τη φύση των ενώσεων του, καθώς και με τις προκύπτουσες από αυτές δραστικές ενώσεις οξυγόνου (Halliwell and Gutteridge, 1999). Η επαγωγή καρκίνου από ενώσεις βαναδίου σε πειραματόζωα δεν έχει επιτευχθεί μέχρι σήμερα.

Το βανάδιο επιδεικνύει αντι-νεοπλασματική δράση *in vivo*. Παράλληλα *in vitro* δράση του ορθοβαναδικού νατρίου σε συγκέντρωση 5-10  $\mu\text{M}$  εμφανίζει κυτταροτοξικότητα σε κυτταρικές νεοπλαστικές σειρές, ενώ ταχέως πολλαπλασιαζόμενες κυτταρικές σειρές είναι πλέον ευαίσθητες στην κυτταροτοξικότητα του βαναδίου (Tassiopoulos et al., 2000). Εκτός αυτού η προσθήκη του  $\text{H}_2\text{O}_2$  στο  $\text{NaVO}_3$  έχει ως αποτέλεσμα την επαύξηση της τοξικότητας, η οποία είναι πιθανώς αποτέλεσμα του σχηματισμού υπεροξυβαναδίου (Tassiopoulos et al., 2000). Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν την τοξικότητα του βαναδίου και του συμπλόκου του δεν έχουν ακόμη εξηγηθεί.

### **5.1. Αντι-καρκινικές και αποπτωτικές δράσεις των ενώσεων βαναδίου στην πειραματική καρκινογένεση σε ζώα**

Οι χημειοπροστατευτικές δράσεις και αντικαρκινικές δράσεις των ενώσεων βαναδίου έχουν μελετηθεί σε ευρύτατο βαθμό, σε πειραματόζωα και καρκινικές κυτταρικές σειρές πολλών τύπων.

Τα πρώτα τεκμήρια ότι το βανάδιο μπορεί να έχει χημειοπροστατευτικές δράσεις στην πειραματική καρκινογένεση, προέκυψαν από τις εργασίες του Thompson και των συνεργατών του (Thompson et al., 1984) σε καρκίνους του μαστού σε επίμυς Sprague Dawley που είχαν επαχθεί από MNU-1 (1-μεθυλο-1-νιτροσουρία). Η χορήγηση στα ζώα 25  $\mu\text{M}$  ημερησίως θειικού βαναδίου (IV) είχε ως αποτέλεσμα τόσο τη μείωση της συχνότητας του καρκίνου, όσο και τη μείωση του αριθμού όγκων καθώς και την επιμήκυνση του μέσου χρόνου ζωής χωρίς νόσο.

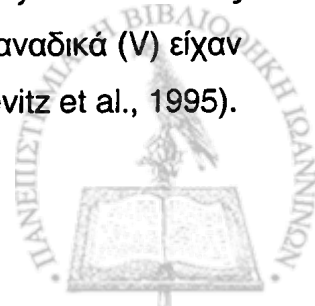


Περαιτέρω μελέτες με καρκινογένεση μαστού σε θηλυκούς επίμυς Sprague-Dawley με DMBA (7,12-διμεθυλο-βενζ (α)-ανθρακένιο), αποκάλυψε ότι η ελεύθερη χορήγηση μεταβαναδικού αμμωνίου στο πόσιμο νερό (0,5  $\mu\text{M}$ ), είχε σημαντική μείωση στο συνολικό αριθμό όγκων, τον αριθμό ψηλαφούμενων όγκων τους ανά ζώο, και τη μέση περίοδο υστέρησης στην εμφάνιση. Οι χημειοπροστατευτικές δράσεις του βαναδίου οφείλονται στη μεταβολή της ηπατικής αντιοξειδωτικής κατάστασης των ζώων καθώς και της τροποποίησης των ενζύμων φάσεων I και II μεταβολισμού φαρμάκων (Bishayee et al., 2000).

Η χημειοπροστατευτική δράση του διαιτητικού (0,5  $\mu\text{M}$ ) μεταβαναδικού αμμωνίου καταδείχθηκε επίσης στην ηπατοκαρκινογένεση αρσενικών και θηλυκών επίμυων Sprague-Dawley η οποία επαγόταν από διαιθυλονιπροσαμίνη (DEN) και προαγόταν από φαινοβαρβιτάλη (Bishayee et al., 2000). Το βανάδιο φαίνεται να έχει αυξημένες αντι-καρκινικές ιδιότητες στην έναρξη παρά στο στάδιο προαγωγής και μετάστασης της ηπατικής καρκινογένεσης. Η ταυτόχρονη χορήγηση βαναδίου μαζί με τον ενεργό μεταβολίτη της βιταμίνης D<sub>3</sub> στο ίδιο μοντέλο καρκινογένεσης δείχνει ότι η χημειοπροστατευτική δράση αυτού του συνδυασμού πιθανότατα οφείλεται στην αναστολή της αλκυλίωσης που επάγεται από DEN και οδηγεί σε γενετική βλάβη των ηπατοκυττάρων (Basak et al., 2000).

Αποδείχθηκαν επίσης οι αντικαρκινικές δράσεις ενώσεων βαναδίου σε αρσενικούς αλφικούς μυς (αλμπίνο) που έφεραν το μεταμοσχευόμενο ασκητικό λέμφωμα Dalton (DL). Το μεταβαναδικό αμμώνιο χορηγούμενο σε χαμηλές δόσεις παρέτεινε την επιβίωση τέτοιων μυών, αυξάνοντας τα επίπεδα των διάφορων ηπατικών ενζύμων αποτοξίνωσης. Το μεταβαναδικό αμμώνιο (5 ng/0.1ml/μυ/ημέρα) επίσης προκάλεσε σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων σε μυς με αλφισμό που είχαν όγκους DL. Υπάρχουν, όμως, τεκμήρια ότι το μεταβαναδικό αμμώνιο σε δόσεις 2-20X μεγαλύτερες μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μια σημαντική δοσο-εξαρτώμενη αύξηση στον αριθμό των καρκινικών κυττάρων καθώς και μείωση του ποσοστού επιβίωσης σε μυς (Cruz et al., 1995).

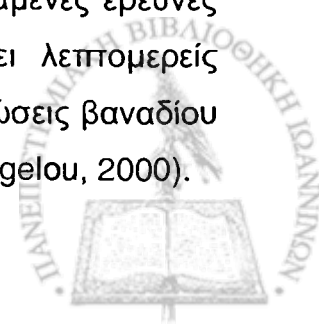
Το ορθοβαναδικό όταν χορηγείται υποδόρια (500 $\mu\text{g}$ /ποντικό/ημέρα για 9 ημέρες) προκαλεί σημαντική μείωση (85-100%) της αύξησης του όγκου MDAY-D2 σε μυς η οποία οφειλόταν πιθανότατα στο βαναδικό (V), στις ρίζες υδροξυλίου και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου (Cruz et al., 1995). Διάφορα υπεροξυβαναδικά (V) είχαν σημαντικά αντι-καρκινικά αποτελέσματα σε ογκογόνους μυς (Djordjevitc et al., 1995).



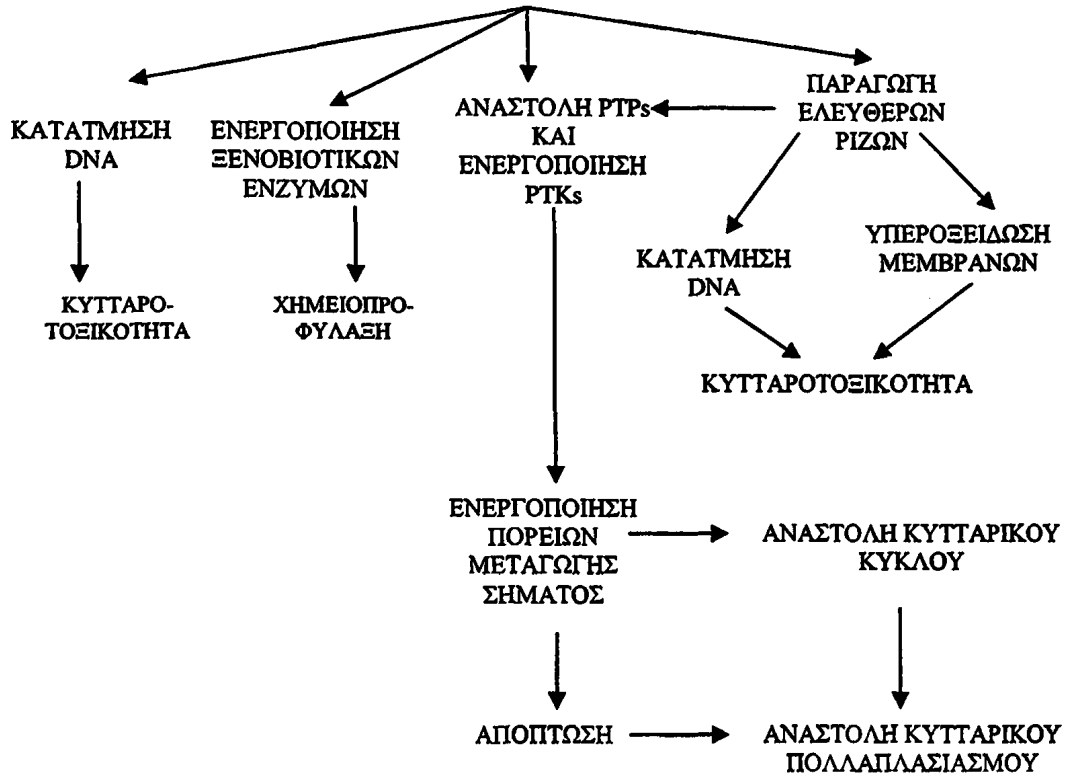
Πρόσφατα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι το θειικό βαναδύλιο (IV) και τα οργανικά σύμπλοκα του βαναδίου (III) με την κυστεΐνη, χορηγούμενα από στόματος σε χαμηλές δόσεις βαναδίου (0,5mg/kg/ημέρα), είχαν σημαντικό θεραπευτικό αποτέλεσμα σε επίμυς Wistar που έφεραν λειομυοσάρκωμα. Όμως τα σύμπλοκα βαναδίου (III)-κυστεΐνης ήταν πιο αποτελεσματικά και λιγότερο τοξικά από αυτά του θειικού βαναδύλιου (Evangelou et al., 1997; Liasko et al., 2000; Evangelou, 2002).

Τα βαναδοκαΐνια, κυρίως το διχλωριούχο βαναδοκαΐνιο, φάνηκε να είναι ισχυρός αντι-ογκογόνος παράγοντας εναντίον όγκου μαστού μύς (TA3Ha) (Djordjevitc, 1995). Η χορήγηση διχλωριούχου βαναδοκαΐνιου (ενδοπεριτοναϊκά, σε δόσεις 100-600mg/kg) σε μύς CF1 που έφεραν ασκητικούς όγκους Erlich, έδειξε ότι η αντικαρκινική δράση των βαναδοκαΐνιων οφειλόταν στην μοριακή αλληλεπίδραση του βαναδίου με τα νουκλεϊκά οξέα, κυρίως το DNA (Korff-Maier and Krahl, 1983). Επιπλέον, η αντι-καρκινική δράση του διχλωριούχου βαναδοκαΐνιου κατά ανθρώπινων καρκινωμάτων πνεύμονα και παχέος εντέρου, τα οποία είχαν μεταμοσχευθεί σε αθυμικούς μύς, αποδείχθηκε ότι οφειλόταν στη συσσώρευση βαναδίου στις περιοχές με πολλά νουκλεϊκά οξέα και στην αναστολή της σύνθεσης DNA και RNA στα καρκινικά κύτταρα (Harding and Moksdi, 2000).

Συλλογικά, αυτές οι πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι οι ενώσεις βαναδίου ασκούν: α) χημειοπροστατευτική δράση εναντίον χημικά επαγόμενης καρκινογένεσης, κυρίως μέσω απενεργοποίησης των ενεργών μεταβολιτών που προκύπτουν από τα καρκινογόνα, μέσω της τροποποίησης του περιεχομένου και της δραστηριότητας των διαφόρων ηπατικών ενζύμων μεταβολισμού ξеноβιοτικών ουσιών καθώς και των υποστρωμάτων τους (P450) και της αύξησης της αντι-οξειδωτικής κατάστασης των οργάνων-στόχων των καρκινογόνων. Δρουν κυρίως στη φάση I (επαγωγή) και δευτερευόντως στη φάση II (προαγωγή) της χημικής καρκινογένεσης β) αντι-καρκινική δράση σε ζώα με όγκους, είτε μέσω συσσώρευσης βαναδίου σε περιοχές πλούσιες σε νουκλεϊκά οξέα, αναστέλλοντας έτσι τη σύνθεση DNA και RNA ή/και επαγωγή δραστηκών μορφών οξυγόνου οι οποίες είναι κυτταροτοξικές στα καρκινικά κύτταρα. Υπάρχει επίσης ένδειξη ότι οι ενώσεις βαναδίου μπορεί, επιπλέον, να ασκούν συστηματική δράση η οποία να ευνοεί την επιβίωση ή και τη ρύθμιση της αύξησης του όγκου σε ζώα που φέρουν όγκους. Εκτεταμένες έρευνες σε φυσιολογικές και καρκινικές σειρές έχουν επιπλέον παράσχει λεπτομερείς πληροφορίες για τους διαφορετικούς τρόπους με τους οποίους οι ενώσεις βαναδίου πιθανά ασκούν τις αντι-καρκινικές τους δράσεις (Σχήμα 1.1, από Evangelou, 2000).



### ΑΝΤΙ-ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΒΑΝΑΔΙΟΥ



Σχήμα 1.1. Αντι-πολλαπλασιαστικοί μηχανισμοί δράσης των ενώσεων βαναδίου



## 6.1. Κυτταρικοί μηχανισμοί των αντι-καρκινικών δράσεων των ενώσεων του βαναδίου

Η ιδανική αντικαρκινική δράση οποιασδήποτε ένωσης θα πρέπει να πληρεί ορισμένα κριτήρια και να έχει τα ακόλουθα επιλεκτικά αποτελέσματα σε κακοήγη κύτταρα: α) μείωση του ρυθμού κυτταρικής ανάπτυξης (αντι-πολλαπλασιαστική δράση), β) κυτταροτοξικές ή/και κυτταροστατικές δράσεις οι οποίες εμφανίζονται είτε ως νέκρωση, είτε ως απόπτωση, γ) μείωση ή και αναστολή του μεταστατικού (διεισδυτικού) δυναμικού των κυττάρων, και δ) μειωμένη ή απουσία δυνατότητας επαγωγής κυτταρικής ανθεκτικότητας. Οι ενώσεις βαναδίου επιδεικνύουν όλες αυτές τις ιδιότητες, είτε στο σύνολο ή κατά μόνες, μέσω μιας ποικιλίας μηχανισμών που θα εξετάσουμε εν συντομία (Σχήμα 1.1).

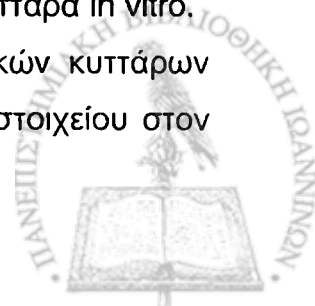
Οι αντικαρκινικοί μηχανισμοί και δράσεις των ενώσεων βαναδίου έχουν ερευνηθεί σε μια ποικιλία καρκινικών κυτταρικών σειρών, μεταξύ των οποίων ανθρώπινου Β λεμφώματος, λευχαιμίας Τ κυττάρων (Kresja et al., 1997) ερυθρολευχαιμίας επίμυος, βασοφιλικής λευχαιμίας των επίμυων, λευχαιμικών κυττάρων L1210 (Djordjevitiz et al., 1995), HL-60 και M07e, ηπατώματος ανθρώπου και επίμυος, ανθρώπινου καρκινώματος ωοθηκών, καρκίνου όρχεων, ρινοφαρυγγικού καρκινώματος, καρκινώματος του λάρυγγα, οστεοσαρκώματος, και ασκητικού σαρκώματος του Ehrlich, νευροβλαστώματος μυών και επίμυων, γλοιώματος επίμυων, επιδερμικών κυττάρων μυός JB6P<sup>+</sup>, καρκινώματος πνεύμονα κατά Lewis, και κυττάρων HeLa (Evangelou, 2002).

## 7.1. Επίδραση του βαναδίου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Τα σύμπλοκα βαναδίου επιδεικνύουν είτε αντι-πολλαπλασιαστικές ή σε ορισμένες περιπτώσεις, πολλαπλασιαστικές δράσεις σε διάφορους τύπους κυττάρων.

Έχει αποδειχθεί ότι σύμπλοκα υπεροξυβαναδίου μειώνουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων νευροβλαστώματος NB41 και γλοιώματος C6, ενώ στους ινοβλάστες μυός C3H10T1 τα υπεροξυβαναδικά που σχηματίζονται *de novo* επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Kradly et al., 1997). Οι διφασικές δράσεις των ενώσεων βαναδίου (μεταβαναδικό αμμώνιο, τρις ενυδατωμένο θειικό βαναδύλιο και ορθοβαναδικό νάτριο) έχουν επίσης αναφερθεί σε πειράματα με κύτταρα *in vitro*.

Η αναστολή του πολλαπλασιασμού καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων από τη χορήγηση ενώσεων βαναδίου οφείλεται στην επίδραση του στοιχείου στον



κυτταρικό κύκλο. Τα σύμπλοκα του υπεροξυβαναδίου παρεμποδίζουν αναστρέψιμα σε χαμηλές συγκεντρώσεις και μη-αναστρέψιμα σε υψηλές συγκεντρώσεις τον κυτταρικό κύκλο από τη φάση G στη φάση M. Η αναστολή του κυτταρικού κύκλου από το βανάδιο επάγεται δια μέσω της αναστολής των φωσφατασών των πρωτεϊνικών τυροσινών (PTPs) που αποφωσφορυλιώνουν υπομονάδες του συμπλόκου των κυκλινών B (Morinville et al., 1998). Επιπλέον η αναστολή του κυτταρικού κύκλου από το βανάδιο εκδηλώνεται από την ενεργοποίηση των πορειών σήματος των πρωτεϊνικών κινασών της υπεροικογένειας MAPKs.

Το βανάδιο ενεργοποιεί την p38 MAPK και επάγει τη μεταγραφή του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα-κΒ (NF-κΒ), παράγοντα εξαιρετικά σημαντικού στον προγραμματισμό του κυτταρικού κύκλου, όπως και της απόπτωσης σε κυτταρικές σειρές επιθηλίου των βρόγχων (Jaspers et al., 2000).

Σύμπλοκα βαναδίου επάγουν την κατάτμηση (cleavage) του DNA μη επιδρώντας απευθείας στα συστατικά του DNA, αλλά εμμέσως με τη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, ειδικότερα ιόντων υδροξυλίου (OH<sup>-</sup>) εντός των κυττάρων. Επώαση του DNA με ιόντα βαναδύλιου και υπεροξείδιο του υδρογόνου οδηγούν σε δραματική διάσπαση του DNA που προκαλούνται κυρίως από την παραγωγή OH<sup>-</sup> από την αντίδραση ιόντων βαναδίου και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sakurai et. al., 1995).

### **8.1. Κυτταρικός θάνατος και σύμπλοκα βαναδίου**

Το ταξίδι του βαναδίου αρχίζει από τη Vanadis και μέσω της τοξικότητας της φύσης του εισέρχεται στην περιοχή της Άτροπος. Οι δύο μορφολογικά διαφορετικοί τρόποι κυτταρικού θανάτου καλούνται *νέκρωση* και *απόπτωση* (Majno and Jorris, 1995). Η νέκρωση σε απλοποιημένη αναλογία περιγράφεται ως έκρηξη, όπου το κύτταρο διογκούται δίχως μεταβολές στην πυρηνική μορφολογία του (Majno and Jorris, 1995). Χρησιμοποιώντας παρόμοια μεταφορά, η απόπτωση που είναι γνωστή και ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, χαρακτηρίζεται από πυρηνική και κυτταροπλασματική πύκνωση, από διόγκωση (blebbing) της μεμβράνης, από τη θραυσματοποίηση του πυρήνα και το σχηματισμό των αποκαλούμενων αποπτωτικών σωμάτων. Τα αποπτωτικά σώματα είναι μικρά, σχεδόν σφαιρικά τμήματα του κυτοσολίου που περικλείουν πυκνωτικά υπολείμματα του πυρήνα (Majno and Jorris, 1995). Η κατάτμηση του DNA σε αποπτωτικά κύτταρα οδηγεί σε εικόνα θραυσματοποίησής του (σκάλα DNA), χαρακτηριστικό δεδομένο όταν



απομονώσουμε το DNA αποπτωτικού κυττάρου και το αναλύσουμε σε πηκτική αгарόζης, ενώ το DNA σε νεκρωτικά κύτταρα παράγει επίχρισμα (Ichijo, 1998). Μια δυσκολία στην αναγνώριση ή στη διάκριση του κυτταρικού θανάτου από την κυτταρική απόπτωση αποτελεί ο καθορισμός πως ο ίδιος μηχανισμός διέγερσης εξαρτώμενος από τη συγκέντρωση και το χρόνο έκθεσης μπορεί να οδηγεί είτε σε νέκρωση, είτε σε απόπτωση, είτε και στις δύο μορφές κυτταρικού θανάτου. Τα ενδοκυττάρια μόρια και οι προαγωγοί των δύο πορειών του κυτταρικού θανάτου δεν έχουν πλήρως χαρακτηριστεί. Όμως οι μηχανισμοί διέγερσης της κυτταρικής απόπτωσης διαμέσου των ενώσεων βαναδίου συσχετίζονται με τη δράση της οικογένειας MAPK λόγω της βιβλιογραφικής πληθώρας που έχει συσσωρευτεί για τις αλληλοεπιδράσεις τους (Canman and Kastan, 1998).

Η απόπτωση ενοχοποιείται για ποικιλία φυσιολογικών διεργασιών και η απουσία ρύθμισής της μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση παθολογικών φαινομένων, μεταξύ των οποίων είναι και ο καρκίνος (Reed, 2002; Reed, 2000). Η ρύθμιση συγκεκριμένων ενδοκυττάρων πορειών σήματος από ενώσεις του βαναδίου μπορεί να επηρεάσουν κυτταρικές λειτουργίες, όπως τον κυτταρικό ρυθμό ανάπτυξης, τη διαφοροποίηση, το μετασχηματισμό, το ρυθμό προσκόλλησης και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

Συσσωρευμένες αποδείξεις υποδηλώνουν ότι οι ενώσεις του βαναδίου ρυθμίζουν τη διάρκεια και το μέγεθος της φωσφορυλίωσης ενός αριθμού πρωτεϊνών, όπως MEK-1, ERK-1, JNK-1, PI-3K και των μεταγραφικών παραγόντων AP-1 και NF-κB, πρωτεϊνών-κλειδιά των πορειών σήματος που εμπλέκονται στην αποπτωτική διαδικασία (Huang et al., 1998).

Η απενεργοποίηση των φωσφατασών ή η ενεργοποίηση των φωσφοκινασών οδηγούν στη συσσώρευση υπολειμμάτων φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνικών τυροσινών σε κύτταρα με αποτέλεσμα τη δημιουργία δευτερογενών μεταβιβαστών, την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κινασών και την ενεργοποίηση παραγόντων μεταξύ των οποίων είναι και ο NF-κB (Perkins, 2004).

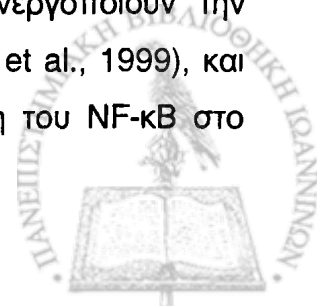


## 9.1. Επίδραση του βαναδίου σε διαφορετικές πορείες απόπτωσης

Παρότι η ποσότητα των πληροφοριών είναι εύρωστη για να εξηγηθούν οι αποπτωτικές πορείες, ελάχιστα στοιχεία υπάρχουν στη βιβλιογραφία για το ρόλο των ενώσεων βαναδίου και τη ρύθμιση των βιοχημικών πορειών προς την κυτταρική απόπτωση. Σε κλασικά παραδείγματα προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου ένα εξωκυττάριο πρόσδεμα (extracellular ligand), όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (TNF $\alpha$ ) οδηγεί στην πυρηνική μετατόπιση του NF- $\kappa$ B και στην ενεργοποίηση των JNK και MKK7 (Mercurio and Manning, 1999; Bours et al., 2000). Η δράση των NF- $\kappa$ B και JNK μπορούν να επηρεαστούν από την παρουσία συμπλόκων υπεροξυβαναδίου και να αναπαριστούν ακόμη μία εν δυνάμει θέση μεγιστοποίησης του σήματος για κυτταρική πορεία θανάτου.

Ο NF- $\kappa$ B ρυθμίζει την έκφραση ποικίλλων γονιδίων των οποίων τα προϊόντα ρυθμίζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις και τον κυτταρικό κύκλο καταλήγοντας είτε στην προστασία από την κυτταρική απόπτωση ή στον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης (Perkins, 2004). Φαίνεται λοιπόν ότι η αποπτωτική δράση των ενώσεων βαναδίου σε σχέση με τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνικών τυροσινών και την ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B εξαρτώνται από το αν ενεργοποιούνται γονίδια-στόχοι θανάτου ή αντι-αποπτωτικά γονίδια (Perkins, 2004). Το τελευταίο φαίνεται να εξαρτάται είτε από τον τύπο των ενεργοποιημένων κυττάρων, είτε από το είδος του συμπλόκου του βαναδίου και τη χορηγούμενη δόση, είτε και από τα δύο. Στα λεμφοκύτταρα στα οποία ενώσεις του βαναδίου επάγουν πυρηνική μετατόπιση του NF- $\kappa$ B, το βανάδιο επάγει απόπτωση των Β-λεμφοκυττάρων, ενώ παράλληλα επιταχύνει την ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων (Schieven et al., 1995). Το βανάδιο επίσης προλάμβανε την απόπτωση σε λευχαιμικές σειρές κυττάρων MO7e που καλλιεργούνταν για 24 ώρες απουσία παραγόντων ανάπτυξης (Bergamashi et al., 1993).

Υπάρχει μεγάλος αριθμός πρόσφατων δεδομένων που υποδεικνύουν πως οι ενώσεις βαναδίου εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα διαμέσου της ενεργοποίησης της πορείας μεταγωγής σήματος των MAPKs, οδηγώντας σε κυτταρική απόπτωση (Samet et al., 1998; Wang et al., 1998). Οι ενώσεις βαναδίου, ιδιαίτερα το θειικό βαναδύλιο ενεργοποιούν την οικογένεια των MAPKs σε επιθηλιακά κύτταρα ωοθηκών (Pandey et al., 1999), και πνευμόνων, ιδιαίτερα την p38, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B στο

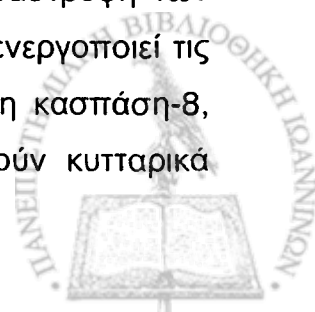




κυτταρόπλασμα (Jaspers et al., 2000). Το δις-υπεροξυβανάδιο (bnp), ένας αναστολέας των PTPs, ενεργοποιεί τον NF-κΒ στα T-λεμφοκύτταρα και τα βαναδοκαΐνια αναστέλλουν την ανάπτυξη καρκινικών όγκων, μέσω της πορείας μεταγωγής σήματος των κινασών της τυροσίνης (Djordjevitj, 1995; Tsiani and Fantus, 1997; D' Cruz and Uckum, 2000).

Οι φωσφατάσες της φωσφοτυροσίνης (PTPs) είναι σημαντικοί ρυθμιστές των πορειών μεταγωγής σήματος και ευαίσθητοι στόχοι του οξειδωτικού στρες (Lau and Baylink, 1993). Το βανάδιο επάγει την ενδοκυττάρια απενεργοποίηση των PTPs και η in vivo δράση του στην αναστολή δράσης των PTPs μπορεί να συσχετίζεται ενεργά με την απόπτωση διαφόρων κυτταρικών τύπων, όπως επιθηλιακά προστατικά κύτταρα, κύτταρα ηπατώματος μυός, κύτταρα BALB/3T3 (Sakai, 1997), οστεοσαρκωματικά κύτταρα UMR106 και οστεοβλάστες (Cortizo et al., 1994). Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι τα ανόργανα άλατα του βαναδίου ενεργοποιούν τις φωσφορυλάσες της φωσφοτυροσίνης, ειδικότερα τις MAPKs που περιλαμβάνουν τις πρωτεϊνικές κινάσες ERK, c-jun, JNK/SARK και τις p38 υποοικογένειες, που ως σημαντικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες διαμεσολαβούν στη μεταγωγή εξωκυτταρικών πορειών σήματος σε ενδοκυττάρια γεγονότα. Είναι επίσης υπεύθυνες για τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται οι κατάρρους κινάσες και οι μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούνται κυρίως από παράγοντες στρες και ιδιαίτερα από το οξειδωτικό στρες. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση αλάτων βαναδίου σε επιδερμικά κύτταρα μυός επάγει απόπτωση διαμέσου της παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου, της ενεργοποίησης της p53, ενός προϊόντος ογκοκατασταλτικού που ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επηρεάζει στην αποπτωτική διαδικασία (Levine, 1997; Canman and Kastan, 1998). Κυτταροτοξικά παράγωγα βαναδοκαΐνης επάγουν απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα με την έναρξη του σήματος εκκίνησης του αποπτωτικού προγράμματος.

Το σήμα εκκίνησης του αποπτωτικού προγράμματος έχει ως αφετηρία τους υποδοχείς θανάτου, απαιτεί όμως την ενεργοποίηση των τελικών εκτελεστών, των κασπασών. Η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου από ενώσεις του βαναδίου στο κυτταρόπλασμα ή στα μιτοχόνδρια έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή των μιτοχονδρίων και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, το οποίο ενεργοποιεί τις κασπάσες. Οι ενεργοποιημένες κασπάσες, όπως η κασπάση-3 και η κασπάση-8, επιφέρουν επιπρόσθετη μιτοχονδριακή καταστροφή και ενεργοποιούν κυτταρικά

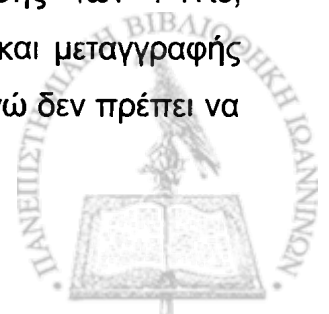


υποστρώματα όπως της πολυ-ADP-ριβουλο-πολυμεράσης (PARP), οδηγώντας σε απόπτωση (Green and Reed, 1998). Οι κασπάσες είναι οι ομόλογες των θηλαστικών του γονιδίου 3 του κυτταρικού θανάτου (*ced-3*) του έλμινθα *Caenorhabditis elegans*.

Η οικογένεια των συσχετιζόμενων γονιδίων για λεμφώματα Β κυτάρων στα θηλαστικά (Bcl γονίδια) ανταποκρίνεται στο *ced-9* του νηματώδη έλμινθα *C. elegans* (Gross et al., 1999). Μέλη της υπεροικογενείας της Bcl-2 διακρίνονται σε δύο λειτουργικές κατηγορίες: τις προ και τις αντι-αποπτωτικές. Οι αντι-αποπτωτικές Bcl-2 πρωτεΐνες, όπως η Bcl-2 και η Bcl-x<sub>L</sub> παρεμποδίζουν τον κυτταρικό θάνατο (Adams and Cory, 1998). Οι αντι-αποπτωτικές Bcl-2 πρωτεΐνες δρουν ανάρρους των κασπασών εμποδίζοντας την πρωτεόλυσή τους και την επακόλουθη ενεργοποίηση. Ο καταρράκτης μεταγωγής σήματος των ERK συνδέεται με τη φωσφορυλίωση της Bcl-2 (Adams and Cory, 1998) η οποία και τροποποιείται παρουσία ενώσεων βαναδίου. Σε αυτές τις περιπτώσεις η φωσφορυλίωση σκοπεύει στη διασφάλιση πορειών μεταγωγής σήματος που οδηγούν στην επιβίωση του κυτάρου (μέσω ERK και PI-3K) και ρυθμίζουν τη δράση των πρωτεϊνών Bcl-2 προς ένα αντι-αποπτωτικό αποτέλεσμα. Επιπλέον είναι θεωρητικώς παραδεκτό ότι τα γεγονότα της φωσφορυλίωσης έχουν μία προ-αποπτωτική επίδραση στις πρωτεΐνες Bcl-2 και ότι η ενεργότητα των κινασών θα μπορούσε να τροποποιηθεί με τους αναστολείς PTP οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο.

Η δράση των Bcl-2 πρωτεϊνών φαίνεται να διεξάγεται διαμέσου της φωσφορυλίωσης συγκεκριμένων καταλοίπων-κλειδίων πρωτεϊνών. Επί παραδείγματι η σύνδεση της Bad στη Bcl-x<sub>L</sub> αναστέλλεται από τη φωσφορυλίωση ενός καταλοίπου κλειδιού από την AKE (πρωτεϊνική κινάση Β) ή την πρωτεϊνική κινάση που συνδέεται με τις PKA και PKC οι οποίες κείνται κατάρρους της πορείας μεταγωγής σήματος του αυξητικού παράγοντα (P1-3K). Η ενεργοποίηση της P1-3K από το βανάδιο έχει αποδειχθεί σε λιποκύτταρα μύος (Sanchez et al., 1998) και σε ηπατοκύτταρα μύος (Kresja et al., 1997).

Είναι λοιπόν εμφανές από το σημαντικό όγκο πληροφοριών που έχει αποκομισθεί από τις έρευνητικές εργασίες ότι οι ενώσεις βαναδίου ενεργοποιούν σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα διαφορετικές πορείες μεταγωγής του σήματος κυρίως μέσω απενεργοποίησης των PTPs και/ή ενεργοποίησης των PTKs, ενεργοποίησης του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και μεταγραφής είτε αποπτωτικών γονιδίων (PARP), ή αντι-αποπτωτικών (Bcl-2), ενώ δεν πρέπει να



παραβλέπεται ο ρόλος του βαναδίου στην ενεργοποίηση της απόπτωσης διαμέσου της ενεργοποίησης των μιτοχονδριακών κασπασών.

Οι ενώσεις βαναδίου επηρεάζουν τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών διαμέσου της αναστολής των μη-εξειδικευμένων πρωτεϊνικών φωσφατασών, επηρεάζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τον ενδοκυτταρικό καταρράκτη μεταγωγής σήματος. Ο καταρράκτης MAPK αναπαριστά μόνον έναν από τους δρόμους μεταγωγής σήματος που φαίνεται ότι τα σύμπλοκα βαναδίου προσβάλλουν (Whitmarsh and Davis, 1996; Whitmarsh and Davis, 2000; Kyriakis and Avruch, 2001). Η υπερ-οικογένεια των MAPKs εμπλέκεται στη ρύθμιση ενός αριθμού ενδοκυττάρων πορειών και έχουν συνδεθεί με αποπτωτικές αποκρίσεις ή αποκρίσεις επιβίωσης σε ορισμένες κυτταρικές σειρές ή τύπους κυττάρων (Kummer et al., 1997; Ichijo, 1998). Οι ERKs ενεργοποιούνται φυσιολογικά ως απόκριση σε παράγοντες πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης, ενώ οι JNKs και η p38 συνήθως ενεργοποιούνται ως απόκριση σε κυτοκίνες πρόκλησης φλεγμονής και κυτταρικού στρες.

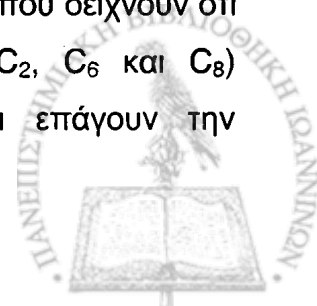
Επιπρόσθετα, αφού η υπερ-οικογένεια των MAPK συνδέεται με την επιβίωση του κυττάρου και την απόπτωση, η ρύθμιση της δράσης μελών της οικογένειας θα μπορούσε να είναι υπεύθυνη για την τοξικότητα που επιδεικνύουν οι ενώσεις του βαναδίου. Άλατα του μετάλλου διεγείρουν τις πρωτεΐνες ERK-1 και ERK-2, p70<sup>56k</sup> και p90<sup>rsk</sup> σε κύτταρα CHO (Tournier et al., 2000). Πρόσφατες μελέτες σε μετασχηματισμένους ινοβλάστες μύς από ογκογονίδια παρουσία βαναδίου, οδήγησαν σε εκτιμήσεις ότι η ενεργότητα των ERK-1 και ERK-2 ελέγχεται από μια εξειδικευμένη PTP (Whitmarsh and Davis, 2000). Η χρήση υπεροξυβαναδίου που σχηματίζεται *in situ* οδηγεί στην ενεργοποίηση των ERKs σε κύτταρα HeLa (Band et al., 1996). Ένα από τα σύμπλοκα του υπεροξυβαναδίου (bpV phen), οδηγεί σε ισχυρή φωσφορυλίωση της πρωτεϊνικής τυροσίνης συγκρινόμενο με το ορθοβαναδικό άλας του νατρίου, όπως και σε ενεργοποίηση της ERK-2 και του NF-κΒ σε δύο λεμφοκυτταρικές κυτταρικές σειρές, τη Ramos και τη Jurkat (Krejsa et al., 1997). Χρήση υπεροξυβαναδίου οδήγησε σε πολλαπλασιασμό και ταυτόχρονη ενεργοποίηση και μετατόπιση των ERK-1 και ERK-2 στον πυρήνα σε ινοβλάστες μύς C3H10T1/2. Η ενεργοποίηση των ERKs από το bpV (phen) έχει διαπιστωθεί και σε ηπατοκύτταρα μύς (Band et al., 1997).



## **ΕΝΟΤΗΤΑ ΙΙ: ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΕΡΑΜΙΔΙΟΥ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ**

### **10.1. Εισαγωγή στο ρόλο του κεραμιδίου στον πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση των κερατινοκυττάρων**

Η επιδερμίδα των θηλαστικών είναι ένας συνεχώς ανανεούμενος ιστός, και η ακεραιότητα και λειτουργία του εξαρτάται από την ρύθμιση του ισοζυγίου μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού, κυτταρικής διαφοροποίησης και κυτταρικού θανάτου (Hale et al., 1996). Αν και υπάρχουν πολλές πληροφορίες σε σχέση με τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση, ελάχιστα είναι γνωστά για την απόπτωση των επιδερμικών κερατινοκυττάρων. Η απόπτωση είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος που χαρακτηρίζεται από μορφολογικά κριτήρια μεταξύ των οποίων είναι η συμπύκνωση της χρωματίνης, η θραυσματοποίηση του DNA, η συρρίκνωση των κυττάρων και η διόγκωση (blebbing) των μεμβρανών (Vaux and Strasser, 1996; Hale et al., 1996). Ως επακόλουθο της ακεραιότητας των κυτταρικών μεμβρανών και των ενδοκυττάρων χώρων, τα γειτονικά κύτταρα δεν επηρεάζονται και δεν δημιουργείται φλεγμονή όπως συμβαίνει στον κυτταρικό θάνατο με νέκρωση (Wyllie, 1986; Majno and Jorjris, 1995). Ο αποπτωτικός θάνατος των κερατινοκυττάρων, που έχει όμοια δομικά και ρυθμιστικά χαρακτηριστικά με το θάνατό τους λόγω της τελικής διαφοροποίησης, αφαιρεί ενεργά τα υπερβολικά και μη-φυσιολογικά κύτταρα από την επιδερμίδα. Ένα χαρακτηριστικό της διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων είναι η *de novo* σύνθεση μεγάλης ποσότητας κεραμιδίων που ανήκουν στα σφιγγολιπίδια, τα οποία αποτελούν το 40% περίπου των λιπιδίων της επιδερμίδας. Τα κεραμίδια που παράγονται επίσης με την υδρόλυση της σφιγγομελίνης (κύκλος της σφιγγομελίνης), που βρίσκεται ενσωματωμένη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, δρουν ως ενδοκυτταριοί αγγελιοφόροι και εμπλέκονται στην επαγωγή της διαφοροποίησης και της απόπτωσης και στη μείωση ή στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Merrill, 2002; Hannun and Obeid, 2002; Spiegel and Milstien, 2002; Kolesnick, 2002). Παράγοντες που αυξάνουν τα επίπεδα των κεραμιδίων στα κερατινοκύτταρα είναι ο TNF $\alpha$ , η 1 $\alpha$ ,25-διϋδροξυβιταμίνη D $_3$  και η καλσιποτριόλη (ανάλογο της βιταμίνης D $_3$ ) (Geilen et al., 1997). Υπάρχουν σχετικά λίγες μελέτες που δείχνουν ότι τα συνθετικά κεραμίδια μικρής υδρογονανθρακικής αλυσίδας (C $_2$ , C $_6$  και C $_8$ ) αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και επάγουν την

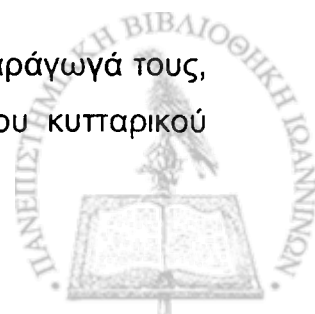


απόπτωσή τους, αλλά οι μηχανισμοί δράσης των κεραμιδίων στα κερατινοκύτταρα δεν είναι κατανοητοί (Gniadecki et al., 1998; Iwasaki-Bessho, 1998; Bektas et al., 1998; Buisson-Legendre et al., 1999; Di Nardo et al., 2000; Müller-Wieprecht, 2000; Sugiki et al., 2000). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το κεραμίδιο μειώνει τα επίπεδα της έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 σε φυσιολογικά κερατινοκύτταρα (Di Nardo et al., 2000) και η υπερέκφραση του Bcl-2 σε μια αυθόρμητα αθανатоποιημένη κερατινοκυτταρική σειρά, HaCaT, επιφέρει ανθεκτικότητα στην επαγόμενη απόπτωση από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο (Müller-Wieprecht, 2000).

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ένα προϊόν γονιδίου που εμπλέκεται στον λιπιδικό μεταβολισμό, η κλαστρίνη/απολιποπρωτεΐνη J (ApoJ) φαίνεται να δρα ως αντι-αποπτωτικό γονίδιο (Jenne and Tschopp, 1992; Rosenberg and Silkensen, 1995; Jones and Jomary, 2002; Trougakos and Gonos, 2003). Προκειμένου να μελετηθεί και να συγκριθεί ο αντι-αποπτωτικός ρόλος της ApoJ με αυτόν της Bcl-2, κατασκευάστηκαν κερατινοκύτταρα HaCaT τα οποία υπερέκφραζαν είτε την ανθρώπινη Bcl-2 πρωτεΐνη ή την κλαστρίνη/ApoJ και στα οποία χορηγήθηκε C<sub>2</sub>-κεραμίδιο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και επάγει την απόπτωση των κερατινοκυττάρων HaCaT με δόσο-εξαρτώμενο και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο. Το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο δεν μετέβαλε την έκφραση των Bcl-2 και ApoJ καθώς επίσης και των κυκλινο-εξαρτώμενων αναστολέων των κινασών (cyclin-dependent kinase inhibitors), p21 και p27. Όμως, προκάλεσε την υδρόλυση της πολυ-ADP-ριβοσυλο-πολυμεράσης (PARP), ενός δείκτη της απόπτωσης των κυττάρων. Ενώ η υπερέκφραση του Bcl-2 στα HaCaT επέφερε πλήρη ανθεκτικότητα, η υπερέκφραση της κλαστρίνης/ApoJ επέφερε μερική ανθεκτικότητα στην επαγόμενη από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο κυτταρική απόπτωση. Με βάση τα ευρήματα της παρούσας εργασίας και τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας, προτείνεται ένα απλό υποθετικό μοντέλο της δράσης του Bcl-2 και της κλαστρίνης/ApoJ στην πορεία της μεταγωγής του σήματος του κεραμιδίου. Περισσότερες όμως μελέτες απαιτούνται προκειμένου να επιβεβαιωθεί αυτό το υποθετικό μοντέλο.

### **11.1. Μεταβολισμός των σφιγγολιπιδίων**

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει αποδειχθεί ότι τα λιπίδια, καθώς και τα παράγωγά τους, έχουν βασικό ρόλο στη μεταγωγή του σήματος και στη ρύθμιση του κυτταρικού

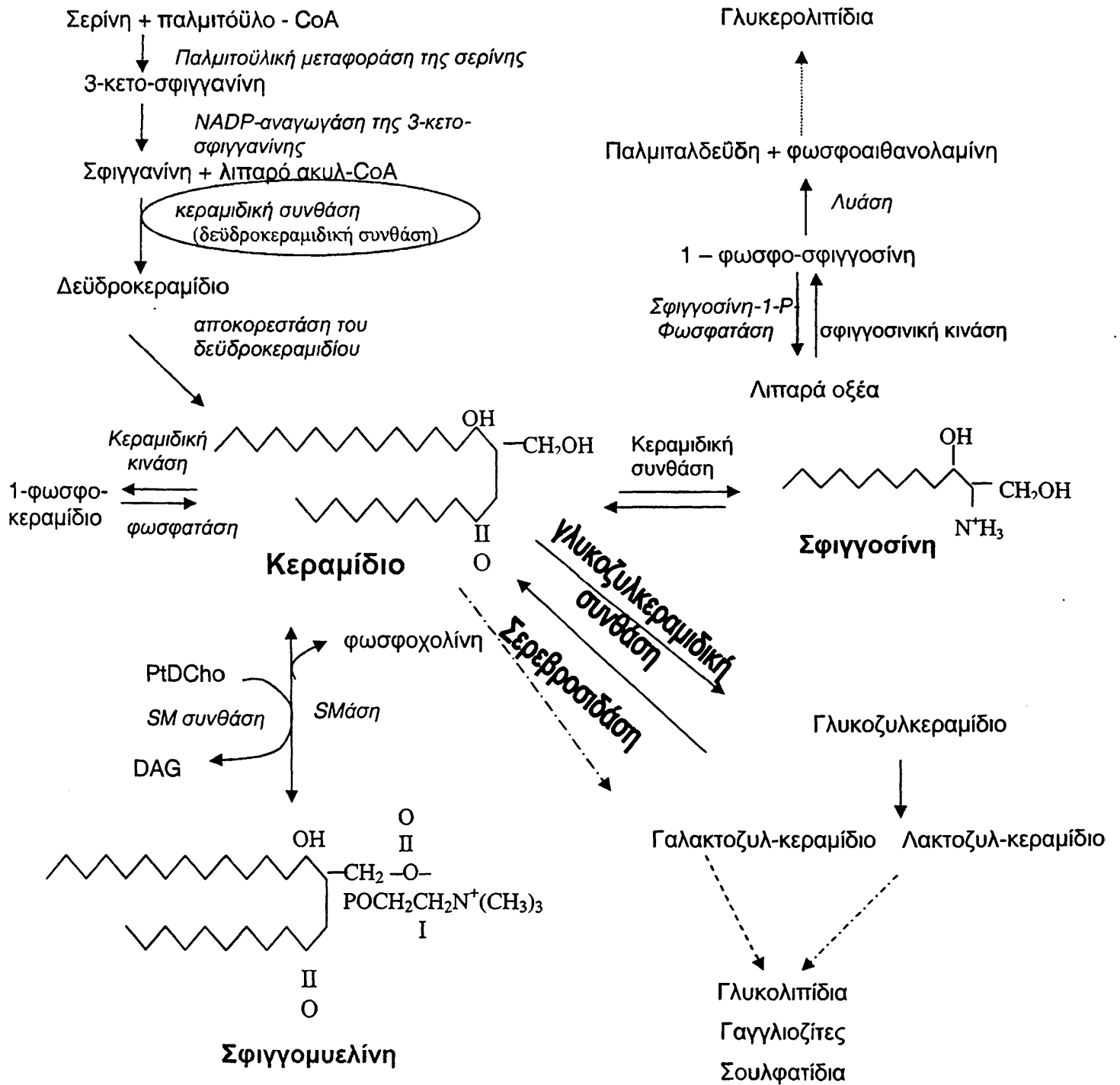


κύκλου και της απόπτωσης. Αυτοί οι ρόλοι εξαρτώνται από τη δομική διαμόρφωση του λιπιδίου. Τέτοιες δομικές διαμορφώσεις απαντώνται κυρίως στα σφιγγολιπίδια, τα οποία και αποτελούν μία εξαιρετικά πλούσια πηγή βιοενεργών μορίων. Τα σφιγγολιπίδια είναι μια οικογένεια ποικίλων φωσφολιπιδίων και γλυκολιπιδίων που η δομή τους βασίζεται στη σφιγγοσίνη. Πειράματα έχουν δείξει ότι πολλά από τα ένζυμα του σφιγγολιπιδικού μεταβολισμού και των προϊόντων του συνδέονται άμεσα με τη μεταγωγή του σήματος και τη ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών όπως ο σχηματισμός ειδικών δομών, (π.χ. βιολογικές μεμβράνες), η συμμετοχή τους στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυτάρων και κυτάρων-υποστρώματος, η ρύθμιση της συμπεριφοράς κυτταρικών πρωτεϊνών και υποδοχέων και η μεταγωγή του σήματος ως εξωκυττάριοι αγωνιστές και ως ενδοκυττάριοι αγγελιοφόροι (Merrill, 2002; Hannun and Obeid, 2002; Spiegel and Milstien, 2002; Kolesnick, 2002).

Ένα από τα σφιγγολιπίδια που παράγονται με *de novo* σύνθεση ή με την υδρόλυση της σφιγγομυελίνης είναι και το κεραμίδιο (**Σχήμα 2.1**), το οποίο φαίνεται να συσχετίζεται με κυτταρικές λειτουργίες, όπως η απόπτωση και η παύση του κυτταρικού κύκλου (Geilen et al., 1997; Hannun and Luberto, 2000; Merrill, 2002; Hannun and Obeid, 2002; Kolesnick, 2002).

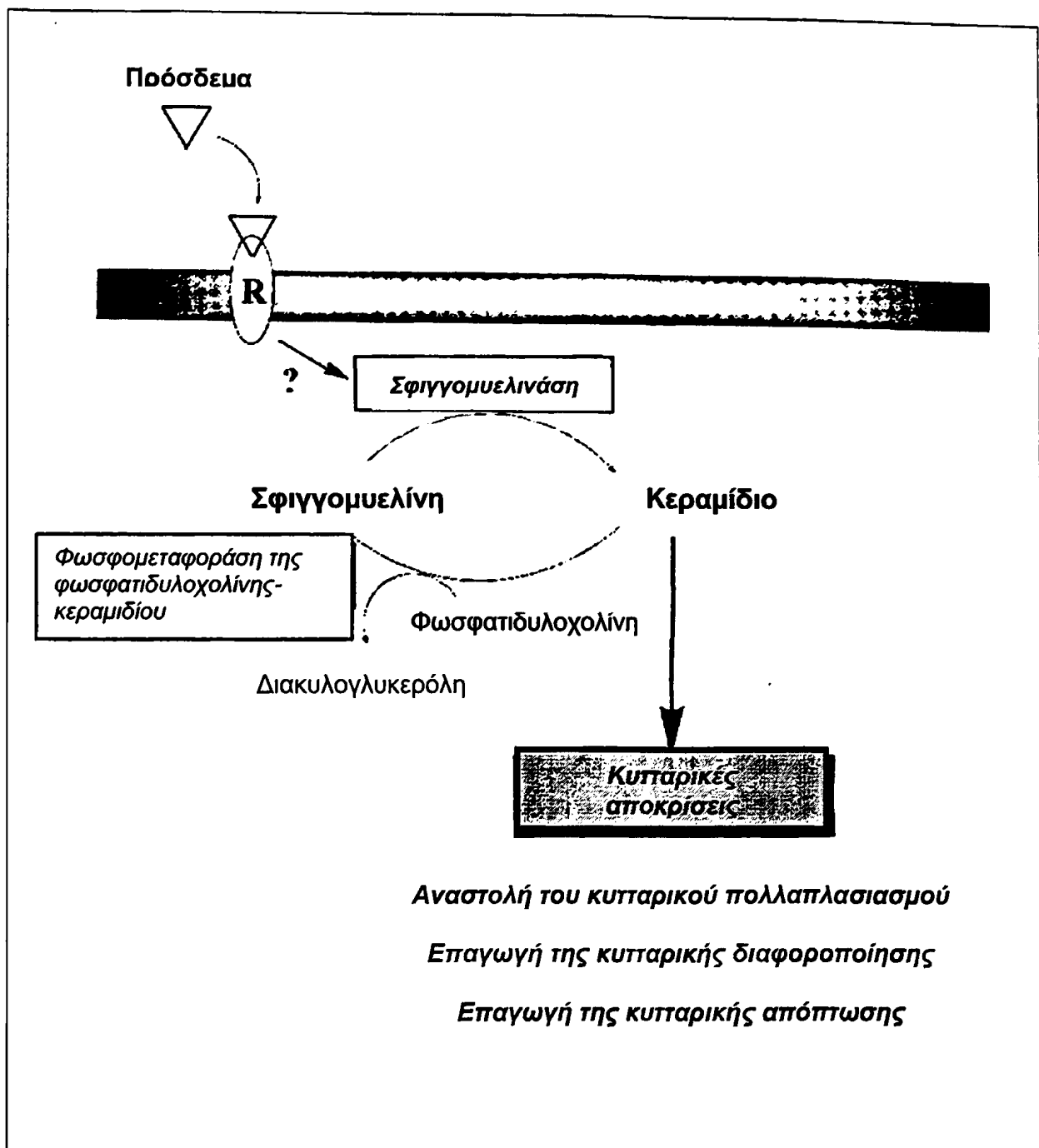
Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων που διεγείρει την υδρόλυση της σφιγγομυελίνης ή/και τον σφιγγολιπιδικό μεταβολισμό, με αποτέλεσμα την ενδοκυττάρια συσσώρευση του κεραμιδίου (**Σχήμα 3.1**). Τέτοιοι διεγέρτες είναι οι κυτοκίνες (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  και IFN- $\gamma$ ), το πρόσδεμα Fas, κυτταροτοξικοί παράγοντες (χημειοθεραπευτικά όπως η δοξορουβικίνη, το CPT-11 και το ετοποσίδιο), περιβαλλοντικές εντάσεις (θερμοπληξία, ιονίζουσα και υπέρυθρη ακτινοβολία), τραυματισμοί και μολύνσεις (π.χ. μόλυνση από τον ιό HIV και από βακτήρια) (Geilen et al., 1997; Hannun and Luberto, 2000; Hannun and Obeid, 2002). Αν αθροίσουμε όλα τα παραπάνω βλέπουμε ότι τα επίπεδα κεραμιδίου στον οργανισμό καθορίζονται από τη συνδυασμένη δράση διαφόρων παραγόντων έντασης και διαφόρων ενζύμων του μεταβολισμού των σφιγγολιπιδίων. Είναι αξιοσημείωτο ότι η συσσώρευση του κεραμιδίου συμβαίνει συχνά προτού από οποιοσδήποτε άλλες αναγνωρίσιμες κυτταρικές αλλαγές και υποδηλώνει έναν πιθανό ρόλο ρύθμισης αυτών των κυτταρικών αποκρίσεων (Hannun, 1996; Mathias et al., 1998; Merrill, 2002; Hannun and Obeid, 2002; Spiegel and Milstien, 2002; Kolesnick, 2002).





**Σχήμα 2.1.** Η κεντρική θέση του κεραμιδίου στο μεταβολισμό των σφιγγολιπιδίων. Η βιοσύνθεση των σφιγγολιπιδίων αρχίζει στο ενδοπλασματικό δίκτυο με τη συμπύκνωση της σερίνης και του παλμιτούλο-CoA και ακολουθείται από αναγωγή προς δεϋδροκεραμίδιο το οποίο αλκυλιώνεται για να παραχθεί κεραμίδιο το οποίο χρησιμοποιείται για τη σύνθεση σφιγγομυελίνης (SM) ή κερεβροζιτών στο Golgi, δηλαδή τα πρόδρομα μόρια γλυκολιπιδίων και γαγγλιοζιτών. Οι αντιδράσεις που καταλύονται από την παλμιτούλο-μεταφοράση της σερίνης και τη συνθάση του κεραμιδίου είναι τα στάδια ρύθμισης του μεταβολισμού των σφιγγολιπιδίων (Hannun and Luberto, 2000; Kolesnick, 2002). PtDCho, Φωσφατιδυλοχολίνη; DAG, διακυλο γλυκερόλη.





**Σχήμα 3.1.** Ο καταρράκτης των κλιμακωτών αντιδράσεων της σφιγγομελίνης-κεραμιδίου ('κύκλος της σφιγγομελίνης') που διεγείρεται από εξωγενείς παράγοντες (αγωνιστές) (π.χ. TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , Fas) και επηρεάζει τις κυτταρικές αποκρίσεις (Geilen et al., 1997). R, υποδοχέας.



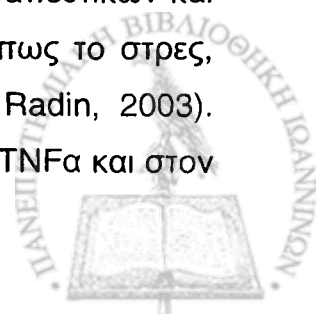
### 12.1. Σχηματισμός του κεραμιδίου

Η σφιγγομυελίνη (N-ακυλο-σφιγγοσίνη-1-φωσφοχολίνη), συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών, έχει σφιγγοειδή βάση, της οποίας το μεγαλύτερο μέρος είναι η σφιγγοσίνη. Αυτή η σφιγγοειδής βάση συνδέεται με αμιδικό δεσμό με ένα λιπαρό οξύ που έχει καρβοξυλική αλυσίδα μήκους 16 ή 18 ατόμων-C για να δώσει το κεραμίδιο. Το τελικό μόριο της σφιγγομυελίνης σχηματίζεται μετά την προσθήκη φωσφοχολίνης στη θέση του C1 του μορίου του κεραμιδίου (Σχήμα 2.1).

Η *de novo* σύνθεση του κεραμιδίου αρχίζει με τη συμπύκνωση της σερίνης και του παλμιτοϋλο-CoA για το σχηματισμό της 3-κετο-σφιγγανίνης, η οποία στη συνέχεια ανάγεται σε δεϋδροσφιγγοσίνη. Στα επόμενα βήματα μία ακυλομάδα λιπαρού οξέος προστίθεται στην τελευταία μέσω ενός αμιδικού δεσμού και παράγει δεϋδροκεραμίδιο και στη συνέχεια κεραμίδιο με την εισαγωγή ενός *trans*-4,5-διπλού δεσμού (Geilen et al., 1997; Merrill, 2002). Φαίνεται ότι το κεραμίδιο έχει ένα βασικό ρόλο στο μεταβολισμό των σφιγγολιπιδίων: λειτουργεί ως πρόδρομο μόριο για τον σχηματισμό κερεβροζιτών, σουλφατιδίων, γαγγλιοσιδίων, ακυλο-κεραμιδίων και σφιγγολιπιδίων, όπως είναι η σφιγγομυελίνη. Η τελευταία σχηματίζεται με τη μεταφορά μίας ομάδας φωσφορυλοχολίνης από τη φωσφατιδυλοχολίνη στο κεραμίδιο (Geilen et al., 1997; Merrill, 2002).

Το κεραμίδιο, βασική μονάδα του λιπιδίου σφιγγομυελίνη, παράγεται και από την υδρόλυση της σφιγγομυελίνης μέσω της δράσης του ενζύμου της σφιγγομυελινάσης, με *de novo* πορείες στις οποίες υπεισέρχεται η συνθάση του κεραμιδίου μέσω N-ακυλίωσης (N-acylation) της σφιγγανίνης και την προσθήκη ενός διπλού δεσμού, από την ενεργοποίηση όξινων ή ουδέτερων σφιγγομυελινασών ώστε να διασπάσουν το δεσμό μεταξύ κεραμιδίου και φωσφορικού οξέος της σφιγγομυελίνης ή από τη μετατροπή άλλων μορίων σφιγγολιπιδίων, όπως της σφιγγοσίνης (Σχήμα 2.1) (Hannun, 1996; Smyth et al., 1997; Ruvoilo, 2001; Kolesnick and Kronke, 1998; Kolesnick, 2002 ).

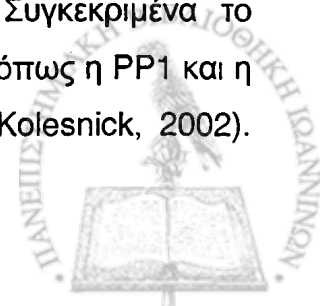
Η παραγωγή κεραμιδίου είναι αποτέλεσμα ποικίλων ερεθισμάτων που περιλαμβάνουν την αποστέρηση παραγόντων αύξησης, τη δράση των κυτοκινών, την ιονίζουσα ακτινοβολία, το θερμικό στρες, τη δράση των χημειοθεραπευτικών και άλλων τοξικών παραγόντων και τη δράση ποικίλων παραγόντων, όπως το στρες, ακόμα και η διατροφή (Jarris and Grant, 1998; Kolesnick, 2002; Radin, 2003). Παράλληλα, η έκθεση κυττάρων στην 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, στον TNFα και στον



ειδικό προσδέτη CD95/APO-1/Fas επάγει την πορεία μεταγωγής σήματος ενεργοποιημένη από το κεραμίδιο. Η αυξημένη παρουσία του κεραμιδίου σε ιστούς ή κύτταρα έχει τεκμηριωθεί ως παράγοντας αναστολής του κύκλου των κυττάρων, κυτταρικής διαφοροποίησης και κυρίως απόπτωσης (Kolesnick and Kronke, 1998; Kolesnick and Hannun, 1999; Hannun and Luberto, 2000). Παρ' όλα αυτά το κεραμίδιο μπορεί να τροποποιηθεί μέσω γλυκοζυλίωσης σε ανενεργή μορφή (Runolo et al., 1999; Kolesnick and Kronke, 1998) ή να μεταβολιστεί σε μόρια, όπως η 1-φωσφορική σφίγγοσίνη (sphingosine-1-phosphate), που έχει ενοχοποιηθεί ως μόριο που επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση του κυττάρου, λειτουργίες εντελώς αντίθετες των γεγονότων που επιφέρει η δράση του κεραμιδίου στα κύτταρα (Spiegel and Milstien, 2000; Spiegel and Kolesnick, 2002). Η γλυκοζυλιωμένη μορφή του κεραμιδίου, το γλυκοζυλο-κεραμίδιο, (glucosylceramide) μειώνει ή αναστέλλει την κυτταροτοξική δράση του κεραμιδίου, όπως και η 1-φωσφορική σφίγγοσίνη (S1P), ένας από τους μεταβολίτες των σφίγγολιπιδίων. Έτσι έχει υποδειχθεί ότι η ισορροπία μεταξύ των δύο πορειών του μεταβολισμού των σφίγγολιπιδίων παίζει σημαντικό ρόλο στο να καθοριστεί η πορεία επιβιωσιμότητας ή η πορεία θανάτου κυττάρων θηλαστικών (Kolesnick, 2002). Καθώς τα επίπεδα σφίγγοσίνης σε κύτταρα θηλαστικών είναι υποπολλαπλάσια των συγκεντρώσεων κεραμιδίου, η παραγωγή επιπρόσθετων ποσοτήτων S1P απαιτεί επιπρόσθετη σύνθεση σφίγγοσίνης (Kolesnick, 2002). Γι' αυτό το λόγο η ενεργοποίηση της πορείας της σφίγγομυελίνης δεν μπορεί να αποκλειστεί ποτέ από την αποτυχία ανίχνευσης υψηλών συγκεντρώσεων κεραμιδίου, εκτός και αν έχουν γίνει ταυτόχρονες μετρήσεις σφίγγομυελίνης, σφίγγοσίνης και S1P.

### 13.1. Κυτταρικοί στόχοι του κεραμιδίου

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι κεραμίδια που δρουν ως ενδοκυτταριοί αγγελιοφόροι ενεργοποιούν την πρωτεϊνική φωσφατάση CAPP (ceramide-activated protein phosphatase), που ανήκει στην 2A οικογένεια των σερίνης/θρεονίνης πρωτεϊνικών φωσφατασών, ένας άμεσος στόχος και ένζυμο-κλειδί στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από το κεραμίδιο (Hannun and Luberto, 2000; Runolo, 2001; Hannun and Obeid, 2002; Kolesnick, 2002). Συγκεκριμένα το κεραμίδιο ενεργοποιεί δύο μέλη αυτής της οικογένειας των CAPPs όπως η PP1 και η PP2A (Hannun and Luberto, 2000; Hannun and Obeid, 2002; Kolesnick, 2002).



Άλλος ένας στόχος του κεραμιδίου είναι η πρωτεϊνική κινάση CAPK (ceramide-activated protein kinase) η οποία ανήκει στην οικογένεια των προλινο-κυτταρικών κινασών και είναι η ίδια με την κινάση-αναστολέα του ras, KSR (kinase suppressor of ras). Επίσης οι ισομορφές PKCδ και PKCζ της πρωτεϊνικής κινάσης C αποτελούν τον τρίτο στόχο της δράσης του κεραμιδίου (Geilen et al., 1997; Sumitomo et al., 2002; Grant and Spiegel, 2002). Υπάρχουν επίσης και άλλοι παράγοντες των οποίων η δράση ρυθμίζεται από το κεραμίδιο, όπως η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος, οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB, c-myc, c-jun, το Bcl-2 και η φωσφολιπάση D (Geilen et al., 1997).

Όσον αφορά τον τρόπο δράσης του εξωγενούς κεραμιδίου, δεν είναι ακόμη κατανοητός. Πρόσφατες αναφορές δείχνουν ότι διάφοροι παράγοντες όπως ο TNF-α, το πρόσδεμα Fas, η ακτινοβολία-UV, οι ακτίνες-Χ, αλλά και το κεραμίδιο ενεργοποιούν τον καταρράκτη αντιδράσεων της c-jun αμινοτελικής-κινάσης (JNK), που ονομάζεται επίσης πορεία ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης SAPK (Stress-activated protein kinase) διότι ενεργοποιείται επίσης σε συνθήκες στρες (Verheij, 1996). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η πορεία μεταγωγής σήματος μέσω της JNK ενεργοποιεί το τριαδικό σύμπλοκο πρωτεϊνικών παραγόντων TCF (ternary complex factor), Elk-1/p62TCF, επακόλουθο της οποίας είναι η ενεργοποίηση του c-fos SRE (serum response element; στοιχείο απόκρισης σε ορό). Επομένως υπάρχει μια σύνδεση μεταγωγής σήματος μεταξύ του κεραμιδίου και της ενεργοποίησης της πορείας JNK-Elk-1/p62TCF για τη μεταγωγή των ενδοκυττάρων μηνυμάτων των παραγόντων στρες και κυτταροκινών (Kim and Kim, 1998). Αυτή η σύνδεση παρέχεται από την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Rac, μέλος της οικογένειας των Rho GTPασών, και της επακόλουθης ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης A2 (PLA2). Έτσι η πορεία Rac και Rac-PLA2 είναι πιθανά μια κύρια πυρηνική πορεία μεταγωγής σήματος με την οποία το κεραμίδιο ενεργοποιεί το c-fos SRE τουλάχιστον σε ινοβλάστες (Kim and Kim, 1998).

Κατά συνέπεια η πορεία μεταγωγής του σήματος μέσω της JNK μπορεί να είναι μια κύρια πορεία με την οποία το κεραμίδιο, δρώντας ως ενδιάμεσος αγγελιοφόρος μεταβιβάζει στο εσωτερικό του κυττάρου τα μηνύματα των παραγόντων στρες ή των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών.

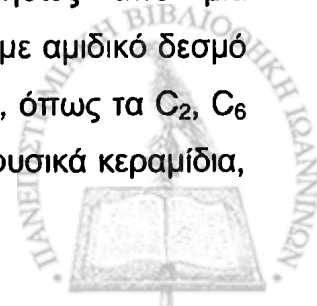


### 14.1. Κυτταρικές αποκρίσεις στο κεραμίδιο

Η ενεργοποίηση του κύκλου της σφιγγομυελίνης με την επαγόμενη αύξηση των επιπέδων του κεραμιδίου, συνοδεύεται από τρεις βασικές κυτταρικές αποκρίσεις: (1) αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, (2) επαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης και (3) επαγωγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) (Σχήμα 3.1). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι βιολογικές επιδράσεις του κεραμιδίου είναι στενά συνδεδεμένες με τη δομική του διαμόρφωση και έτσι μικρές αλλαγές στο μόριο μπορούν να οδηγήσουν στην απενεργοποίησή του. Έτσι, το στερεοϊσομερές του ενεργού D-ερυθρο-κεραμιδίου έχει βρεθεί πως είναι βιολογικά ανενεργό.

Η άμεση ενεργοποίηση της σφιγγομυελινάσης από περιβαλλοντικούς παράγοντες στρες (ιονίζουσα ακτινοβολία, παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου) οδηγεί στην παραγωγή κεραμιδίου που με τη σειρά του ενεργοποιεί την αποπτωτική πορεία SAPK/JNK. Η αναγνώριση νέων στόχων της JNK που περιλαμβάνει τη c-jun, τη Bcl-2 και το μεταγραφικό παράγοντα AP-1, δείχνει υποθετικούς μηχανισμούς μέσω των οποίων η ενεργοποίηση της JNK από το κεραμίδιο προάγει τον κυτταρικό θάνατο. Για παράδειγμα, η υπερφωσφορλίωση της Bcl-2 από τη JNK απενεργοποιεί την αντι-αποπτωτική λειτουργία της, (Haldar et al., 1998) η οποία είναι απαραίτητη για την επαγωγή θανάτου μέσω κεραμιδίου κυττάρων που εκφράζουν τη Bcl-2 (Runolo et al., 1999). Το κεραμίδιο μεταβάλλει επίσης τη σχέση μεταξύ προ-αποπτωτικών (Bax και Bad) και αντι-αποπτωτικών (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>) πρωτεϊνών, μελών της οικογένειας Bcl-2 που συνδέονται με τη μεμβράνη των μιτοχονδρίων, οδηγώντας αφενός σε απώλεια της ακεραιότητάς της και αφετέρου στο σχηματισμό πόρων που επιτρέπουν τη μαζική έξοδο προ-αποπτωτικών μορίων (20-60 kDa), όπως το κυτόχρωμα c και τον παράγοντα απόπτωσης (Malisan and Testi, 1999). Επίσης μια μιτοχονδριακή μορφή της συνθάσης του κεραμιδίου ενεργοποιείται αποκλειστικά από την ιονίζουσα ακτινοβολία και το οξειδωτικό στρες κυττάρων HeLa και φαίνεται ως αναγκαία προϋπόθεση για την αποτελεσματική αφοσίωση των μιτοχονδρίων στην αποπτωτική διαδικασία (Kolesnick, 2002).

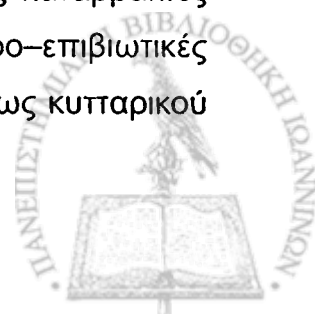
Η φυσική μορφή, D-ερυθρο-κεραμίδιο, αποτελείται συνήθως από μια σφιγγοειδή βάση C<sub>18</sub> και από ένα C<sub>14-26</sub> λιπαρό οξύ που συνδέεται με αμιδικό δεσμό (Σχήμα 2.1). Μολονότι τα κεραμίδια με μικρές ανθρακικές αλυσίδες, όπως τα C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub> και C<sub>8</sub> δεν είναι ισχυροί τελεστές (επηρεαστές) σε σύγκριση με τα φυσικά κεραμίδια,



είναι αυτά που χρησιμοποιούνται κυρίως σε πειράματα κυτταρικής βιολογίας και βιοχημείας. Τα κεραμίδια με μικρές ανθρακικές αλυσίδες όπως τα C<sub>2</sub> και C<sub>6</sub> (που περιέχουν μια άλυσσο ακετυλο-και εξανο-λιπαρού οξέος, αντίστοιχα) είναι ενεργά σε σχετικά φυσιολογικές συγκεντρώσεις. Μελέτες έχουν δείξει ότι όταν χορηγούνται σε συγκεντρώσεις 1-20 μM σε 2-10x10<sup>6</sup> κύτταρα ανά ml, τότε επιτυγχάνονται κυτταρικές συγκεντρώσεις οι οποίες είναι μέσα στο εύρος των ενδογενών επιπέδων του κεραμιδίου. Επομένως, η δράση αυτών των κεραμιδίων σε σχετικά φυσιολογικές συγκεντρώσεις επιβεβαιώνουν τη χρησιμότητά τους για την ανίχνευση του ρόλου του κεραμιδίου στη μεταγωγή του σήματος, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση (Hannun and Luberto, 2000).

Το κεραμίδιο ενεργοποιεί, όπως προαναφέρθηκε, τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες PP2A και PP1. Η αναστολή έκφρασης της PP1 μέσω φωσφατιδικού οξέος παρεμποδίζει την επαγόμενη από το κεραμίδιο αποφωσφορυλίωση της Rb και αναστέλλει τη διάσπαση της PARP, εμπλέκοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την PP1 στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου και στην επαγωγή της αποπτωτικής διαδικασίας (Kishikawa et al., 1999). Επιπλέον ένας νέος ρόλος της από το κεραμίδιο ενεργοποιημένης PP1 στη ρύθμιση έκφρασης της οικογένειας Bcl-2 και στο mRNA του γονιδίου της κάσπασης-9 έχει πρόσφατα παρουσιαστεί (Chalfant et al., 2001; Chalfant et al., 2002). Επίσης, η PP2A ρυθμίζει αρνητικά τις προ-επιβιωτικές κινάσες PKC και AKT, όπως και τη λειτουργία βασικών μορίων για τη διατήρηση πορειών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, όπως η Bcl-2 και η Bad (Ruvolo et al., 2002). Το κεραμίδιο επάγει τη διαμέσου PP2A αποφωσφορυλίωση της Bcl-2 με αποτέλεσμα την απώλεια της αντιαποπτωτικής λειτουργίας του μορίου (Ruvolo et al., 2002). Το κεραμίδιο μπορεί να επιδείξει αυξημένη ενεργότητα μέσω αυξορρύθμισής του (upregulation). Ένα σύγχρονο παράδειγμα τέτοιου μηχανισμού αποτελεί η αυξορρύθμιση του κεραμιδίου από πρωτεϊνική κινάση σε νευρώνες του ιππόκαμπου (Pelled et al., 2002). Ο μηχανισμός περιλαμβάνει την επαγωγή μέσω κεραμιδίου συγκέντρωσης της PP2A στα μιτοχόνδρια, που με τη σειρά της ενεργοποιεί τη φωσφατάση της Bcl-2 καταλήγοντας στην αδρανοποίηση του βασικού αντι-αποπτωτικού μορίου της Bcl-2 σε κύτταρα HL-60 (Ruvolo et al., 2002).

Η ικανότητα του κεραμιδίου να επάγει αντι-πολλαπλασιαστικούς καταρράκτες σήματος, ενώ ταυτόχρονα να καταστέλλει προ-αναπτυξιακές και προ-επιβιωτικές πορείες των κυττάρων, οδηγεί τους ερευνητές στο χαρακτηρισμό του ως κυτταρικού ρεοστάτη (Spiegel and Kolesnick, 2002).

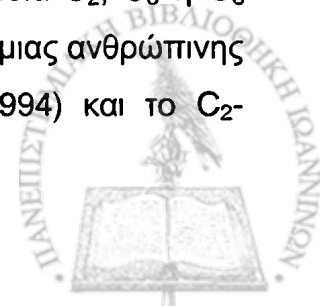


Η αρνητική δράση του κεραμιδίου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό περιγράφηκε αρχικά στα κύτταρα HL-60, όπου αποδείχτηκε ότι έχει χρονο-και δοσο-εξαρτώμενη δράση (Okazaki et al., 1990). Χορήγηση του C<sub>6</sub>-κεραμιδίου σε MOLT-4 κύτταρα ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό τους με χρονο- και δοσο-εξαρτώμενο τρόπο λόγω της αποφωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος. Σε αντίθεση μια κυτταρική σειρά με ανεπαρκές ρετινοβλάστωμα (Rb<sup>-/-</sup>) εμφάνιζε ανθεκτικότητα στο κεραμίδιο. Άρα πιθανά ένας τρόπος δράσης του κεραμιδίου είναι μέσω της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Dbaiibo et al., 1995).

Ο κύκλος της σφιγγομυελίνης και ο σχηματισμός του κεραμιδίου ενδοκυττάρια αποτελούν πιθανά το συνδετικό κρίκο μεταξύ των εξωκυττάρων σημάτων και του μηχανισμού της αναστολής ή μείωσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την επαγωγή της απόπτωσης ως μία διαδικασία ρύθμισης της απομάκρυνσης των κατεστραμμένων ή άχρηστων κυττάρων. Η χορήγηση κεραμιδίου εξωγενώς (που είναι διαπερατό από την κυτταρική μεμβράνη) μπορεί να προκαλέσει αναστολή ή μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ακολουθούμενη από απόπτωση ή χωρίς απόπτωση, αλλά αυτό εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο (Hannun, 1996; Geilen et al., 1997; Kolesnick and Hannun 1999; Hannun and Luberto, 2000; Hannun and Obeid, 2002; Kolesnick, 2002).

Σε φυσιολογικούς ινοβλάστες, τα κεραμίδια αναπαράγουν τα περισσότερα χαρακτηριστικά της κυτταρικής γήρανσης, όπως μη-αναστρέψιμη παύση του κυτταρικού κύκλου στην G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> φάση, ενεργοποίηση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb), αναστολή των μιτογόνων αποκρίσεων, αναστολή της πορείας της φωσφολιπάσης D-πρωτεϊνικής κινάσης c και τα κλασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά του γηρασμένου φαινότυπου, χωρίς να επάγει απόπτωση ή κυτταροτοξικότητα. Επίσης να σημειωθεί ότι τα επίπεδα του ενδογενούς κεραμιδίου είναι 4-5 φορές υψηλότερα στα γηρασμένα από ότι στα νεαρά κύτταρα, δείχνοντας έτσι ότι το κεραμίδιο παίζει ρόλο στη ρύθμιση της γήρανσης (Obeid and Venable, 1997).

Τα επιδερμικά κερατινοκύτταρα είναι ενεργά στη σύνθεση και καταβολισμό των κεραμιδίων και η πορεία μεταγωγής του σήματος μέσω του κεραμιδίου παίζει σημαντικό ρόλο στην επιδερμίδα (Geilen et al., 1997). Τα κεραμίδια C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub> ή C<sub>8</sub> αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και επάγουν τη διαφοροποίηση μιας ανθρώπινης καρκινικής κερατινοκυτταρικής σειράς, DJM-1, (Wakita et al., 1994) και το C<sub>2</sub>-



κεραμίδιο αυξάνει τη δράση της 1,25-διϋδροξυ-βιταμίνης D<sub>3</sub> στη διαφοροποίηση εμβρυϊκών ανθρώπινων κερατινοκυττάρων (Pillai et al., 1998).

Τα κεραμίδια αναστέλλουν τη σύνθεση του DNA σε πρωτογενείς καλλιέργειες επιδερμικών κερατινοκυττάρων μύος (Jung et al., 1998) και ανθρώπου (Gniadecki et al., 1998; Di Nardo et al., 2000) κατά δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η προσθήκη κεραμιδίου όχι μόνον αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό, αλλά και επάγει την απόπτωση διαφόρων κερατινοκυτταρικών σειρών. Ειδικότερα, το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο επάγει την απόπτωση φυσιολογικών ανθρώπινων κερατινοκυττάρων (Gniadecki et al., 1998; Buisson-Legendre et al., 1999), μιας αυθόρμητα αθανатоποιημένης ανθρώπινης κερατινοκυτταρικής σειράς, HaCaT (Iwasaki-Bessho, 1998; Bektas et al., 1998; Müller-Wieprecht, 2000) και μιας ανθρώπινης καρκινικής σειράς του πλακώδους επιθηλίου, HSC-I (Sugiki et al., 2000) με δόσο-και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο. Η επαγωγή της απόπτωσης στα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα ακολουθούνταν από τη μείωση των επιπέδων της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 (Di Nardo et al., 2000). Η υπερέκφραση της Bcl-2 μύος σε κερατινοκύτταρα HaCaT βρέθηκε να επιφέρει ανθεκτικότητα στην επαγόμενη από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο απόπτωση (Müller-Wieprecht, 2000). Παρόμοια, η υπερέκφραση της Bcl-2 σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη (Herrmann et al., 1997) ή μαστού (EL-Assaad et al., 1998) επέφερε ανθεκτικότητα στην επαγόμενη από C<sub>2</sub>-κεραμίδιο απόπτωση. Σε ανθρώπινα ηπατοκαρκινικά κύτταρα, το κεραμίδιο επάγει την έκφραση του κυκλινο-εξαρτώμενου αναστολέα των κινασών p21 με τρόπο που δεν εξαρτάται από την παρουσία του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53, μολονότι η p53 είναι μεταγραφικός ενεργοποιητής της p21 και επάγει την απόπτωσή τους (Kang et al., 1999). Υπερέκφραση της p21 σε καρκινικά κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα την προαγωγή του κυτταρικού θανάτου με απόπτωση επαγόμενη από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο (Kang et al., 1999).

### 15.1. Απόπτωση και αντι-αποπτωτικά γονίδια

Η απόπτωση είναι μία μορφή κυτταρικού θανάτου που ενεργοποιείται σε διάφορα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων και των κερατινοκυττάρων ως απόκριση σε φυσιολογικές και παθολογικές διεγέρσεις. Η απόπτωση συνδέεται με ποικίλα κυτταρικά γεγονότα, όπως η ανάπτυξη του κυττάρου, ο μηχανισμός άμυνας του



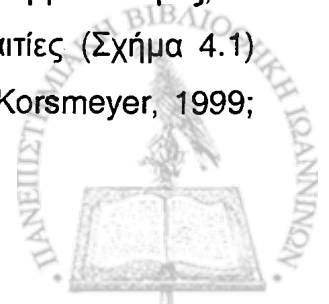
οργανισμού, και η καταστολή της ογκογένεσης (Ashkenazi and Dixit, 1998; Green and Reed, 1998; Evan and Littlewood, 1998; Reed, 1998; Reed, 1999).

Η απόπτωση, δηλαδή η προγραμματισμένη καταστροφή ενός κυττάρου, είναι μια πολύπλοκη διεργασία. Η απόφαση για θάνατο δεν μπορεί να παρθεί ελαφρά τη καρδία, και η δραστηριότητα πολλών γονιδίων επηρεάζει την πιθανότητα ενεργοποίησης από ένα κύτταρο, αυτού του προγράμματος αυτοκαταστροφής. Άπαξ και ληφθεί η απόφαση, η σωστή εκτέλεση του προγράμματος απόπτωσης απαιτεί τη συνδυασμένη ενεργοποίηση και εκτέλεση πολλαπλών υποπρογραμμάτων.

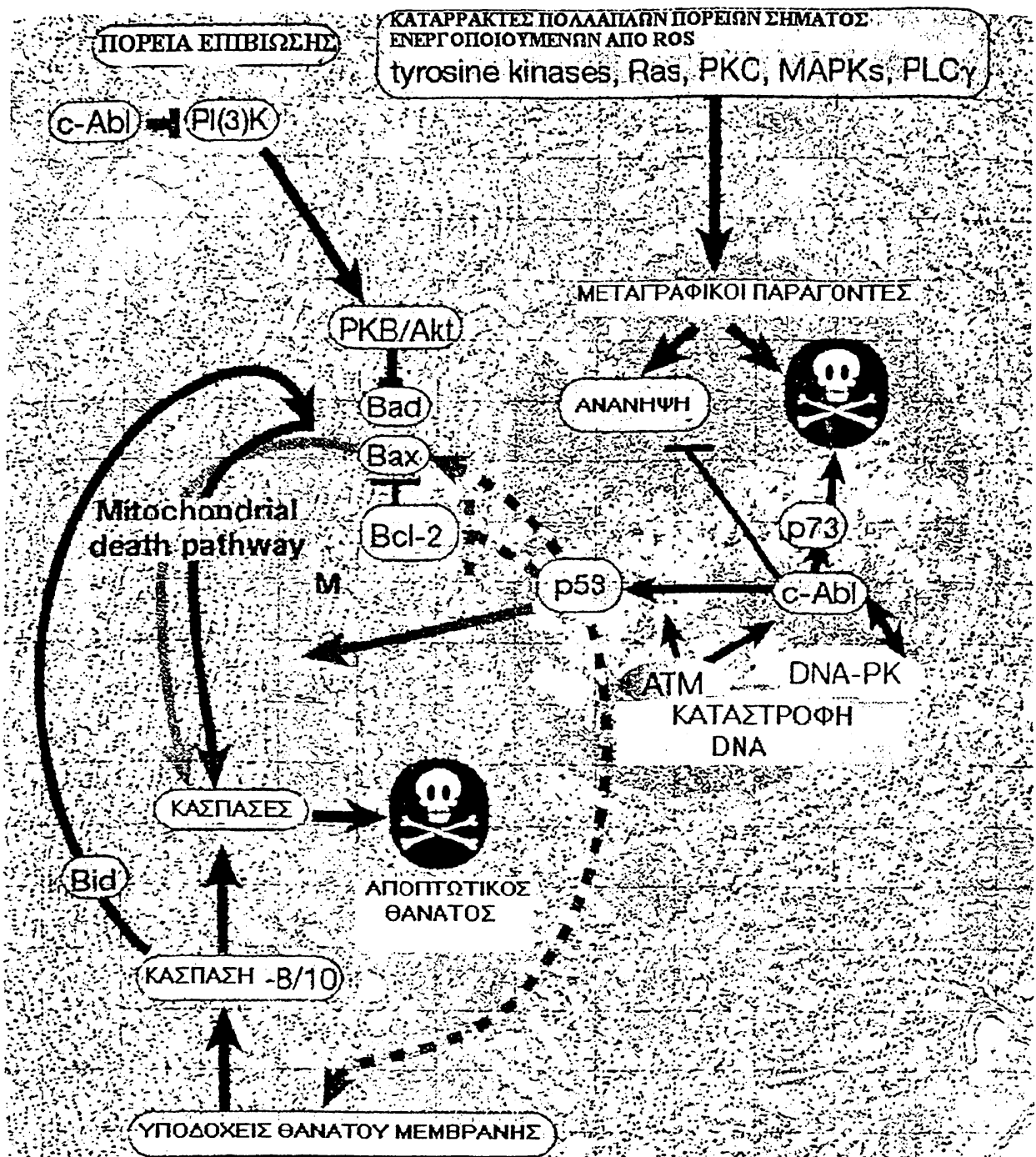
Τα πολυκύτταρα ζώα συχνά χρειάζεται να απαλλαγούν από κύτταρα που έχουν σε περίσσεια ή τους είναι εμπόδιο ή που είναι δυνητικά επικίνδυνα. Για αυτό τον σκοπό χρησιμοποιούν ένα ενεργό μοριακό πρόγραμμα, αφιερωμένο σε αυτή τη διεργασία. Ο ρυθμιζόμενος (ή προγραμματισμένος) κυτταρικός θάνατος είναι τόσο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

Τα αποπτωτικά κύτταρα έχουν ορισμένα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά όπως η συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος, πύκνωση, καταστροφή του πυρήνα, αποδιάταξη της χρωματίνης και κατακερματισμό του DNA με αποτέλεσμα το σχηματισμό αποπτωτικών σωματιδίων (Majno and Joris, 1995). Βιοχημικά, ενεργοποιούνται διαδοχικά συγκεκριμένα ένζυμα, οι κασπάσες, οι οποίες οδηγούν στην ενεργοποίηση ενδονουκλεασών που με τη σειρά τους διασπούν το DNA μεταξύ των νουκλεοσωμάτων και έτσι σχηματίζονται τμήματα του DNA μήκους κατά προσέγγιση πολλαπλών των 185 bp (Green and Kroemer, 1998; Thornberry and Lazebnik, 1998; Shi, 2002). Η απόπτωση επίσης οδηγεί στη δυσλειτουργία κυτταρικών οργανιδίων (μιτοχονδρίων, λυσοσωματίων, ενδοπλασματικού δικτύου) από τα οποία η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων είναι η πιο καλά χαρακτηρισμένη (Green and Kroemer, 1998; Green and Reed, 1998; Ferri and Kroemer, 2000).

Διάφορες αιτίες μπορούν να οδηγήσουν τα κύτταρα σε απόπτωση, όπως για παράδειγμα η ακτινοβολία-UV, το κεραμίδιο, η εναιώρησή τους σε ημιστερεή μεθυλοκυταρίνη, τα αντικαρκινικά φάρμακα, το οξειδωτικό και θερμικό στρες, οι κυττοκίνες και τα ογκογονίδια, καθώς επίσης και παθολογικές αιτίες (Σχήμα 4.1) (Green and Reed, 1998; Evan and Littlewood, 1998; Vaux and Korsmeyer, 1999; Reed, 1999; Reed, 2000).







Σχήμα 4.1. Σχηματική παρουσίαση της αποπτωτικής κυτταρικής πορείας (Hengartner, 2000). Μεταξύ των πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την αποπτωτική διαδικασία καθώς επίσης και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι τα μέλη της υπερικογένειας του Bcl-2. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το προϊόν ενός άλλου γονιδίου, η κλαστρίνη/απολιποπρωτεΐνη J (ApoJ), η οποία βρίσκεται σε σωματίδια HDL, εμπλέκεται στο μεταβολισμό των λιπιδίων και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις και επάγεται από διάφορους παράγοντες στρες, επιφέρει ανθεκτικότητα σε οξειδωτικό και θερμικό στρες, ακτινοβολία-UV, ακτίνες-Χ, κυτταροτοξικούς και χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, καθιστώντας την ApoJ ένα δυνητικά αντι-αποπτωτικό γονίδιο.



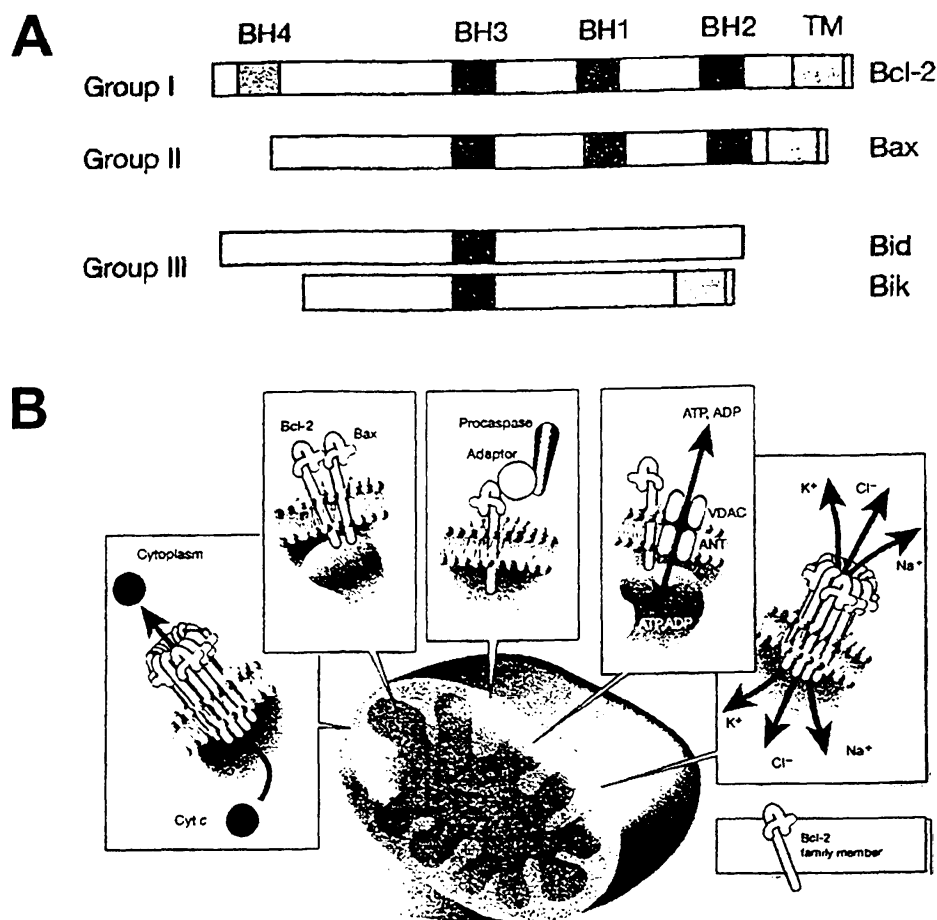
### 16.1. Η υπεροικογένεια του Bcl-2 στην απόπτωση

Η υπεροικογένεια του Bcl-2 αποτελεί μια από τις σημαντικότερες ομάδες ρυθμιστικών πρωτεϊνών της απόπτωσης, και συμπεριλαμβάνει αντι-αποπτωτικά (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> και Bcl-w) καθώς και προ-αποπτωτικά μέλη (Bax, Bad, Bak, Bid, Bcl-x<sub>s</sub>, Bim και Bik). Αυτές οι πρωτεΐνες εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική πλευρά της μιτοχονδριακής μεμβράνης, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στην πυρηνική μεμβράνη ως αποτέλεσμα της προσκόλλησης του καρβοξυ-τελικού άκρου τους. Τα μέλη της υπεροικογένειας διμερίζονται και η αναλογία των προ- προς τα αντι-αποπτωτικά μόρια καθορίζει, εν μέρει, την ευαισθησία των κυτάρων στην απόπτωση (Σχήμα 4.1) (Reed, 1998; Green and Reed, 1998; Adams and Cory, 1998; Gross et. al., 1999; Reed, 1999; Cory and Adams, 2002).

Οι ρυθμιζόμενες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών είναι θεμελιώδεις για την κατανόηση της λειτουργίας ενός δεύτερου συνόλου ρυθμιστών της απόπτωσης, της οικογένειας Bcl-2. Αυτή η οικογένεια έχει διαιρεθεί σε τρεις ομάδες, με βάση τις δομικές ομοιότητες και λειτουργικά κριτήρια. Μέλη της ομάδας I επιδεικνύουν αντι-αποπτωτική δραστικότητα, ενώ μέλη των ομάδων II και III προάγουν τον κυτταρικό θάνατο (Σχήμα 5.1A) (Hengartner, 2000; Cory and Adams, 2002).

Πώς ελέγχουν τον κυτταρικό θάνατο τα μέλη της οικογένειας Bcl-2; Όλα τα μέλη φαίνεται να σπαταλούν τον περισσότερο χρόνο τους εμποδίζοντας το ένα την επόμενη κίνηση του άλλου. Πολλά μέλη της οικογένειας μπορούν να ομοδιμεριστούν, αλλά ακόμη πιο σημαντικό είναι το ότι προαγωγικά και αντιτιθέμενα στην απόπτωση μόρια μπορεί να σχηματίσουν ετεροδιμερή (Σχήμα 5.1B) (Reed, 1999; Adams and Cory, 1998; Cory and Adams, 2002). Επειδή κάθε μέλος της οικογένειας Bcl-2 μπορεί να αλληλεπιδράσει με πολλά άλλα μέλη, είναι πιθανοί μέσα σε ένα κύτταρο πολλοί συνδυασμοί ετεροδιμερών. Σε μια πρώτη προσέγγιση μπορεί να θεωρήσουμε ότι ο ετεροδιμερισμός μπορεί απλά να λογιστεί ως αμοιβαία εξουδετέρωση των προσδεδεδμένων προαγωγών και ανταγωνιστών της απόπτωσης. Άρα το πρόβλημα καταλήγει σε σύγκριση των συνολικών επιπέδων αυτών των δύο κατηγοριών μορίων: κύτταρα με περισσότερες πρωτεΐνες-προαγωγούς του θανάτου είναι ευαίσθητα στο θάνατο. Κύτταρα με περίσσεια προστατευτικών μορίων είναι συνήθως ανθεκτικά. Επομένως ο λόγος προ : αντι-αποπτωτικών μελών της υπεροικογένειας Bcl-2 καθορίζει και την έκβαση της απόκρισης των κυτάρων σε αποπτωτικούς παράγοντες (Hengartner, 2000).





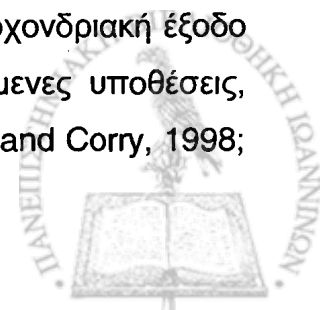
**Σχήμα 5.1.** Τα μέλη της υπερικογένειας του Bcl-2. (A) Το όνομα Bcl προέρχεται από το γονίδιο που εμπλέκεται στην ανάπτυξη του λεμφώματος των B-λεμφοκυττάρων (B-cell lymphoma; bcl). Η υπερικογένεια του Bcl-2 αποτελείται από πάνω από 12 μέλη τα οποία ταξινομούνται σε τρεις λειτουργικές ομάδες I, II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

Οι πρωτεΐνες Bcl-2 πρέπει να κάνουν κάτι περισσότερο από το να «συνομιλούν» η μια με την άλλη, αν είναι να επηρεάσουν τον κυτταρικό θάνατο. Ποιό είναι το τελικό προϊόν όλων αυτών των αλληλεπιδράσεων; Στον νηματώδη *Caenorhabditis elegans*, το αντι-αποπτωτικό μόριο και ομόλογο του Bcl-2, το *ced-9*, προστατεύει τα κύτταρα από θάνατο προσδεδεμένο άμεσα στο μόριο-προαγωγό της απόπτωσης και ομόλογο της Araf-1, το *ced-9* (Hu et al., 1998). Έτσι, το *ced-9* αποσύρει το *ced-4* από την κυκλοφορία. Παρ' όλο που αυτό είναι ένα ελκυστικό σενάριο, δεν έχει ακόμη παρατηρηθεί παρόμοια αλληλεπίδραση στα θηλαστικά, ίσως επειδή μια τέτοια παρατήρηση είναι δύσκολο, αν όχι αδύνατον, να γίνει, τουλάχιστον κάτω από τις συνθήκες που χρησιμοποιούνται (Hu et al., 1998, Hausmann et al., 2000). Αντίθετα, η κύρια λειτουργία των μελών της οικογένειας Bcl-2 φαίνεται να είναι η ρύθμιση της απελευθέρωσης προαγωγών της απόπτωσης, ιδιαίτερα του κυτοχρώματος c, από το διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων στο κυτταροδιάλυμα (Σχήμα 5.1B) (Adams and Corry, 1998; Hengartner, 2000; Corry and Adams, 2002).

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

Ο ακριβής τρόπος με τον οποίο το κυτόχρωμα c διασχίζει την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη δεν είναι γνωστός, είναι όμως ξεκάθαρο ότι η οικογένεια Bcl-2 ενέχεται άμεσα στη ρύθμιση αυτής της διεργασίας (Σχήμα 5.1B). Για παράδειγμα, η προσθήκη μορίων της οικογένειας Bcl-2 που προάγουν την απόπτωση σε απομονωμένα μιτοχόνδρια αρκεί για να επάγει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, ενώ η υπερέκφραση μορίων της ίδιας οικογένειας που προστατεύουν από την απόπτωση, παρεμποδίζει αυτή την κίνηση του κυτοχρώματος c.

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



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

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

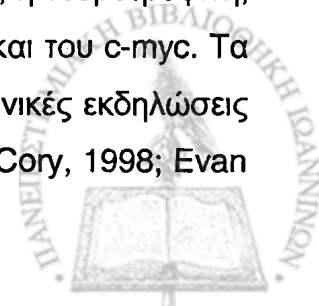
Μέλη της οικογένειας Bcl-2 επάγουν ρήξη της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Είναι πιθανόν να ελέγχουν την ομοίωση των μιτοχονδρίων (π.χ. ιοντο-ανταλλαγή, οξειδωτική φωσφορυλίωση). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, τα αποπτωτικά σήματα αλλάζουν τη φυσιολογία των μιτοχονδρίων, έτσι ώστε το οργανίδιο διογκώνεται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



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

Η έξοδος του κυτοχρώματος c από το διαμεμβρανικό χώρο είναι ένα περίπου καθολικό χαρακτηριστικό του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου. Όμως, σε ορισμένες περιπτώσεις συμβαίνει σχετικά αργά στην πορεία αυτής της διεργασίας. Για παράδειγμα, η απόπτωση που επάγεται από τους υποδοχείς κυτταρικού θανάτου συχνά παρακάμπτει τη μιτοχονδριακή πορεία (Lorenzo et al., 1999). Όπως μπορεί να αναμένεται, από τα μοντέλα που συζητήθηκαν πιο πάνω, τέτοιου είδους θάνατοι είναι σχετικά ανεπηρέαστοι από την προστασία μέσω των πρωτεϊνών Bcl-2, και η απελευθέρωση κυτοχρώματος c στο κυτταροδιάλυμα είναι μάλλον το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των κασπασών, παρά το αίτιό τους (Σχήμα 5.1B) (Lorenzo et al., 1999; Hengartner, 2000; Corry and Adams, 2002).

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



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

Πιο ειδικά στα κύτταρα της επιδερμίδας, η οποία είναι και ο πλέον εκτεθειμένος ιστός σε οξειδωτικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως είναι η ακτινοβολία, διάφορες μολύνσεις και χημικά, η απόπτωση παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση των κατεστραμμένων κυττάρων. Η έκφραση του Bcl-2, σε αυτές τις περιπτώσεις, ελαττώνεται κατά τη διαδικασία της κυτταρικής διαφοροποίησης στην επιδερμίδα, επιτρέποντας έτσι τη διεξαγωγή της απόπτωσης.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η αποπτωτική δράση του κεραμιδίου οφείλεται στην άμεση ενεργοποίηση της πορείας MEKK/JNKK/JNK. Η αντι-αποπτωτική δράση του Bcl-2 στο κεραμίδιο ερευνήθηκε αρχικά σε καρκινικά κύτταρα και φαίνεται να έχει άμεση σχέση με την απενεργοποίηση της JNK1 πρωτεΐνης (Herrmann et al., 1997). Πάντως πέρα από αυτό, το Bcl-2 πιθανά έχει γενικά την ικανότητα να ρυθμίζει ποικίλα κυτταρικά στρες που ενεργοποιούν την υδρόλυση της σφιγγομυελίνης και το σχηματισμό του κεραμιδίου (Geilen et al., 1997). Μελέτες έχουν δείξει ότι το Bcl-2 αναστέλλει την αποπτωτική διαδικασία που επάγεται από διαφορετικά κυτταρικά ερεθίσματα επηρεάζοντας κυτταρικούς στόχους μετά τη συσσώρευση του κεραμιδίου. Σε αντίθεση το Bcl-x<sub>L</sub> επηρεάζει κυτταρικούς στόχους πριν τη συσσώρευση του κεραμιδίου, όπως η ενεργοποίηση της κασπάσης-8 μετά την έκθεση των κυττάρων στον TNFα αναστέλλοντας την απόπτωση των κυττάρων (EL-Asaad et al., 1998).

### **17.1. Κλαστρίνη/Απολιποπρωτεΐνη J (ApoJ): Ένα δυνητικά αντι-αποπτωτικό γονίδιο**

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

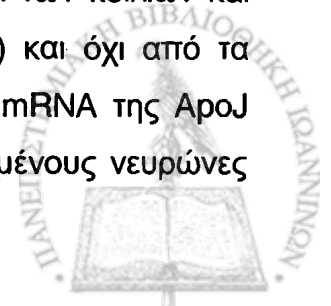


Ένας αριθμός φυσιολογικών λειτουργιών έχει αποδοθεί στην κλαστρίνη/απολιποπρωτεΐνη J (ApoJ) λόγω της κατανομής της και των ιδιοτήτων της. Η ApoJ φαίνεται να εμπλέκεται σε μια σειρά φυσιολογικών λειτουργιών όπως: στη ρύθμιση του συμπληρώματος, στην ωρίμανση του σπέρματος, στην ενδοκρινή έκκριση, στην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

Η κλαστρίνη/απολιποπρωτεΐνη J (ApoJ) βρίσκεται συνδεδεμένη με την απολιποπρωτεΐνη A-1 και κυκλοφορεί ως μέρος της HDL ή VLDL και το σύμπλοκο ειδικά συσχετίζεται με την παροξονάση (paroxonase), μια 44 kDa εστεράση του ορού. Επομένως μια ιδιότητα που έχει αποδοθεί στην ApoJ είναι η μεταφορά των λιπιδίων από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ. Ο μόνος υποδοχέας που γνωρίζουμε για την ApoJ είναι ο gp330 που έχει μεγάλη συγγένεια με αυτή (Jenne and Tschopp, 1992; Rosenberg and Silkensen, 1995; Jones and Jomary, 2002). Η εύρεση φυσιολογικών συγκεντρώσεων της ApoJ σε ασθένειες με ανεπάρκεια Apo A1, Apo A11 και HDL (σύνδρομο Tangier) υποδηλώνει πως η Apo A1 δεν είναι απαραίτητη για την κυκλοφορία στον ορό της ApoJ (Choi-Miura et al., 1993). Οι συγκεντρώσεις της ApoJ στον ορό έχουν ορισθεί να είναι μεταξύ 50 και 340 mg/ml (Rosenberg and Silkensen, 1995).

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

Η ApoJ συντίθεται στα μεγακαρυοκύτταρα και αυτό εξηγεί την αφθονία της στα αιμοπετάλια ( $2,5 \text{ mg}/10^9$  αιμοπεταλίων) (Tschopp et al., 1993). Η ApoJ είναι παρούσα κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα των όρχεων, της επιδιδυμίδας, του ήπατος, του στομάχου και του εγκεφάλου (Aronow et al., 1993), όμως δεν εκφράζεται από όλα τα κύτταρα σε ένα δεδομένο όργανο. Στον καρδιακό μύ το mRNA της ApoJ ανιχνεύεται στα μυοκύτταρα των κόλπων και όχι των κοιλιών και στο στόμαχο συντίθεται από τα κύρια ή θεμέλια κύτταρα (chief) και όχι από τα καλυπτήρια ή τοιχωματικά (parietal) κύτταρα. Στον εγκέφαλο το mRNA της ApoJ ανιχνεύεται στα αστροκύτταρα, με πολύ ειδική κατανομή σε ορισμένους νευρώνες



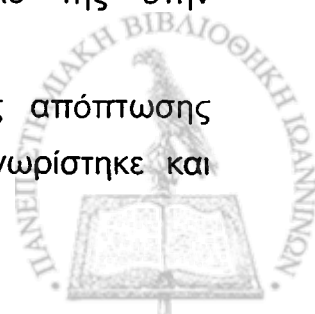


(Danik et al., 1993; Pasinetti et al., 1994). Σε πολλά όργανα η AroJ εκφράζεται στις επιφάνειες ιστών-υγρών, υποδηλώνοντας τον πιθανό προστατευτικό της ρόλο στις κυτταρικές μεμβράνες από τη δράση του γαστρικού υγρού, της χολής, των ούρων και του παγκρεατικού υγρού (Aronow et al., 1993). Στους επίμυς το mRNA της AroJ ανιχνεύεται στα κύτταρα του φθαρού υμένα της μήτρας 7,5 ημέρες μετά την έναρξη της εγκυμοσύνης και στα επιθηλιακά κύτταρα του λεκιθικού σάκου του ώριμου πλακούντα (Aronow et al., 1993). Επιπλέον η AroJ ανευρίσκεται σε μυοκύτταρα των κόλπων και των κοιλιών, στην καρδιά του εμβρύου μύς, όμως μόνο στα μυοκύτταρα των κόλπων στην καρδιά ενήλικα μύς. Στους νεφρούς η AroJ ανιχνεύτηκε στα επιθηλιακά κύτταρα του ουρητήρα, αλλά όχι στα μεσεγγυματικά (French et al., 1993), όπως και στα νεοσχηματιζόμενα ουροφόρα σωληνάρια, εν αντιθέσει με τα νεφρικά σπειράματα, όπου δεν ανευρέθηκε ποτέ.

Στον ενήλικα μυ η έκφραση της AroJ στα ουροφόρα σωληνάρια είναι ισχνή εν αντιθέσει με την υπερέκφρασή της στα ουροφόρα σωληνάρια των νεογέννητων. Στον αναπτυσσόμενο εμβρυικό πνεύμονα μύς η AroJ ανιχνεύεται στο βρογχικό δέντρο, ενώ δεν ανευρίσκεται στον πνεύμονα ενηλίκου μύς.

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

Η σύνδεση έκφρασης ή υπερέκφρασης της AroJ και της απόπτωσης επιτεύχθηκε για πρώτη φορά όταν ο παράγοντας TRPM-2 αναγνωρίστηκε και

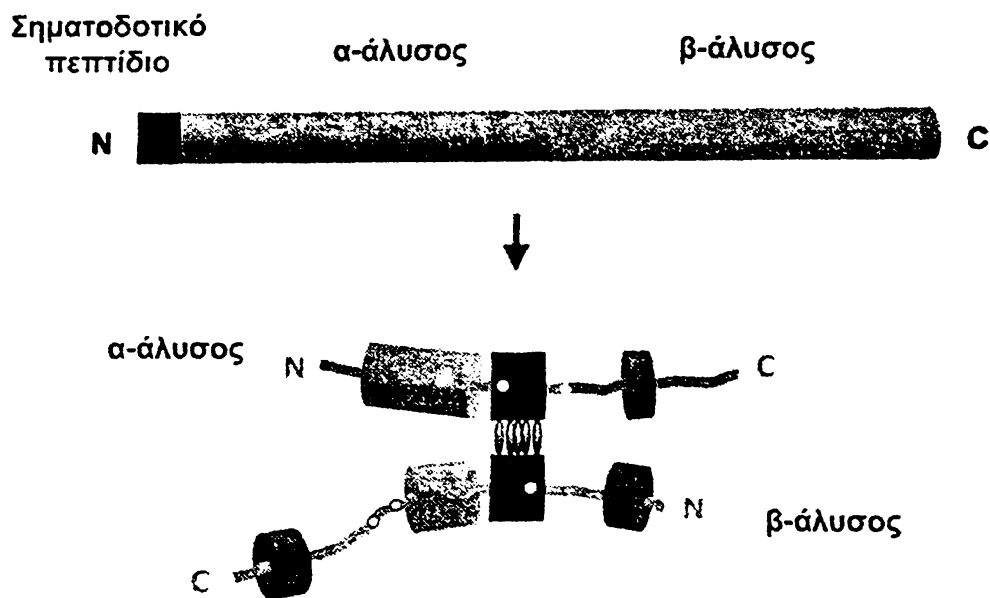


κλωνοποιήθηκε ως ο κύριος παράγοντας που υπερεκφράστηκε κατά τη διάρκεια της παλινδρόμησης του προστάτη επίμυος μετά τον ευνουχισμό. Από τότε η ApoJ συνδέθηκε και με άλλους ιστούς που υφίστανται απόπτωση (Jenne and Tschopp, 1992). Ένα βασικό χαρακτηριστικό της ApoJ είναι η επαγωγή της σε παθολογικές καταστάσεις, όπως στη σπειραματονεφρίτιδα, στην πολυκυστική νόσο των νεφρών και στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Alzheimer). Η έκφραση της απολιποπρωτεΐνης σε ποικίλες παθήσεις, όπως η αθηρωμάτωση (ικανότητα δέσμευσης λιπιδίων), τα μυοκαρδιακά έμφρακτα (υπερέκφραση στα κατεστραμμένα μυϊκά κύτταρα του εμφραγματικού μυοκαρδίου και απουσία στα υγιή), οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Scrapie, Alzheimer), όπου ανευρίσκεται στους δυστροφικούς νευρώνες, στις αμυλοειδείς πλάκες, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στα ενεργά αστροκύτταρα, ο καρκίνος (υπερέκφραση σε ποικίλο αριθμό καρκινικών κυτταρικών σειρών, σε αδενοκαρκινώματα του μαστού και της μήτρας σε νεφρικούς όγκους και σε γλοιώματα, νευροβλαστώματα), η νεφρική νόσος (σπειραματονεφρίτιδα, κυστική νόσος, χρόνια ενδιάμεση νεφρίτιδα) αποτελεί ένα αίνιγμα για τους ερευνητές.

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

Η προ-πρωτεΐνη ωριμάζει με περιορισμένη πρωτεόλυση σχηματίζοντας μια ετεροδιμερή γλυκοπρωτεΐνη 80 kDa που αποτελείται από δύο αλυσίδες, α και β, μοριακού βάρους 36-40kDa η καθεμία, συνδεδεμένες μεταξύ τους με 5 δισουλφιδικούς δεσμούς (Σχήμα 6.1) (Jenne and Tschopp, 1992; Rosenberg and Silkensen, 1995; Wilson and Easterbrook-Smith, 2000; Jones and Jomary, 2002; Trougakos and Gonos, 2003). Σε ανθρώπινα κύτταρα υπάρχουν πολλαπλές μορφές της ApoJ (Trougakos and Gonos, 2003): Η ετεροδιμερής εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη 80 kDa, η ενδοκυττάρια μορφή 60 kDa (λιγότερο γλυκοζυλιωμένη μορφή) (Petrovoulou et al., 2001) και μια πυρηνική μορφή 45-50 kDa που φαίνεται ότι προσδένει στην K470/K480 DNA δεσμευτική υπομονάδα επιδιορθωτικής πρωτεΐνης





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

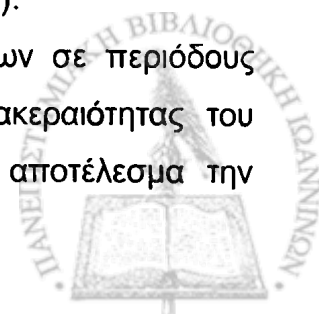
(Yang et al., 2000). Περαιτέρω ανάλυση του ανθρώπινου γονιδίου έδειξε ότι η πρωτεΐνη περιέχει τέσσερις αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localisation signals η nls) κατάρρους του σηματοδοτικού πεπτιδίου που εντοπίζεται μεταξύ δύο θέσεων έναρξης ATG (Yang et al., 2000). Η επαγωγή της έκφρασης της AroJ από το δεύτερο ATG μετά από ιονίζουσα ακτινοβολία οδηγεί στην ενεργοποίησή της και τον εντοπισμό της πρωτεΐνης στον πυρήνα των κυττάρων.

Η ρύθμιση της έκφρασης της απολιποπρωτεΐνης J από κυτταρικούς αυξητικούς παράγοντες έχει επίσης μελετηθεί. Ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας β (TGFβ) που επενεργεί σε μεγάλο αριθμό διαφορετικών ειδών κυττάρων ρυθμίζοντας τον πολλαπλασιασμό τους, τη διαφοροποίησή τους και την απόπτωση καταστέλλει την έκφρασή του mRNA της AroJ σε κύτταρα λείων μυικών ινών χοίρου (Thomas-Salgar and Millis, 1994). Πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν επίσης ότι ο TGFβ είτε επάγει, είτε αναστέλλει την AroJ σε αστροκύτταρα αρουραίου, κάτι που εξαρτάται από το σύνολο του κυτταρικού τύπου των καλλιεργούμενων κυττάρων (Morgan et al., 1995). Όταν τα αστροκύτταρα συγκαλλιεργούνται παρουσία ολιγοδενδριτικών και μικρογλοιακών κυττάρων, αυξάνουν τις συγκεντρώσεις mRNA της AroJ ως απόκριση στον TGFβ. Όταν τα αστροκύτταρα καλλιεργούνται μόνα τους, τότε η παρουσία του TGFβ καταστέλλει την έκφραση της AroJ.

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

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

Παρομοίως η διατήρηση των κυτταρικών αλληλοαποκρίσεων σε περιόδους ασθενειών είναι βασική προϋπόθεση για τη διατήρηση της ακεραιότητας του οργάνου. Η επαγωγή της AroJ μετά από οστική βλάβη με αποτέλεσμα την



επαύξηση των κυτταρικών αλληλοαποκρίσεων θα μπορούσε θεωρητικά να είναι προς όφελος ιστών που υπόκεινται παθοφυσιολογικές μεταβολές (απόπτωση των κυττάρων του προστάτη αδένου επαγομένη από ευνουχισμό ή έμφρακτο μυοκαρδίου) με την πρόληψη των διαταραχών που επέρχονται στην αρχιτεκτονική των προσβεβλημένων ιστών.

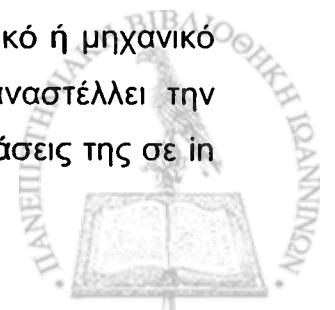
Είναι λοιπόν φανερό ότι ο ρόλος της AroJ στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση κυττάρων δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί, αλλά φαίνεται ότι εξαρτάται από τη μορφή της, τον κυτταρικό τύπο και το είδος του παράγοντα στρες.

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

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

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

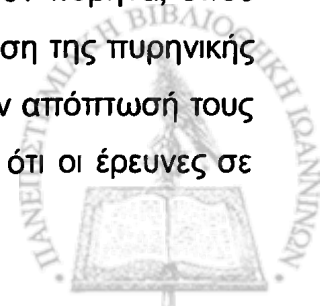
Είναι αδιευκρίνιστο εάν η AroJ εμπλέκεται άμεσα στη διαδικασία της απόπτωσης ή η εισαγωγή της είναι δευτερεύουσα στη διαδικασία της απόπτωσης και έμμεση ως προστατευτικός και αμυντικός μηχανισμός του κυττάρου. Επομένως ο ρόλος της AroJ στον ενεργό κυτταρικό θάνατο είναι ακόμα διφορούμενος. Προσφάτως έχουν διατυπωθεί επιχειρήματα τα οποία προτείνουν την κλαστρίνη (AroJ) ως μια μορφή της εκκρινόμενης πρωτεΐνης του θερμικού στρες, ή συνοδού μορίου, εν όψει της επαγομένης της έκφρασης από θερμικό, οξειδωτικό ή μηχανικό στρες, την ποικιλία των προσδετών της, την ικανότητά της να αναστέλλει την επαγομένη από στρες καθίζηση πρωτεϊνών, και τις αναφερόμενες δράσεις της σε in



νίνο συστήματα ως προστατευτικού μορίου κατά κυτταροτοξικών παραγόντων. Στα πλαίσια του ενεργού κυτταρικού θανάτου, αυτά τα τεκμήρια δεν συνηγορούν υπέρ του ρόλου της AroJ ως προαποπτωτικού μορίου, που ενισχύονται περαιτέρω από την αποτυχία της στοχευόμενης υπερέκφρασης του γονιδίου να προκαλέσει αυξημένο ποσοστό θανάτου κυττάρων φωτούποδοχέων σε ένα διαγονιδιακό πρότυπο (Jomary et al., 1999).

Η υπερέκφραση της εκκρινόμενης μορφής της AroJ σε ανθρώπινα κύτταρα παρείχε αμφίβολα αποτελέσματα (Viard et al., 1999; Dumont et al., 2000; Petropoulou et al., 2001; Dumont et al., 2002). Η χορήγηση ή υπερέκφραση της εκκρινόμενης κλαστρίνης σε ανθρώπινα ανδρογονοεξαρτώμενα προστατικά καρκινικά κύτταρα LNCaP επέφερε ανθεκτικότητα στην επαγομένη απόπτωση από τον TNF $\alpha$  (Sensibar et al., 1995; Sintich et al., 1999) και τα κατέστησε μη ανδρογονοεξαρτώμενα *in vivo* (Miyake et al., 2000a,b). Σε καρκινικά επιδερμικά κύτταρα A341 η AroJ δεν μετέβαλε τις αποκρίσεις των κυττάρων σε θερμικό και οξειδωτικό στρες, όμως η εισαγωγή του γονιδίου σε αντινοσηματική κατεύθυνση ευαισθητοποίησε τα κύτταρα στους δύο προαναφερόμενους παράγοντες στρες και οδήγησε στην απόπτωσή τους (Viard et al., 1999). Η υπερέκφραση της εκκρινόμενης AroJ επέφερε ανθεκτικότητα σε αιθανόλη και τερτ-βουτυλυδροπεροξειδίο, αλλά όχι σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (Petropoulou et al., 2001; Dumont et al., 2002). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν επίσης ότι η εκκρινόμενη AroJ μειώνει το ρυθμό πολλαπλασιασμού προστατικών επιθηλιακών κυττάρων αθανατοποιημένων με SV40 (Bettuzi et al., 2002). Με τεχνικές ανοσοφθορισμού σε κύτταρα MCF-7 καλλιεργούμενων με βιταμίνη D<sub>3</sub>, η χορήγηση της οποίας επιφέρει απόπτωση, αποδείχθηκε η αντι-αποπτωτική δράση της AroJ στην επαγομένη απόπτωση των κυττάρων MCF-7 από τη βιταμίνη D<sub>3</sub> (Wilson et al., 1995). Είναι λοιπόν φανερό ότι ο ρόλος της κλαστρίνης/απολιποπρωτεΐνηςJ στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση κυττάρων δεν έχει ακόμη διευκρινισθεί, αλλά φαίνεται ότι εξαρτάται από τη μορφή της, τον κυτταρικό τύπο και το είδος του στρες.

Όμως δεν είναι όλες οι μορφές της AroJ που επιδεικνύουν αυτές τις αντι-αποπτωτικές ιδιότητες. Πρόσφατα, μια πυρηνική μορφή 55 kDa της AroJ, επαγομένη από ακτινοβολία *in vitro* έχει ανευρεθεί να στοχεύει στον πυρήνα, όπου φαίνεται να δρά ως σήμα θανάτου (Yang et al., 2000). Υπερέκφραση της πυρηνικής μορφής της σε αδενοκαρκινικά κύτταρα μαστών MCF -7 επάγει την απόπτωσή τους (Yang et al., 1999, Yang et al., 2000). Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι οι έρευνες σε



επίμυς, όπου το γονίδιο της ApoJ εκμηδενίστηκε (Knockout) (Clu1) έχουν καταδείξει τις δύο όψεις των δράσεων της κλαστρίνης. Συγκεκριμένα, από την μια πλευρά η απουσία της μειώνει το ποσοστό νεκρών κυττάρων σε εγκεφαλική βλάβη που επάγεται από υποξεία ισχαιμία, γεγονός που υποδηλώνει ότι το μόριο λειτουργεί φυσιολογικά για να επιτείνει τη βλάβη νευρώνων υπό τέτοιες συνθήκες (Han et al., 2001). Από την άλλη, στα ίδια πειραματόζωα με εκμηδενισμένο το γονίδιο, η αυτοάνοση βλάβη στο μυοκάρδιο αυξάνεται, υποδηλώνοντας ένα φυσιολογικά προστατευτικό ρόλο (McLaughlin et al., 2000).

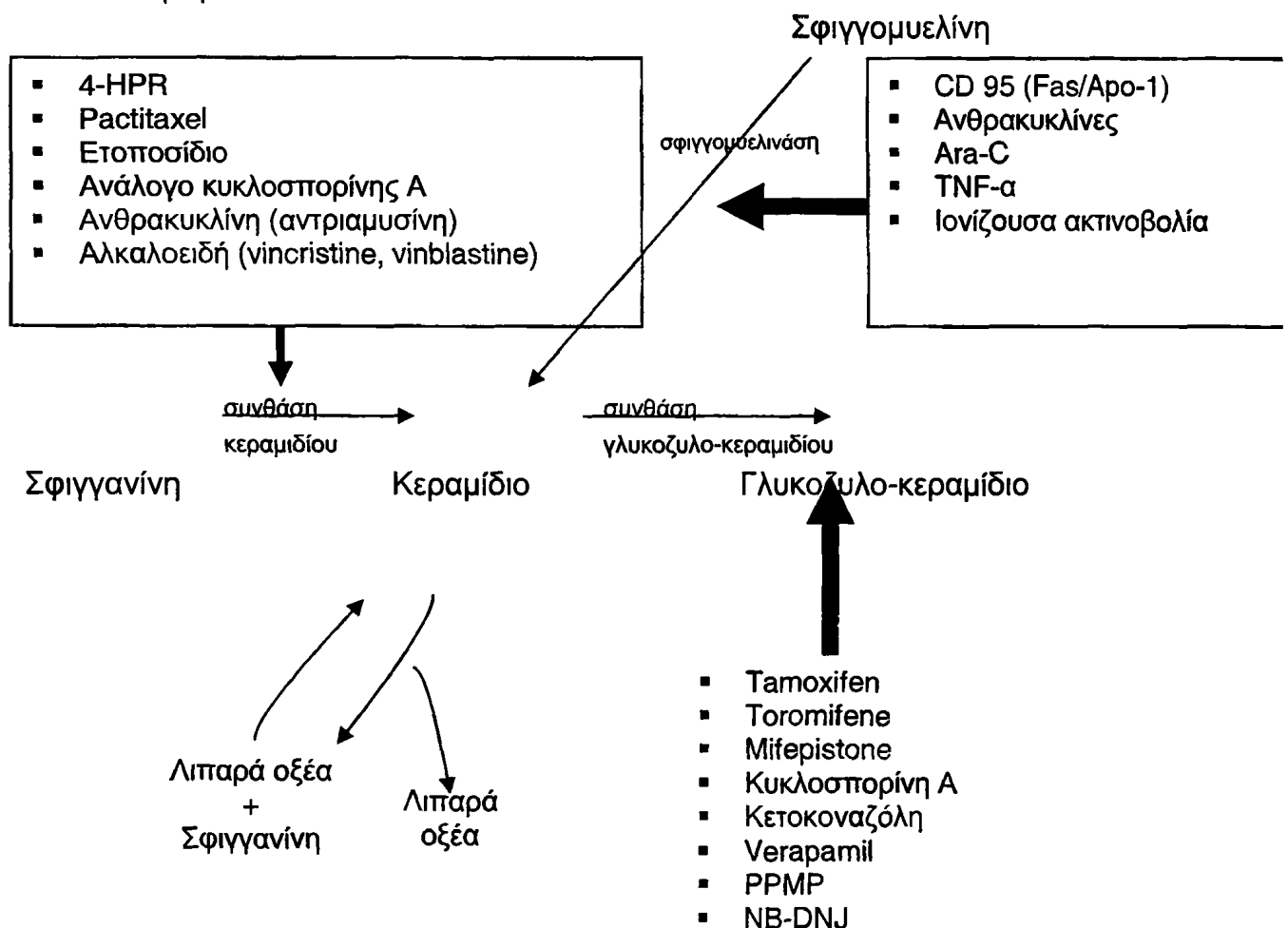
Είναι πιθανόν, κατόπιν όλων αυτών ότι όπως συμβαίνει και με ορισμένα αλλά επίλεκτα μόρια, όπως η p53, η Bcl-x<sub>L</sub>, η ApoJ να μπορεί να δρά είτε ως προαγωγέας, είτε ως αναστολέας του κυτταρικού θανάτου, ανάλογα με το είδος του κυττάρου ή τις συγκεκριμένες μοριακές οντότητες.



## ΕΝΟΤΗΤΑ III: ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΚΑΙ ΚΕΡΑΜΙΔΙΟ

### 18.1. Κεραμίδιο και απόκριση σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες

Ένας μεγάλος αριθμός κυτταροτοξικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται κλινικά φαίνεται να είναι αποτελεσματικός λόγω της ικανότητάς τους να ενεργοποιούν αποπτωτικές πορείες επαγόμενες από το κεραμίδιο σε καρκινικά κύτταρα. Διάφορες φαρμακευτικές ουσίες επηρεάζουν το μεταβολισμό του κεραμιδίου επάγοντας την απονο σύνθεσή του, με την ενεργοποίηση της σφιγγομυελινάσης και με/ή την αναστολή σχηματισμού γλυκοζυλο-κεραμιδίου (Σχήμα 7.1). Σε κάθε περίπτωση το αποτέλεσμα είναι η επιταχυνόμενη και επαυξημένη κυτταρική απόκριση ελεγχόμενη από το κεραμίδιο.



4-HPR=N-(4-hydroxyphenyl) retinamide

Ara-C=1-β-D-arabinofurasyI cytosine

TNF-α=παραγόντας νέκρωσης όγκου α

PPMP=1-phenyl-2-hexadecanoylamine-3-pyrrolidino-1-propanol

NB-DNJ=N-butyldeoxynojirimycin

Σχήμα 7.1. Κεραμίδιο και απόκριση σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες





Σε κύτταρα Jurkat E6.1, κύτταρα λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, χορήγηση ανθρακυκλινών αυξάνει τη συγκέντρωση κεραμιδίου διεγείροντας τη συνθετάση του κεραμιδίου (Jattrezou et al., 1996). Παρομοίως χορήγηση δοξορουβικίνης (ανθρακυκλίνη) αυξάνει τη συγκέντρωση κεραμιδίου σε κύτταρα MCF-7, ενώ η χορήγηση βινκριστίνης σε λευχαιμικά κύτταρα ALL-697 επάγει απόπτωση με σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων κεραμιδίου (Zhang et al., 1996). Χορήγηση 1,5 nM βινμπλαστίνης (Vinblastine) σε κύτταρα προκαλεί σημαντική άνοδο των επιπέδων κεραμιδίου και κυτταρικό θάνατο σε κύτταρα επιδερμικού καρκινώματος KB-3-1. Χορήγηση Paclitaxel συνδέεται με τη de novo σύνθεση κεραμιδίου σε MCF-7 αδενοκαρκινικά κύτταρα μαστού και τον αποπτωτικό θάνατό τους, ενώ σε Jurkat T κύτταρα αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τους και επάγει την απόπτωσή τους μόνο όταν χορηγηθεί εξωγενώς κεραμίδιο (Myrick et al., 1999; Mehta et al., 2000). Χορήγηση ταμοξιφένη (tamoxifen) παρεμποδίζει τη μετατροπή του κεραμιδίου σε γλυκοσυλο-κεραμίδιο αυξάνοντας έτσι τη συγκέντρωση του ενδοκυττάριου κεραμιδίου από 35% έως 1100%, αναλόγως της κυτταρικής σειράς (Lucci et al., 1999). Το συνθετικό ρετινοειδές 4-HRP προκαλεί απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα προστάτη LNCaP με την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης κεραμιδίου, όπως και σε υψηλής ανθεκτικότητας φάρμακα κυτταρικών σειρών νευροβλαστώματος, όπως και λευχαιμικών κυττάρων (Maurer et al., 1999). Το ετοποσίδιο (αναστολέας της τοποϊσομεράσης II) αυξάνει τα κυτταρικά επίπεδα κεραμιδίου de novo μέσω ενεργοποίησης της παλμιτομεταφοράσης της σερίνης, ενώ σε λευχαιμικά T-λεμφοκύτταρα Molt-4 προκαλεί απόπτωση μέσω της ενεργοποίησης των σφιγγομυελινασών και της παραγωγής κεραμιδίου (Senchenkov et al., 2001). Η 1,25-διϋδροξυ-βιταμίνη D<sub>3</sub> διεγείρει την υδρόλυση της σφιγγομυελίνης σε λευχαιμικά κύτταρα και σε καρκινοκύτταρα, όπως επίσης αναστέλλει την ανάπτυξη κυττάρων αδενοκαρκινώματος προστάτη (Geilen et al., 1996, Mengubas et al., 1999). Χορήγηση Ara-C σε κύτταρα HL-60 προκαλεί την αύξηση της συγκέντρωσης κεραμιδίου λόγω της ενεργοποίησης της σφιγγομυελινάσης. Χορήγηση Ara-C σε λευχαιμικά B-λεμφοκύτταρα και σε καρκινικά κύτταρα ωθηκών SKOV-3 οδήγησε σε άνοδο των επιπέδων κεραμιδίου έως και 6 φορές και στον αποπτωτικό θάνατό τους (Mengubas et al., 1999). Κατωτέρω παρατίθενται όλες οι φαρμακευτικές ουσίες που προάγουν την παραγωγή κεραμιδίου (Πίνακας 1.1).

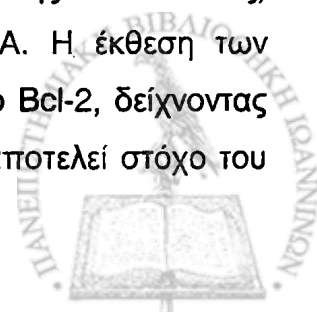


**Πίνακας 1.1. Τοξικοί παράγοντες που οδηγούν στην ενδοκυττάρια συσσώρευση κεραμιδίου και στην κυτταρική απόπτωση**

Τοξικός Παράγοντας	Κυτταρικό σύστημα
Δανουροβικίνη (Daunorubicin)	Jurkat E6 1, HL-60, U-937 P388 λευχαιμικά κύτταρα
Αδριαμυκίνη, Δοξουροβικίνη (Doxorubicin, Adriamycin)	MCF-7 καρκινικά κύτταρα μαστού
Βινκριστίνη (Vincristine)	ALL-697 λευχαιμικά κύτταρα
Βινμπλαστίνη (Vinblastine)	KB-3-1, επιδερμοειδές καρκίνωμα
Ετοποσίδιο (Etoposide)	Jurkat, λευχαιμικά κύτταρα
Ταμοξιφένη (Tamoxifen)	MCF-7 καρκινικά κύτταρα μαστού
1,25-(OH) <sub>2</sub> Βιταμίνη D <sub>3</sub>	HL-60, HaCaT, κερατινοκύτταρα
4-HPR	CHLA-90, SMS-LHN, νευροβλάστωμα, HL-60
Σουραμίνη (Suramin)	MCF-7, DU-145, PC-3 προστατικά κύτταρα
Ara-C	HL-60
Paclitaxel	MCF-7, MDA-MB-468 καρκινικά κύτταρα μαστού
Ιονίζουσα ακτινοβολία	BL30A (αρτηριακά ενδοθηλιακά κύτταρα λεμφώματος Burkitt's)

Από: Senchenkov, et al., 2001; Radin, 2003

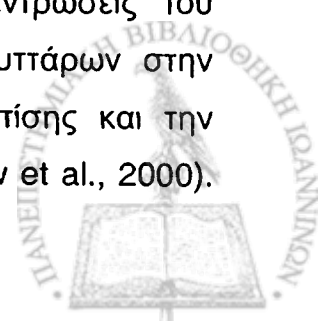
Παράλληλα με το σημαντικό ρόλο του κεραμιδίου ως μορίου που εμπλέκεται σε κυτταρικά σήματα θανάτου ως απόκριση σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Radin, 2003), μπορεί να έχει ουσιαστικό ρόλο και στον επαγόμενο από ακτινοβολία κυτταρικό θάνατο. Η έκθεση αορτικών ενδοθηλιακών κυττάρων βοοειδούς σε ιονίζουσα ακτινοβολία επήγαγε την απόπτωσή τους λόγω συσσώρευσης του κεραμιδίου ως αποτέλεσμα της υδρόλυσης της σφιγγομυελίνης από την ουδέτερη σφιγγομυελινάση (Haimovitz-Friedman et al., 1994). Επιπρόσθετες μελέτες σε κύτταρα HL-60 και U-937 έδειξαν ότι η επαγόμενη από την ακτινοβολία θραυσματοποίηση του DNA (συνέπεια ενεργούς αποπτωτικής διαδικασίας) συνοδεύονταν από τη μείωση της έκφρασης του Bcl-2 mRNA. Η έκθεση των παραπάνω κυττάρων στο κεραμίδιο είχε το ίδιο αποτέλεσμα στο Bcl-2, δείχνοντας ότι η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου του Bcl-2 μπορεί να αποτελεί στόχο του



κεραμιδίου στην επαγόμενη από αυτό απόπτωση μετά από έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία (Martin et al., 1995). Η κυτταρική ανθεκτικότητα σε ιονίζουσα ακτινοβολία μπορεί επίσης να συσχετιστεί με εξασθένηση των λειτουργιών σύνθεσης του κεραμιδίου ή ελαττωματικής πορείας παραγωγής κεραμιδίων (Senchenkov et al., 2001).

### **19.1. Μεταβολισμός του κεραμιδίου και πολλαπλή ανθεκτικότητα σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες**

Τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν πολλαπλούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας έναντι χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Η δυσλειτουργία του μεταβολισμού του κεραμιδίου είναι ένας από τους έμφυτους ή αποκτώμενους μηχανισμούς που συνδράμουν στην κυτταρική ανθεκτικότητα στα χημειοθεραπευτικά. Μελέτες που αφορούν τις ενδοκυτταρικές πορείες μεταγωγής σώματος που ενεργοποιούνται από το κεραμίδιο και τους μεταβολίτες του αποδεικνύουν ότι οι μεταβολές αυτών των πορειών μπορεί να συμβάλουν στην ανθεκτικότητα ορισμένων μορφών καρκινικών κυττάρων, όπως των κυττάρων του μαστού, του προστάτη και του δέρματος έναντι συγκεκριμένων χημειοθεραπευτικών. Ισχυρά στοιχεία δείχνουν πως η γλυκοζυλίωση του κεραμιδίου από τη συνθάση του γλυκοζυλο-κεραμιδίου (GCS) και η σύνθεση του μη-τοξικού μεταβολίτη γλυκοζυλο-κεραμιδίου, απαντάται σε ορισμένες πολυανθεκτικές στα φάρμακα κυτταρικές σειρές, αποτελώντας μια εναλλακτική πορεία παράκαμψης της αποπτωτικής πορείας (Lucci et al., 1998; Senchenkov et al., 2001). Καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7, ανθεκτικά στη χημειοθεραπεία, χαρακτηρίζονται από την ανικανότητα της σφιγγομυελινάσης να συνθέσει κεραμίδιο. Η χρήση κυττάρων ραβδομυοσάρκωματος έδειξε πως η επαγόμενη απόπτωση από τον TNFα έχει ως προάγγελο την ενδοκυττάρια αύξηση της συγκέντρωσης του κεραμιδίου και την αναστολή δράσης δύο ενζύμων της GCS και της συνθετάσης της σφιγγομυελίνης (Bourteele et al., 1998). Επιπροσθέτως, η κεραμιδάση που καταλύει τη διάσπαση του κεραμιδίου υπερεκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη. Η υπερέκφραση της κεραμιδάσης προστατεύει τα κύτταρα από τον επαγόμενο μέσω TNFα θάνατο, ενώ φαρμακολογικός αποκλεισμός της κεραμιδάσης από την N-ελαίλο-αιθανολαμίνη (N-oleoylethanolamine) επαναφέρει τις συγκεντρώσεις του κεραμιδίου σε προστατευτικά επίπεδα και την ευαισθησία των κυττάρων στην απόπτωση που επάγεται από κυτοκίνες και τον TNFα καθώς επίσης και την χημειοευαισθησία τους έναντι διαφόρων χημειοθεραπευτικών (Strelow et al., 2000).

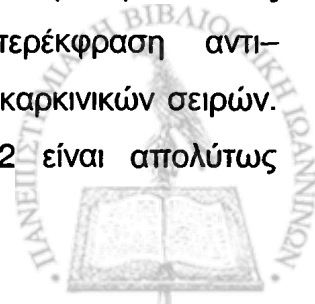


Ανθεκτικά καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7-AdrR και καρκινικά κύτταρα επιδερμίδας KB-V-1 έχουν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις γλυκοζυλο-κεραμιδίου από τις αντίστοιχες χημειοευαίσθητες κυτταρικές σειρές MCF-7 και KB-3-1. Επίσης κύτταρα αδenoκαρκινώματος ωοθήκης OVCAR-3 ανθεκτικά στη δοξορουβικίνη και cis-platin έχουν υψηλά επίπεδα γλυκοζυλο-κεραμιδίου. Ανάλυση όγκων από περιστατικά καρκίνου που απέτυχαν να ανταποκριθούν στη χημειοθεραπεία έδειξε πως όλα τα καρκινικά κύτταρα είχαν υψηλές συγκεντρώσεις γλυκοζυλο-κεραμιδίου (Lucci et al., 1998; Makin and Dive, 2001).

Η διαμόλυνση ευαίσθητων στη χημειοθεραπεία καρκινικών κυττάρων MCF-7 με το γονίδιο της συνθετάσης του γλυκοζυλο-κεραμιδίου (κύτταρα MCF-7/GCS) έδειξε πως είχαν 11 φορές υψηλότερη συγκέντρωση γλυκοζυλο-κεραμιδίου και ήταν ανθεκτικά στη δοξορουβικίνη και στη χορήγηση εξωγενούς κεραμιδίου, όπως και στον επαγόμενο από τον TNFα κυτταρικό θάνατο (Lin et al., 1999).

Ορισμένες δραστικές ουσίες αντικαρκινικών σκευασμάτων μπορεί με τη χορήγησή τους να επαναφέρουν την ευαισθησία καρκινικών κυττάρων στη χρήση χημειοθεραπευτικών. Χορήγηση ταμοξιφένης (Tamoxifen) για τη θεραπεία μελανώματος, κακοήθους γλοιώματος και παγκρεατικού καρκινώματος παρεμποδίζει το σχηματισμό γλυκοζυλο-κεραμιδίου. Όταν σε ανθεκτικά κύτταρα MCF-7-AdrR χορηγήθηκε εξωγενώς κεραμίδιο και ταμοξιφένη η βιωσιμότητά τους μειώθηκε κατά 50% και ενεργοποιήθηκε η αποπτωτική διαδικασία (Senchenkov et al., 2001). Επίσης η ταμοξιφένη είναι αποτελεσματική στην αναστροφή της ανθεκτικότητας καρκινικών κυττάρων νεφρού αναστέλλοντας τη σύνθεση γλυκοζυλο-κεραμιδίου, ενώ το αντιμυκητιασικό φάρμακο κετοконаζόλη, δομικά παρόμοιο με την ταμοξιφένη, υπερκεράζει την ανθεκτικότητα καρκινικών κυττάρων μαστού στη δοξορουβικίνη και στη βινμπλαστίνη, παρεμποδίζοντας επίσης τη σύνθεση του γλυκοζυλο-κεραμιδίου (Senchenkov et al., 2001; Radin, 2003).

Πρόσφατες μελέτες που συνδέονται με την επίδραση διαιτητικής χορήγησης σφιγγολιπιδίων στην εξέλιξη και ανάπτυξη καρκινικών όγκων στο κόλον απέδειξαν ότι η σφιγγοσίνη και το κεραμίδιο καταπολεμούν αποτελεσματικά την εξέλιξη του όγκου (Schmelz et al., 2001). Τα ευρήματα αυτά υπόσχονται ότι η στόχευση του μεταβολισμού του κεραμιδίου μπορεί να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για πρωτότυπες αντικαρκινικές φαρμακευτικές στρατηγικές. Ακόμα η υπερέκφραση αντι-αποπτωτικών μορίων όπως η Bcl-2 αναστέλλει την απόπτωση καρκινικών σειρών. Εμβυϊκοί ινοβλάστες επίμυων που υπερεκφράζουν τη Bcl-2 είναι απολύτως



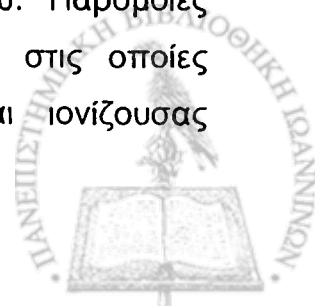
ανθεκτικοί στην επαγόμενη από το ετοποσίδιο και τη σταυροσπορίνη απόπτωση (Makin and Dive, 2003). Η απώλεια της Bax σε καρκινώματα κόλου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ανθεκτικότητας των κυττάρων στα χημειοθεραπευτικά (Makin and Dive, 2003).

Η στόχευση πορειών μεταβολισμού και κυτταρικού θανάτου που επάγονται από το κεραμίδιο αποτελεί μία ελκυστική στρατηγική για την κλινική θεραπεία καρκίνων και για να υπερνικηθεί η ανθεκτικότητα καρκινικών σειρών σε χημειοθεραπευτικά παρασκευάσματα.

Το ανερχόμενο ενδιαφέρον για την ανάδειξη του ρόλου του κεραμιδίου και των μεταβολισμών του στη φυσιολογία των ιστών και στην παθοφυσιολογία πηγάζει από το ρόλο του στις ενδοκυττάρια πορείες μεταγωγής σήματος που επάγουν απόπτωση με την αύξηση της συγκέντρωσής του και τη μείωση της S1P ή που επάγουν πολλαπλασιασμό και αναστέλλουν το αποπτωτικό πρόγραμμα με τη μείωση της συγκέντρωσης κεραμιδίου και την αύξηση του επιπέδου της S1P (Kolesnick, 2002). Η ρύθμιση των επιπέδων κεραμιδίου μπορεί όπως προαναφέρθηκε να επαυξήσει την αποτελεσματικότητα ορισμένων αντικαρκινικών θεραπειών. Η αναστολή της βιοσύνθεσης S1P υποδηλώνει έναν ετερόκλητο δρόμο για τη μεγιστοποίηση των επαγόμενων από το κεραμίδιο πορειών θανάτου. Η εσωτερική και ουσιαστική λειτουργία της πορείας της σφιγγομυελίνης είναι να αποκρίνεται σε σήματα στρες είτε περιβαλλοντικά είτε φαρμακολογικά μετατρέποντάς τα σε βιοχημικά μηνύματα. Ως επιστέγασμα των δράσεων του κεραμιδίου αναφέρθηκε ότι το πεδίο της χημειοθεραπείας μέσω κεραμιδίου ανοίγει νέους ορίζοντες στη μάχη κατά των νεοπλαστικών εξαλλαγών και της καταπολέμησής τους (Mandala et al., 2002).

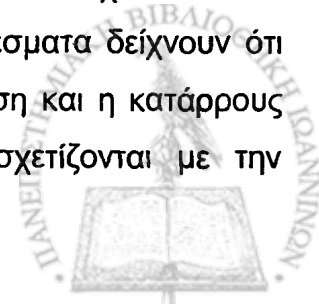
### **20.1. Βανάδιο και κεραμίδιο**

Η ενεργοποίηση υποδοχέων αντιγόνων σε ανώριμα B λεμφοκύτταρα ή σε φυσιολογικές κυτταρικές σειρές B-λεμφοκυττάρων οδηγεί σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ή αποπτωτικό θάνατο (Dawson et al., 2000). Ταυτόχρονα, η ενεργοποίηση υποδοχέων B κυττάρων ενεργοποιεί τη σφιγγομυελινάση με αποτέλεσμα την αυξημένη ενδοκυτταρική συσσώρευση κεραμιδίου. Παρόμοιες συγκεντρώσεις κεραμιδίου έχουν ανιχνευτεί σε κυτταρικές σειρές στις οποίες επάγεται απόπτωση μέσω TNF $\alpha$ , Fas, κορτικοστεροειδών και ιονίζουσας



ακτινοβολίας. Η φωσφατάση-2 της φωσφοτυροσίνης (PTP2) είναι γνωστό ότι υπορυθμίζει την πορεία σήματος του αντιγονικού υποδοχέα των B κυττάρων. Ένας πρωτεϊνικός αναστολέας της φωσφατάσης της φωσφοτυροσίνης, το BMOV [Bis (maltolato) oxovanadium], επάγει απόπτωση στην κυτταρική σειρά Ramos B-λεμφοκυττάρων, αλλά όχι στην κυτταρική σειρά Jurkat T-λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, η χορήγηση BMOV οδήγησε σε τετραπλασιασμό της συγκέντρωσης κεραμιδίου στα B λεμφοκύτταρα, αύξηση που δεν παρατηρήθηκε στα T-λεμφοκύτταρα, που υποδηλώνει την ενεργοποίηση της σφιγγομυελινάσης ως αποτέλεσμα του ανασταλτικού ρόλου του BMOV στη φωσφορυλίωση της τυροσίνης εξειδικευμένων πρωτεϊνών και την ενεργοποίηση της πορείας αποπτωτικού θανάτου (Dawson et al., 2000). Χορήγηση BMOV επάγει μεταβολές στη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών μόνο στα B-λεμφοκύτταρα Ramos, στα οποία η εξωγενής χορήγηση κεραμιδίου (C<sub>2</sub> και C<sub>6</sub>) επάγει απόπτωση (Kolesnick and Golde, 1994). Η υπερέκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-x<sub>L</sub> και Bcl-2 στα B-λεμφοκύτταρα επάγει ανθεκτικότητα στην επαγόμενη από το κεραμίδιο απόπτωση (Hannun, 1996). Έτσι αποδεικνύεται ότι αφού η αναστολή ενεργοποίησης των φωσφατασών είναι ο μηχανισμός δράσης του BMOV στα B-λεμφοκύτταρα, η αυξημένη συγκέντρωση κεραμιδίου στην κυτταρική σειρά Ramos, αλλά όχι στα κύτταρα Jurkat, είναι η συστατική μεταβολή για την έναρξη της αποπτωτικής διαδικασίας στα B λεμφοκύτταρα (Dawson et al., 2000).

Οι ισολινομιμητικοί αυξητικοί παράγοντες (IGFs) είναι ικανοί να παρεμποδίσουν την απόπτωση σε πολλές κυτταρικές σειρές *in vitro*, δυνητικά μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα IGF-I (IGF-IR) (Gill et al., 1997). Μικρές δόσεις C<sub>2</sub>-κεραμιδίου απαιτούνται για να επάγουν απόπτωση σε ινοβλάστες που δεν εκφράζουν τον υποδοχέα IGF-IR. Το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο ενεργοποιεί την MAP κινάση φωσφορυλιώνοντας τον υποδοχέα IGF-I και επάγοντας είσοδο στην G2 φάση του κυτταρικού κύκλου. Έχει δειχθεί ότι το κεραμίδιο χορηγούμενο σε ινοβλάστες IGF-IR<sup>+</sup> ενεργοποιεί τις κινάσες τυροσίνης με αποτέλεσμα την επαγωγή του κυτταρικού θανάτου (Stewart et al., 1999). Παρουσία ορθοβαναδικού άλατος του νατρίου αποδείχθηκε ότι ο επαγόμενος κυτταρικός θάνατος επιταχύνεται και η συσσώρευση κεραμιδίου αυξάνεται, με αποτέλεσμα την κυτταρική απόπτωση. Ο ρόλος του κεραμιδίου στην επαγωγή της απόπτωσης παρουσία ενεργών υποδοχέων IGF-IR απαιτεί την ενεργοποίηση των κινασών τυροσίνης. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι αναφορικά με το ρόλο του IGF-IR, του οποίου η φωσφορυλίωση και η κατάργηση ενεργοποίηση των κινασών της τυροσίνης φυσιολογικά συσχετίζονται με την



επιβίωση του κυττάρου (Guvillier et al., 1996), επιβεβαιώθηκε πως σε ινοβλάστες IGF-IR<sup>+</sup> η συμπαρουσία C<sub>2</sub> και ορθοβαναδικού άλατος του νατρίου οδηγεί σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Stewart et al., 1999)

Χορήγηση C<sub>6</sub>-κεραμιδίου στην κυτταρική σειρά RBL-2H3 (βασεόφιλα κύτταρα) αναστέλλει την φωσφορυλίωση της ERK (extracellular signal-regulated kinase) και καταστέλλει την παραγωγή της προσταγλανδίνης PGD<sub>2</sub>. Η αναστολή της φωσφορυλίωσης της ERK που επάγεται από το κεραμίδιο αναστέλλεται από το ορθοβαναδικό άλας, έναν αναστολέα της φωσφατάσης της τυροσίνης προλαμβάνοντας έτσι την επαγόμενη από το κεραμίδιο αποφωσφορυλίωση της ERK στα κύτταρα. Έτσι αποδεικνύεται ότι η αποφωσφορυλίωση και η αδρανοποίηση της ERK που επάγονται από το κεραμίδιο είναι αποτέλεσμα ενεργοποίησης των πρωτεϊνικών φωσφατασών της τυροσίνης (PTPs) με συνέπεια την έναρξη του αποπτωτικού προγράμματος (Kitatani et al., 2001).

Κατά συνέπεια, η ύπαρξη των ελάχιστων μελετών φανερώνει ότι η χορήγηση ενώσεων βαναδίου σε καρκινικές κυτταρικές σειρές επάγει την ενδοκυττάρια συσσώρευση του κεραμιδίου και την απόπτωσή τους, φανερώνοντας μια σχέση μεταξύ των ενώσεων βαναδίου και της αποπτωτικής διαδικασίας μέσω των πορειών ενεργοποίησης του αποπτωτικού θανάτου που επάγεται από το κεραμίδιο.



#### **ΕΝΟΤΗΤΑ IV: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ AP-1 ΣΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ**

Ο μεταγραφικός παράγοντας AP-1 τροποποιεί τη ρύθμιση γονιδίων ως απόκριση σε ποικίλα εξωκυτταρικά ερεθίσματα που περιλαμβάνουν αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες, ογκογονίδια, ενεργοποιητές όγκων και χημικά καρκινογόνα (Karin et al., 1997). Ο παράγοντας AP-1 αναπαριστά ένα ετερόλογο σύνολο διμερών πρωτεϊνών που αποτελούνται από μέλη των οικογενειών Jun, Fos και ATF.

Με την πρόσδεσή τους στο DNA, η ενεργοποίηση της μεταγραφής των υπομονάδων ενός σταθερού διμερούς συμπλόκου μπορεί να ποικίλλει, κάτι το οποίο εξηγείται με διαφορές στη φωσφορυλίωσή του από ανάρρους πρωτεϊνικές κινάσες, όπως και με αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με άλλους κυτταρικούς παράγοντες. Ως αποτέλεσμα στοχεύουν διαφορετικές ομάδες γονιδίων, με συνέπεια μεμονωμένα μέλη της οικογένειας AP-1 να έχουν εξειδικευμένες λειτουργίες στις ρυθμιζόμενες από το AP-1 κυτταρικές διαδικασίες. Η δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών και η ανάλυση κυτάρων τους οδήγησε στην αναγνώριση εξειδικευμένων, μη-αλληλοκαλυπτόμενων λειτουργιών των πρωτεϊνών Fos, Jun και ATF (Angel et al., 2001; Shaulian and Karin, 2001).

Το δέρμα αποτελεί ένα πολύ ιδιαίτερο λεπτεπίλεπτο τμήμα του σώματος, ιδιαίτερα προσβάσιμο για αποκόμιση σημαντικών πληροφοριών σε σχέση με τη ρύθμιση και λειτουργία του AP-1 και των AP-1-ρυθμιζόμενων γονιδίων σε πολλαπλές βιολογικές πορείες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαφοροποίηση και η κυτταρική απόπτωση. Επιπλέον ιστοκαλλιέργειες και μοντέλα πειραματόζωων έχουν χρησιμοποιηθεί για να καθορίσουν το ρόλο των υπομονάδων AP-1 στο σχηματισμό και στην ανάπτυξη όγκων (Angel et al., 2001; Shaulian and Karin, 2001; Shaulian and Karin, 2002).

Η επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων στρες (ακτινοβολία, χημικών ξενοβιοτικών, τραυματισμοί από μηχανικό στρες) εκθέτει κυρίως το δέρμα σε ποικίλες αποκρίσεις, αφού αποτελεί τον εξώτερο προστατευτικό φραγμό του σώματος στις επιδράσεις παραγόντων στρες, ενώ στο δέρμα ενεργοποιούνται ταυτόχρονα γενετικά προγράμματα που ελέγχουν την κυτταρική απόκριση στο στρες, την αναδιάταξη των ιστών του ή την αναγέννησή τους κατά τη διάρκεια τραυματισμού.

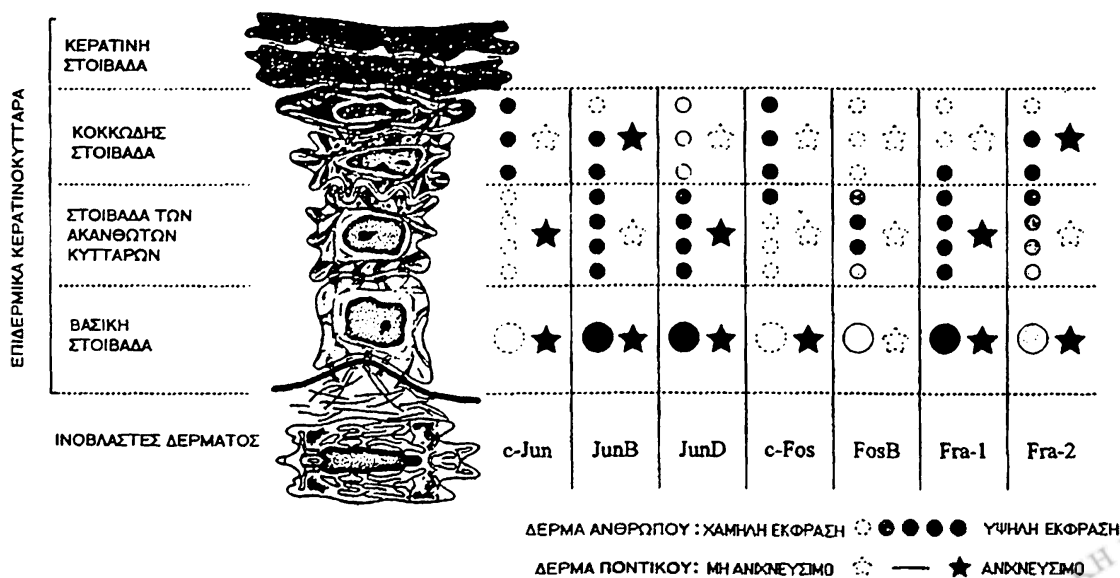




### 21.1. Έκφραση του AP-1 στο δέρμα

Το δέρμα διαχωρίζεται σε δύο κύρια τμήματα, την επιδερμίδα, που αναπαριστά την εξωτερική στοιβάδα και το χόριο που διαχωρίζεται από την επιδερμίδα μέσω της βασικής στοιβάδας. Η ομοιοσταση της επιδερμίδας βασίζεται σε αυστηρώς καθορισμένες ισορροπίες μεταξύ του πολλαπλασιασμού των κυττάρων της και της διαφοροποίησής τους. Ο συνεχής πολλαπλασιασμός των βασικών κυττάρων (stem cells) της βασικής στοιβάδας της επιδερμίδας και η τυχόν μεταβολή της ισορροπίας μεταξύ πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των κυττάρων των παρακείμενων στοιβάδων είναι οι δύο προαπαιτούμενες προϋποθέσεις για την αντικατάσταση των αποβαλλόμενων κυττάρων στην κεράτινη στοιβάδα του δέρματος. Οι διαφορετικές στοιβάδες διαχωρίζονται και κατατάσσονται ιστολογικά ή μέσω της παρουσίας ειδικών κυτταρικών στοιχείων, όπως η αφθονία δεσμοσωμάτων σε κύτταρα που ανήκουν σε στοιβάδα των ακανθωτών κυττάρων ή της παρουσίας κοκκίων υαλίνης στην κοκκώδη στοιβάδα. Τυπικά γονίδια-μάρτυρες έχουν αναχνητευτεί να είναι ενδεικτικά των πορειών διαφοροποίησης ή των ειδικών φάσεων των κυττάρων της επιδερμίδας (Angel et al., 2001; Shaulian and Karin 2001; Shaulian and Karin 2002).

Ενώ το πρότυπο έκφρασης των υπομονάδων AP-1 δεν έχει αναλυθεί στο χόριο και ιδίως στους ινοβλάστες του χορίου, η έκφραση ορισμένων μελών των οικογενειών των πρωτεϊνών έχει μελετηθεί στα κερατινοκύτταρα ποντικών και ανθρώπων με *in situ* υβριδοποίηση και ανοσοϊστοχημική ανάλυση (Rutberg et al., 1996) (Σχήμα 8.1).



Σχήμα 8.1. Έκφραση των υπομονάδων του AP-1 στο δέρμα.



Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης στον μυ η έκφραση του c-jun και του JunB στο δέρμα γίνεται ορατή την ημέρα 17,5, φανερώνοντας ένα όχι καλά καθορισμένο προφίλ της έκφρασης του c-jun στην επιδερμίδα. Η έκφραση του JunB ήταν ορατή στα κύτταρα της επιφάνειας της κεράτινης στοιβάδας, όχι όμως στα κύτταρα των βασικών στοιβάδων όπου επιτελείται ο πολλαπλασιασμός τους. Σε αντίθεση η έκφραση του Fra-2 αποδείχθηκε στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας και της κοκκώδους στοιβάδας του δέρματος, αλλά όχι στην κεράτινη στοιβάδα της επιδερμίδας (Carrasco and Bravo, 1995).

Τα στοιχεία υποδεικνύουν ότι κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του δέρματος ούτε το c-jun ή το JunB παίζουν αποφασιστικό ρόλο. Σε νεογέννητους μυς η έκφραση του c-jun, JunD και Fra-1 ανιχνεύεται ταυτόχρονα στη βασική στοιβάδα και στη στοιβάδα των ακανθωτών κυττάρων, ενώ στη βασική στοιβάδα εντοπίζονται επίσης το c-fos, το JunB, αλλά όχι το FosB. Το JunB και το Fra-2 είναι τα μόνα μέλη της οικογένειας των AP-1 που ανευρίσκονται στην κοκκώδη στοιβάδα (Rutberg et al., 1996) υποδεικνύοντας ότι η παρουσία των υποομάδων της οικογένειας AP-1 συσχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων των οποίων η έκφραση τροποποιείται από διαφορετικές υπομονάδες του AP-1.

Διαφορές στα πρότυπα έκφρασης παρατηρήθηκαν για τις πρωτεΐνες Fos και Jun στα νεογνά και στους νεογέννητους μυς. Στον άνθρωπο η πρωτεΐνη JunB όπως και η JunD υπερεκφράζονταν σε όλες τις στοιβάδες της επιδερμίδας, με υψηλότερα επίπεδα στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας και των ακανθωτών κυττάρων. Σε αντίθεση, η c-jun ανευρέθηκε αποκλειστικά στην κοκκώδη στοιβάδα. Η πρωτεΐνη c-fos παρατηρήθηκε σε αμφότερες τις στοιβάδες των ακανθωτών κυττάρων και των κοκκιωδών κυττάρων, ενώ ήταν απύσχα από τη βασική στοιβάδα και την κατώτερη ζώνη της βλαστικής στοιβάδας της επιδερμίδας. Ενδιαφέρον στοιχείο αποτελεί η μη-αλληλοκάλυψη της έκφρασης της c-fos, ιδιαίτερα της FosB, αποδεικνύοντας την εξειδικευμένη ρύθμιση γονιδιακών στόχων από συγκεκριμένες υπομονάδες του AP-1 (Shaulian and Karin, 2001). Οι πρωτεΐνες FosB, Fra-1 και Fra-2 εκφράζονταν στη στοιβάδα των ακανθωτών κυττάρων, με αυξανόμενη τάση έκφρασης στην κατώτατη ζώνη της κοκκώδους στοιβάδας (Welter and Eckert 1995).



## 22.1. Ρύθμιση και δράση των πρωτεϊνών fos και jun στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων

### 22.1A. Πορείες σήματος και γονιαδιακοί στόχοι του AP-1 στο δέρμα

Τα διαφορετικά πρότυπα έκφρασης των πρωτεϊνών Jun και Fos στην επιδερμίδα αποδεικνύουν τον εξειδικευμένο ρόλο μεμονωμένων υπομονάδων του AP-1 στην κυτταρική λειτουργία. Ο κριτικός ρόλος του Fos και Jun περιλαμβάνει την αρνητική ρυθμιστική δράση του c-jun στην p53 και θετική ρυθμιστική δράση στην κυκλίνη D1, όπως και θετική μεταγραφική ρύθμιση της p16 από το JunB σε ινοβλάστες (Angel et al., 2001). Η σύνδεση της c-jun στην πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb) έχει περιγραφεί σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινων κερατινοκυττάρων (Nead et al., 1998) προτείνοντας πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ μελών AP-1 και ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου (κυκλινών ή αναστολέων των κυκλινών). Ως γενική εντύπωση ο ρόλος του c-jun ως ενεργητικού ρυθμιστή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του JunB (και πιθανώς του JunD) ως αναστολέα της κυτταρικής αύξησης, ευνοώντας την κυτταρική διαφοροποίηση, μπορεί να μην ισχύει για τα κύτταρα της επιδερμίδας (Jochum et al., 2001).

Επιπλέον στοιχείο για το ρόλο των AP-1 υπομονάδων στη λειτουργία των κερατινοκυττάρων αποτελεί ο αυξημένος αριθμός γονιδίων που ρυθμίζονται από τον AP-1 και εκφράζονται σε διαφορετικές στοιβάδες της επιδερμίδας (Sinha et al., 2000). Η λίστα των γονιδίων-στόχων του AP-1 στην επιδερμίδα περιλαμβάνει την τρανσγλουταμινάση και διαφορετικά μέλη της οικογένειας των κυτοκερατινών (Welter and Eckert 1995), την προφίλαγγρίνη (Jang et al., 1996) και την ινβολουκρίνη (involucrin), που αποτελεί πρόδρομη πρωτεΐνη του κυτταρικού τοιχώματος (Lopez-Bayghen et al., 1996).

Κάτω από αυτές τις συνθήκες, μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων-στόχων του Fos, Jun και AP-1 έχουν παρατηρηθεί, υποδηλώνοντας ειδικές και μερικώς αντιθετικές λειτουργίες των υπομονάδων AP-1 στη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων (Rutberg et al., 1997). Συνάμα υπάρχουν ισχυρές αποδείξεις ότι πορείες μεταγωγής σήματος που ρυθμίζονται από τη δράση του AP-1 είναι κύριοι ρυθμιστές του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων (Jang and Surh, 2003). Παρόλο το μέγεθος της ερευνητικής δραστηριότητας για το πρότυπο έκφρασης των μελών AP-1 και των δυνητικών γονιαδιακών στόχων του σε



κυτταροκαλλιέργειες και σε πειραματόζωα (ιδίως μύς), οι φαινότυποι μών που στερούνται το c-fos, το FosB και το JunD στην επιδερμίδα τους δεν αποδίδουν στοιχεία για ένα κριτικό ρόλο των προαναφερόμενων πρωτεϊνών στο φυσιολογικό δέρμα (Angel et al., 2001). Πέραν τούτου η απάλειψη του c-jun από τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας δεν οδήγησε σε αλλαγές του φαινότυπου του δέρματος. Επιζητώντας τα πειραματικά αποτελέσματα φαίνεται ότι μεμονωμένες υπομονάδες όπως το c-jun ή το c-fos μπορεί να μην είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη του δέρματος ή πως άλλα μέλη της οικογένειας AP-1 μπορεί λειτουργικά να αντισταθμίζουν την απώλεια αυτή.

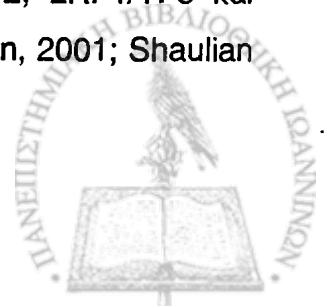
Σύμφωνα με τις λειτουργίες του δέρματος να χρησιμεύει ως προστατευτικός φραγμός κατά περιβαλλοντικών στρεσογόνων, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, τα κύτταρα που ενεργά ανταποκρίνονται στους στρέσορες, μεταβάλλουν το ρεπερτόριο των γονιδιακών τους εκφράσεων, ώστε να το προστατεύσουν από επαγόμενη από ακτινοβολία βλάβη (Behrens et al., 2000).

Μακροχρόνια έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία προκαλεί πρόωμη γήρανση του δέρματος (φωτογήρανση) με συμπτώματα, όπως αλλαγή της υφής του, εμφάνιση ρυτίδων και εναπόθεσης διάστικτων κηλίδων χρωματίνης (pigmentation). Η διαδικασία της γήρανσης καθοδηγείται από μεγάλες αλλαγές των γονιδιακών εκφράσεων των ινοβλαστών στο δέρμα (Bernerd and Asselineau, 1998; Fagot et al., 2002).

Σε συμφωνία με τον κριτικό ρόλο των μελών AP-1 στην ενεργοποίηση αυτών των γονιδίων η μεταγραφή των γονιδίων των c-jun, junB και c-fos επηρεάζεται με την δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας.

### **22.1B. Ο ρόλος του AP-1 στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό κυττάρων θηλαστικών**

Οι πρωτεΐνες AP-1 των θηλαστικών σχηματίζουν ομοδιμερή (fos/fos, jun/jun) και ετεροδιμερή (fos/jun) μέσω των βασικών περιοχών φερμουάρ λευκίνης (basic region-leucine zipper proteins; bZIP) και αποτελούνται από την ομάδα Jun (c-jun, JunB και JunD), την ομάδα Fos (c-fos, FosB, Fra-1 και Fra-2) και τις υποοικογένειες των συγγενών ενεργοποιητών μεταγραφικών παραγόντων (ATF2, LRF1/TF3 και BATF) (Wisdom et al., 1999; Angel et al., 2001; Shaulian and Karin, 2001; Shaulian and Karin, 2002).



Πρόσφατες έρευνες πιστοποιούν πως ο μεταγραφικός παράγοντας της ενεργοποιού πρωτεΐνης-1 (AP-1) συμμετέχει ενεργά στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής επιβίωσης και του κυτταρικού θανάτου. Οι δυνατότητες σύνδεσης με το DNA και ενεργοποίησης μεταγραφής των πρωτεϊνών Jun ποικίλουν με τη c-jun να επιδεικνύει το υψηλότερο δυναμικό ενεργοποίησης. Ο ετεροδιμερισμός της c-jun με τη c-fos επαυξάνει την ικανότητα μεταγραφής της c-jun μέσω του σχηματισμού πλέον σταθερών διμερών ενώ ο ετεροδιμερισμός με την JunB την αδρανοποιεί (Halazonetis et al., 1988; Shaulian and Karin, 2002).

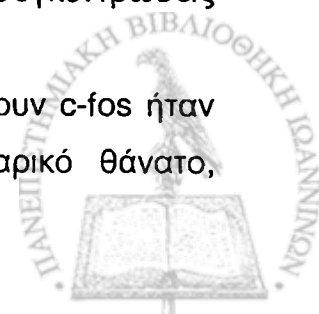
Έτσι η διαφορετική έκφραση των πρωτεϊνών AP-1 σε ανταπόκριση εξωκυτταρικών ερεθισμάτων (στρες) ελέγχεται ως ένας από τους πλέον σημαντικούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν ενεργότητα της AP-1.

Τα ερευνητικά δεδομένα αναφέρουν πως παράγοντες αύξησης και προαγωγής της ογκογένεσης επάγουν τη δράση του συμπλόκου AP-1 και πως οι πρωτεΐνες c-jun και c-fos, προϊόντα κυτταρικών πρωτο-ογκογονιδίων, που σχηματίζονται άμεσα έχουν ως αποτέλεσμα η ενεργότητα της AP-1 να ασκεί τον έλεγχο στην αύξηση των κυττάρων, όπως και στο μετασχηματισμό τους. Είναι γεγονός πως το πρωτο-ογκογονίδιο c-jun είναι ένα από τα πλέον αποκρινόμενα γονίδια στην ακτινοβολία UV. Η έκθεση σε UV έχει ως αποτέλεσμα την ταχύτατη και δραματική ενεργοποίηση των JNK που οδηγεί στη φωσφορυλίωση της c-jun και του ATF-2 επιταχύνοντας την ικανότητα μεταγραφής τους (Karin, 1995; Wisdom, 1999; Angel et al., 2001).

Ως μέλος του AP-1, η c-fos έχει ενοχοποιηθεί ως μόριο «κλειδί» για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαφοροποίηση και τον κυτταρικό μετασχηματισμό (Angel et al., 2001; Shaulian and Karin, 2001; Shaulian and Karin, 2002). Πέραν από τον πρωταρχικό της ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη και εξέλιξη των κυττάρων, η c-fos έχει συσχετισθεί με τον αποπτωτικό θάνατο κυττάρων που επάγεται από αντι-υπερπλαστικές συνθήκες (Colotta et al., 1992; Smeyne et al., 1993) και ως απόκριση στον κυτταρικό τραυματισμό (Hollander and Fornace, 1989; Verrier et al., 1986).

Η παρουσία ενδογενούς c-fos σε κυτταρικές σειρές hamster έδειξαν ότι τα αυξημένα επίπεδά της συνδυαζόταν με υψηλό ρυθμό αποπτωτικού θανάτου κατάρων σε σύγκριση με κύτταρα-μάρτυρες που είχαν μικρότερες συγκεντρώσεις ενδογενούς c-fos (Preston et al., 1996).

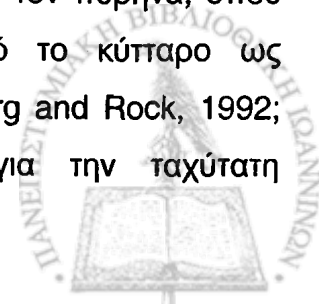
Η ταυτόχρονη υπερέκφραση της Bcl-2 σε κύτταρα που εκφράζουν c-fos ήταν αρκετή ώστε να αναστείλει τον επαγόμενο από τη c-fos κυτταρικό θάνατο,



αποδεικνύοντας ότι η πρωτεΐνη Bcl-2 αναστέλλει την επαγόμενη από τη c-fos απόπτωση. Η υπερέκφραση της Bcl-2 στην κυτταρική σειρά JB6 επιδερμικών κυττάρων μύς παρουσία του προαγωγέα ογκογένεσης TPA επιτάχυνε τον νεοπλαστικό μετασχηματισμό των κυττάρων, εν αντιθέσει με την απουσία του TPA όπου η υπερέκφραση της Bcl-2 απέτυχε να επάγει νεοπλαστικό μετασχηματισμό (Amstad et al., 1997). Επειδή έχει αποδεχθεί ότι ο εστέρας TPA επάγει απόπτωση σε ποικίλες κυτταρικές σειρές, η ταυτόχρονη έκφρασή του με τον αντι-αποπτωτικό παράγοντα Bcl-2 σε επιδερμικά κύτταρα μύς JB6 ή και απουσία αυτού, απέτυχε να επάγει απόπτωση. Η συγκέντρωση του AP-1 είναι κρίσιμη για την απόκριση των JB6 κυττάρων στον επαγόμενο μετασχηματισμό τους από το TPA. Συγκρίθηκε η έκφραση του mRNA των c-jun και c-fos, όπως και οι συγκεντρώσεις της AP-1 στους κυτταρικούς κλώνους JB6 που υπερέκφραζαν τη Bcl-2. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι κυτταρικοί κλώνοι JB6 που υπερέκφραζαν τη Bcl-2 παρουσία TPA εξέφρασαν σημαντικά αυξημένη πρωτεΐνη c-fos, αλλά όχι c-jun. Επιπλέον τα επίπεδα του AP-1 σε διαμολυσμένα κύτταρα JB6 που υπερέκφραζαν τη Bcl-2 ήταν υψηλότερες από τα κύτταρα μάρτυρες (Amstad et al., 1997). Η υπερέκφραση της Bcl-2 παρουσία του TPA ενεργοποιεί την εξαρτώμενη από την MAPK (mitogen-activated protein kinase) πορεία σήματος (Seger and Krebs, 1995). Ο επαγόμενος μέσω TPA κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η προαγωγή της ογκογένεσης ρυθμίζονται από την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (Yuspa, 1994) και την ταυτόχρονη ενεργοποίηση κατάρρους μελών του καταρράκτη των MAPK, που οδηγεί στη μεταγραφική επαγωγή των πρόδρομων γονιδίων c-fos και c-jun (Seger and Krebs, 1995).

Έχει επίσης αναφερθεί ότι η πρωτεΐνη c-fos επιδεικνύει αντι-αποπτωτική δράση και αυτό συνδέεται με πρόσφατες αποδείξεις ότι η c-fos ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που προστατεύουν κύτταρα από τον αποπτωτικό θάνατο (Scheiber et al., 1995; Kaina et al., 1997), όπως και από πειραματικές μελέτες με c-fos<sup>-/-</sup> κύτταρα μύς που εμφανίζονται ως υπερευαίσθητα στην επαγωγή απόπτωσης (Kaina et al., 1997).

Η κυτταρική απόπτωση επίσης εμπλέκει το πρωτεόσωμα, ένα πολυκαταλυτικό σύμπλοκο πρωτεασών που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα, όπου αποικοδομούνται πρωτεΐνες οι οποίες αναγνωρίζονται από το κύτταρο ως ελαττωματικές μετά από πρόσδεσή τους σε ουβικιτίνη (Coldberg and Rock, 1992; Ciechanover, 1994). Το πρωτεόσωμα είναι υπεύθυνο για την ταχύτατη



αποικοδόμηση της πρωτεΐνης c-fos που συνεισφέρει στην εκτέλεση του αποπτωτικού προγράμματος του κυτταρικού θανάτου (He et al., 1998).

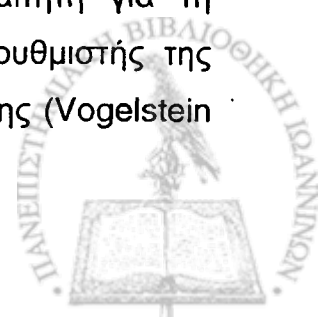
Ο ρόλος του c-fos στην απόπτωση έχει παρατηρηθεί στην κυτταρική σειρά WEH/7.2 μύς, ένα μοντέλο κυτταροκαλλιέργειας άωρων θυμοκυττάρων σε απόπτωση επαγόμενη από γλυκοκορτικοειδή. Η κυτταρική σειρά WEH/7.2 δεν εκφράζει ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις της Bcl-2 και επάγει απόπτωση σε ανταπόκριση χορήγησης δεξαμεθαζόνης, ενός συνθετικού γλυκοκορτικοστεροειδούς. Είναι πιθανό ότι η συσχετιζόμενη με το πρωτεόσωμα αποδόμηση του c-fos να οδηγεί στην εξασθένιση της δράσης του AP-1 σε επαγόμενη απόπτωση από δεξαμεθαζόνη σε θυμοκύτταρα (He et al., 1998).

Η πρωτεΐνη c-fos φυσιολογικά έχει μικρή ημιπερίοδο ζωής, με συνέπεια η ρυθμιζόμενη πορεία σήματος από τη c-fos να διαρκεί ελάχιστα. Όμως, η παρατεταμένη μη-φυσιολογική έκφραση του c-fos οδηγεί σε κυτταρικό μετασχηματισμό και συνδέεται με την υπερέκφραση γονιδίων που ενέχονται στην μεταστατική διαδικασία (Angel et al., 2001; Shaulian and Karin, 2001). Επίσης η έκφραση της Bcl-2 σταθεροποιεί τη c-fos στη ρυθμιζόμενη από το πρωτεόσωμα αποικοδόμηση και κύτταρα που υπερεκφράζουν Bcl-2 έχουν υψηλότερα επίπεδα c-fos με αποτέλεσμα να είναι πιο ανθεκτικά σε διάφορους αποπτωτικούς παράγοντες (He et al., 1998).

Είναι λοιπόν φανερό, όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία, ότι η υπερέκφραση της c-fos μπορεί να επιφέρει είτε ένα φαινότυπο ανθεκτικό ή ευαίσθητο σε αποπτωτικούς παράγοντες. Το που οφείλεται η διαφορά αυτή στις αποκρίσεις των κυττάρων που υπερεκφράζουν γονίδια fos παραμένει εν πολλοίς άγνωστον.

### **22.1Bi. Γονίδια-στόχοι του AP-1 που εμπλέκονται στην αποπτωτική πορεία των κυττάρων**

Γονίδια στόχοι που ρυθμίζονται από την έκφραση του AP-1 και συμμετέχουν σε πορείες απόπτωσης κυττάρων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αποτελούν οι κυκλίνες D, η p53, και τα ρυθμιστικά γονίδια που κωδικοποιούν FasL και την τρανσφεράση της 5-μεθυλοκυτοσίνης. Η κυκλίνη D, είναι απαραίτητη για τη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G1 στην S όντας θετικός ρυθμιστής της κυτταρικής αύξησης, ενώ η p53 είναι αρνητικός ρυθμιστής της αύξησης (Vogelstein et al., 2000; Vousden, 2000).

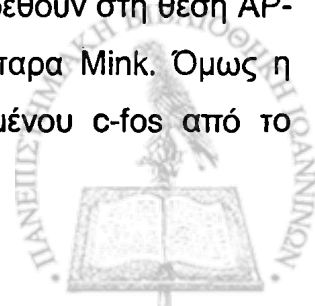


Η c-fos δρα συνεργικά με τη c-jun για την ενεργοποίηση της κυκλίνης D1, ενώ αντίθετα η JunB αναστέλει τη μεταγραφή της κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο (Bakiri et al., 2000). Η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της p53 και κατά συνέπεια την επαγωγή των γονιδίων-στόχων της p53 των οποίων τα πρότυπα οδηγούν σε αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Vogelstein et al., 2000; Vousden, 2000). Η έκφραση της c-jun ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση της p53 και την ικανότητά της να ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων στόχων (Schreiber et al., 1999; Shaulian et al., 2000).

#### **22.1Bii. Η αλληλοεπίδραση του c-fos στην έκφραση του γονιδίου της κλαστρίνης/απολιποπρωτεΐνης J**

Μεταξύ των δυνητικά αντι-αποπτωτικών γονιδίων που φαίνεται ότι ρυθμίζονται από την ογκο-πρωτεΐνη c-fos είναι η κλαστρίνη/απολιποπρωτεΐνη J (ApoJ). Ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας-β (TGFβ) επάγει την έκφραση της κλαστρίνης σε σειρά κυττάρων μέσω μίας ομόφωνης αλληλουχίας DNA πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 στον προαγωγέα της κλαστρίνης. Ο TGFβ διεγείρει τα επίπεδα mRNA της κλαστρίνης και την πρωτεϊνική σύνθεση σε ποικιλία κυττάρων όπως καρδιακά, ηπατικά κύτταρα, ορχικά κύτταρα, κύτταρα επιδιδυμίδας, επιθηλιακά κύτταρα, κύτταρα και ινοβλάστες, επάγοντας τη συσσώρευση μιας νέας μορφής της ApoJ μοριακού βάρους 43 kDa που εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων (Reddy et al., 1996), με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης μετά την πάροδο 16 ωρών (Jin and Howe, 1997). Πρόσφατα μια πυρηνική μορφή της κλαστρίνης η XIP-8 έχει απομονωθεί μετά τη χρήση ιονίζουσας ακτινοβολίας σε καρκινικά κύτταρα μαστικού αδένου, παίζοντας σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης κάτι που επανειλημμένα έχει παρατηρηθεί στα ίδια κύτταρα παρουσία TGFβ (Yang et al., 1999; Yang et al., 2000; Criswell et al., 2003).

Η επαγόμενη έκφραση του γονιδίου της κλαστρίνης από τον TGFβ διαμέσω των πρωτεϊνών Smad απαιτεί την αλληλεπίδραση (συνέργεια) με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες ή συνενεργοποιητές (coactivators), όπως ο παράγοντας AP-1 (Jin and Howe, 1997; Dennler et al., 1998). Πολλαπλά μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων Fos και Jun δύνανται να προσδεθούν στη θέση AP-1 του γονιδίου της κλαστρίνης σε πνευμονικά επιθηλιακά κύτταρα Mink. Όμως η επαγωγή μέσω TGFβ καταλήγει σε απώλεια του προσδεδμένου c-fos από το





μεταγραφικό σύμπλοκο, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η c-fos είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής του γονιδίου της κλαστρίνης/ApoJ (Jin and Howe, 1999; Karin et al., 1997).

Ο κατασταλτικός ρόλος του c-fos στην έκφραση του γονιδίου της κλαστρίνης/ApoJ αποδείχθηκε με δύο διαφορετικές πειραματικές προσεγγίσεις. Η υπερέκφραση του c-fos σε πνευμονικά επιθηλιακά κύτταρα παρεμπόδισε την επαγομένη από τον TGFβ ενεργοποίηση του προαγωγέα της κλαστρίνης/ApoJ, ενώ σταθερές κυτταρικές σειρές που επίσης υπερέκφραζαν c-fos απέτυχαν να επιδείξουν αυξημένα επίπεδα mRNA της ενδογενούς κλαστρίνης/ApoJ, αν και (οι κυτταρικές σειρές) παρέμειναν ευαίσθητες στη ρυθμιζόμενη αναστολή της αύξησής τους από τον TGFβ, αποδεικνύοντας την ειδικότητα της ανασταλτικής δράσης του c-fos (Jin and Howe, 1999).

Ο TGFβ παροδικά αυξάνει τα επίπεδα mRNA του c-fos προκαλώντας ταχεία μειορρύθμιση (down-regulation) της σύνθεσης της πρωτεΐνης c-fos (Angel and Herrlich, 1994). Η διατήρηση χαμηλής έκφρασης του γονιδίου της κλαστρίνης/ApoJ απαιτεί νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη c-fos ως καταστολέα και η επαγομένη μειορρύθμισή της από τον TGFβ έχει ως αποτέλεσμα την απουσία της από το σύμπλοκο του AP-1 και την επακόλουθη ενεργοποίηση του γονιδίου της κλαστρίνης (Jin and Howe, 1999). Η χορήγηση TGFβ πιθανώς λόγω της επίδρασης που έχει στη σύνθεση η σταθερότητα της πρωτεΐνης c-fos ακυρώνει την κατασταλτικά επενέργεια του c-fos στην κλαστρίνη/ApoJ επάγοντας την έκφραση του γονιδίου της (Jin and Howe, 1997; Jin and Howe, 1999).

Η σταθερότητα της πρωτεΐνης c-fos συσχετίζεται με την κατάσταση φωσφορυλίωσης των υπολειμμάτων σερίνης στο καρβοξυτελικό άκρο της και πιθανώς ο TGFβ επηρεάζει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης c-fos ρυθμίζοντας τη φωσφορυλίωση των υπολειμμάτων σερίνης στην πρωτεΐνη (Jin and Howe, 1997; Bergman et al., 1998; Jin and Howe, 1999).

## **22.1Γ. Ο ρόλος του AP-1 στο μετασχηματισμό και στην αύξηση των κυττάρων**

Η αναγνώριση του c-fos και c-jun, ομολόγων των θηλαστικών των ρετροϊικών ογκοπρωτεϊνών v-fos και v-jun, ως συστατικά του AP-1 συνδέθηκε με την κυτταρική αύξηση ή τον κυτταρικό μετασχηματισμό. Ήταν ήδη γνωστό πως η απορρυθμιστική υπερέκφραση του c-fos ήταν ικανή να επάγει μετασχηματισμό σε



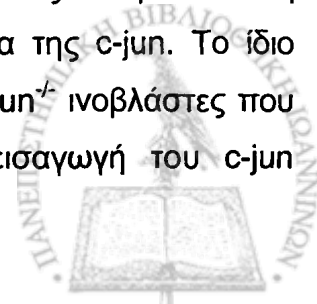
αθανατοποιημένους ινοβλάστες μυός (Miller et al., 1984; Roux et al., 1990; Roux et al., 1991; Angel et al., 2001; Shaulian and Karin, 2001).

Σε μη-αθανατοποιημένους εμβρυϊκούς ινοβλάστες μυός η υπερέκφραση του c-jun αποδείχτηκε ανεπαρκής για την επαγωγή του κυτταρικού μετασχηματισμού (Schutt et al., 1989a). Όμως ο επαγόμενος μετασχηματισμός από το ογκογονίδιο Ha-ras σε αθανατοποιημένους ινοβλάστες μυός απαιτεί την έκφραση του c-jun. Πιθανώς η έκφραση του ογκογονιδίου Ha-ras έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της ERK και της JNK, που οδηγούν στη φωσφορυλίωση στο αμινοτελικό άκρο της c-jun, επάγοντας τη μεταγραφική ενεργότητα της (Karin, 1995). Η από κοινού έκφραση του c-fos και c-jun επιπλέον επιτάχυναν την ικανότητα μετασχηματισμού του c-jun, ενώ η παρουσία JunB την αδρανοποίησε (Schutte et al., 1989a). Η υπερέκφραση του c-jun είναι ικανή συνθήκη για το μετασχηματισμό αθανατοποιημένων ινοβλαστών μυός, Rat1A, ενώ η έκφραση του JunB δεν μετασχηματίζει την ίδια κυτταρική σειρά (Schutte et al., 1989b). Ενώ η v-jun είναι μικρότερης ισχύος παράγοντας ενεργοποίησης της μεταγραφής σε κύτταρα θηλαστικών, είναι 10-25 φορές πιο παραγωγική από τη c-jun στο μετασχηματισμό ινοβλαστών εμβρύου όρνιθας (Shaulian and Karin; 2001; Angel et al., 2001).

Η ενεργότητα μετασχηματισμού κυτάρων που επηρεάζεται από τη c-jun και τη c-fos αποδεικνύει πως ο AP-1 εμπλέκεται στη διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενώ για το μετασχηματισμό ή την επαγωγή ογκογένεσης απαιτείται ο μειωμένος ρυθμός κυτταρικού θανάτου. Πράγματι χορήγηση μείγματος αντισωμάτων Fos ήταν ικανή να αναστείλει τον κυτταρικό κύκλο (Preston et al., 1996), ενώ αντισώματα κατά και των τριών πρωτεϊνών Jun ήταν ικανά να αναστείλουν την κυτταρική απόπτωση (Preston et al., 1996, Wisdom et al., 1999).

Η ανεπαρκής έκφραση του c-fos και FosB σε ινοβλάστες οδήγησε σε ανεπαρκή πολλαπλασιασμό τους και μύες με γενετική ανεπάρκεια έκφρασης c-fos και FosB είχαν κατά 30% μικρότερη ανάπτυξη από τους μάρτυρες (Brown et al., 1998).

Σε αντίθεση με fos<sup>-/-</sup>, ινοβλάστες c-jun<sup>-/-</sup> εμφανίζουν φαινότυπο ψευδογήρανσης μετά από δύο ανακαλλιέργειες και η πρόοδος του κυτταρικού τους κύκλου ελαττώνεται (Angel et al., 2001). Η επανεισαγωγή του c-jun στα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα τον αυξημένο πολλαπλασιασμό τους, υποδηλώνοντας ότι η αναστολή πολλαπλασιασμού τους οφειλόταν αποκλειστικά στην απουσία της c-jun. Το ίδιο φαινόμενο πειραματικά αποδείχθηκε σε αθανατοποιημένους c-jun<sup>-/-</sup> ινοβλάστες που ο φυσιολογικός πολλαπλασιασμός επανήλθε με την επανεισαγωγή του c-jun



(Wisdom et al., 1999). Αθανατοποιημένη κυτταρική σειρά ινοβλαστών απουσία έκφρασης της c-jun παρομοίως εμφάνισε ελαττωματική επανεισαγωγή των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο μετά την επίδραση ακτινοβολίας UV (Shaulian et al., 2000; Shaulian and Karin, 2001).

Η απουσία του γονιδίου JunB δεν μεταβάλλει τους ρυθμούς πολλαπλασιασμού των αρχέγονων εμβρυϊκών κυττάρων ή των ινοβλαστών (Schorpp-Kistner et al., 1999). Ινοβλάστες από διαγονιδιακούς μυς που εκφράζουν 5-10 φορές περισσότερο JunB από τα φυσιολογικά επέδειξαν μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων τους (Schorpp-Kistner et al., 1999; Reed 2002). Συμπερασματικά τα πειραματικά ευρήματα και τα αποτελέσματα αποδεικνύουν πως οι c-fos και c-jun στο σύμπλοκο AP-1 προάγουν την αύξηση, ενώ η JunB είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της δράσης του συμπλόκου. Ο ρόλος δε της JunD στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι πολύπλοκος, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό σε ορισμένες συνθήκες και αναστέλλοντάς τον κάτω από άλλες.

Η ικανότητα μελών της οικογένειας πρωτεϊνών Jun και Fos, όπως και των ρετροϊικών παραγώγων τους να μετασχηματίζουν κυτταρικές καλλιέργειες, επάγοντας ογκογένεση σε ζώα (πτηνά, επίμυς) είναι επαρκώς στοιχειοθετημένη (Angel et al., 2001). Μεταβολές στην έκφραση του AP-1 και της ενεργότητάς του συσχετίζονται με διαφορετικούς βαθμούς ανάπτυξης μελανώματος (Rutberg et al., 1994). Ανάλυση της ενεργότητας του AP-1 σε κυτταρικές σειρές κερατινοκυττάρων και επιδερμικών όγκων αποδεικνύουν τη δράση του στην ογκογένεση (Sato et al., 1997; Karin et al., 1997; Behrens et al., 2000; Angel et al., 2001; Horne and Vousden, 2004).



## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### ΥΛΙΚΑ

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

Υλικό	Εταιρεία
DMEM	Biochrom KG, Germany
Ορός εμβρύου μόσχου (FCS)	Biochrom KG, Germany (Seromed)
Πεκιικιλίνη/Στρεπτομυκίνη 10000 IU/ml / 10000 µg/ml	Biochrom KG, Germany
L-γλουταμίνη (200 mM)	Biochrom KG, Germany
Θρυψίνη - EDTA	Biochrom KG, Germany
PBS	Sigma Chemical Co.
Θρυπτόνη (Bacto-tryptone)	Lab M, U.K
Εκχύλισμα ζύμης (Bacto-yeast extract)	Lab M, U.K
Άγαρ	Lab M, U.K
N-ακετυλο-σφιγγοσίνη (C <sub>2</sub> -κεραμίδιο)	Sigma Chemical Co.
VO <sub>2</sub>	Riedel, Germany
Διμεθυλο-σουλφοξειδίο (DMSO)	Sigma Chemical Co.
Πολυβρίνη (Polybrene)	Aldrich Chemical Co.
1 kb DNA ladder	Life Technologies Inc.
Lambda DNA-Hind III digest	Life Technologies Inc.
Lambda DNA-BstEII Digest	Life Technologies Inc.
Ένζυμα περιορισμού DNA	New England Biolabs
Αγαρόζη	Life Technologies Inc.
Πρότυποι μάρτυρες πρωτεϊνών (Kaleidoscope Prestained Standards)	BIORad Laboratories, USA
Qiagen αντιδραστήρια απομόνωσης πλασμιδιακού DNA	Qiagen, Germany



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



## ΜΕΘΟΔΟΙ

### ΕΝΟΤΗΤΑ Ι: ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

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

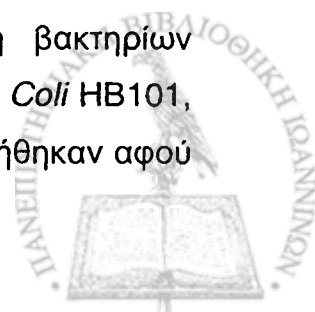
Η παρασκευή των τρυβλίων αυτών έγινε παράλληλα με την παρασκευή διαλύματος L- Broth. 10g θρυπτόνης (Bacto-tryptone), 5g εκχυλίσματος ζύμης (Bacto-yeast extract) και 10g χλωριούχου νατρίου (Riedel, Germany), διαλύθηκαν με ανάδευση και αύξηση της θερμοκρασίας σε 1000 ml δις απεσταγμένου νερού και το διάλυμα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

25 mg/ml Αμπικιλίνης: Διάλυμα του άλατος νατρίου της αμπικιλίνης (Sigma chemical Co.) σε συγκέντρωση 25 mg/ml σε αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O φιλτραρίστηκε μέσω ενός αποστειρωμένου μικροφίλτρου 0.45 µm και διατηρήθηκε στους -20°C σε μικρές ποσότητες (aliquots).

#### 2.2. Παρασκευή βακτηρίων επιδεκτικών προς μετασχηματισμό (competent cells)

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

Τα συνηθισμένα βακτηριακά στελέχη για την παρασκευή βακτηρίων επιδεκτικών προς μετασχηματισμό με πλασμίδια είναι τα στελέχη *E. Coli* HB101, DH5α, JM109 και MC1061. Αυτά τα βακτηριακά στελέχη χρησιμοποιήθηκαν αφού



υπέστησαν επεξεργασία ώστε να γίνουν 'επιδεκτικά κύτταρα' (competent cells), δηλαδή κύτταρα ικανά να μετασχηματιστούν (να δεχτούν πλασμίδια).

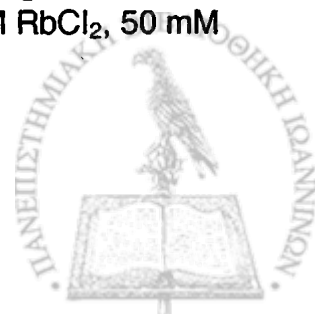
Αρχικά, μη ικανά (επιδεκτικά) βακτήρια τοποθετήθηκαν σε 5 ml L- Broth και επωάστηκαν σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C για 24 ώρες ώστε να αναπτυχθούν. Την επομένη ημέρα, 0.5 ml της ολονύχτιας υγρής βακτηριακής καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 20 ml L-broth σε μια αποστειρωμένη κωνική φιάλη και τα βακτήρια επωάστηκαν για 2 περίπου ώρες σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C για να αναπτυχθούν μέχρις ότου η OD<sub>600</sub> ήταν 0.3. Κατά τη διάρκεια της επώασης των βακτηρίων παρασκευάστηκαν τα διαλύματα A και B, τα οποία τοποθετήθηκαν στον πάγο. Η υγρή καλλιέργεια των βακτηρίων φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 5000 στροφές, στους 4°C και αφού αναρροφήθηκε το υπερκείμενο, το βακτηριακό ίζημα εναιωρήθηκε σε 1 ml διαλύματος A. Στη συνέχεια προστέθηκαν άλλα 9 ml διαλύματος A και μετά την ανάμιξη τα βακτήρια φυγοκεντρήθηκαν και πάλι για 5 λεπτά, στις 5000 στροφές και στους 4°C. Το υπερκείμενο αναρροφήθηκε προσεκτικά και το βακτηριακό ίζημα εναιωρήθηκε με 1 ml διαλύματος B. Αφού προστέθηκαν άλλα 9 ml διαλύματος B, το εναιώρημα αφέθηκε στον πάγο για 30 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 5000 στροφές και στους 4°C. Το βακτηριακό ίζημα εναιωρήθηκε σε 1 ml διαλύματος B που περιείχε 10% γλυκερόλη (Riedel, Germany) και δείγματα των 50-100 μl βακτηρίων τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένους σωλήνες erpendorff και αποθηκεύτηκαν στους -70°C για μελλοντική χρήση.

Τα 'επιδεκτικά κύτταρα' διατηρήθηκαν σε χλωριούχο ασβέστιο (CaCl<sub>2</sub>) και χλωριούχο ρουβίδιο (RbCl<sub>2</sub>) διότι τα ιόντα Ca<sup>2+</sup> δημιουργούν σύμπλοκα με το φωσφόρο του DNA και κατ' αυτόν τον τρόπο καθιζάνουν ως ίζημα. Μέσω του βακτηριακού μετασχηματισμού αυξάνεται η διαπερατότητα της μεμβράνης και τα κύτταρα αρχίζουν να εκκρίνουν έναν παράγοντα που ονομάζεται 'παράγοντας μετασχηματισμού' (competent factor).

Διάλυμα A: 10 mM MOPS pH 7.0, 10 mM RbCl<sub>2</sub>

Διάλυμα B: 10 mM MOPS pH 6.5, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, και 50 mM CaCl<sub>2</sub>.

Διάλυμα αποθήκευσης βακτηρίων: 10 mM MOPS pH 6.5, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 50 mM CaCl<sub>2</sub> και 10% γλυκερόλη



### 2.3. Μετασχηματισμός βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA

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

### 2.4. Ανάπτυξη υγρών καλλιεργειών βακτηρίων

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

Για απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλους όγκους (maxi prep), η ανάπτυξη υγρών καλλιεργειών βακτηρίων γινόταν με ανάμιξη 0,5 ml ανεπτυγμένης καλλιέργειας βακτηρίων σε 5 ml L-Broth και 100 μg/ml αμπικιλίνης σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C για όλη τη νύχτα (>16 ώρες) και στη συνέχεια με τον εμβολιασμό 100 ml L-Broth και 100 μg/ml αμπικιλίνης με 5 ml της ολονύχτιας αναπτυγμένης βακτηριακής καλλιέργειας και επώαση σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C για όλη τη νύχτα.





## 2.5. Παρασκευή βακτηρισκών αποθεμάτων γλυκερόλης

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

## 2.6. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρούς όγκους (mini prep)

1.5 ml υγρής καλλιέργειας βακτηρίων, προερχόμενες από αποικίες (παρ. 2.4), τοποθετήθηκαν σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα erpendorff και φυγοκεντρήθηκαν στις 6500 στροφές για 2 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια το βακτηριακό ίζημα εναιωρήθηκε με δίνη (vortexing) σε 200 μl διαλύματος λύσης βακτηρίων. Μετά από 5 λεπτά επώασης σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκαν 400 μl αλκαλικού διαλύματος και το μίγμα αφέθηκε στον πάγο για 5 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 300 μl διαλύματος οξικού νατρίου pH 5.2, έγινε ελαφριά ανάμειξη και το εναιώρημα αφέθηκε στον πάγο για 10 λεπτά (η χρήση οξικού νατρίου pH 5.2 υποβοηθεί στη καθίζηση πρωτεϊνών, RNA και χρωματοσωμικού DNA). Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, στις 13000 στροφές στους 4°C, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε έναν καθαρό αποστειρωμένο σωλήνα erpendorff και προστέθηκαν 0.6 όγκοι ισοπροπανόλης (Riedel, Germany). Το πλασμιδιακό DNA αφέθηκε να κατακρημνιστεί για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 13000 στροφές στους 4°C. Το ίζημα DNA εκπλύθηκε με 70% αιθανόλη και ξηράνθηκε σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού. Το πλασμιδιακό DNA εναιωρήθηκε σε 50 μl 1xTE pH 8.0 και αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

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

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

Αλκαλικό διάλυμα: 0.2 NaOH, 1% SDS

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



## 2.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλους όγκους (maxi prep)

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA έγινε είτε με τη χρήση αντιδραστηρίου Qiagen ή με τη χρήση αντιδραστηρίου Nucleobond.

Οι καλλιέργειες των βακτηρίων που αναπτύχθηκαν σε όγκο 50-100 ml L-Broth με 100 µg/ml αμπικιλίνης φυγοκεντρήθηκαν για 25 λεπτά, στις 5200 στροφές και στους 4°C. Το βακτηριακό ίζημα εναιωρήθηκε σε 4 ml ρυθμιστικού διαλύματος εναιώρησης (resuspension buffer) που περιείχε RNAση και ήταν διατηρημένο στους 4°C, με δίνη (vortexing). Στη συνέχεια προστέθηκαν 4 ml αλκαλικού διαλύματος, έγινε ελαφριά ανάμιξη και το εναιώρημα αφέθηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος προστέθηκαν 4 ml 'ρυθμιστικού διαλύματος εξουδετέρωσης' (neutralization buffer), έγινε ελαφριά ανάμιξη και το εναιώρημα αφέθηκε στον πάγο. Μετά από 20 λεπτά έγινε φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές, για 30 λεπτά και στους 4°C. Στο μεταξύ οι ειδικές στήλες 'QIAGEN tip-100 ή Nucleobond tip-100 εκπλύθηκαν με 4 ml 'ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης' (equilibration buffer). Στη συνέχεια το υπερκείμενο που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση μεταβιβάστηκε στις στήλες και αφέθηκε να περάσει διαμέσου των στηλών, στις οποίες κατακρατήθηκε το πλασμιδιακό DNA. Μετά οι στήλες εκπλύθηκαν 2 φορές με 10 ml 'ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης' (wash buffer) και το πλασμιδιακό DNA εκχυλίστηκε από τις στήλες με 5 ml 'ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης' (elution buffer). Στη συνέχεια προστέθηκαν 3.5 ml ισοπροπανόλης (Riedel, Germany), έγινε ανάμιξη (vortexing) και το πλασμιδιακό DNA αφέθηκε να κατακρημνιστεί για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές για 30 λεπτά στους 4°C για τη συλλογή του πλασμιδιακού DNA. Ακολούθησε έκπλυση με 70% αιθανόλη και ξήρανση σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτή κενού. Το πλασμιδιακό DNA εναιωρήθηκε σε 100-200 µl 1xTE pH 8.0, μεταφέρθηκε σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα erpendorff και αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

Η ποσότητα του απομονωμένου DNA υπολογίζεται φωτομετρικά, με μέτρηση στα 260 nm και με βάση τον τύπο: Οπτική πυκνότητα (O.D) =1 αντιστοιχεί σε 50 µg DNA. Ελέγχουμε το DNA μετά από πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού (παρ. 2.22) και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (παρ. 2.20).



## **ΕΝΟΤΗΤΑ II: ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ**

### **2.8. Κυτταρικές σειρές και καλλιέργεια**

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

**Πίνακας 1. Περιγραφή κυτταρικών σειρών**

<b>Κυτταρική σειρά</b>	<b>Περιγραφή</b>	<b>Βιβλιογραφική αναφορά</b>
HaCaT	Αυθόρμητα αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα δέρματος	Boukamp et al. (1988)
MRC-5	Φυσιολογικό στέλεχος εμβρυϊκών ινοβλαστών	Jacobs et al. (1970)
ΦΝΧ (Phoenix)	Αμφοτροπική κυτταρική σειρά πακεταρίσματος ρετροϊών	Αδημοσίευτη κυτταρική σειρά (ευγενική χορήγηση του Καθηγητή K. B. Marcu, State University of New York, Stony Brook)

Κύτταρα HaCaT, MRC-5 και η αμφοτροπική κυτταρική σειρά πακεταρίσματος ρετροϊών Phoenix (ΦΝΧ) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό μόσχου (Foetal Calf Serum) (Seromed), 100 IU/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη και 2 mM L-γλουταμίνη στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Όλα τα υλικά κυτταροκαλλιέργειας ήταν από τη Biochrom KG, Germany.

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



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

Πλήρες θρεπτικό υλικό κυττάρων DMEM: Σε 440 ml Dulbecco's MEM (DMEM) που περιείχε 3.7 g/l NaHCO<sub>3</sub> και 1,0 g/l D-γλυκόζης προστέθηκαν 50 ml ορού από έμβρυο μόσχου, 5.0 ml 10000IU/ml πενικιλίνης και 10000 μg/ml στρεπτομυκίνης και 5 ml 200 mM L- γλουταμίνης. Οι τελικές συγκεντρώσεις που προέκυψαν ήταν: 10% ορός από έμβρυο μόσχου, 100 μg/ml στρεπτομυκίνης, 100 IU/ml πενικιλίνης και 2 mM L- γλουταμίνης.

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

## 2.9. Ανακαλλιέργεια κυττάρων

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

Αρχικά επιλέχθηκαν τρυβλία των 90 mm, με κύτταρα σε πλήρες ταπήτιο (confluent) και το θρεπτικό υλικό DMEM αναρροφήθηκε με τη βοήθεια αποστειρωμένων πιπετών Pasteur. Στη συνέχεια τα τρυβλία εκπλύθηκαν δύο φορές με 10 ml PBS και ύστερα προστέθηκε 1 ml διάλυμα θρυψίνης-EDTA (Biochrom KG, Germany) σε αυτά. Το διάλυμα περιείχε 0.05% θρυψίνη / 0.02% EDTA (w/v) σε PBS χωρίς ιόντα ασβεστίου (Ca<sup>2+</sup>) και μαγνησίου (Mg<sup>2+</sup>). Τα κύτταρα αφέθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> για περίπου 2-5 λεπτά, ώστε να αποκολληθούν από το τρυβλίο. Μετά προστέθηκε ο κατάλληλος όγκος PBS στα τρυβλία, ώστε να γίνουν οι επιθυμητές διαιρέσεις, συνήθως σε αναλογίες 1:2, 1:4, 1:8 ή 1:16. Τέλος αφού προστέθηκε ο κατάλληλος όγκος εναιωρήματος κυττάρων στα νέα τρυβλία, ανάλογα με τη διαίρεση, προστέθηκαν



και 10 ml πλήρους DMEM και τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, ώστε να αναπτυχθούν τα κύτταρα εκ νέου.

### ***Ανάπτυξη, διατήρηση και αποθήκευση κυτταρικών σειρών***

#### **2.10. Διατήρηση των κυττάρων - Πάγωμα κυττάρων**

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

Για τη διατήρηση και τη βαθιά κατάψυξη των κυττάρων, επιλέχθηκαν τρυβλία με κύτταρα σε ημι-πλήρες ταπήτιο (semi-confluent) και αποκολλήθηκαν με θρυψίνη-EDTA όπως περιγράφεται στην παράγραφο 'ανακαλλιέργεια κυττάρων' (παρ. 2.9). Στη συνέχεια προστέθηκαν 9 ml PBS στα τρυβλία με τα αποκολλημένα κύτταρα και τη θρυψίνη-EDTA και τα εναιωρήματα των κυττάρων μεταβιβάστηκαν σε αποστειρωμένους σωλήνες Falcon των 15 ml. Έγινε φυγοκέντρηση στον ψυχρό θάλαμο για 5-10 λεπτά στις 1500-2000 rpm, και αφού οι σωλήνες μεταφέρθηκαν στην εστία κυτταροκαλλιέργειας κάθετης νοηματικής ροής, το υπερκείμενο αναρροφήθηκε προσεκτικά ώστε να μην υποστεί ζημιά το κυτταρικό ίζημα. Στη συνέχεια, σε κάθε σωλήνα Falcon προστέθηκαν 2 ml ορού (FCS) που περιείχε διμεθυλο-σουλφοξειδίου (DMSO) (Sigma Chemical Co.) και τα κύτταρα εναιωρήθηκαν με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης πλαστικής πιπέττας. Να σημειωθεί ότι το διμεθυλο-σουλφοξειδίου κάνει τις μεμβράνες ημιδιαπερατές, ενώ ταυτόχρονα ελαχιστοποιεί τον μεταβολισμό των κυττάρων. Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρθηκε σε 2 ειδικές αμπούλες (cryovials) των 2 ml, για κάθε Falcon (1 ml εναιωρήματος ανά Falcon). Οι αμπούλες τοποθετήθηκαν σε ειδικό ισοθερμικό δοχείο ('Mister Frosty', Nalgene) που περιείχε ισοπροπανόλη και μεταφέρθηκαν στους -70°C για όλη τη νύχτα ώστε να παγώσουν σταδιακά (1°C/λεπτό). Την επομένη ημέρα μεταφέρθηκαν στο υγρό άζωτο για μακρυπρόθεσμη διατήρηση.

Μέσο διατήρησης κυττάρων: 1,8 ml FCS και 0,2 ml DMSO (FCS -10% DMSO)



### 2.11. Ανασύσταση κυττάρων - Ξεπάγωμα κυττάρων

Οι αμπούλες από το υγρό άζωτο τοποθετήθηκαν για περίπου 1-2 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 37°C ώστε να ξεπαγώσουν τα κύτταρα και το περιεχόμενο μεταβιβάστηκε σε φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας των 25 cm<sup>2</sup>, όπου προστέθηκαν αργά 8 ml πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM. Τα κύτταρα ανακινήθηκαν ελαφρά και τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Την επόμενη ημέρα, αφού τα κύτταρα προσκολλήθηκαν στο δάπεδο των φλασκών, το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και προστέθηκαν 6 ml φρέσκου πλήρους DMEM και οι φλάσκες επανατοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο, ώσπου τα κύτταρα να σχηματίσουν πλήρες ταπήτιο. Όταν αναπτύχθηκαν σε πλήρες ταπήτιο θρυψινοποιήθηκαν και ανακαλλιεργήθηκαν, όπως περιγράφηκε παραπάνω (παρ. 2.9).

### 2.12. Καταμέτρηση κυττάρων με το αιμοκυτταρόμετρο

Μετά τη θρυψινοποίηση των κυττάρων και την αποκόλληση τους από τις φλάσκες ή τα τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας, 10 μl εναιωρήματος κυττάρων σε PBS τοποθετήθηκαν στο αιμοκυτταρόμετρο (Neubauer Chamber) όπου και έγινε η μέτρηση των κυττάρων σε δύο διαγώνια τετράγωνα από το σταυρό (τα οποία είναι διαιρεμένα σε 16 επιμέρους τετραγωνάκια, δηλαδή 2x16). Η μέτρηση επαναλήφθηκε τρεις φορές, υπολογίσθηκε ο μέσος όρος των κυττάρων των μετρήσεων, διαιρέθηκε δια 100 και πολλαπλασιάστηκε x 10<sup>6</sup> παρέχοντας έτσι το συνολικό αριθμό των κυττάρων x 10<sup>6</sup> ανά ml του αρχικού εναιωρήματος κυττάρων.

### 2.13. Χρώση κυττάρων με κρυσταλλικό ιώδες

Το θρεπτικό υλικό από τα τρυβλία με τις μονοστοιβάδες κυττάρων αναρροφήθηκε και τα κύτταρα εκπλύθηκαν δύο φορές με 5-10ml PBS. Στη συνέχεια προστέθηκαν 5 ml μεθανόλης:συμπυκνωμένου (glacial) οξικού οξέος σε αναλογία 3:1 για τη σταθεροποίηση (μονιμοποίηση) των κυττάρων και το διάλυμα παρέμεινε για 10-20 δευτερόλεπτα. Το μίγμα αναρροφήθηκε και προστέθηκαν 5 ml κρυσταλλικού ιώδους (Crystal Violet) (διάλυμα 0.5 mg/ml σε δις-απεσταγμένο νερό), ώστε να καλυφθούν πλήρως τα κύτταρα για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη συλλογή του κρυσταλλικού ιωδίου, οι αποικίες εκπλύθηκαν με το νερό της βρύσης. Αφού στέγνωσε το τρυβλίο, οι αποικίες επιμετρήθηκαν για



την αποτελεσματικότητα της σποράς (P.E; plating efficiency) που εκφράστηκε ως το ποσοστό του αριθμού των αποικιών προς τον αριθμό κυττάρων που έχουν σπαρεί.

$$\% \text{ P.E.} = \frac{\text{Αριθμός Αποικιών}}{\text{Αριθμός κυττάρων αρχικής σποράς}} \times 100$$

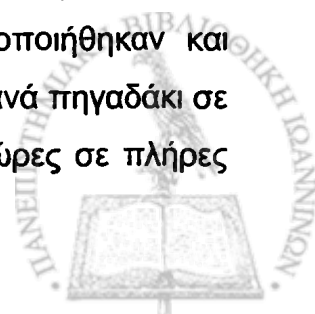
Σε μετρήσεις κυττάρων κάτω από διαφορετικές συνθήκες [π.χ. χωρίς και μετά από επεξεργασία με C<sub>2</sub>-κεραμίδιο ή Θειικό βαναδύλιο (VOSO<sub>4</sub>)] το κλάσμα του αριθμού αποικιών χωρίς επεξεργασία προς το κλάσμα του αριθμού αποικιών με επεξεργασία αποτελούσε την επί τοις % βιωσιμότητα των κυττάρων κάτω από διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας.

#### 2.14. Καμπύλες αύξησης

Κύτταρα HaCaT και HaCaT που έκφραζαν διαφορετικά γονίδια (HaCaTneo, HaCaTΑροJ/6, HaCaTBcl-2/2, HaCaTc-fos και HaCaTv-fos), σε πλήρες ταπήτιο θρυψινοποιήθηκαν και μετρήθηκαν σε αιμοκυτταρόμετρο. Έγινε σπορά 2.5x10<sup>4</sup> κυττάρων ανά πηγαδάκι σε πολυτρυβλίο 24 πηγαδιών και διαμέτρου 18 mm και τα κύτταρα επώαστηκαν για 12-14 ημέρες σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Μετά από 24 ώρες από την σπορά τους κύτταρα από δύο πηγαδάκια ανά κάθε κυτταρική σειρά μετρήθηκαν ώστε να υπολογισθεί ο αριθμός των κυττάρων που επικολλήθηκαν. Η ανάπτυξη των κυττάρων παρακολουθήθηκε για διάστημα 12-14 ημερών, με μέτρηση σε αιμοκυτταρόμετρο των κυττάρων δύο πηγαδιών ανά κυτταρική σειρά κάθε 2 ημέρες, ώστε να σχεδιαστούν καμπύλες αύξησης και να υπολογισθεί ο ρυθμός αύξησής τους.

#### 2.15. Επεξεργασία κυττάρων HaCaT με C<sub>2</sub>-κεραμίδιο και ανάλυση της αύξησης τους

Κύτταρα HaCaT και HaCaT που έκφραζαν διαφορετικά γονίδια (HaCaTneo, HaCaTΑροJ/6 και HaCaTBcl-2/2) σε πλήρες ταπήτιο θρυψινοποιήθηκαν και μετρήθηκαν σε αιμοκυτταρόμετρο. Έγινε σπορά 1x10<sup>5</sup> κυττάρων ανά πηγαδάκι σε πολυτρυβλίο 24 πηγαδιών και τα κύτταρα επώαστηκαν για 36 ώρες σε πλήρες

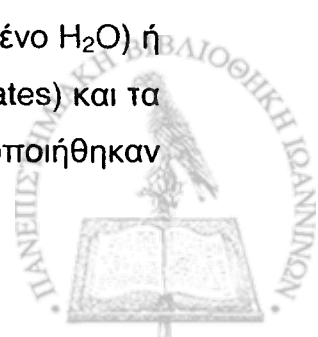


θρεπτικό υλικό DMEM στους 37°C, 5%CO<sub>2</sub>. Μετά από 36 ώρες, προστέθηκαν 1.5 ml θρεπτικού υλικού χωρίς ορό και τα κύτταρα επωάστηκαν για 1 ώρα. Στην συνέχεια το θρεπτικό υλικό χωρίς ορό ανανεώθηκε και χορηγήθηκαν 0, 5, 10, 20 και 40 μM C<sub>2</sub>-κεραμιδίου (σε 100% αιθανόλη) ή 0.4% αιθανόλης (control) ανά κάθε δύο πηγαδάκια (in duplicates) και τα κύτταρα επωάστηκαν για 12, 24 ή 48 ώρες. Μετά την πάροδο των συγκεκριμένων χρόνων, τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν και μετρήθηκαν σε αιμοκυτταρόμετρο. Ο αριθμός των κυττάρων με ή χωρίς C<sub>2</sub>-κεραμίδιο υπολογίστηκε επί τις % του αριθμού των κυττάρων επεξεργασμένων με αιθανόλη.

Για την επίδραση του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου στον σχηματισμό αποικιών, 200 κύτταρα HaCaT και HaCaT που έκφραζαν διαφορετικά γονίδια (HaCaTneo, HaCaTArpJ/6 και HaCaTBcl-2/2) ανά τρυβλίο 6 cm καλλιεργήθηκαν για 36 ώρες σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Μετά τις 36 ώρες, το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και αντικαταστάθηκε με 3 ml φρέσκου θρεπτικού υλικού DMEM χωρίς ορό για 1 ώρα. Στην συνέχεια χορηγήθηκαν 0, 5, 10, 20 και 40 μM C<sub>2</sub>-κεραμιδίου (σε 100% αιθανόλη) ή 0.4 % αιθανόλης ανά κάθε δύο τρυβλία (in duplicates) και τα κύτταρα επωάστηκαν για επιπλέον 24 ώρες. Το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και αντικαταστάθηκε με πλήρες θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 12-14 ημέρες για την ανάπτυξη των αποικιών. Το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και οι αποικίες χρωματίστηκαν με 0.5 mg/ml κρυσταλλικό ιώδες, όπως περιγράφεται παραπάνω (παρ. 2.13).

## **2.16. Επεξεργασία κυττάρων HaCaT με Θειικό βαναδύλιο (VOSO<sub>4</sub>) και ανάλυση της αύξησης τους**

Κύτταρα HaCaT και HaCaT που έκφραζαν διαφορετικά γονίδια (HaCaTneo, HaCaTArpJ/6, HaCaTBcl-2/2, HaCaTc-fos και HaCaTv-fos) σε πλήρες ταπήτιο θρυψινοποιήθηκαν και μετρήθηκαν σε αιμοκυτταρόμετρο. Έγινε σπορά 1x10<sup>5</sup> κυττάρων ανά πηγαδάκι σε πολυτρυβλίο 24 πηγαδιών και τα κύτταρα επωάστηκαν για 36 ώρες σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Μετά από 36 ώρες, προστέθηκαν 1.5 ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM με ή χωρίς 0, 25, 50, 100, 200, 500 και 1000 μM VOSO<sub>4</sub> (σε δις-απεσταγμένο H<sub>2</sub>O) ή αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό ανά κάθε δύο πηγαδάκια (in duplicates) και τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν





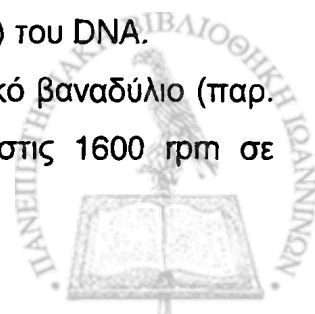
και μετρήθηκαν σε αιμοκυτταρόμετρο. Ο αριθμός των κυττάρων με ή χωρίς  $\text{VO}_2$  υπολογίστηκε επί τις % του αριθμού των κυττάρων επεξεργασμένων με νερό.

Για την επίδραση του  $\text{VO}_2$  στον σχηματισμό αποικιών, 200 κύτταρα HaCaT και HaCaT που έκφραζαν διαφορετικά γονίδια (HaCaTneo, HaCaTArpJ/6, HaCaTBcl-2/2, HaCaTc-fos και HaCaTv-fos) ανά τρυβλίο 6cm καλλιεργήθηκαν για 36 ώρες σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Μετά τις 36 ώρες, θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και αντικαταστάθηκε με 3 ml πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM με ή χωρίς 0, 25, 50, 100, 200, 500 και 1000  $\mu\text{M}$   $\text{VO}_2$  (σε ddH<sub>2</sub>O) ή αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό ανά κάθε δύο τρυβλία (in duplicates) και τα κύτταρα επώαστηκαν για επιπλέον 24 ώρες. Το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και αντικαταστάθηκε με πλήρες θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 12-14 ημέρες για την ανάπτυξη των αποικιών. Το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και οι αποικίες χρωματίστηκαν με 0.5 mg/ml κρυσταλλικό ιώδες, όπως περιγράφεται παραπάνω (παρ. 2.13).

## 2.17. Προσδιορισμός αποκλεισμού της trypan blue

Ένα από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του κυτταρικού θανάτου είναι η απώλεια της ακεραιότητας των μεμβρανών, επακόλουθο της οποίας είναι η ανικανότητα των κυττάρων να αποκλείουν ζωτικές χρωστικές ουσίες, όπως η trypan blue (Gorman et al., 1996). Αυτή η μέθοδος του αποκλεισμού της trypan blue είναι χρήσιμη ως μια προκαταρκτική μέθοδος υπολογισμού του κυτταρικού θανάτου από διάφορους παράγοντες. Όμως, ο τρόπος του κυτταρικού θανάτου δεν μπορεί να μελετηθεί με αυτή τη μέθοδο αφού νεκρωτικά και αποπτωτικά κύτταρα μπορούν να προσλάβουν τη χρωστική. Επίσης υπάρχει η πιθανότητα της υποτίμησης του βαθμού του κυτταρικού θανάτου, καθώς αποπτωτικά κύτταρα σε πρώιμα στάδια διατηρούν την ακεραιότητα των μεμβρανών τους για αρκετές ώρες. Επομένως, αυτά τα αποπτωτικά κύτταρα θα αποκλείουν την είσοδο της χρωστικής και θα συμπεριλαμβάνονται στον υπολογισμό ως ζωντανά. Είναι λοιπόν φανερό ότι ο προσδιορισμός του αποκλεισμού της trypan blue θα πρέπει να χρησιμοποιείται μαζί με άλλες βιοχημικές τεχνικές, όπως η κατάτμηση (τμηματοποίηση) του DNA.

Κύτταρα επεξεργασμένα με C<sub>2</sub>-κεραμίδιο (παρ. 2.15) ή θειικό βαναδύλιο (παρ. 2.16) θρυψινοποιήθηκαν, συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 1600 rpm σε



θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα εκπλύθηκε με PBS και επαναιωρήθηκε σε 0.5 ml PBS. Στο εναιώρημα αναμίχθηκε με 0.5 ml διαλύματος trypan blue και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5-8 λεπτά (όχι περισσότερο από 10 λεπτά καθώς η trypan blue είναι τοξική στα κύτταρα), επαρκή χρόνο για τη πρόσληψη της χρωστικής ουσίας. Μετά από μια σύντομη εναιώρηση, 10 μl του εναιωρήματος τοποθετήθηκαν σε ένα αιμοκυτταρόμετρο (Neubauer chamber) και τα κύτταρα εξετάστηκαν και μετρήθηκαν κάτω από ένα οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση x40). Τα νεκρά κύτταρα χρωματίζονται μπλε, ενώ τα ζωντανά κύτταρα είναι συνήθως άχρωμα ή επιδεικνύουν χρυσή-καφέ χρώση με ομαλές ακέραιες δομές. Στο αιμοκυτταρόμετρο καταμετρήθηκαν τα ζωντανά κύτταρα και ο αριθμός τους υπολογίσθηκε όπως περιγράφεται παραπάνω (παρ. 2.12) σαν ποσοστό:

$$\% \text{ Ζωντανά κύτταρα} = \frac{\text{Αριθμός ζωντανών κυττάρων}}{\text{Συνολικός αριθμός κυττάρων}} \times 100$$

0.4% Διάλυμα Trypan Blue (Sigma Chemical Co., Cat. No: T8154)



## **ΕΝΟΤΗΤΑ III: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ**

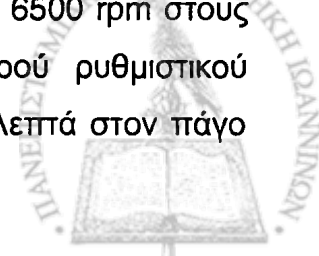
### **(A) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ**

#### **2.18. Απομόνωση χαμηλού μοριακού βάρους γενομικού DNA**

Χαμηλού μοριακού βάρους γενομικό DNA απομονώθηκε από κύτταρα HaCaT και HaCaT που έφεραν διαφορετικά γονίδια (HaCaTneo, HaCaTBcl-2/2, HaCaTArpJ/6, HaCaTc-fos και HaCaTv-fos) και από MRC-5 ή MRC-5 που έφεραν διαφορετικά γονίδια (MRC-5Puro, MRC-5Bcl-2 και MRC-5ArpJ). Σκοπός της διαδικασίας αυτής ήταν να μελετηθεί εάν και κατά πόσο επάγεται απόπτωση από παράγοντες όπως το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο ή το θειικό βαναδύλιο (VOSO<sub>4</sub>).

Τα κύτταρα που προορίζονταν για την απομόνωση χαμηλού μοριακού βάρους γενομικού DNA καλλιεργήθηκαν για 36 ώρες σε χαμηλή πυκνότητα (1.5 - 2x10<sup>6</sup> κύτταρα ανά 100 mm τρυβλίο) πριν τη χορήγηση C<sub>2</sub>-κεραμιδίου ή VOSO<sub>4</sub>. Μετά την πάροδο των 36 ωρών, το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και προστέθηκαν 5 ml θρεπτικού υλικού χωρίς ορό για 1 ώρα πριν την χορήγηση του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου. Το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε πάλι με 5 ml θρεπτικού υλικού χωρίς ορό με ή χωρίς C<sub>2</sub>-κεραμίδιο (0, 5, 10, 20 και 40 μM) ή 0.4% αιθανόλη και τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες στους 37°C, 5%CO<sub>2</sub>. Για τη χορήγηση θειικού βαναδυλίου, προστέθηκαν 5 ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM με ή χωρίς (0, 25, 50, 100, 200, 500 και 1000 μM) θειικό βαναδύλιο και τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες στους 37°C, 5%CO<sub>2</sub>.

Χαμηλού μοριακού βάρους γενομικό DNA απομονώθηκε από επικολλημένα και επιπλέοντα στο θρεπτικό υλικό κύτταρα όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Sugiki et al., 2000). Περιληπτικά, επιπλέοντα κύτταρα στο θρεπτικό υλικό συλλέχθηκαν σε 15 ml σωλήνα Falcon και διατηρήθηκαν σε πάγο. Τα επικολλημένα κύτταρα εκπλύθηκαν 2 φορές με PBS-1mM EDTA pH8.0 και τα εκπλύματα προστέθηκαν στον σωλήνα Falcon. Τα επικολλημένα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν, συλλέχθηκαν στον σωλήνα Falcon μαζί με τα επιπλέοντα κύτταρα και φυγοκεντρήθηκαν στις 2000 rpm στους 4°C. Το κυτταρικό ίζημα εναιωρήθηκε σε 1 ml PBS-1 mM EDTA pH 8.0, μεταφέρθηκε σε σωλήνες eppendorf και επαναφυγοκεντρήθηκε σε μικροφυγόκεντρο στις 6500 rpm στους 4°C. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 μl ψυχρού ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης DNA (DNA lysis buffer), αφέθηκε για 5 λεπτά στον πάγο



και φυγοκεντρήθηκε για 20 λεπτά στις 13000 rpm στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε ένα καθαρό αποστειρωμένο σωλήνα errendorff και επωάστηκε διαδοχικά με 2 mg/ml RNάση A για 2 ώρες στους 37°C και με 250 μg/ml πρωτεϊνάση K για 2 ώρες στους 37°C. Μετά τις επωάσεις, προστέθηκαν 20 μl 5 M NaCl και 120 μl ισοπροπανόλης και τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -20°C όλη τη νύχτα για την κατακρήμνιση του DNA. Μετά από φυγοκέντρηση στις 13000 rpm στους 4°C για 20 λεπτά, το DNA εκπλύθηκε με 70% αιθανόλη και το ίζημα του DNA αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά για να στεγνώσει. Στη συνέχεια εναιωρήθηκε σε 20 μl ρυθμιστικό διάλυμα 1XTE pH7.4.

Τα δείγματα του DNA αναλύθηκαν σε 1.6% πηκτή αγαρόζης που περιείχε 0.5 μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης DNA 0.5XTBE σε τάση 70V για 3 ώρες. Το DNA ανιχνεύθηκε κάτω από λάμπα υν και φωτογραφήθηκε (παρ. 2.20).

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

## **2.19. Απομόνωση ολικού RNA με τη μέθοδο του χλωριούχου λιθίου - ουρίας**

Η απομόνωση άθικτου (μη-αποικοδομημένου) RNA απαιτεί την προσθήκη στο διάλυμα ομογενοποίησης ισχυρών χαστροπικών παραγόντων που απελευθερώνουν το RNA από τη σύνδεσή του με τις ριβοπρωτεΐνες και παράλληλα απενεργοποιούν τις ριβονουκλεάσες.

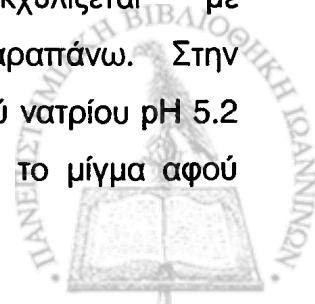
Επειδή το RNA είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στη δράση των ριβονουκλεασών, κατά τη διάρκεια των χειρισμών του μορίου πρέπει να λαμβάνονται οι απαραίτητες προφυλάξεις ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα αποικοδόμησής του. Όλα τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλής μοριακής καθαρότητας όπως LiCl, Tris, Ουρία, EDTA, αιθανόλη (Riedel, Germany), SDS (Gibco BRL Life Technologies) και φαινόλη (Sigma Chemical Co). Τα γυαλικά, τα πλαστικά και τα διαλύματα αποστειρώνονταν στο αυτόκαυστο, ενώ τα διαλύματα που ήταν ευαίσθητα στη θερμοκρασία αποστειρώνονταν με διήθηση σε φίλτρα 0.2 μm Nalgene (Nalgene Rochester, USA).

Για την απενεργοποίηση των ριβονουκλεασών που τυχόν υπήρχαν σε διαλύματα, γίνονταν επεξεργασία των διαλυμάτων με διαιθυλο-ανθρακικό (DEPC) (Sigma Chemical Co.).



Για την απομόνωση ολικού RNA με τη μέθοδο του LiCl-ουρίας χρησιμοποιήθηκε φαινόλη που είχε εξισορροπηθεί σύμφωνα με πρότυπες τεχνικές (Sambrook et al., 1989), ώστε η υδατική φάση να έχει pH μεγαλύτερο από 7.6. Στην εξισορροπημένη φαινόλη προστέθηκε διάλυμα 1XTES πριν τη χρήση της (Φαινόλη/TES).

Η απομόνωση ολικού RNA με τη μέθοδο του LiCl-ουρίας είναι προσαρμοσμένη από τους Auffray and Rougeon (1980) και έγινε ως εξής: Κύτταρα HaCaT καλλιεργημένα σε 5 τρυβλία 10 cm εκπλύθηκαν με ψυχρή PBS-1 mM EDTA pH 8.0 και συλλέχθηκαν με θρυψινοποίηση και φυγοκέντρηση σε αποστειρωμένους σωλήνες Falcon 15 ml. Στο κυτταρικό ίζημα προστέθηκαν 7 ml ψυχρού διαλύματος 3M LiCl-6M ουρίας και τα κύτταρα εναιωρήθηκαν με δίνη (vortexing) για 2 λεπτά και στη συνέχεια έγινε κατεργασία με υπέρηχους (sonication) στον πάγο για 2 λεπτά. Αυτά τα στάδια έχουν ως αποτέλεσμα τη λύση των κυτάρων, την αύξηση της ποσότητας του RNA που θα απομονωθεί καθώς επίσης και τη βελτίωση της ποιότητάς του αφού καταστρέφεται το κυτταρικό DNA. Το εναιώρημα διατηρήθηκε στους 4°C για όλη τη νύχτα πριν την περαιτέρω επεξεργασία του. Στη συνέχεια το κυτταρικό εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε στις 6000 rpm για 25 λεπτά στους 4°C σε κεφαλή αιωρούμενων κάδων σε ψυχόμενη φυγόκεντρο Heraeus (Μοντέλο Biofuge 17RS). Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε προσεκτικά και αφού προστέθηκαν 3.5 ml ψυχρού διαλύματος 3M LiCl-6M ουρίας (δηλ. ½ όγκοι του αρχικού), το ίζημα αναμίχθηκε καλά με δίνη (vortexing) και επαναφυγοκεντρήθηκε όπως παραπάνω. Μετά τη φυγοκέντρηση, προστέθηκαν 3.5 ml 1XTES και το ίζημα αναμίχθηκε καλά με δίνη μέχρι να διαλυθεί. Στη συνέχεια προστέθηκαν διαδοχικά 3.5 ml φαινόλης/TES και 3.5 ml χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και το ίζημα αναμίχθηκε καλά με δίνη για 2 λεπτά και κατόπιν εκχυλίστηκε σε ανακινητή για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 3000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου και η άνω υδατική φάση μεταφέρθηκε σε έναν καθαρό αποστειρωμένο σωλήνα Falcon 15 ml. Σε περίπτωση που η υδατική φάση δεν είναι καθαρή λόγω της αφθονίας πολυσακχαριτών (συνήθως συμβαίνει σε μεγάλες παρασκευές ολικού RNA) τότε επανεκχυλίζεται με φαινόλης/TES:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη, όπως παραπάνω. Στην υδατική φάση προστέθηκαν, στη συνέχεια, 1/10 όγκοι 3M οξικού νατρίου pH 5.2 (~0.4 ml) και 2 όγκοι ψυχρής 100% αιθανόλης (~9.0 ml) και το μίγμα αφού



ανακινήθηκε καλά τοποθετήθηκε στους  $-40^{\circ}\text{C}$  για όλη τη νύχτα για να κατακρημνιστεί το RNA. Την επομένη ημέρα, το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 6000 rpm για 25 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$  σε κεφαλή αιωρούμενων κάδων σε ψυχόμενη φυγόκεντρο Heraeus και το ίζημα RNA εκπλύθηκε με ψυχρή 75% αιθανόλη. Το RNA που απομονώθηκε διαλύθηκε σε 100 μl αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό επεξεργασμένο με DEPC, μεταφέρθηκε σε καθαρούς, αποστειρωμένους σωλήνες errendorff και διατηρήθηκε στους  $-40^{\circ}\text{C}$  μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Η ποσότητα του απομονωμένου RNA υπολογίζεται φωτομετρικά με μέτρηση στα 260 nm και με βάση τον τύπο: Οπτική πυκνότητα  $(\text{O.D})_{260} = 25$  αντιστοιχεί σε 1 mg/ml RNA ή  $\text{OD}_{260} = 1$  αντιστοιχεί σε 40 μg RNA. Η καθαρότητα του RNA υπολογίζεται επίσης φωτομετρικά με μέτρηση στα 260 nm και στα 280 nm. Όταν ο λόγος των μετρήσεων 260 nm/280 nm είναι μεγαλύτερος από 1.7 το RNA θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας.

Δις-απεσταγμένο νερό επεξεργασμένο με δισαιθυλο-ανθρακικό (DEPC-ddH<sub>2</sub>O): 100 μl DEPC προσθέτονται σε 500 ml δις-απεσταγμένου νερού (ή διαλύματος) [τελική συγκέντρωση 0.1% DEPC (v/v)] και το DEPC διαλύεται με γρήγορη ανακίνηση για περίπου 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το νερό (ή το διάλυμα) αποστειρώνονται στο αυτόκαυστο.

Διάλυμα 3M LiCl-6M Ουρίας: Διαλύονται 127.2g LiCl και 360.36g ουρίας σε 1 λίτρο αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό επεξεργασμένο με DEPC. Το διάλυμα φιλτράρεται διαμέσου ενός φίλτρου 0.45 μm Nalgene και αποθηκεύεται στους  $4^{\circ}\text{C}$ .

1XTE pH 7.6, 0.5% SDS (1XTES): 10 mM Tris pH 7.6, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS σε DEPC-ddH<sub>2</sub>O το οποίο αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο πριν την προσθήκη SDS

Φαινόλη/TES: Εξισορροπημένη φαινόλη (Sambrook et al., 1989) κορεσμένη με 1XTES

3M Οξικό Νάτριο pH 5.2: Παρασκευάζεται διάλυμα 3M οξικού νατρίου σε δις-απεσταγμένο νερό και το pH ρυθμίζεται στο 5.2 με συμπυκνωμένο οξικό οξύ. Στο διάλυμα γίνεται επεξεργασία με DEPC και αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο. Διατηρείται στους  $4^{\circ}\text{C}$ .



## **(B) ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ**

### **2.20. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης**

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

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

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

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

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οριζόντιες πηκτές αγαρόζης 1% σε 0.5XTBE για την ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού ή ρετροϊικού DNA και πηκτές αγαρόζης 1.6% σε 0.5XTBE για την ηλεκτροφόρηση χαμηλού μοριακού βάρους γενομικού DNA. Η στερεά αγαρόζη σε 0.5XTBE θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων έως βρασμού και αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία 50–56°C πριν την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/ml. Το διάλυμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και εισήχθη στο διάλυμα ένα κατάλληλο χτενάκι για τη δημιουργία επίπεδης πηκτής με υποδοχές ('πηγαδάκια'). Μετά το πολυμερισμό της αγαρόζης και το



σχηματισμό της πηκτής (gel), προστέθηκε ο απαραίτητος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος 0.5XTBE ώστε να καλυφθεί η πηκτή αγαρόζης και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις υποδοχές ('πηγαδάκια') της πηκτής αφού αναμείχθηκαν σε αναλογία 1:10 με διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων (sample loading buffer) για την κατακρήμνιση του DNA και την παρακολούθηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης (ολικός όγκος δειγμάτων 25  $\mu$ l). Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν και μάρτυρες DNA με γνωστά, κλιμακούμενα μοριακά βάρη όπως 1 kb DNA ladder, Lambda DNA-Hind III digest και Lambda DNA-BstEII Digest (Gibco BRL Life Technologies Inc.). Μπορούν έτσι να υπολογιστούν προσεγγιστικά τα μοριακά βάρη των προς έλεγχο τμημάτων του DNA.

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

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

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

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

## 2.21. Ηλεκτροφόρηση RNA

Η ηλεκτροφόρηση του RNA διεξήχθη σε 1% πηκτή αγαρόζης σε 1XMOPS που περιείχε 2.2M φορμαλδεΰδη (παρ. 2.27).





## **(Γ) ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ**

### **1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ DNA**

#### **2.22. Κοπή πλασμιδίων με περιοριστικά ένζυμα**

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

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

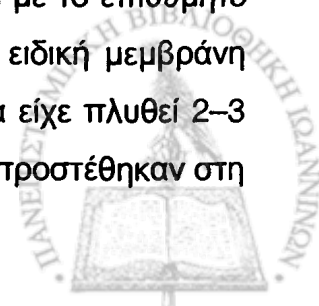
#### **2.23. Ανάκτηση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης με ηλεκτροδιήθηση**

Η ανάκτηση τμημάτων DNA από πηκτές αγαρόζης πραγματοποιείται συνήθως για δύο βασικούς λόγους:

1. Για την απομόνωση ενός επιθυμητού γονιδίου ή τμήματος γονιδίου με προορισμό την παρασκευή κατάλληλου ιχνηθέτη (παρ. 2.28) για τον υβριδισμό νουκλεϊκών οξέων (παρ. 2.29).
2. Για την απομόνωση ενός γονιδίου και την κλωνοποίηση του σε έναν πλασμιδιακό φορέα (π.χ. ευκαρυωτικό φορέα έκφρασης, ρετροϊικό φορέα) (παρ. 2.26, 2.35).

Σε περίπτωση ανάκτησης ενός τμήματος DNA από πηκτή αγαρόζης (1% σε 0.5XTBE) ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

Το τμήμα της πηκτής αγαρόζης που περιλαμβάνει τη ζώνη με το επιθυμητό γονίδιο κόπηκε με αποστειρωμένη λεπίδα και μεταφέρθηκε σε ειδική μεμβράνη κυτταρίνης (μεμβράνη διαπίδυσης, παρ. 2.24) (~10 cm) η οποία είχε πλυθεί 2–3 φορές με αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό και στην οποία προστέθηκαν στη



συνέχεια 3 - 4 ml 0.5XTBE ώστε να καλυφθεί το κομμάτι της πηκτής αγαρόζης. Τα άκρα της μεμβράνης κλείστηκαν με ειδικά κλιπς. Η μεμβράνη τοποθετήθηκε στη οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και εφαρμόσθηκε τάση 100 volts για 1-2 ώρες με σκοπό την έξοδο του DNA από την πηκτή στο διάλυμα 0.5XTBE. Η κατάσταση του DNA στη μεμβράνη ελέγχεται τακτικά σε UV. Εάν έχει κολλήσει στα τοιχώματα της μεμβράνης αντιστρέφουμε για 1-2' τη φορά της ηλεκτροφόρησης. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης η μεμβράνη ανοίχθηκε από το ένα άκρο της και το DNA με 0.5XTBE μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο σωλήνα Falcon 15ml. Η μεμβράνη εκπλύθηκε με 2ml αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό, το οποίο προστέθηκε στο σωλήνα Falcon. Στη συνέχεια προστέθηκε ένας ίσος όγκος εξισορροπημένης φαινόλης (Sambrook et al., 1989) και ένας ίσος όγκος χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και το μίγμα αναδεύθηκε με δίνη (vortex) και κατόπιν φυγοκεντρήθηκε στις 3.500 rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο (υδάτινη φάση, ~4-5 ml) μεταφέρθηκε στη συνέχεια σε καθαρό σωλήνα, αναμείχθηκε με έναν ίσο όγκο χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και επαναφυγοκεντρήθηκε όπως παραπάνω. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε πάλι σε έναν καθαρό αποστειρωμένο σωλήνα Falcon 15ml και προστέθηκαν 2 όγκοι αιθανόλης και 1/10 όγκοι 3M οξικού νατρίου pH 5.2. Αφού αναμείχθηκε καλά, διατηρήθηκε στους -40°C καθόλη τη διάρκεια της νύχτας για την κατακρήμνιση του DNA. Την επομένη ημέρα φυγοκεντρήθηκε στις 6000 rpm στους 4°C για 30 λεπτά και το ίζημα εκπλύθηκε με 70% αιθανόλη. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε προσεκτικά και το ίζημα εναιωρήθηκε σε 100 μl 1XTE pH 8.0. Το διάλυμα DNA μεταφέρθηκε σε ένα σωλήνα erpendorff και διατηρήθηκε στους -40°C έως ότου χρησιμοποιηθεί.

1XTE pH 8.0: 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0

## 2.24. Παρασκευή μεμβρανών διαπίδυσης (dialysis tubing)

Αρχικά έγινε κοπή των μεμβρανών σε κατάλληλο μήκος (~10 cm) και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε διάλυμα που περιείχε 2% (w/v) διττανθρακικού νατρίου που περιείχε 1 mM EDTA pH 8.0 για να βράσουν για 10 λεπτά. Στη συνέχεια οι μεμβράνες εκπλύθηκαν με αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό και τοποθετήθηκαν σε 1 mM EDTA pH 8.0 για να επαναθερμανθούν στους 100°C



για άλλα 10 λεπτά. Μετά την έκπλυση τους με αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό, διατηρήθηκαν σε αιθανόλη στους 4°C.

## 2.25. Αποφωσφορυλίωση του DNA

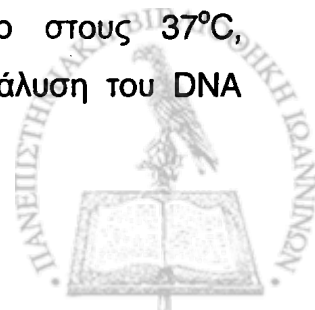
Η αποφωσφορυλίωση του DNA, που χρησιμοποιείται στην κλωνοποίηση τμημάτων DNA (π.χ. ενός γονιδίου σε ένα φορέα έκφρασης), αναφέρεται στην αφαίρεση των 5'-φωσφορικών ομάδων από την αλκαλική φωσφατάση ώστε να κατασταλεί η αυτοσύνδεση ή επανακυκλοποίηση τμημάτων DNA μετά από πέψη με ένζυμα περιορισμού. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε έχει περιγραφεί λεπτομερώς (Sambrook et al., 1989). Περιληπτικά, 2 µg γραμμικού πλασμιδιακού (φορέας έκφρασης) DNA (μετά από πέψη) επωάστηκαν με 1 μονάδα εντερικής αλκαλικής φωσφατάσης (Boehringer Mannheim Corporation Ltd) σε ρυθμιστικό διάλυμα 1XCIP για όλη τη νύχτα στους 37°C για την αποφωσφορυλίωση του DNA. Η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη 300 mM EDTA pH 8.0. Το DNA εκχυλίστηκε με φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (24:24:1) και κατακρημνίσθηκε με τη προσθήκη 1/10 όγκων οξικού νατρίου pH 5.2 και 2 όγκων 100% αιθανόλης στους -20°C (Sambrook et al., 1989).

Ρυθμιστικό διάλυμα 10XCIP: 100 mM Tris-Cl pH 8.3, 10 mM ZnCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Σπερμιδίνη

## 2.26. Σύνδεση τμημάτων DNA

Για τη σύνδεση τμημάτων DNA (π.χ. κλωνοποίηση ενός γονιδίου σε ένα φορέα έκφρασης), τα τμήματα αναμίχθηκαν σε αναλογία 3:1 (γονίδιο/φορέα έκφρασης) παρουσία της T4 DNA λιγάσης. Περιληπτικά, 300 ng αποφωσφορυλιωμένου DNA φορέα έκφρασης και 1 µg DNA γονιδίου αναμίχθηκαν με 1 Χρυσμιστικό διάλυμα λιγάσης και 1 μονάδα T4 DNA λιγάσης σε έναν όγκο 20 µl και επωάστηκαν για όλη τη νύχτα στους 16°C.

Ίκανά (επιδεκτικά) βακτήρια' μετασχηματίσθηκαν στη συνέχεια με το μείγμα όπως περιγράφηκε παραπάνω (παρ. 2.3) και επιστρώθηκαν σε τρυβλία L-agar που περιείχαν 100 µg/ml αμπικιλίνη (παρ. 2.1). Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν μετά από την ολονύχτια επώαση σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C, χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση (παρ. 2.6) και την ανάλυση του DNA (παρ. 2.20, 2.22).



## 2. ΑΝΑΛΥΣΗ RNA

### 2.27. Ηλεκτροφόρηση του RNA

Μετά από την απομόνωση (παρ. 2.19), το ολικό RNA ηλεκτροφορήθηκε σε 1% πηκτή αγαρόζης σε 0.5XTBE για να γίνει έλεγχος της ακεραιότητας του παρασκευάσματος.

Όπως κατά τη διάρκεια της απομόνωσης του RNA έτσι και κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησής του λαμβάνονται ειδικές προφυλάξεις για την προστασία του μορίου από τη δράση των ριβονουκλεασών. Για το λόγο αυτό οι συσκευές ηλεκτροφόρησης διατηρήθηκαν σε διάλυμα 0.1 M NaOH για δύο ώρες τουλάχιστον πριν τη χρήση και στη συνέχεια εκπλύθηκαν με αποστειρωμένο DEPC-ddH<sub>2</sub>O (Sambrook et al., 1989).

Η ηλεκτροφόρηση του RNA πραγματοποιήθηκε σε 1% πηκτή αγαρόζης-2.2M φορμαλδεΐδη (Krumlauf et al., 1994; Kolettas and Rosenberger, 1998) ως εξής:

2 g αγαρόζης διαλύθηκαν με βρασμό σε 156 ml αποστειρωμένου DEPC-ddH<sub>2</sub>O και το διάλυμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 60°C για να αποκτήσει τη συγκεκριμένη θερμοκρασία. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10 ml 20XMOPS και 34 ml 37% φορμαλδεΐδη (τελική συγκέντρωση 2.2 M) (Analar, BDH-Merck) και το μίγμα τοποθετήθηκε στη συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, όπου τοποθετήθηκε ένα χτενάκι για τη δημιουργία επίπεδης πηκτής με υποδοχές ('πηγαδάκια').

Τα δείγματα ολικού RNA (30 μg σε 10 μl DEPC-ddH<sub>2</sub>O) αναμίχθηκαν με το ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων RNA, θερμάνθηκαν για να αποδιαταχθούν στους 60°C για 15 λεπτά και τοποθετήθηκαν στον πάγο. Αμέσως μετά τοποθετήθηκαν στις υποδοχές ('πηγαδάκια') της πηκτής και η ηλεκτροφόρηση άρχισε σε θερμοκρασία δωματίου με σταθερή τάση 70 Volt για 5-7 ώρες μέχρι το κυανούν της βρωμοφαινόλης να φθάσει περίπου 2-3 cm από το τέλος της πηκτής.

20XMOPS: 0.4 M MOPS pH 7.0, 0.1M οξικό νάτριο, 0.02m EDTA pH 8.0.

Αποστειρώθηκε στο αυτόκαυστο μετά από επεξεργασία με DEPC.

Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων RNA: 2μl 20XMOPS, 20μl απιονισμένο φορμαμίδιο, 7μl 37% φορμαλδεΐδη, 4 μl μπλε χρωστική

Μπλε χρωστική: 50% αποστειρωμένη γλυκερόλη (παρασκευασμένη σε DEPC-ddH<sub>2</sub>O), 1XMOPS, 0.01% κυανούν της βρωμοφαινόλης



## 2.28. Παρασκευή ανιχνευτή με ιχνηθέτη του DNA

Η ιχνηθέτηση του DNA γίνεται με την μέθοδο των τυχαίων εξαμερών (Feinberg and Vogelstein, 1983). Για την αντίδραση χρησιμοποιείται το αντίστοιχο πακέτο υλικών (kit) της Pharmacia. Η αντίδραση γίνεται σε σωλήνα erpendorff, στον οποίο προστίθενται κατά σειρά:

- (α) 50 ng το δίκλωνου τμήματος DNA σε όγκο 10 μl, που αποδιατάσσεται με βρασμό στους 100°C για 2 λεπτά.
- (β) Το μίγμα νουκλεοτιδίων (dATP, dGTP, dTTP, 0.1 mM) όγκου 10 μl.
- (γ) Το μίγμα των τυχαίων εξαμερών νουκλεοτιδίων, d(N)<sub>6</sub> σε όγκο 5 μl.
- (γ) Αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 50 μl.
- (δ) 5 μl σημασμένου νουκλεοτιδίου [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (50 μCi, ~3.000 Ci/mmol).
- (ε) 1 μl (1 u/μl) του ενζύμου Klenow, τμήματος της DNA πολυμεράσης I.

Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, που πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, τα εξαμερή συνδέονται με τις συμπληρωματικές τους ακολουθίες που βρίσκονται πάνω στο μονόκλωνο DNA και η πολυμεράση Klenow αναγνωρίζοντας τις μερικώς δίκλωνες περιοχές συνθέτει νέα αλυσίδα ενσωματώνοντας και το σημασμένο dCTP.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, διαχωρίζονται τα τμήματα του DNA που έχουν ραδιοσημανθεί από την ελεύθερη ραδιενέργεια με χρωματογραφία διήθησης διαμέσου στήλης 0.9 ml Sephadex G-50 (medium) (Sambrook et al., 1989) και ακολουθεί μέτρηση του ποσοστού ενσωμάτωσης του ραδιενεργού dCTP σε υγρό σπινθηρισμού σε μετρητή β-ακτινοβολίας. Υπολογίζεται με τον τρόπο αυτό το ποσοστό της ενσωματωμένης σε σχέση με την ελεύθερη ραδιενέργεια και η ειδική ενεργότητα του ανιχνευτή σε cpm/μg DNA.

## 2.29. Αποτύπωμα κατά Northern (Northern blot)

Η τεχνική του υβριδισμού των νουκλεϊνικών οξέων επιτρέπει την ανίχνευση συγκεκριμένων DNA ή RNA με βάση τη συμπληρωματικότητα των βάσεων μεταξύ ομόλογων αλληλουχιών. Με το αποτύπωμα κατά Northern μπορούμε να ανιχνεύσουμε συγκεκριμένα mRNA μετά την μεταφορά του RNA σε μεμβράνη και τον υβριδισμό της μεμβράνης με τα συμπληρωματικά ιχνηθετημένα μόρια cDNA. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες nylon (Genescreen, DuPont NEN).



Για το αποτύπωμα κατά Northern ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

α) Ηλεκτροφόρηση του RNA

Η ηλεκτροφόρηση του RNA πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε (παρ. 2.27).

(β) Μεταφορά του RNA από τη πηκτή στη μεμβράνη

Για τη μεταφορά του RNA από τη πηκτή αγαρόζης-φορμαλδεΐδης σε μεμβράνη Genescreen με παθητική διάχυση, έγινε πρώτα επεξεργασία της πηκτής σε θερμοκρασία δωματίου, ως εξής:

- (i) Εμβάπτιση της πηκτής σε 50 mM NaOH, 0.1 M NaCl για 20 λεπτά
- (ii) Εμβάπτιση της πηκτής σε 0.1 M Tris-Cl pH 7.6 για 20 λεπτά
- (iii) Εμβάπτιση της πηκτής σε 2XSSC για 20 λεπτά

Η μεταφορά του RNA στη μεμβράνη Genescreen πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια σε διάλυμα 20xSSC με παθητική διάχυση για 16-20 ώρες (Sambrook et al., 1989). Μετά τη μεταφορά η μεμβράνη με το RNA εκπλύθηκε για λίγο σε αποστειρωμένο διάλυμα 6XSSC και τοποθετήθηκε για 2 ώρες στους 80°C για την σταθεροποίηση των μορίων του RNA στη μεμβράνη. Η μεμβράνη στη συνέχεια προϋβριδίστηκε και υβριδίστηκε με κατάλληλους ιχνηθέτες ραδιοσημασμένους με  $^{32}\text{P}$  (παρ. 2.28).

(γ) Προϋβριδισμός και Υβριδισμός

Η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε κατάλληλη φιάλη του κλιβάνου υβριδισμού και προϋβριδίστηκε με επώαση σε 10 ml διαλύματος προϋβριδισμού στους 42°C όλη τη νύχτα (>4 ώρες). Μετά την ολοκλήρωση της επώασης αφαιρέθηκε το διάλυμα προϋβριδισμού και η μεμβράνη υβριδίστηκε. Όπως και στον προϋβριδισμό η μεμβράνη επώαστηκε σε 10 ml διαλύματος υβριδισμού που περιείχε ένα μετουσιωμένο κατάλληλο ιχνηθέτη ραδιοσημασμένο με  $^{32}\text{P}$  ( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP), στους 42°C για όλη τη νύχτα (>16 ώρες). Ο ραδιοσημασμένος ανιχνευτής DNA που παρασκευάστηκε (παρ. 2.28) μετουσιώθηκε μετά από βρασμό δύο λεπτών και μεταφέρθηκε στη γιάλινη φιάλη υβριδισμού που περιείχε τη μεμβράνη.

δ) Έκπλυση της μεμβράνης και αυτοραδιογραφία

Μετά το τέλος της επώασης το ραδιενεργό υλικό αφαιρείται και η έκπλυση της μεμβράνης γίνεται διαδοχικά σε διάλυμα (100 ml):

2XSSC, 0.1% SDS για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου



0.5XSSC, 0.5% SDS για 30 λεπτά στους 65°C

0.1XSSC, 0.5% SDS για 30 λεπτά στους 65°C

Σε περιπτώσεις που κρίνεται απαραίτητο ή έκπλυση γίνεται σε 0.1XSSC, 0.1% SDS για 15-30 λεπτά στους 65°C.

Η έκθεση γίνεται σε φωτογραφικό φιλμ (Kodak X-OMAT AR) που τοποθετείται σε κασέτα στους -70°C για 24 ώρες ή για περισσότερο χρονικό διάστημα και στη συνέχεια γίνεται εμφάνιση του φωτογραφικού φιλμ.

Για την αφαίρεση του ανιχνευτή, ώστε να ξαναχρησιμοποιηθεί η μεμβράνη για νέο υβριδισμό, έγινε έκπλυση της μεμβράνης σε 0.1XTE pH 8.0, 0.1 % SDS στους 100°C για 15 λεπτά και ακολούθησαν 2 εκπλύσεις με 0.1XSSC σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη εκτέθηκε σε φωτογραφικό φιλμ και εμφάνιση για να επιβεβαιωθεί η απομάκρυνση του ανιχνευτή, ενώ διατηρείται προστατευμένη σε πλαστική μεμβράνη έως την επαναχρησιμοποίησή της.

20XSSC: 3M NaCl, 0.3M κίτρικό νάτριο

Διάλυμα προϋβριδισμού: 5XSSC, 5Xδιάλυμα Denhardt's, 1% SDS, 20 mM NaP pH 6.5, 50% απιονισμένο φορμαμίδιο, 250 μg αποδιαταγμένο DNA σπέρματος σολωμού

Διάλυμα υβριδισμού: 5XSSC, 1Xδιάλυμα Denhardt's, 1% SDS, 20 mM NaP pH 6.5, 50% απιονισμένο φορμαμίδιο, 10% θειική δεξτράνη 500.000, 250 μg μετουσιωμένο DNA σπέρματος σολωμού

50Xδιάλυμα Denhardt's: 10g φικόλλης, 10 g λευκωματίνη ορού μόσχου κλάσμα V (BSA fraction V), 10g πολυβινυλο-πυρολιδόνη σε 1 λίτρο αποστειρωμένου δις-απεσταγμένου νερού

NaP: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ρυθμισμένο σε pH 6.5 με NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>



## ΕΝΟΤΗΤΑ IV: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

### 2.30. Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων για την ανάλυση πρωτεϊνών

Κύτταρα HaCaT, HaCaTneo, HaCaTBcl-2/2, HaCaTΑροJ/6, HaCaTc-fos και HaCaTv-fos και κύτταρα MRC-5, MRC-5Puro, MRC-5Bcl-2 και MRC-5ΑροJ στα οποία χορηγήθηκε C<sub>2</sub>-κεραμίδιο ή VOSO<sub>4</sub>, όπως ακριβώς περιγράφηκε παραπάνω (παρ. 2.15 και 2.16, αντίστοιχα) χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων, σύμφωνα με προηγούμενες μεθόδους που έχουν περιγραφεί (Sambrook et al., 1989).

Περιληπτικά, τρυβλία των 10 cm εκπλύθηκαν αρχικά δύο φορές με 5 ml ψυχρής PBS-1mM EDTA pH 8.0 και στη συνέχεια προστέθηκε 1.0 ml ψυχρής PBS-1mM EDTA pH 8.0 και τα κύτταρα συλλέχθηκαν με ειδικό σιλικονούχο υλικό (rubber policeman) σε σωλήνα errendorff. Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στις 6500 rpm για 2' στο ψυχρό θάλαμο (cold room) και το υπερκείμενο αφαιρέθηκε. Κατόπιν προστέθηκαν 100–150 μl διαλύματος RIPA το οποίο περιείχε αναστολείς πρωτεασών, ομογενοποιήθηκαν με δίνη (vortex) και το μίγμα παρέμενε στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολούθησε ανάδευση με δίνη (vortex) για περίπου 1 λεπτό και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό, αποστειρωμένο σωλήνα errendorff και μικρή ποσότητα των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τα αντιδραστήρια της Biorad. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε μικρότερα (aliquots) των 25 μl και προστέθηκε ¼ του όγκου 4xδιάλυμα πρωτεϊνικού δείγματος (Protein Loading buffer) και τα εκχυλίσματα διατηρήθηκαν στους -40°C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

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

4xΔιάλυμα πρωτεϊνικού δείγματος (Protein Loading buffer): 250 mM Tris-Cl pH 6.8, 40% γλυκερόλη, 8% SDS, 2.8 M β-μερκαπτοαιθανόλη και 0.2% κυανού της βρωμοφαινόλης





### 2.31. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

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

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

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες πηκτές SDS-PAGE: 10% για την ανάλυση της κλαστρίνης/ΑροJ, 15% για το Bcl-2 και 8% για την πολυμεράση της πολυ-ADP ριβόζης (Poly-ADP ribose polymerase; PARP), και τα προϊόντα του πρωτο-ογκογονιδίου c-fos και του ογκογονιδίου v-fos, σύμφωνα με προηγούμενες μεθόδους που έχουν περιγραφεί (Sambrook et al., 1989).

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



**Όγκοι πηκτής επιστοιβάξης (για δύο πηκτές: 10 ml)**

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

**Όγκοι πηκτών διαχωρισμού (για δύο πηκτές: 20 ml)**

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

Το μίγμα αφέθηκε να πολυμερισθεί με την προσθήκη TEMED σε θερμοκρασία δωματίου για 20-30 λεπτά. Τα πρωτεϊνικά δείγματα (~100 μg



πρωτεΐνης) θερμάνθηκαν για 10 λεπτά στους 100°C, φορτώθηκαν στην πηκτή και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε 100V σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης για ~2 ώρες. Ως δείκτες των μοριακών βαρών των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ένα πρότυπο έγχρωμο μίγμα πρωτεϊνών (Kaleidoscope prestained standards; Bio-Rad Laboratories, USA) που περιείχε: μιοσίνη 199 kDa (μπλε), β-γαλακτοσιδάση 133 kDa (πορφυρό), λευκωματίνη ορού μόσχου 67 kDa (πράσινο), ανθρακική ανυδράση 40.1 kDa (βιολετί), αναστολέας θρυψίνης από σόγια 31.6 kDa (πορτοκαλί), λυσοζύμη 18.5 kDa (κόκκινο) και απροτινίνη 7.1 kDa (μπλε).

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

### 2.32. Χρώση της πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου

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

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

Διαλύματα αποχρωματισμού: Ανάμιξη 95% αιθανόλης και 5% οξικού οξέος σε αναλογία:  
(α) 2:3 για 60-120 λεπτά  
(β) 1.5:3.5 για 60-120 λεπτά  
(γ) 1:4 για 120 λεπτά  
(δ) 350 ml 5% οξικού οξέος και 150 ml αποστειρωμένου δις-απεσταγμένου νερού για 60 λεπτά—όλη τη νύχτα

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

Η προσπάθεια διαχωρισμού και ανίχνευσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση σε SDS-πηκτή πολυακρυλαμιδίου, μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανίχνευση με τη χρήση αντισωμάτων (ανοσο-αποτύπωμα κατά western).

Μετά την ηλεκτροφόρηση σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα Tris-γλυκίνης που περιείχε SDS, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε 1X



ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών για όλη τη νύχτα (>16 ώρες) στους 4°C και τάση 35V σύμφωνα με προηγούμενες μεθόδους (Sambrook et al., 1989).

Μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών, οι μεμβράνες επώαστηκαν για 3 ώρες–όλη τη νύχτα σε 5% άπαχο γάλα σκόνη ελεύθερο λιπιδίων διαλυμένο σε PBS το οποίο περιείχε 0.05% Tween-20 (5% blocking solution). Στην συνέχεια οι μεμβράνες επώαστηκαν με το πρώτο αντίσωμα σε 5% blocking solution. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: Για την ApoJ-goat anti-human ApoJ, 1:1500 (SantaCruz, sc-6419; Κλώνος C-18), για το Bcl-2-mouse anti-human Bcl-2, 1:500 (BD Transduction Laboratories, 610538) ή mouse monoclonal anti-human Bcl-2 (SantaCruz, sc-509), για την PARP-mouse anti-human PARP, 1:1000 (BD Pharmingen, 556362), για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μεμβράνες εκπλύθηκαν 3 φορές από 10 λεπτά με PBS που περιείχε 0.05% Tween-20 και εκτέθηκαν στο δεύτερο αντίσωμα σε αναλογία 1:2000 (donkey anti-goat IgG-Horse Radish Peroxidase (HRP) για την ApoJ και goat-anti mouse IgG-HRP για το Bcl-2, PARP, c-fos/v-fos) σε 5% blocking solution για 1.5–2 ώρες. Οι μεμβράνες εκπλύθηκαν 3 φορές από 10 λεπτά με PBS που περιείχε 0.05% Tween-20 και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν σε σκοτεινό θάλαμο χρησιμοποιώντας το Pierce Super Signal West Pico Chemiluminescence kit (Pierce, USA) ή το ECL (Amersham Int.), σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών, και εκτέθηκαν σε φιλμ Kodak-XOMAT AR.

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

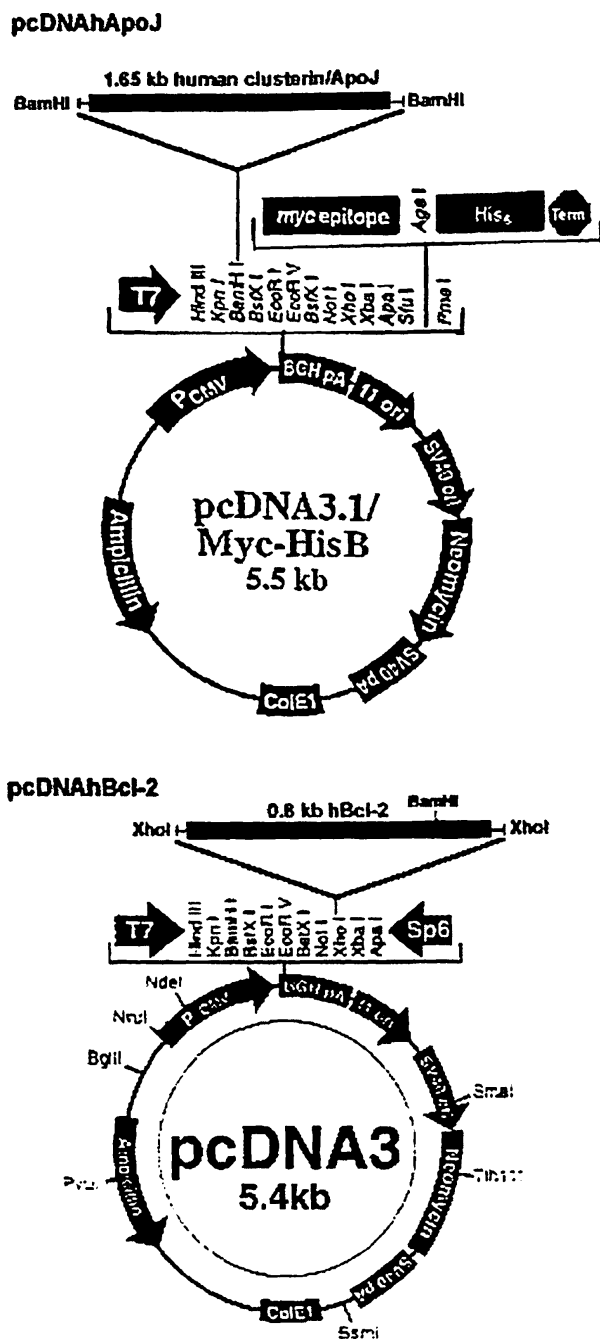


## **ΕΝΟΤΗΤΑ V: ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ**

### **2.34. Φορείς έκφρασης (expression vectors)**

Οι φορείς έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση των κυττάρων HaCaT ήταν: pcDNA3.1B (Invitrogen), pcDNABcl-2 και pcDNAApoJ (Σχήμα 1.2) τα οποία φέρουν το γονίδιο της φωσφομεταφοράσης της νεομυκίνης (neo), που επιφέρει ανθεκτικότητα στα διαμολυσμένα κύτταρα στο συνθετικό αντιβιοτικό G418. Το pcDNABcl-2 φέρει επιπλέον το 0.8 kb ανθρώπινο αντι-αποπτωτικό γονίδιο Bcl-2 στη θέση XhoI του pcDNA3.1 (Odajima et al., 2000) και το pcDNAApoJ φέρει επιπλέον το 1.65 kb ανθρώπινο γονίδιο της κλαστρίνης/απολιπρωτεΐνης J (ApoJ) στη θέση BamHI του pcDNA3.1B (Petrovoulou et al., 2001). Το pcDNABcl-2 και το pcDNAApoJ ήταν ευγενείς προσφορές των Dr. Itaru Matsumura, Osaka University Medical School, Japan και Δρ. Ευσταθίου Γκόνου, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, αντίστοιχα.





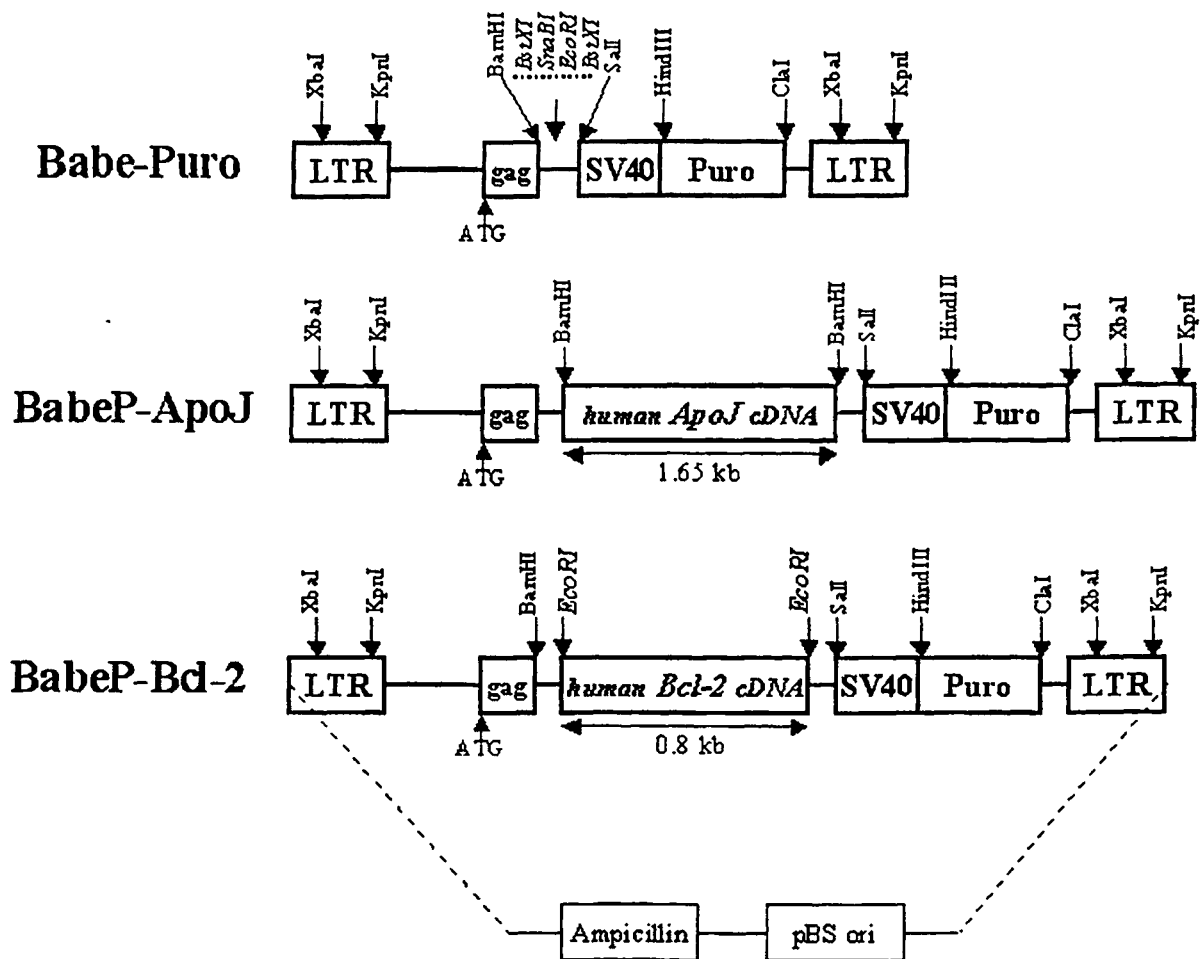
**Σχήμα 1.2.** Φορείς έκφρασης της κλαστρίνης/απολιποπρωτεΐνης J (clusterin/ApoJ) και του Bcl-2. Οι φορείς έκφρασης pcDNA3.1B (Invitrogen), pcDNABcl-2 και pcDNAApoJ που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση των κυττάρων HaCaT και την κατασκευή σταθερών κυτταρικών κλώνων HaCaTneo, HaCaTBcl-2 και HaCaTApoJ, αντίστοιχα. Το pcDNA3.1B φέρει το γονίδιο neo ως μάρτυρα επιλογής το οποίο επιφέρει ανθεκτικότητα στο συνθετικό αντιβιοτικό G418. Το pcDNAApoJ φέρει το γονίδιο neo και το πλήρες ανθρώπινο 1.65 kb ApoJ cDNA στη θέση BamHI του pcDNA3.1B (Petroroulou et al., 2001). Το pcDNABcl-2 φέρει το neo και το ανθρώπινο 0.8 kb Bcl-2 cDNA στην θέση XhoI του pcDNA3 (Invitrogen) (Odajima et al., 2000).



### 2.35. Ρετροϊικοί φορείς (Retroviral vectors)

Οι ρετροϊικοί φορείς Babe-Puro (Morgenstern and Land, 1990), Babe-Puro/Bcl-2 (BabeP-Bcl-2) (Tang et al., 2001) και Babe-Puro/ApoJ (BabeP-ApoJ) (Petrovouli et al., 2001) έχουν περιγραφεί προηγουμένως. Ο ρετροϊικός φορέας Babe-Puro φέρει το γονίδιο της πουρομυκίνης (Puro) ως μάρτυρα επιλογής κυττάρων θηλαστικών κάτω από το μεταγραφικό έλεγχο του προαγωγέα της πρώιμης περιοχής του ιού του SV40 (Morgenstern and Land, 1990), ενώ ο BabeP-Bcl-2 (Tang et al., 2001) και ο BabeP-ApoJ (Petrovouli et al., 2001) φέρουν επιπλέον του γονιδίου της πουρομυκίνης, το ανθρώπινο Bcl-2 cDNA και το ανθρώπινο cDNA της κλαστρίνης/απολιποπρωτεΐνης J (ApoJ) (Σχήμα 2.2). Το ανθρώπινο Bcl-2 cDNA (0.8 kb) είναι κλωνοποιημένο στη θέση EcoRI του Babe-Puro, ενώ το ανθρώπινο ApoJ cDNA (1.65 kb) είναι κλωνοποιημένο στη θέση BamHI του Babe-Puro. Και τα δύο γονίδια βρίσκονται κάτω από το μεταγραφικό έλεγχο του προαγωγέα του ρετροϊού (5' LTR). Το BabeP-ApoJ και το BabeP-Bcl-2 ήταν ευγενείς προσφορές των Δρ. Ευσταθίου Γκόνου, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα και Dr. Damu Tang, University of Montreal, Canada, αντίστοιχα.



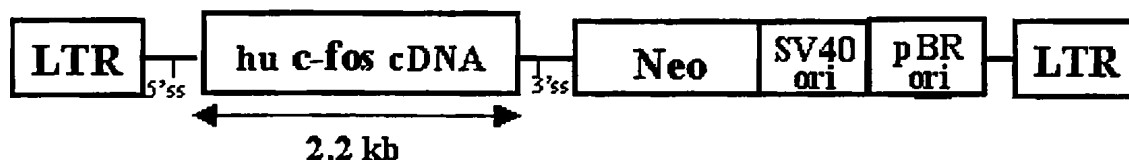


**Σχήμα 2.2.** Ρετροϊκοί φορείς έκφρασης της κλαστρίνης/απολιποπρωτεΐνης J (ApoJ) και του Bcl-2. Στο ρετροϊό ελέγχου Babe-Puro κλωνοποιήθηκε στη θέση BamHI το ανθρώπινο cDNA της κλαστρίνης/απολιποπρωτεΐνης J (ApoJ) για την κατασκευή του ρετροϊικού φορέα BabeP-ApoJ (Petroroulou et al., 2001) και στη θέση EcoRI το ανθρώπινο cDNA του Bcl-2 για την κατασκευή του ρετροϊικού φορέα BabeP-Bcl-2 (Tang et al., 2001).



Οι ρετροϊκοί φορείς PM43.1 και PM29.5 βασίζονται στους πρότυπους pZIPNeoSV(X)1 και pZIPNeoSV(B)1, αντίστοιχα (Cepko et al., 1984) και φέρουν το cDNA του ανθρώπινου πρωτο-ογκογονιδίου *c-fos* και το ογκογονίδιο *v-fos* του ρετροϊκού οστεοσαρκώματος ποντικού FBR, αντίστοιχα (Roux et al., 1990; Roux et al., 1991) (Σχήμα 3.2). Οι ρετροϊκοί φορείς PM43.1 και PM29.5 ήταν ευγενής προσφορά του Dr. Marc Piechaczyk, Institute Genetique Moleculaire, Universite de Montpellier II, France. Ο PM43.1 φέρει το 2.2 kb ανθρώπινο *c-fos* cDNA στη θέση BamHI του pZIPNeoSV(X)1 [pZIPX], ενώ ο PM29.5 φέρει ένα 2.4 kb NaeI-XhoI DNA τμήμα που έχει την κωδικοποιούσα περιοχή του *v-fos*<sup>FBR</sup> του ρετροϊκού οστεοσαρκώματος ποντικού FBR, κλωνοποιημένο στη θέση XhoI του pZIPNeoSV(B)1 [pZIPB]. Και τα δύο γονίδια βρίσκονται κάτω από το μεταγραφικό έλεγχο του προαγωγέα του ρετροϊού (5' LTR). Επιπλέον οι ρετροϊκοί φορείς PM43.1 και PM29.5 φέρουν το γονίδιο της φωσφομεταφοράσης της νεομυκίνης (Neo) και επιφέρουν ανθεκτικότητα στα επιμολυσμένα κύτταρα στο συνθετικό αντιβιοτικό G418.

### PM43.1 (12.4 kb)



### PM29.5 (12.44 kb)



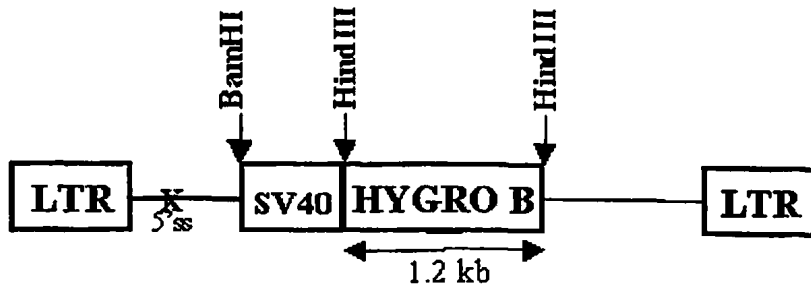
**Σχήμα 3.2. Ρετροϊκοί φορείς έκφρασης των *c-fos* και *v-fos*.** Στο ρετροϊκό φορέα ελέγχου pZIPX κλωνοποιήθηκε το ανθρώπινο cDNA του πρωτο-ογκογονιδίου *c-fos* για την κατασκευή του ρετροϊκού φορέα PM43.1, ενώ στο ρετροϊκό φορέα ελέγχου pZIPB κλωνοποιήθηκε το ογκογονίδιο *v-fos*FBR για την κατασκευή του ρετροϊκού φορέα PM29.5 (Roux et al., 1990; Roux et al., 1991). Οι ρετροϊκοί φορείς PM43.1 και PM29.5 φέρουν επιπλέον το γονίδιο Neo που επιφέρει ανθεκτικότητα στα επιμολυσμένα κύτταρα στο συνθετικό αντιβιοτικό G418.



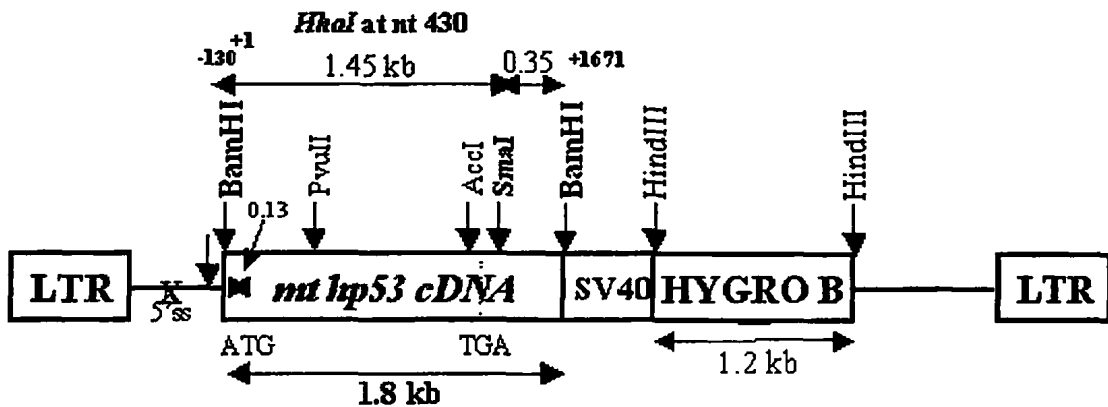
Ο ρετροϊικός φορέας ΔΗ-SCX3 φέρει επιπλέον του γονιδίου της φωσφομεταφοράσης της υδρομυκίνης (HygroB), ένα ανθρώπινο μεταλλαγμένο p53<sup>143ala</sup> cDNA (Σχήμα 4.2). Ο ΔΗ-SCX3 ήταν ευγενής προσφορά του Δρ. Θεοδώρου Τζαβάρα, Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, και η κατασκευή και η χρήση του δεν έχουν δημοσιευθεί. Για την κατασκευή του ρΔΗ-SCX3, το 1.8 kb BamHI μεταλλαγμένο ανθρώπινο cDNA της p53 (mtp53<sup>143ala</sup>) από τα νουκλεοτίδια -130 έως +1671 σε σχέση με τη θέση έναρξης της μετάφρασης (Baker et al., 1989) απομονώθηκε από το φορέα έκφρασης pCrp53-SCX3 (Baker et al., 1990) (ευγενής προσφορά του Dr. Burt Vogelstein, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, USA). Στη συνέχεια έγινε επεξεργασία του mtp53<sup>143ala</sup> cDNA με τη πολυμεράση Klenow για τη δημιουργία ισοτελών άκρων (blunt-ended), προστέθηκαν συνδέτες (linkers) BamHI και κλωνοποιήθηκε στη θέση BamHI του ρΔΗ (Overell et al., 1988) (ευγενής προσφορά του Dr. Robert Overell, Immunex Corporation, USA) για να παραχθεί ο ρετροϊικός φορέας ρΔΗ-SCX3. Το HygroB είναι κάτω από το μεταγραφικό έλεγχο του πρώιμου προαγωγέα του SV40 και επιφέρει ανθεκτικότητα στην υδρομυκίνη Β. Το ανθρώπινο μεταλλαγμένο p53<sup>143ala</sup> cDNA, που είναι κάτω από το μεταγραφικό έλεγχο του πρώιμου προαγωγέα του ρετροϊού 5' LTR, κλωνοποιήθηκε από έναν ανθρώπινο ορθοκολικό καρκίνο και είναι αποτέλεσμα μιας μετάβασης από Τ σε C μέσα στο κωδικόνιο 143 (GTG σε GCG), έτσι ώστε να μεταβάλλεται το αμινοξύ που κωδικοποιείται από Val σε Ala. Επιπλέον αυτή η μετάβαση έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας νέας θέσης περιορισμού, HhaI (GCGC, nt 427-430) που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό μεταξύ άγριου-τύπου (wt) και μεταλλαγμένου (mutant; mt) ανθρώπινου p53 cDNA. Η κατεύθυνση του cDNA στο ρετροϊικό φορέα μπορεί να ελεγχθεί με SmaI και ClaI που κόβουν 350 bp ανάρρους του 3' άκρου του p53 και μέσα στο ρετροϊικό φορέα, αντίστοιχα.



**pΔH (6.5 kb)**



**pΔH-SCX3 (8.3 kb)**

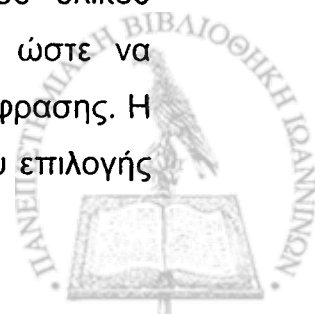


Σχήμα 4.2. Σχηματική παράσταση του ρετροϊκού φορέα ελέγχου ΔΗ και του ρετροϊκού φορέα έκφρασης της  $p53^{143ala}$ , ΔΗ-SCX3. Ο ΔΗ-SCX3 φέρει επιπλέον του γονιδίου της φωσφομεταφοράσης της υγρομυκίνης (Hygro), ένα ανθρώπινο μεταλλαγμένο  $p53^{143ala}$  cDNA που απομονώθηκε από έναν ανθρώπινο ορθοκολικό καρκίνο (Baker et al., 1989; Baker et al., 1990) και κλωνοποιήθηκε στη θέση BamHI του ρΔΗ (Overell et al., 1988). Το Hygro B είναι κάτω από το μεταγραφικό έλεγχο του πρώιμου προαγωγέα του SV40 και επιφέρει ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη B, ενώ το ανθρώπινο μεταλλαγμένο  $p53^{143ala}$  cDNA, που είναι κάτω από το μεταγραφικό έλεγχο του πρώιμου προαγωγέα του ρετροϊού 5' LTR, είναι αποτέλεσμα μιας μετάλλαξης Val σε Ala.

### 2.36. Διαμόλυνση κερατινοκυττάρων HaCaT

Η διαμόλυνση των κυττάρων HaCaT πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της πολυβρίνης-διμεθυλοσουλφοξειδίου (polybrene-DMSO), όπως περιγράφηκε λεπτομερώς προηγουμένως (Gonos et al., 1993). Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι οι κυτταρικές επιφάνειες και το πλασμιδιακό DNA είναι αρνητικά φορτισμένα και η προσθήκη του πολυκατιόντος της πολυβρίνης διευκολύνει την προσρόφηση του DNA στις κυτταρικές επιφάνειες. Στη συνέχεια η προσθήκη του DMSO διευκολύνει το άνοιγμα των μεμβρανικών πόρων με αποτέλεσμα το DNA να εισέρχεται μέσα στα κύτταρα και να ενσωματώνεται στο γενομικό DNA, μετά την προσθήκη αντιβιοτικού (Πίεση επιλογής; Selection pressure).

Περίληπτικά, κύτταρα HaCaT σε πλήρες ταπήτιο θρυψινοποιήθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε χαμηλή πυκνότητα ( $1-2 \times 10^6$ ) ανά 10 cm τρυβλία καλλιέργειας σε εμπλουτισμένο DMEM θρεπτικό υλικό για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και προστέθηκαν 2.5 ml εμπλουτισμένου θρεπτικού υλικού DMEM που περιείχαν 8  $\mu\text{g/ml}$  πολυβρίνη (polybrene) (Sigma Chemical Co.) και 15  $\mu\text{g/ml}$  πλασμιδιακού DNA (pcDNA3.1B, pcDNA/Bcl-2 ή pcDNA/ApoJ) (Μέσο διαμόλυνσης; Transfection medium) και τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> για 6 ώρες. Κάθε τριάντα λεπτά γινόταν ελαφρά ανακίνηση των τρυβλίων (3-4 φορές) καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης των κυττάρων με το DNA, ούτως ώστε το DNA να κατανεμηθεί ομοιόμορφα πάνω από όλα τα κύτταρα. Μετά την πάροδο των 6 ωρών το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και τα κύτταρα επώαστηκαν με 5 ml εμπλουτισμένου θρεπτικού υλικού DMEM που περιείχαν 30% διμεθυλο-σουλφοξειδίου (DMSO, tissue culture grade; Sigma Chemical Co.) (Μέσο καταπληξίας ή σοκ; Shock medium) για 4 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, μέσα στην εστία κυτταροκαλλιέργειας κάθετης νηματικής ροής. Στην συνέχεια το θρεπτικό υλικό που περιείχε DMSO αναρροφήθηκε και τα κύτταρα εκπλύθηκαν δύο φορές με 10 ml DMEM που περιείχε αντιβιοτικά και γλουταμίνη, χωρίς ορό. Μετά την έκπλυση των κυττάρων, προστέθηκαν 10 ml εμπλουτισμένου θρεπτικού υλικού DMEM και τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> για 48 ώρες. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και προστέθηκαν 10ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM και 500  $\mu\text{g/ml}$  G418 (Μέσο επιλογής; Selection Medium) ώστε να επιλεγούν σταθεροί κλώνοι επιτυχώς διαμολυσμένοι με τους φορείς έκφρασης. Η επιλογή των κυττάρων έγινε για τρεις εβδομάδες. Η αλλαγή του μέσου επιλογής



των διαμολυσμένων κυττάρων επαναλαμβάνονταν κάθε 3-4 μέρες καθόλη τη διάρκεια επιλογής των κυττάρων παρουσία 500 µg/ml G418 ώστε να διασφαλιστεί η επιλογή των κυτταρικών κλώνων που υπερεκφράζουν τα εισαχθέντα γονίδια (Gonos et al., 1993). Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας επιλογής, επιλέχθηκαν σταθεροί κυτταρικοί κλώνοι και χαρακτηρίστηκαν με ηλεκτοφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (παρ. 2.30, 2.31) και ανοσοαποτύπωμα κατά western (παρ. 2.33) για την έκφραση των εισαχθέντων γονιδίων. Αποθέματα των σταθερά διαμολυσμένων κυττάρων HaCaT παρασκευάστηκαν και αποθηκεύτηκαν στο υγρό άζωτο (παρ. 2.10).

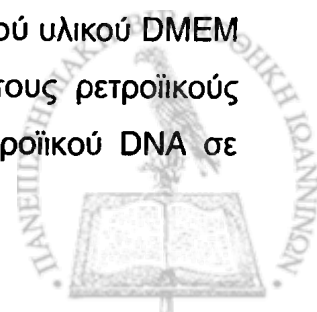
### **2.37. Παραγωγή ρετροϊών με διαμόλυνση DNA**

Για την παραγωγή ρετροϊών χρησιμοποιήθηκε η αμοφοτροπική κυτταρική σειρά πακεταρίσματος ρετροϊών Phoenix (ΦNX) η οποία διαμολύνθηκε με τους επιθυμητούς ρετροϊικούς φορείς (Babe-Puro, BabeP-Bcl-2, BabeP-ApoJ, pZIPNeoSV(X)1, PM43.1 ή PM29.5) με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου (Gorman et al., 1983; Gorman et al., 1985; Gonos et al., 1993). Τα ρετροϊικά σωματίδια που προέκυψαν μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων ΦNX χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση των κυττάρων HaCaT και MRC-5 (Kolettas et al., 1994; Kolettas and Rosenberger, 1998).

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

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

Περίληπτικά, έγινε σπορά  $3 \times 10^6$  κύτταρα ΦNX ανά τρυβλίο 6 cm και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Μετά την επώαση, έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού με 3 ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM τουλάχιστον 2 ώρες πριν τη διαμόλυνση των κυττάρων με τους ρετροϊικούς φορείς. Στη συνέχεια αναμίχθηκαν με δίνη (vortex) 15 µg ρετροϊικού DNA σε



1XTE pH8.0 με 31μl 2M CaCl<sub>2</sub> και αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 250 μl. Το μίγμα προστέθηκε στάγδην και υπό χαμηλή συνεχή ανάδευση, σε 250 μl αποστειρωμένου διαλύματος 2XHBS pH 7.12. Το καθαρό (διαφώτιστο; translucent) ίζημα συμπλεγμάτων DNA-CaPO<sub>4</sub> που σχηματίστηκε (όγκος 500 μl) προστέθηκε αμέσως στάγδην στα κύτταρα που τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, για να μη μεταβληθεί το pH της καλλιέργειας, και ακολούθησε επώαση για όλη τη νύχτα (>18 ώρες).

Μετά από τουλάχιστον 18 ώρες επώασης, το θρεπτικό υλικό που περιείχε το DNA αναρροφήθηκε και τα διαμολυσμένα κύτταρα εκπλύθηκαν δύο φορές με 5 ml DMEM που περιείχε αντιβιοτικά και L-γλουταμίνη χωρίς ορό. Μετά την προσθήκη 4 ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM, τα διαμολυσμένα κύτταρα ΦΝΧ επώαστηκαν στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> για 24–48 ώρες πριν τη συλλογή των ρετροϊκών σωματιδίων για την επιμόλυνση των κυττάρων HaCaT και MRC-5

2XHBS, pH 7.12: 50 mM HEPES, 280mM NaCl, 15 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.12

10 mg/ml πολυβρίνη σε αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό

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

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

Οι ανασυνδυασμένοι ρετροϊοί ελαττωματικής αντιγραφής (replication-defective recombinant retroviruses) που παράχθηκαν με τη διαμόλυνση των κυττάρων ΦΝΧ με τους ρετροϊικούς φορείς χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση των κυττάρων MRC-5 και HaCaT, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Kolettas et al., 1994; Kolettas and Rosenberger, 1998).

Περίληπτικά η διαδικασία πραγματοποιείται σε δύο βασικά στάδια:

- (i) Το θρεπτικό υλικό των διαμολυσμένων κυττάρων ΦΝΧ που περιείχε τα ρετροϊικά σωματίδια συλλέχθηκε μετά από 24 ώρες και διήλθε διαμέσου ενός μικροφίλτρου 0.45μm (Sartorius). Στα 4 ml του διηθήματος προστέθηκε πολυβρίνη σε τελική συγκέντρωση 8 μg/ml, το οποίο στη συνέχεια προστέθηκε στα κύτταρα HaCaT και MRC-5 (βλέπε ii).
- (ii) Έγινε σπορά 5x10<sup>5</sup> κυττάρων MRC-5 και HaCaT σε φλάσκες 25cm<sup>2</sup> και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Μετά την



επώαση το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με το διήθημα (4 ml) από τα διαμολυσμένα κύτταρα ΦΝΧ (βλέπε i) και η επώαση στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> συνεχίστηκε για 8 ώρες. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό με τους ρετροϊούς αντικαταστάθηκε και προστέθηκαν στα κύτταρα 5 ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM και η επώαση συνεχίστηκε στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> για 2-3 επιπλέον ημέρες.

Μετά την επώαση το θρεπτικό υλικό ανανεώθηκε πάλι με 5 ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM που περιείχε το αντιβιοτικό επιλογής των επιμολυσμένων κυττάρων MRC-5 και HaCaT και η επώαση συνεχίστηκε στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> για 10-14 ημέρες για την επιλογή σταθερών κυτταρικών πληθυσμών. Η επιλογή των επιμολυσμένων κυττάρων MRC-5 έγινε σε 1 µg/ml πουρομυκίνη για 10 ημέρες, ενώ η επιλογή των επιμολυσμένων κυττάρων HaCaT έγινε σε 400 µg/ml G418 για 14 ημέρες. Το θρεπτικό υλικό με το αντιβιοτικό επιλογής ανανεώνονταν κάθε 3-4 ημέρες καθόλη τη διάρκεια της επιλογής των επιμολυσμένων κυττάρων.



# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## ΕΝΟΤΗΤΑ Ι

**Οι επιδράσεις του θειικού βαναδύλιου στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κερατινοκυττάρων HaCaT: Ο ρόλος των αντι-αποπτωτικών γονιδίων κλαστρίνης/ApοJ και Bcl-2**

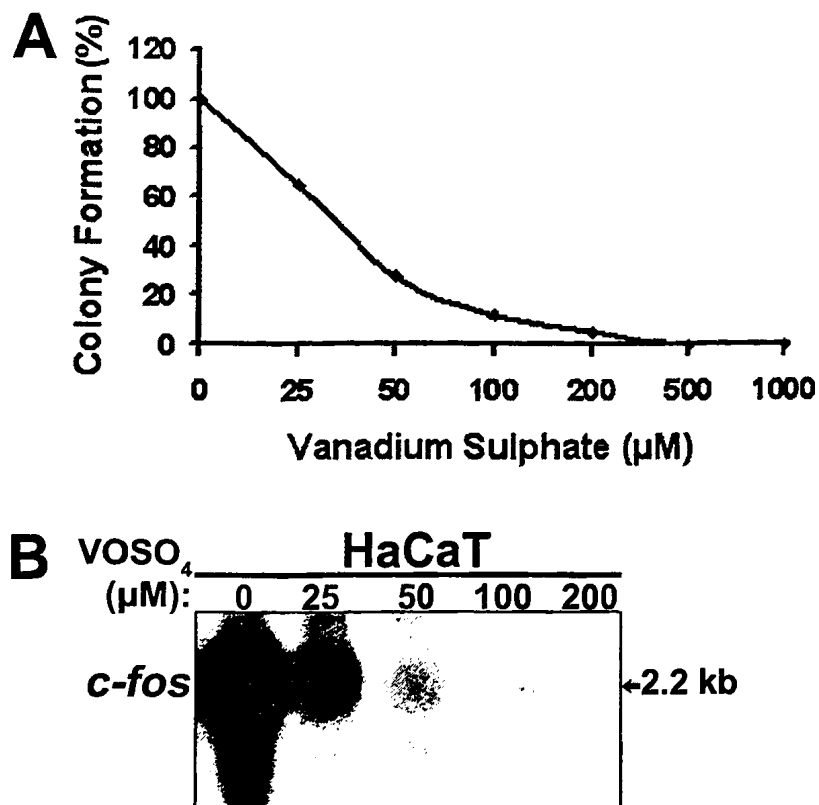
**1.3. Το θειικό βαναδύλιο αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HaCaT καταστέλλοντας την έκφραση του πρωτο-ογκογονιδίου *c-fos***

Προκειμένου να μελετηθούν οι επιδράσεις του θειικού βαναδύλιου στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HaCaT, σε κύτταρα σε χαμηλή πυκνότητα (200 κύτταρα ανά 60 mm τρυβλίο) χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0–1000  $\mu\text{M}$ )  $\text{VO}\text{SO}_4$  για 24 h και η ικανότητα σχηματισμού αποικιών (colony formation) προσδιορίστηκε μετά από 14 ημέρες, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Όπως φαίνεται από το Σχήμα 1.3Α, το θειικό βαναδύλιο ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HaCaT με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Όμως, η αναστολή του πολλαπλασιασμού ήταν εμφανής και ταχεία στη χαμηλή συγκέντρωση των 25  $\mu\text{M}$   $\text{VO}\text{SO}_4$ , ενώ η αύξηση των συγκεντρώσεων του  $\text{VO}\text{SO}_4$  πέρα των 50  $\mu\text{M}$  μολονότι προκάλεσε την επιπλέον αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, δεν ακολούθησε γραμμική πορεία.

Το πρωτο-ογκογονίδιο *c-fos* έχει εμπλακεί στην ομοιόσταση των κερατινοκυττάρων, αλλά και στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Sinha et al., 2000; Angel et al., 2001). Προκειμένου να εξετασθεί εάν η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HaCaT οφείλονταν στη μεταβολή της έκφρασης του πρωτο-ογκογονιδίου *c-fos*, ολικό RNA απομονώθηκε από μη-επεξεργασμένα κύτταρα, αλλά και από κύτταρα HaCaT στα οποία χορηγήθηκε θειικό βαναδύλιο σε συγκεντρώσεις 0-200  $\mu\text{M}$  και αναλύθηκε με αποτύπωμα κατά Northern όπως







**Σχήμα 1.3.** Αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HaCaT και μείωση της έκφρασης του *c-fos* mRNA από το θειικό βαναδύλιο. **(A)** Έγινε σπορά 200 κυττάρων HaCaT σε τρυβλία 6 cm και στα κύτταρα χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου μετά από 36 h από τη σπορά για 24 h. Τα κύτταρα εκπλύθηκαν με DMEM χωρίς ορό και αφέθηκαν για 14 ημέρες προκειμένου να αναπτυχθούν αποικίες. Η ικανότητα σχηματισμού των αποικιών εκφράστηκε επί τις % των φυσιολογικών κυττάρων στα οποία δεν χορηγήθηκε θειικό βαναδύλιο. **(B)** Σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα HaCaT χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου για 24 h και ολικό RNA απομονώθηκε και μελετήθηκε για την έκφραση του πρωτο-ογκογονιδίου *c-fos* με αποτύπωμα κατά Northern χρησιμοποιώντας ως ιχνηθέτη ολόκληρο το *c-fos* cDNA του αρουραίου.

περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι, για την έκφραση του *c-fos*. Όπως φαίνεται από το Σχήμα 1.3B, το θειικό βαναδύλιο κατέστειλε την έκφραση του *c-fos* mRNA με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Η μείωση της έκφρασης του *c-fos* mRNA ήταν εμφανής στα 25  $\mu\text{M}$   $\text{VOSO}_4$ , σημαντική στα 50  $\mu\text{M}$  και απύουσα στα 100  $\mu\text{M}$   $\text{VOSO}_4$ .

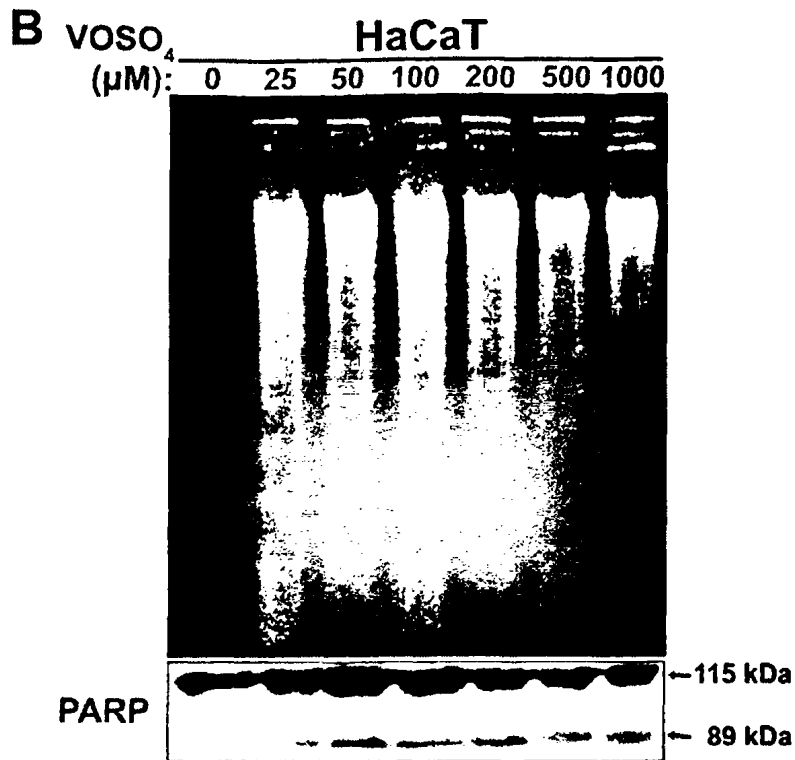
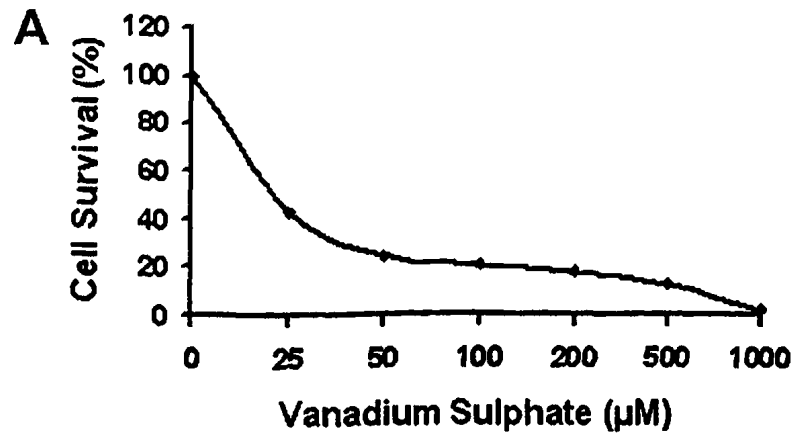
Συνολικά, τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HaCaT συσχετιζόταν με την μειορρύθμιση της έκφρασης του *c-fos* mRNA.

### 2.3. Το θειικό βαναδύλιο επάγει την απόπτωση των κυττάρων HaCaT

Για να μελετηθούν οι επιδράσεις του θειικού βαναδύλιου στη βιωσιμότητα των κυττάρων HaCaT, χορηγήθηκαν στα κύτταρα αυξανόμενες συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου (0–1000  $\mu\text{M}$ ) για 24 h και η επιβίωση των κυττάρων HaCaT μελετήθηκε με τον προσδιορισμό της trypan blue. Το θειικό βαναδύλιο μείωσε την επιβίωση των ανθρώπινων κερατινοκυττάρων HaCaT με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (Σχήμα 2.3A). Όμως, η μείωση της κυτταρικής επιβίωσης, όπως και η μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Σχήμα 1.3A), ήταν εμφανής και ταχεία στη χαμηλή συγκέντρωση των 25  $\mu\text{M}$   $\text{VOSO}_4$ , ενώ η περαιτέρω αύξηση των συγκεντρώσεων του  $\text{VOSO}_4$  μολονότι προκάλεσε την επιπλέον μείωση της επιβίωσης των κυττάρων HaCaT δεν ακολούθησε γραμμική πορεία.

Προκειμένου να μελετηθεί αν η μείωση της επιβίωσης των κυττάρων HaCaT οφείλονταν στην κυτταρική απόπτωση, αυξανόμενες συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου χορηγήθηκαν σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα HaCaT για 24 h και χαμηλού μοριακού βάρους DNA απομονώθηκε και αναλύθηκε σε 1.6% πηκτή αγαρόζης. Το θειικό βαναδύλιο προκάλεσε την απόπτωση των κυττάρων HaCaT. Όμοια, η κυτταρική απόπτωση ήταν φανερή στη χαμηλή συγκέντρωση των 25  $\mu\text{M}$   $\text{VOSO}_4$ , ενώ η περαιτέρω αύξηση των συγκεντρώσεων του  $\text{VOSO}_4$  δεν φαίνεται να είχε μεγαλύτερη επίδραση στη θραυσματοποίηση του DNA (Σχήμα 2.3B, άνω πλαίσιο). Αντίθετα, σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 100  $\mu\text{M}$   $\text{VOSO}_4$ , δηλαδή στα 200 - 1000  $\mu\text{M}$   $\text{VOSO}_4$  υπάρχει απώλεια του προφίλ της θραυσματοποίησης του DNA, το οποίο στις υψηλές συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου εμφανίζεται ως





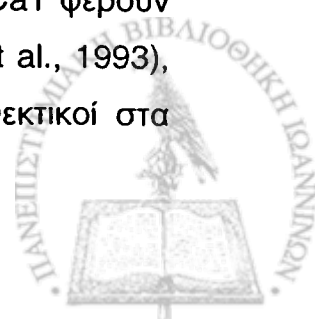
**Σχήμα 2.3.** Το θειικό βαναδύλιο προκάλεσε την απόπτωση των κυττάρων HaCaT. **(A)** Σε  $1 \times 10^5$  κυττάρων HaCaT χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου για 24 h και η κυτταρική επιβίωση μελετήθηκε με τον προσδιορισμό της trypan blue. Η κυτταρική επιβίωση εκφράστηκε επί τις % των φυσιολογικών κυττάρων στα οποία δεν χορηγήθηκε θειικό βαναδύλιο. **(B, άνω μέρος)** Σε  $1.5 \times 10^6$  κυττάρων HaCaT χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου για 24 h και χαμηλού μοριακού βάρους DNA απομονώθηκε και αναλύθηκε σε 1.6% πηκτή αгарόζης. **(B, κάτω μέρος)** Σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα HaCaT χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου για 24 h και κυτταρικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν και μελετήθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά western για την έκφραση της PARP.

επίχρισμα (smear), χαρακτηριστικό νεκρωτικών κυττάρων (Σχήμα 2.3B, άνω πλαίσιο). Η παρατήρηση αυτή, βέβαια, χρίζει και άλλων επιπλέον μελετών διαφοροποίησης μεταξύ αποπτωτικού και νεκρωτικού θανάτου (Majno and Joris, 1995). Ανεξάρτητα από τη διαφορετική μορφή κυτταρικού θανάτου σε χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου, είναι φανερό ότι η απόπτωση των κυττάρων HaCaT εμφάνισε το ίδιο πρότυπο με αυτό της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Δηλαδή, οι χαμηλές συγκεντρώσεις του θειικού βαναδύλιου ήταν επαρκείς για να προκαλέσουν την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων HaCaT.

Επιπλέον, η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και η επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων HaCaT φαίνεται ότι συσχετίζονταν με την μειορρύθμιση της έκφρασης του *c-fos* mRNA από το  $\text{VOSO}_4$ .

Η πρωτεολυτική διάσπαση της πολυ-ADP-ριβουσυλο-πολυμεράσης (PARP) είναι ένας αξιόπιστος δείκτης της κυτταρικής απόπτωσης. Σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα HaCaT χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου για 24 h και κυτταρικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν και μελετήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου και με ανοσο-αποτύπωμα western-blot) για την έκφραση της PARP. Το θειικό βαναδύλιο προκάλεσε την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (Σχήμα 2.3B, κάτω πλαίσιο). Ενώ τα κύτταρα στα οποία δεν χορηγήθηκε θειικό βαναδύλιο εκφράζανε μόνον την φυσιολογική μορφή του ενζύμου, μοριακού βάρους 115 kDa, στα κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε θειικό βαναδύλιο εκφράζανε και τις δύο μορφές της PARP, την 115 kDa φυσιολογική μορφή του ενζύμου αλλά και την 89 kDa διασπασμένη μορφή της, ένα επιπλέον αποδεικτικό στοιχείο της απόπτωσης των κυττάρων HaCaT από το θειικό βαναδύλιο. Η πρωτεολυτική διάσπαση της PARP ανιχνεύθηκε ακόμη και στη χαμηλή συγκέντρωση των 25  $\mu\text{M}$   $\text{VOSO}_4$  και συσχετίζονταν με τα ευρήματα του προσδιορισμού της trypan blue (Σχήμα 2.3A) και της θραυσματοποίησης του DNA (Σχήμα 2.3B, άνω πλαίσιο).

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 εμπλέκεται στην επαγωγή της απόπτωσης των κερατινοκυττάρων από ενώσεις βαναδίου (Huang et al., 2000). Τα ευρήματα είναι σημαντικά διότι τα HaCaT φέρουν μεταλλαγμένες μορφές της p53 (μεταλλάξεις p53 τύπου UV) (Lehman et al., 1993), όπως και οι περισσότεροι τύποι/μορφές καρκίνων οι οποίοι είναι ανθεκτικοί στα



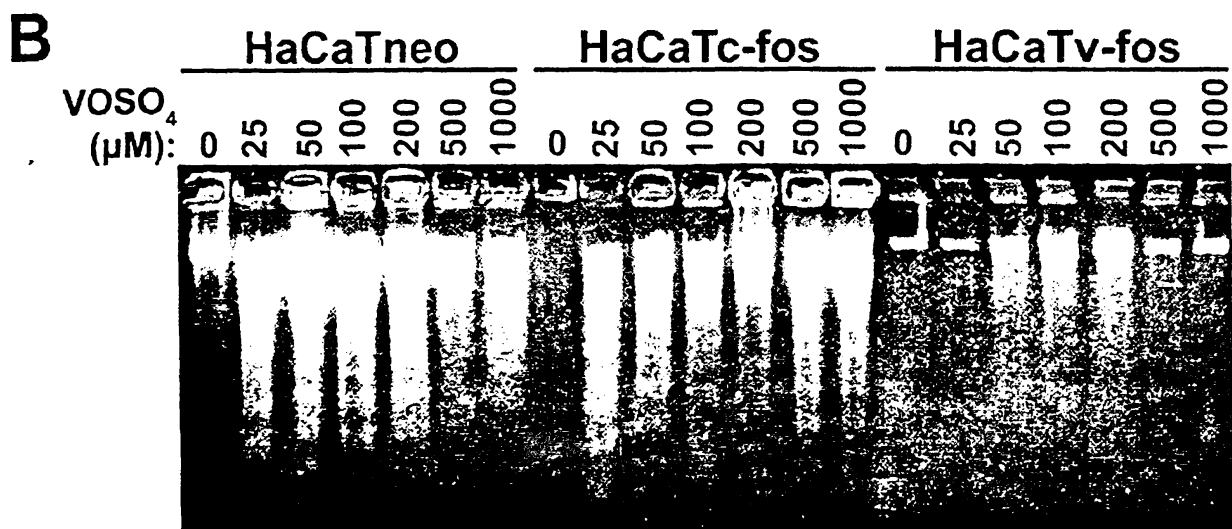
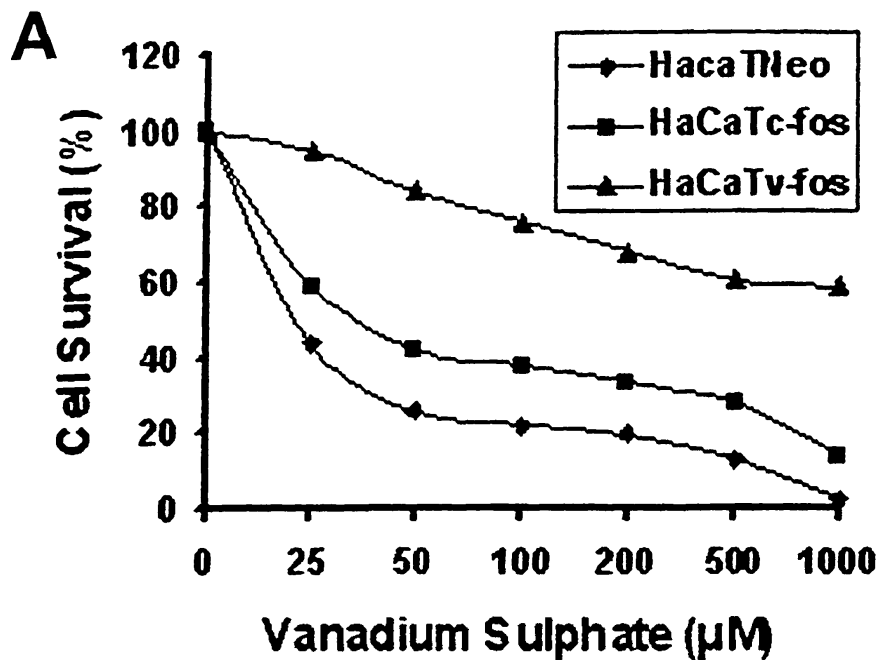
χημειοθεραπευτικά. Επομένως δείξαμε ότι το θειικό βαναδύλιο επάγει την απόπτωση κερατινοκυττάρων ανεξάρτητα από την παρουσία άγριου-τύπου p53.

### **3.3. Η υπερέκφραση του ογκογονιδίου *v-fos*, αλλά όχι του *c-fos*, παρεμποδίζει την απόπτωση των κυττάρων HaCaT που επάγεται από το θειικό βαναδύλιο**

Το σύμπλοκο c-fos/AP-1, ένας κύριος ενεργοποιητής άλλων γονιδίων ως απόκριση σε παράγοντες πρόκλησης βλαβών στο DNA (Angel et al., 2001; Shaulian and Karin, 2002), παίζει σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα κυττάρων σε χημειοθεραπευτικά (Dempke et al., 2000). Επειδή το θειικό βαναδύλιο κατέστειλε την έκφραση του *c-fos* mRNA και προκάλεσε την αναστολή του πολλαπλασιασμού και την επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων HaCaT, επιμολύναμε κύτταρα HaCaT, με ρετροϊικούς φορείς που έφεραν το φυσιολογικό ανθρώπινο *c-fos* cDNA, καθώς και το ρετροϊκό *v-fos* ογκογονίδιο (μεταλλαγμένη μορφή του πρωτο-ογκογονιδίου *c-fos*), (Roux et al., 1990; Roux et al., 1991), όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι, προκειμένου να μελετηθεί αν η υπερέκφραση του *fos* επηρεάζει το αποτέλεσμα της χορήγησης του θειικού βαναδύλιου σε σχέση με την κυτταρική απόπτωση.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.3A, το θειικό βαναδύλιο μείωσε την επιβίωση των HaCaTneo με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, όμοια ακριβώς με τη μείωση της επιβίωσης των μη-διαμολυσμένων κυττάρων HaCaT (Σχήμα 2.3A). Ομοίως, η μείωση της κυτταρικής επιβίωσης εκδηλώθηκε στη χαμηλή συγκέντρωση των 25  $\mu\text{M}$  VOSO<sub>4</sub>, και η περαιτέρω αύξηση των συγκεντρώσεων του VOSO<sub>4</sub> μολονότι προκάλεσε την επιπλέον μείωση της επιβίωσης των κυττάρων HaCaT δεν ήταν γραμμική. Σε αντίθεση, η υπερέκφραση του ογκογονιδίου *v-fos* είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης σε σχέση με τα κύτταρα HaCaTneo ή HaCaT*c-fos* (Σχήμα 3.3A). Αν και τα κύτταρα HaCaT που υπερεκφράζανε το πρωτο-ογκογονίδιο *c-fos* εμφάνισαν μια αύξηση της βιωσιμότητας μετά τη χορήγηση του VOSO<sub>4</sub>, αυτή η αύξηση ήταν σχετικά μικρή συγκρινόμενη με τα κύτταρα HaCaTneo ή τα HaCaT*v-fos* (Σχήμα 3.3A).



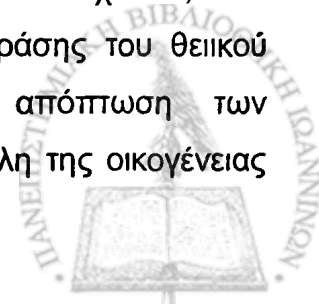


**Σχήμα 3.3.** Το *v-fos* αλλά όχι το *c-fos* καταστέλλει την απόπτωση των κυττάρων HaCaT που επάγεται από το θειικό βαναδύλιο. **(A)** Σε  $1 \times 10^5$  κυττάρων HaCaTneo, HaCaTc-fos και HaCaTv-fos χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου για 24 h και η κυτταρική επιβίωση μελετήθηκε με τον προσδιορισμό της trypan blue. Η κυτταρική επιβίωση εκφράσθηκε επί τις % των φυσιολογικών κυττάρων στα οποία δεν χορηγήθηκε θειικό βαναδύλιο. **(B)** Σε  $1.5 \times 10^6$  κυττάρων HaCaT χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου για 24 h και χαμηλού μοριακού βάρους DNA απομονώθηκε και αναλύθηκε σε 1.6% πηκτή αγαρόζης.

Προκειμένου να μελετηθεί αν η ανθεκτικότητα των κυττάρων HaCaT*v-fos* οφείλονταν στην παρεμπόδιση της κυτταρικής απόπτωσης, χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου (0–1000μM) σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα HaCaTneo, HaCaT*c-fos* και HaCaT*v-fos* για 24 h και χαμηλού μοριακού βάρους DNA απομονώθηκε και αναλύθηκε σε 1.6% πηκτή αγαρόζης. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.3B, η υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης *v-fos*, αλλά όχι της *c-fos*, παρεμπόδισε σημαντικά την επαγόμενη από το VOSO<sub>4</sub> απόπτωση των κυττάρων HaCaT, σε σύγκριση με τα κύτταρα HaCaTneo.

Το θειικό βαναδύλιο επήγαγε την απόπτωση των κυττάρων HaCaTneo σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0–200 μM), ακόμη και στη συγκέντρωση των 25 μM, όπως και στα μη διαμολυσμένα κύτταρα HaCaT (Σχήμα 2.3B), ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (> 200 μM VOSO<sub>4</sub>) το DNA εμφανίστηκε ως επίχρισμα, πιθανή ένδειξη νεκρωτικού θανάτου, ακριβώς όπως και στα μη-διαμολυσμένα κύτταρα HaCaT (Σχήμα 2.3B). Ενώ, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης του πρωτο-ογκογονιδίου *c-fos* δεν επέφερε ανθεκτικότητα, πιθανά διότι συμπεριφέρεται όπως και η ενδογενής πρωτεΐνη *c-fos* και υπόκειται στην ενδογενή κυτταρική ρύθμιση (Roux et al., 1991), η υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης *v-fos* ανέστειλε την επαγόμενη από VOSO<sub>4</sub> απόπτωση στα κύτταρα HaCaTneo ή HaCaT*c-fos* (Σχήμα 3.3A). Να σημειωθεί όμως, πρώτον, ότι η ένταση των θραυσμάτων του DNA των κυττάρων HaCaT*c-fos* είναι μικρότερη από αυτή των HaCaTneo και δεύτερον, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 500 και 1000 μM VOSO<sub>4</sub>, τα κύτταρα HaCaT*c-fos* υφίστανται κυτταρικό θάνατο με απόπτωση και πιθανά όχι με νέκρωση, όπως παρατηρήθηκε στα κύτταρα HaCaT (Σχήμα 2.3B) και HaCaTneo (Σχήμα 3.3B). Αυτές οι παρατηρήσεις δεν μπορούν να θεωρηθούν ασήμαντες δεδομένου ότι η αναστολή του πολλαπλασιασμού και η επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων HaCaT από το θειικό βαναδύλιο συσχετίζεται με τη μειορύθμιση του *c-fos* mRNA (Σχήμα 1.3B), και αποτελούν ενδείξεις που πιθανά επιβεβαιώνουν το ρόλο του *fos* στην ομοίωση των κερατινοκυττάρων (Angel et al., 2001).

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την ογκογόνο δράση του *v-fos* αλλά και έναν μηχανισμό, μέσω της μειορύθμισης του *c-fos*, με τον οποίο το θειικό βαναδύλιο αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και επάγει την απόπτωση, τουλάχιστον, των κερατινοκυττάρων HaCaT. Συνολικά, τα ευρήματα αυτά της δράσης του θειικού βαναδύλιου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κερατινοκυττάρων είναι ιδιαίτερα σημαντικά δεδομένου ότι τα μέλη της οικογένειας



του fos έχουν ογκογόνο δράση και υπερεκφράζονται σε πολλούς διαφορετικούς τύπους / μορφές καρκίνων.

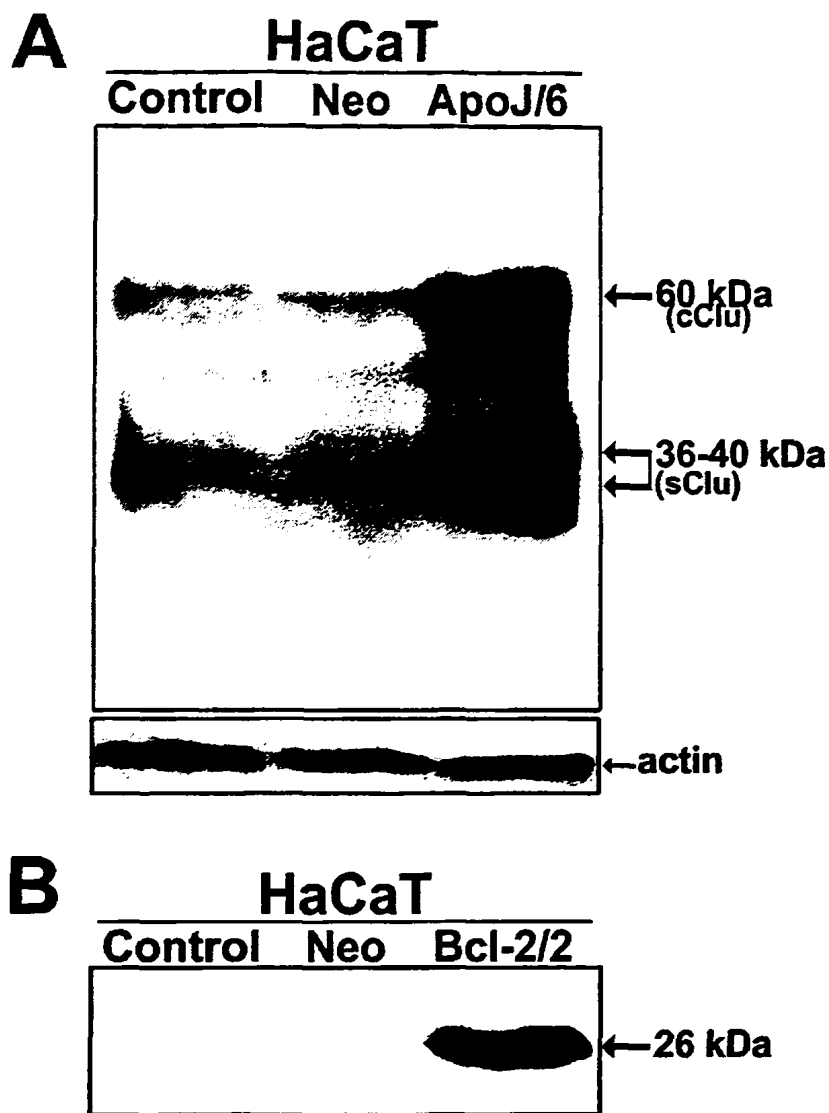
#### 4.3. Υπερέκφραση της κλαστρίνης/απολιποπρωτεΐνης J (ApoJ) και της ογκοπρωτεΐνης Bcl-2 στους διαμολυσμένους κυτταρικούς κλώνους HaCaT

Μεταξύ των γονιδίων που εμπλέκονται στην αναστολή της κυτταρικής απόπτωσης μετά από χορήγηση διαφόρων στρεσογόνων και αποπτωτικών παραγόντων είναι η κλαστρίνη/απολιποπρωτεΐνη J (ApoJ) (Trougakos and Gonos, 2002) και η Bcl-2 (Hengartner, 2000; Cory and Adams, 2002). Μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη c-fos δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης της ApoJ (Jin and Howe, 1999) και ότι η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 παρεμποδίζει την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης c-fos που λαμβάνει χώρα στο πρωτεόσωμα κατά την απόπτωση κυττάρων μετά τη χορήγηση δεξαμεθαζόνης (He et al., 1998) και επαυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης c-fos και τη μεταγραφική ενεργότητα του συμπλόκου c-fos/AP-1 σε κερατινοκύτταρα (Amstad et al., 1997).

Για να μελετήσουμε τις επιδράσεις των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών κλαστρίνης/ApoJ και Bcl-2 στην επαγόμενη από VOSO<sub>4</sub> απόπτωση των κερατινοκυττάρων τα οποία εμφανίζουν μειορύθμιση των επιπέδων έκφρασης του c-fos mRNA μετά τη χορήγηση θειικού βαναδύλιου, κατασκευάσαμε κύτταρα HaCaT που υπερέκφραζαν την κλαστρίνη/ApoJ και τη Bcl-2, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Περιληπτικά, κύτταρα HaCaT διαμολύνθηκαν με τους φορείς έκφρασης, pCDNA, pCDNA/ApoJ (Petrovoulou et al., 2001) και pCDNA/Bcl-2 (Odajima et al., 2000), επιλέχθηκαν στο συνθετικό αντιβιοτικό G418 και σταθεροί κυτταρικοί κλώνοι απομονώθηκαν και αναλύθηκαν για την έκφραση των ApoJ και Bcl-2 με ανοσοαποτύπωμα κατά western. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.3, δύο από τους κλώνους υπερέκφραζαν αυτές τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, HaCaTApoJ/6 (Σχήμα 4.3A) και HaCaTBcl-2/2 (Σχήμα 4.3B) αντίστοιχα, σε υψηλά επίπεδα και επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτες (Βλέπε επίσης Σχήμα 8.3. για το χαρακτηρισμό των κυτταρικών κλώνων).







**Σχήμα 4.3.** Έκφραση της κλαστρίνης/απολιποπρωτεΐνης J (ApoJ) και της ογκοπρωτεΐνης Bcl-2 στους σταθερά διαμολυσμένους κυτταρικούς κλώνους HaCaT. Κύτταρα HaCaT διαμολύνθηκαν με τους φορείς έκφρασης, pCDNA, pCDNA/ApoJ και pCDNA/Bcl-2, επιλέχθηκαν σε G418 και κυτταρικοί κλώνοι χαρακτηρίστηκαν για την έκφραση των (A) ApoJ και (B) Bcl-2, με ανοσοαποτύπωμα κατά western.

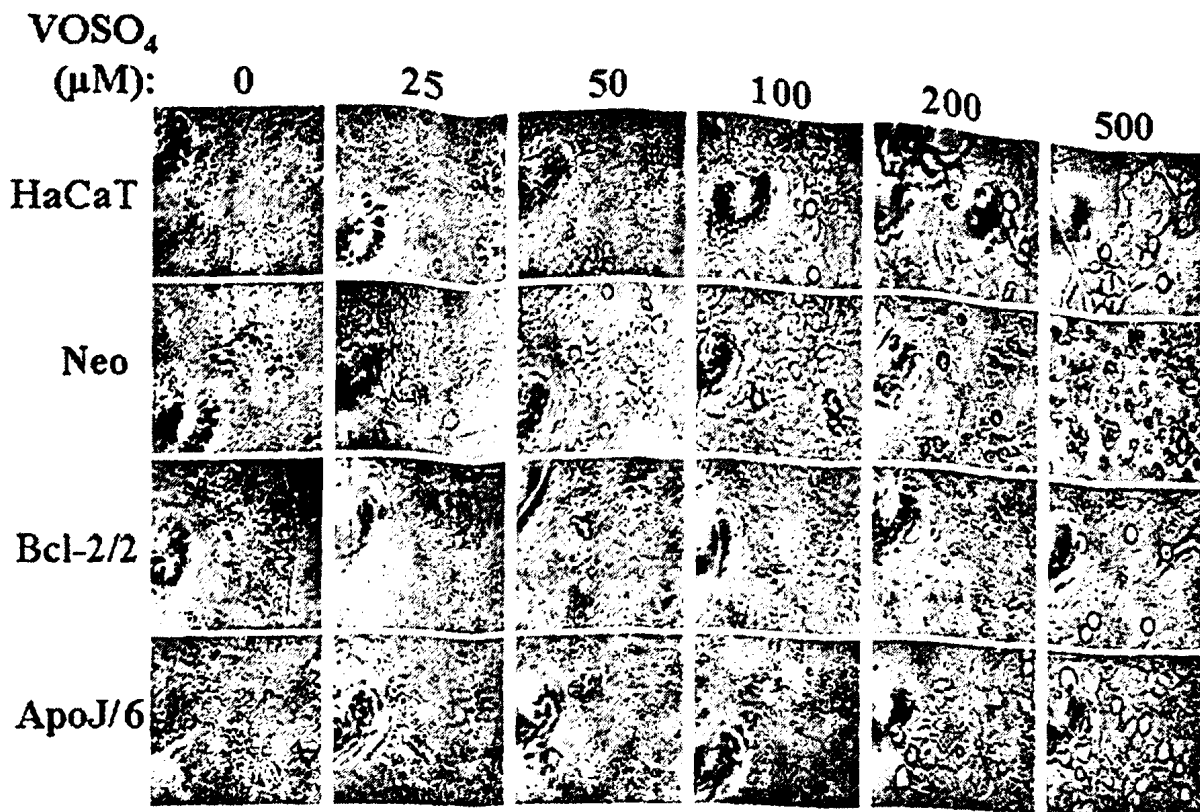
### 5.3. Bcl-2 και κλαστρίνη/ApoJ καταστέλλουν την απόπτωση των κυττάρων HaCaT που επάγεται από το θειικό βαναδύλιο σε διαφορετικό βαθμό

Η απόπτωση που επάγεται από το θειικό βαναδύλιο μελετήθηκε μορφολογικά και μοριακά σε κύτταρα HaCaTneo, HaCaTBcl-2/2 και HaCaTApoJ/6.

Κύτταρα HaCaT, HaCaTneo, HaCaTBcl-2/2 και HaCaTApoJ/6 εξετάστηκαν σε μικροσκόπιο αντιθέτων φάσεων, μετά τη χορήγηση 0-500  $\mu\text{M}$  θειικού βαναδύλιου για 24 ώρες σε πλήρες θρεπτικό υλικό (Σχήμα 5.3). Τα κύτταρα HaCaT και HaCaTneo εμφάνισαν χαρακτηριστικά αποπτωτικού φαινοτύπου, όπως συρρίκνωση και στρογγυλοποίηση σε συγκέντρωση ίση η μεγαλύτερη από 50  $\mu\text{M}$  θειικού βαναδύλιου και ο αποπτωτικός φαινότυπος τους επιδεινώθηκε με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Στα 200  $\mu\text{M}$   $\text{VOSO}_4$  τα κύτταρα εμφάνισαν απώλεια επαφής με το υπόστρωμα και στα 500  $\mu\text{M}$   $\text{VOSO}_4$  αποκολλήθηκαν από το υπόστρωμα (Σχήμα 5.3). Σε αντίθεση, ενώ τα κύτταρα HaCaTApoJ/6 είχαν φυσιολογική μορφολογία σε συγκεντρώσεις 25-200  $\mu\text{M}$   $\text{VOSO}_4$ , με ελάχιστα αποπτωτικά κύτταρα στα 200 και 500  $\mu\text{M}$   $\text{VOSO}_4$  χωρίς να εμφανίζουν απώλεια επαφής με το υπόστρωμα (Σχήμα 5.3), τα κύτταρα HaCaTBcl-2/2 ήταν πλήρως ανθεκτικά στις μορφολογικές μεταβολές επαγόμενες από το θειικό βαναδύλιο, χωρίς να εμφανίσουν χαρακτηριστικά αποπτωτικού φαινοτύπου σε όλες τις συγκεντρώσεις του θειικού βαναδύλιου που χρησιμοποιήθηκαν (Σχήμα 5.3). Επομένως η υπερέκφραση της κλαστρίνης/απολιποπρωτεΐνης J (ApoJ) παρεμποδίζει, ενώ της ογκοπρωτεΐνης Bcl-2 καταστέλλει πλήρως τις μορφολογικές μεταβολές με χαρακτηριστικά αποπτωτικού φαινοτύπου των κυττάρων HaCaT που προκαλείται από το θειικό βαναδύλιο

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος της κλαστρίνης/ApoJ και της Bcl-2 και αν οι μορφολογικές μεταβολές των διαφορετικών κυττάρων HaCaT επαγόμενες από το θειικό βαναδύλιο οφείλονταν στη μείωση της κυτταρικής επιβίωσης και στη κυτταρική απόπτωση, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός με χρώση trypan blue και ανάλυση του DNA, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι.



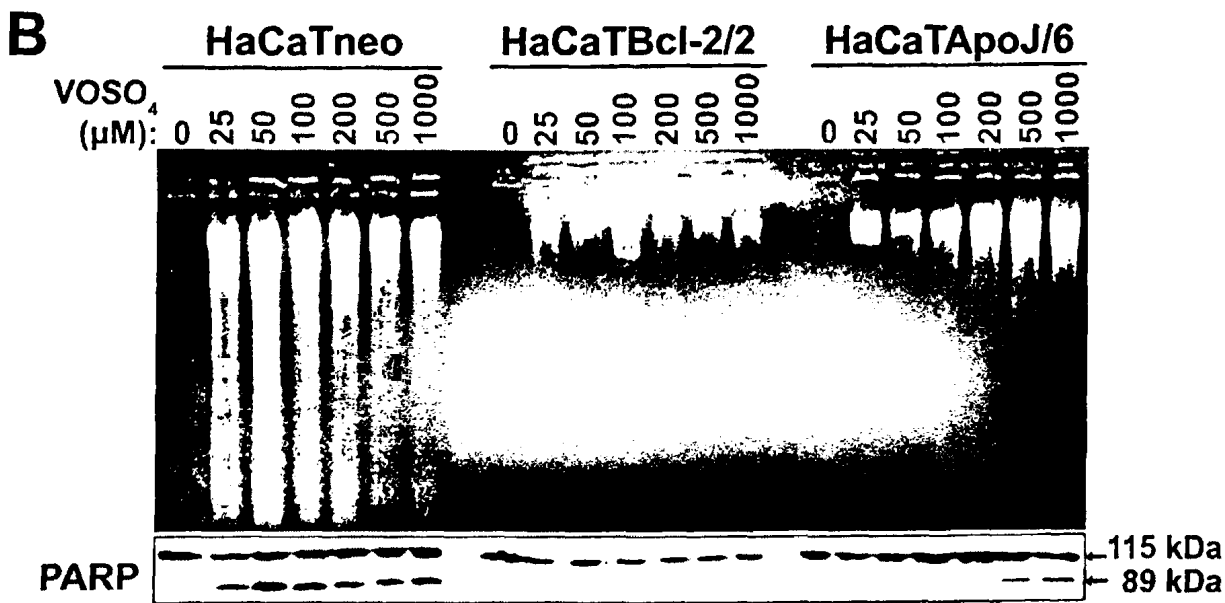
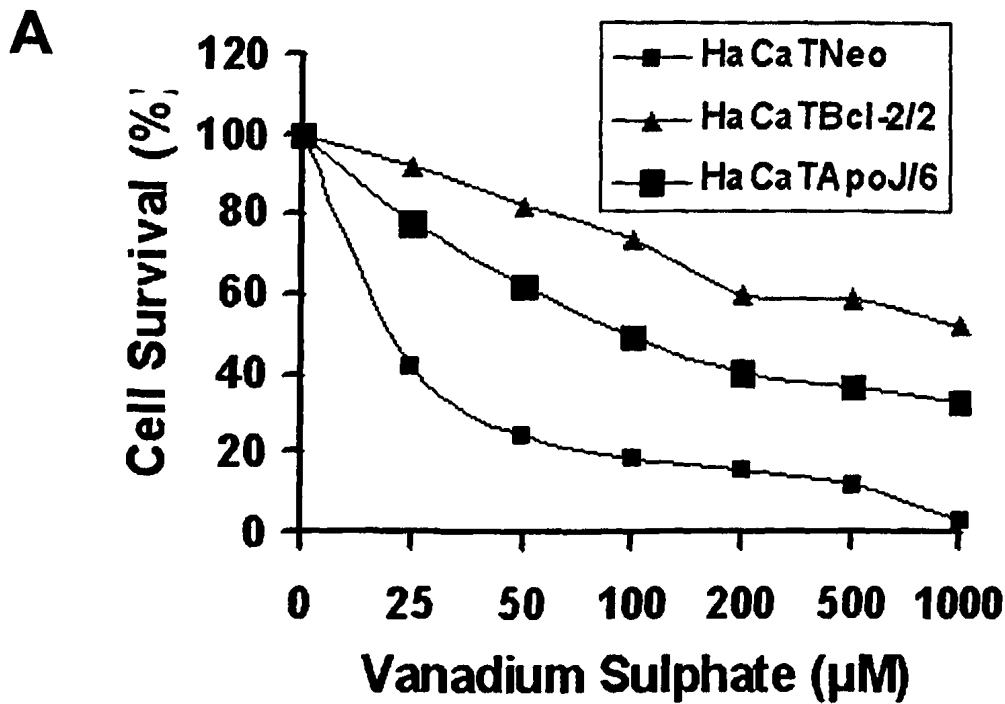


**Σχήμα 5.3.** Μορφολογικές μεταβολές στα φυσιολογικά κύτταρα HaCaT και HaCaTneo και σε κύτταρα HaCaT που υπερεκφράζουν την κλαστρίνη/απολιποπρωτεΐνη J (ApoJ) ή την ογκοπρωτεΐνη Bcl-2 από το θειικό βαναδύλιο. Στα διαφορετικά κύτταρα HaCaT χορηγήθηκαν αυξανόμενες δόσεις θειικού βαναδύλιου (0-500  $\mu\text{M}$ ) για 24 h. Η μορφολογία των διαφορετικών κυττάρων HaCaT εξετάστηκε σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων.

Για να μελετηθούν οι επιδράσεις του θειικού βαναδύλιου στη βιωσιμότητα των κυττάρων HaCaT, χορηγήθηκαν στα κύτταρα αυξανόμενες συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου (0–1000  $\mu\text{M}$ ) για 24 h και η επιβίωση των κυττάρων HaCaT μελετήθηκε με τον προσδιορισμό της *trypan blue* (Σχήμα 6.3A). Η επεξεργασία των κυττάρων HaCaTneo με θειικό βαναδύλιο είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της κυτταρικής επιβίωσης με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (Σχήμα 6.3A). Η μείωση της κυτταρικής επιβίωσης ήταν φανερή και απότομη στη χαμηλή συγκέντρωση των 25  $\mu\text{M}$   $\text{VOSO}_4$  και η περαιτέρω αύξηση των συγκεντρώσεων του  $\text{VOSO}_4$  μολονότι προκάλεσε την επιπλέον μείωση της επιβίωσης των κυττάρων HaCaT δεν ήταν γραμμική, ανάλογα ευρήματα με αυτά των μη-διαμολυσμένων κυττάρων HaCaT (Σχήμα 2.3B). Σε αντίθεση, η υπερέκφραση της κλαστρίνης/ApoJ ή της ογκοπρωτεΐνης Bcl-2 επαύξησε την κυτταρική επιβίωση σε σχέση με τα κύτταρα HaCaTneo (Σχήμα 6.3A). Όμως τα κύτταρα HaCaTBcl-2/2 ήταν πιο ανθεκτικά στην κυτταροτοξική δράση του θειικού βαναδύλιου από ότι τα κύτταρα HaCaTApoJ/6 (Σχήμα 6.3A).

Προκειμένου να μελετηθεί εάν η αύξηση της ανθεκτικότητας / βιωσιμότητας των κυττάρων HaCaTBcl-2/2 και HaCaTApoJ/6 οφείλονταν στην αναστολή ή στην παρεμπόδιση της κυτταρικής απόπτωσης, αυξανόμενες συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου (0–1000  $\mu\text{M}$ ) χορηγήθηκαν σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα HaCaTneo, HaCaTBcl-2/2 και HaCaTApoJ/6 για 24 h και χαμηλού μοριακού βάρους DNA απομονώθηκε από επιπλέοντα και επικολλημένα κύτταρα και αναλύθηκε σε 1.6% πηκτή αгарόζης (Σχήμα 6.3B, άνω πλαίσιο). Η χορήγηση θειικού βαναδύλιου σε κύτταρα HaCaTneo επήγαγε την θραυσματοποίηση του DNA. Η κυτταρική απόπτωση ήταν φανερή στη χαμηλή συγκέντρωση των 25  $\mu\text{M}$   $\text{VOSO}_4$ , ενώ η περαιτέρω αύξηση των συγκεντρώσεων του  $\text{VOSO}_4$  δεν φαίνεται να είχε μεγαλύτερη επίδραση στη θραυσματοποίηση του DNA (Σχήμα 6.3B, άνω πλαίσιο). Αντίθετα, σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 100  $\mu\text{M}$   $\text{VOSO}_4$ , δηλαδή στα 200-1000  $\mu\text{M}$   $\text{VOSO}_4$  υπάρχει απώλεια του προφίλ της θραυσματοποίησης του DNA, το οποίο στις υψηλές συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου εμφανίζεται πιθανά ως επίχρισμα, χαρακτηριστικό νεκρωτικών κυττάρων (Σχήμα 6.3B, άνω πλαίσιο), όμοια με τα ευρήματα των μη-διαμολυσμένων κυττάρων HaCaT (Σχήμα 2.3B, άνω πλαίσιο). Επομένως οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις του θειικού βαναδύλιου ήταν επαρκείς για να προκαλέσουν την επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων HaCaTneo.





**Σχήμα 6.3.** Η Bcl-2 και ApoJ καταστέλλουν την απόπτωση των κυττάρων HaCaT που επάγεται από το θειικό βαναδύλιο. **(A)** Σε  $1 \times 10^5$  κυττάρων HaCaTneo, HaCaTcBcl-2/2 και HaCaTApoJ/6 χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου για 24 h και η κυτταρική επιβίωση μελετήθηκε με τον προσδιορισμό της trypan blue. Η κυτταρική επιβίωση εκφράστηκε επί τις % των φυσιολογικών κυττάρων στα οποία δεν χορηγήθηκε θειικό βαναδύλιο. **(B)** Σε  $1.5 \times 10^6$  κυττάρων HaCaTneo, HaCaTBcl-2/2 και HaCaTApoJ/6 χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου για 24 h και χαμηλού μοριακού βάρους DNA απομονώθηκε και αναλύθηκε σε 1.6% πηκτή αγαρόζης.

Ενώ, η υπερέκφραση της κλαστρίνης/ApoJ επέφερε ανθεκτικότητα, η υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης Bcl-2 ανέστειλε πλήρως την VOSO<sub>4</sub>-επαγόμενη απόπτωση σε σχέση με τα κύτταρα HaCaTneo (Σχήμα 6.3B, άνω πλαίσιο).

Η πρωτεολυτική διάσπαση της πολυ-ADP-ριβοσυλο-πολυμεράσης (PARP), ενός αξιόπιστου δείκτη της κυτταρικής απόπτωσης, χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της κυτταρικής απόπτωσης από το θειικό βαναδύλιο. Σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα HaCaTneo, HaCaTBcl-2/2 και HaCaTApoJ/6 χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου (0-1000 μM) για 24 h και κυτταρικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν και μελετήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου και με ανοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση της PARP. Το θειικό βαναδύλιο προκάλεσε την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP στα κύτταρα HaCaTneo σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (Σχήμα 6.3B, κάτω πλαίσιο). Ενώ τα κύτταρα στα οποία δεν χορηγήθηκε θειικό βαναδύλιο εκφράζανε μόνον την φυσιολογική μορφή του ενζύμου μοριακού βάρους 115 kDa, στα κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε θειικό βαναδύλιο εκφράζανε και τις δύο μορφές της PARP, την 115 kDa φυσιολογική μορφή του ενζύμου, αλλά και τη 89 kDa διασπασμένη μορφή του, ένα επιπλέον αποδεικτικό στοιχείο της απόπτωσης των κυττάρων HaCaT από το θειικό βαναδύλιο (Σχήμα 6.3B, κάτω πλαίσιο). Η πρωτεολυτική διάσπαση της PARP ανιχνεύθηκε ακόμη και στη χαμηλή συγκέντρωση των 25 μM VOSO<sub>4</sub> και συσχετίζεται με τη θραυσματοποίηση του DNA (Σχήμα 6.3B, άνω πλαίσιο). Εκτοπική έκφραση της Bcl-2 στα κύτταρα HaCaT ανέστειλε πλήρως την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP από το θειικό βαναδύλιο σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκε. (Σχήμα 6.3B, άνω πλαίσιο). Αντίθετα η υπερέκφραση της κλαστρίνης/ApoJ ανέστειλε την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP σε συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου έως 200 μM, αλλά όχι στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 500 και 1000 μM. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι πιθανά η Bcl-2 έχει ισχυρότερη αντι-αποπτωτική δράση από αυτή της κλαστρίνης/ApoJ, τουλάχιστον στην απόπτωση των κυττάρων HaCaT που επάγεται από το θειικό βαναδύλιο.



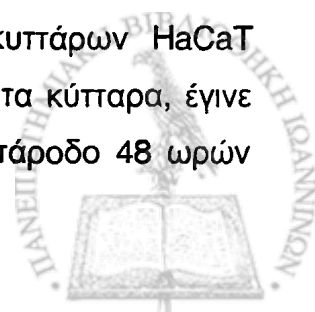
## ΕΝΟΤΗΤΑ II

### **Οι επιδράσεις του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση κερατινοκυττάρων και ινοβλαστών: Ο ρόλος των αντι-αποπτωτικών γονιδίων κλαστρίνης/ApoJ και Bcl-2**

#### **6.3. Το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και επάγει την απόπτωση των κερατινοκυττάρων HaCaT και των ινοβλαστών MRC-5**

Τα κύτταρα HaCaT είναι μια αυθόρμητα αθανатоποιημένη κερατινοκυτταρική σειρά (Boukamp et al., 1988) που έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί σε μελέτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού και απόπτωσης μετά από χορήγηση διαφόρων αυξητικών και κυτταροτοξικών παραγόντων και παραγόντων στρες. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και επάγει την απόπτωση των HaCaT (Iwasaki-Bessho, 1998; Bektas et al., 1998; Müller-Wieprecht et al., 2000). Αυτές οι μελέτες επιτρέπουν τη χρήση του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου, ενός προϊόντος του μεταβολισμού των λιπιδίων, ως μέσου για τη μελέτη ενός δυνητικά αντι-αποπτωτικού γονιδίου, της κλαστρίνης/απολιποπρωτεΐνης J (ApoJ), που μεταξύ άλλων εμπλέκεται στη μεταφορά των λιπιδίων (βλέπε εισαγωγή, παρ. 7.1) και στη σύγκριση του με το Bcl-2, ενός καλά χαρακτηρισμένου αντι-αποπτωτικού γονιδίου ακόμη και στα κύτταρα HaCaT μετά από χορήγηση C<sub>2</sub>-κεραμιδίου (Müller-Wieprecht et al., 2000).

Κύτταρα HaCaT σε χαμηλή κυτταρική πυκνότητα επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις C<sub>2</sub>-κεραμιδίου (5-40 μM) ή με αιθανόλη (0 μM C<sub>2</sub>-κεραμίδιο), σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και για διαφορετικές χρονικές περιόδους 12, 24 ή 48 h και μετρήθηκαν με αιμοκυτταρόμετρο μετά την πάροδο των συγκεκριμένων χρονικών περιόδων για να εκτιμηθεί η δράση του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην κυτταρική απόπτωση. Το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό και την αύξηση των κυττάρων HaCaT κατά χρόνο και δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (Σχήμα 6.3A). Η αναστολή των κερατινοκυττάρων HaCaT διαπιστώθηκε μετά από 12 ώρες επώασης του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου με τα κύτταρα, έγινε εμφανής μετά από 24 ώρες και ήταν σχεδόν πλήρης μετά την πάροδο 48 ωρών



επώασης (Σχήμα 3Α). Η αναστολή του πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση 5  $\mu\text{M}$   $\text{C}_2$ -κεραμιδίου και επαυξήθηκε με την αύξηση των συγκεντρώσεων του  $\text{C}_2$ -κεραμιδίου στις κυτταροκαλλιέργειες (Σχήμα 6.3Α).

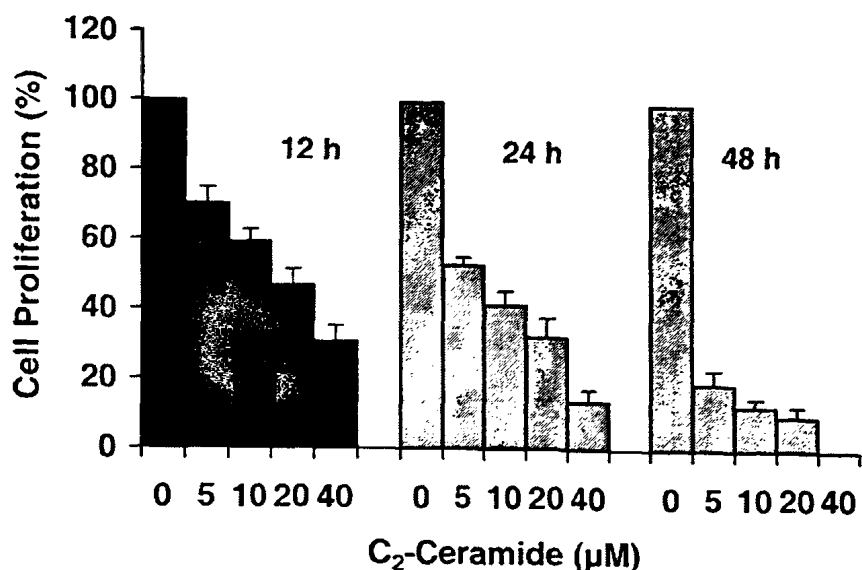
Για να εξεταστεί εάν το  $\text{C}_2$ -κεραμίδιο επάγει την απόπτωση των κυττάρων HaCaT, απομονώθηκε χαμηλού μοριακού βάρους DNA από επιπλέοντα και επικολλημένα κύτταρα HaCaT και MRC-5 που είχαν επωαστεί είτε με συγκεντρώσεις κεραμιδίου από 0-40  $\mu\text{M}$  ή με αιθανόλη και αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Η χορήγηση  $\text{C}_2$ -κεραμιδίου στα κύτταρα HaCaT (Σχήμα 6.3B) προκάλεσε την ενδονουκλεοσωμική θραυσματοποίηση του DNA, χαρακτηριστική των κυττάρων που υφίστανται προγραμματισμένο θάνατο με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, συγκρινόμενη με τα κύτταρα στα οποία δεν είχε χορηγηθεί  $\text{C}_2$ -κεραμίδιο ή είχαν επωαστεί μόνο με 0,4% αιθανόλη. Η επαγωγή της ενδονουκλεοσωμικής θραυσματοποίησης (DNA ladder) ήταν εμφανής σε συγκέντρωση κεραμιδίου 5  $\mu\text{M}$  και αυξήθηκε σημαντικά με συγκεντρώσεις από 10  $\mu\text{M}$  έως 40  $\mu\text{M}$   $\text{C}_2$ -κεραμιδίου για 24 ώρες (Σχήμα 6.3B). Η απόπτωση των κυττάρων HaCaT ήταν εμφανής μετά από 24 ώρες και σχεδόν ολοκληρωτική μετά από επώαση 48 ωρών σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις  $\text{C}_2$ -κεραμιδίου.

Η χορήγηση  $\text{C}_2$ -κεραμιδίου σε κύτταρα MRC-5 με αυξανόμενες συγκεντρώσεις (5-40  $\mu\text{M}$   $\text{C}_2$ -κεραμίδιο) ή 0,4% αιθανόλη είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της ενδονουκλεοσωμικής θραυσματοποίησης μόνο στη συγκέντρωση των 40  $\mu\text{M}$   $\text{C}_2$ -κεραμιδίου (Σχήμα 6.3Γ).

Συνοπτικά, η χορήγηση  $\text{C}_2$ -κεραμιδίου σε κυτταρικές σειρές HaCaT αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την αύξησή τους, ενώ επάγει απόπτωση σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές HaCaT και MRC-5 με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, όμως υψηλότερες συγκεντρώσεις  $\text{C}_2$ -κεραμιδίου απαιτούνται για την επαγωγή της απόπτωσης στα κύτταρα MRC-5. Έτσι αποδεικνύεται ότι τα κύτταρα HaCaT είναι πιο ευαίσθητα στην παρουσία κεραμιδίου από ότι οι φυσιολογικοί ανθρώπινοι διπλοειδείς ινοβλάστες MRC-5.



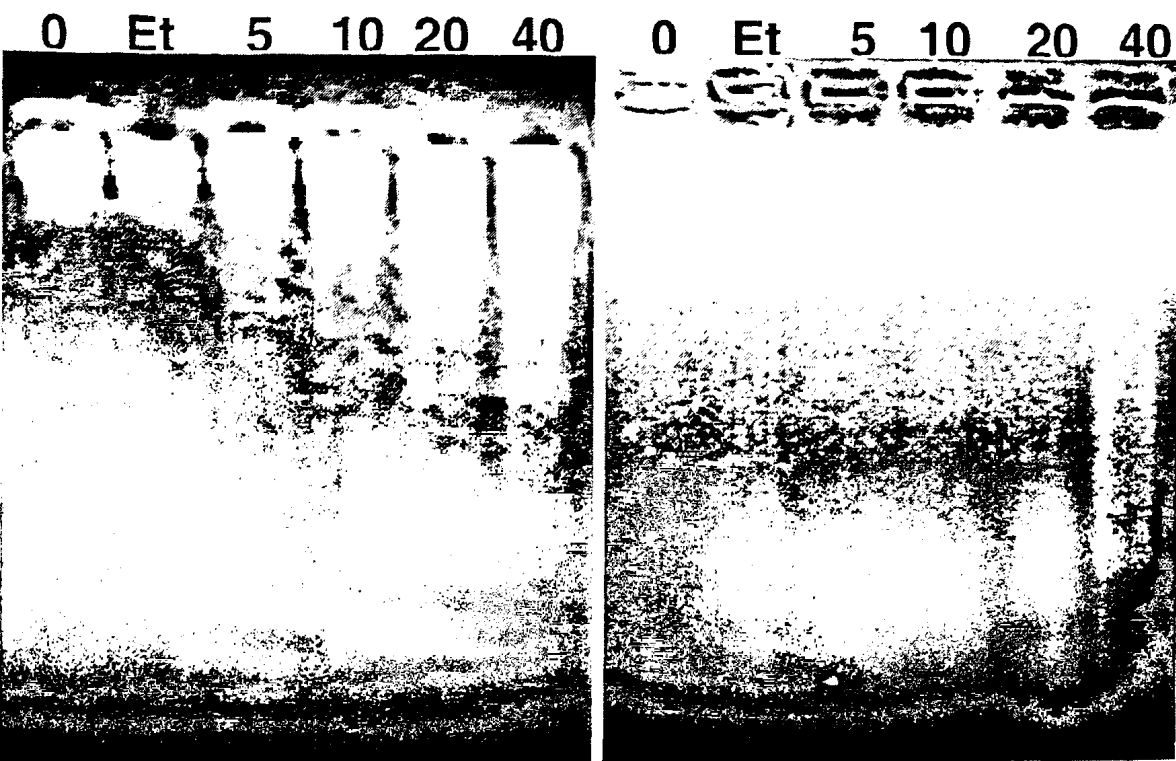




(Γ)

HaCaT

MRC-5



3. Οι επιδράσεις του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου στα κερατινοκύτταρα HaCaT. (A) Αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HaCaT από C<sub>2</sub>-κεραμίδιο. Σε κύτταρα HaCaT χορηγήθηκαν αυξανόμενες δόσεις C<sub>2</sub>-κεραμιδίου (5-40 µM) ή 0,4% αιθανόλης (0 µM) για 12, 24 και 48h. Η βιωσιμότητα των κυττάρων επεξεργασμένων με κεραμίδιο εκφράστηκε ως ποσοστό των κυττάρων επεξεργασμένων με αιθανόλη. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών πειραμάτων σε duplicates ± SD (n=6). (B), (Γ) Επίδραση των αυξανόμενων δόσεων C<sub>2</sub>-κεραμιδίου (0-40 µM) ή 0,4% αιθανόλης (Et) για 24h στη θραυσματοποίηση του DNA των HaCaT (B) και MRC-5 (Γ). DNA απομονώθηκε από επικολλημένα και επιπλέοντα κύτταρα και αναλύθηκε σε 1.6% πηκτική αгарόζης.

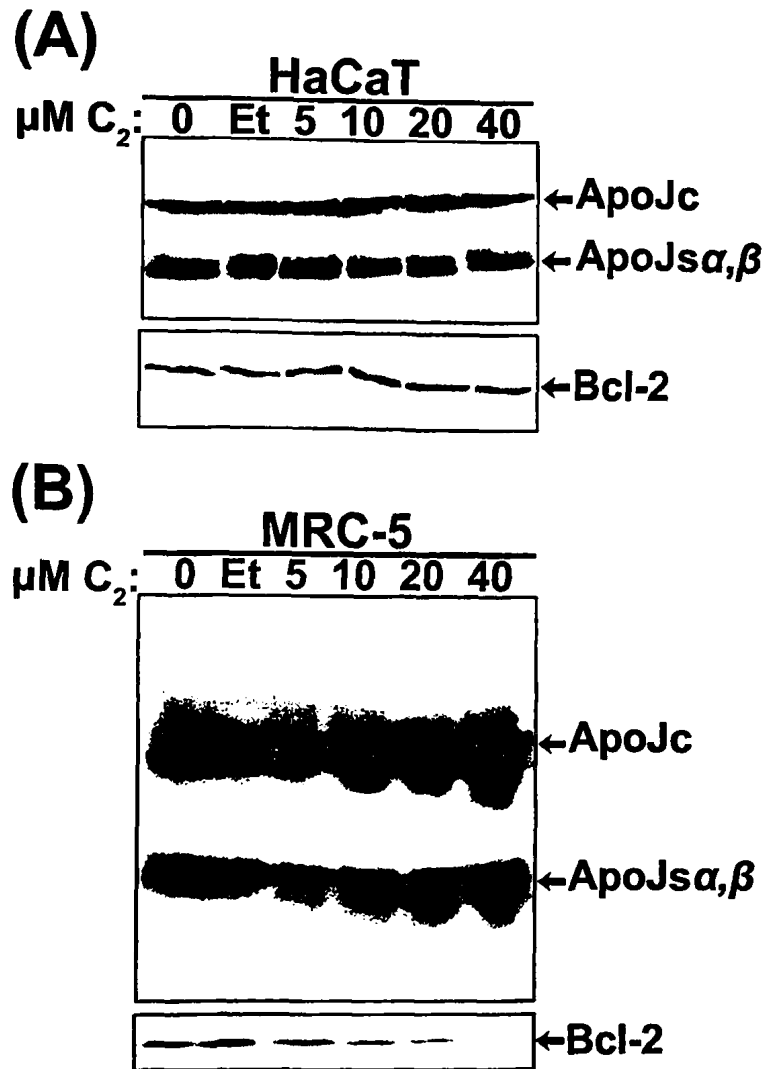
### 7.3. Έκφραση της κλαστρίνης/ApoJ και της Bcl-2 σε φυσιολογικά κύτταρα MRC-5 και HaCaT μετά τη χορήγηση C<sub>2</sub>-κεραμιδίου

Η επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων HaCaT και MRC-5 από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο διεγείρει το ενδιαφέρον μας να μελετήσουμε την έκφραση του Bcl-2, ενός καλά χαρακτηρισμένου αντι-αποπτωτικού γονιδίου, και της κλαστρίνης/απολιποπρωτεΐνης J (ApoJ), ενός δυνητικά αντι-αποπτωτικού γονιδίου, πριν και μετά την χορήγηση C<sub>2</sub>-κεραμιδίου, ενός προϊόντος του μεταβολισμού των λιπιδίων.

Κύτταρα HaCaT σε χαμηλή πυκνότητα επωάστηκαν για 24 h με C<sub>2</sub>-κεραμίδιο, πρωτεΐνες απομονώθηκαν και αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση του Bcl-2 και της ApoJ, όπως έχει περιγραφεί στα Υλικά και στις Μεθόδους (Σχήμα 7.3). Η κλαστρίνη/ApoJ έχει τρεις μορφές όπως έχει ανιχνευθεί κάτω από φυσικές (native) και αναγωγικές (reduced) συνθήκες (Petropoulou et al., 2001): μια ενδοκυττάρια μορφή 60 kDa λιγότερο γλυκοζυλιωμένη, μια εκκρινόμενη μορφή 80 kDa που αποτελείται από δύο αλυσίδες α και β, μοριακού βάρους 36-40 kDa η καθεμία, και μια πυρηνική μορφή. Το αντίσωμα ανίχνευσε την 60 kDa ενδοκυττάρια μορφή της κλαστρίνης/ApoJ, αλλά και την εκκρινόμενη 80 kDa μορφή που εμφανίζεται ως ζώνη των 36-40 kDa (α- και β-αλυσίδες) λόγω της αναγωγής της. Η χορήγηση του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου δεν μετέβαλε τα επίπεδα έκφρασης της κλαστρίνης/ApoJ στα κύτταρα HaCaT (Σχήμα 7.3A, άνω πλαίσιο). Τα κύτταρα HaCaT εκφράζανε χαμηλά επίπεδα της 26 kDa Bcl-2 πρωτεΐνης σε σχέση με την ApoJ και η έκφραση της παρέμενε αμετάβλητη μετά τη χορήγηση C<sub>2</sub>-κεραμιδίου σε κυτταροκαλλιέργειες κυττάρων HaCaT (Σχήμα 7.3A, κάτω πλαίσιο).

Χορήγηση C<sub>2</sub>-κεραμιδίου με αυξανόμενες συγκεντρώσεις σε κύτταρα MRC-5 για 24 ώρες είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή κατά δόσο-εξαρτώμενο τρόπο της πρωτεΐνης κλαστρίνης/ApoJ, δημιουργώντας ενδείξεις συσχέτισης μεταξύ επιπέδων κλαστρίνης/ApoJ και αποπτωτικής διαδικασίας ή κυτταρικής επιβιωσιμότητας (Σχήμα 7.3B, άνω πλαίσιο). Όμως, αντιθέτως η παρουσία C<sub>2</sub>-κεραμιδίου σε κύτταρα MRC-5 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης Bcl-2, ιδιαίτερα όταν οι συγκεντρώσεις του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου κυμαίνονται από 20 μM έως 40 μM (Σχήμα 7.3B, κάτω πλαίσιο).





**Σχήμα 7.3.** Έκφραση της κλαστρίνης/ApoJ και της Bcl-2 σε κύτταρα HaCaT και MRC-5 πριν και μετά τη χορήγηση C<sub>2</sub>-κεραμιδίου. 40μg πρωτεΐνης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε 10% (ApoJ) ή 15% (Bcl-2) πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυταρίνης και η έκφραση της κλαστρίνης/ApoJ και Bcl-2 σε **(A)** κερατινοκύτταρα HaCaT και **(B)** φυσιολογικούς ινοβλάστες MRC-5, ανιχνεύθηκε με ένα πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός στη κλαστρίνη/ApoJ πρωτεΐνη (sc-6419) σε αναλογία 1:1500 ή με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα μύος στην Bcl-2 πρωτεΐνη (sc-509) σε αναλογία 1:500, αντίστοιχα. Χρόνος έκθεσης: (A) ApoJ, 5 λεπτά; Bcl-2, 45 λεπτά, (B) ApoJ, 1 λεπτό, Bcl-2, 2 λεπτά. Et, αιθανόλη

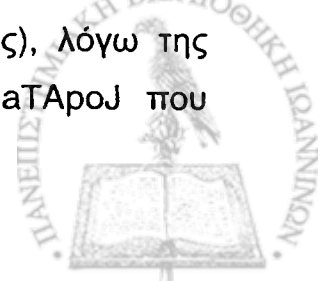
Η μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2 στα κύτταρα MRC-5 συνδέθηκε και συσχετίστηκε με την επαγωγή της απόπτωσης σε αυτά τα κύτταρα, αποδεικνύοντας ότι η χορήγηση κεραμιδίου επάγει μέσω ενός μηχανισμού μείωσης της έκφρασης του κύριου αντι-αποπτωτικού γονιδίου Bcl-2 την απόπτωση των ινοβλαστών MRC-5.

Συμπερασματικά, τα στοιχεία μας δείχνουν ότι τα κύτταρα HaCaT είναι πλέον ευαίσθητα στην επαγόμενη από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο αποπτωτική διαδικασία, από τους φυσιολογικούς ανθρώπινους διπλοειδείς ινοβλάστες MRC-5 πιθανώς διαμέσου μηχανισμών που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων της κλαστρίνης/ApoJ και του Bcl-2.

### 8.3. Κατασκευή και χαρακτηρισμός κυττάρων HaCaT και MRC-5 που υπερεκφράζουν Bcl-2 ή κλαστρίνη/ApoJ

Για να αναλυθεί και να εξεταστεί ο ρόλος της κλαστρίνης/ApoJ στην απόπτωση των κυττάρων HaCaT και MRC-5, και να συγκριθεί με τον καλά μελετημένο αντι-αποπτωτικό ρόλο του Bcl-2 στην επαγόμενη από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο κυτταρική απόπτωση, κύτταρα HaCaT διαμολύνθηκαν με pcDNA3.1B, pcDNA/ApoJ (Petrovou et al., 2001) ή pcDNA/Bcl-2 (Odajima et al., 2000) και επιλέχθηκαν σε G418, ώστε να παραχθούν σταθεροί κλώνοι HaCaTneo, HaCaTApoJ ή, HaCaTBcl-2 αντίστοιχα. Μετά από την επιλογή των διαμολυσμένων κυττάρων σε G418, διάφοροι κλώνοι ανθεκτικοί στο G418 απομονώθηκαν και αναπτύχθηκαν σε πλήρες ταπήτιο και χαρακτηρίστηκαν για την έκφραση της κλαστρίνης/ApoJ ή της Bcl-2 με ανοσο-αποτύπωμα κατά western (Σχήμα 8.3).

Το Σχήμα 8.3A απεικονίζει την έκφραση της κλαστρίνης/ApoJ και της Bcl-2 σε διάφορους σταθερά διαμολυσμένους κυτταρικούς κλώνους HaCaT. Η κλαστρίνη/ApoJ έχει τρεις μορφές, όπως έχει ανιχνευτεί κάτω από φυσικές και αναγωγικές συνθήκες: μια ενδοκυττάρια μορφή 60 kDa, μια εκκρινόμενη μορφή 80 kDa που αποτελείται από δυο αλυσίδες α και β, μοριακού βάρους 36-40 kDa η κάθε μία και μία πυρηνική μορφή. Το αντίσωμα ανιχνεύει την 60 kDa ενδοκυττάρια μορφή της κλαστρίνης/ApoJ, η οποία ωριμάζει ενδοκυττάρια, και την εκκρινόμενη 80 kDa μορφή που εμφανίζεται ως ζώνη των 36–40 kDa (α-και β-αλυσίδες), λόγω της αναγωγής της. Ο κλώνος 6 των διαμολυσμένων κυττάρων HaCaTApoJ που

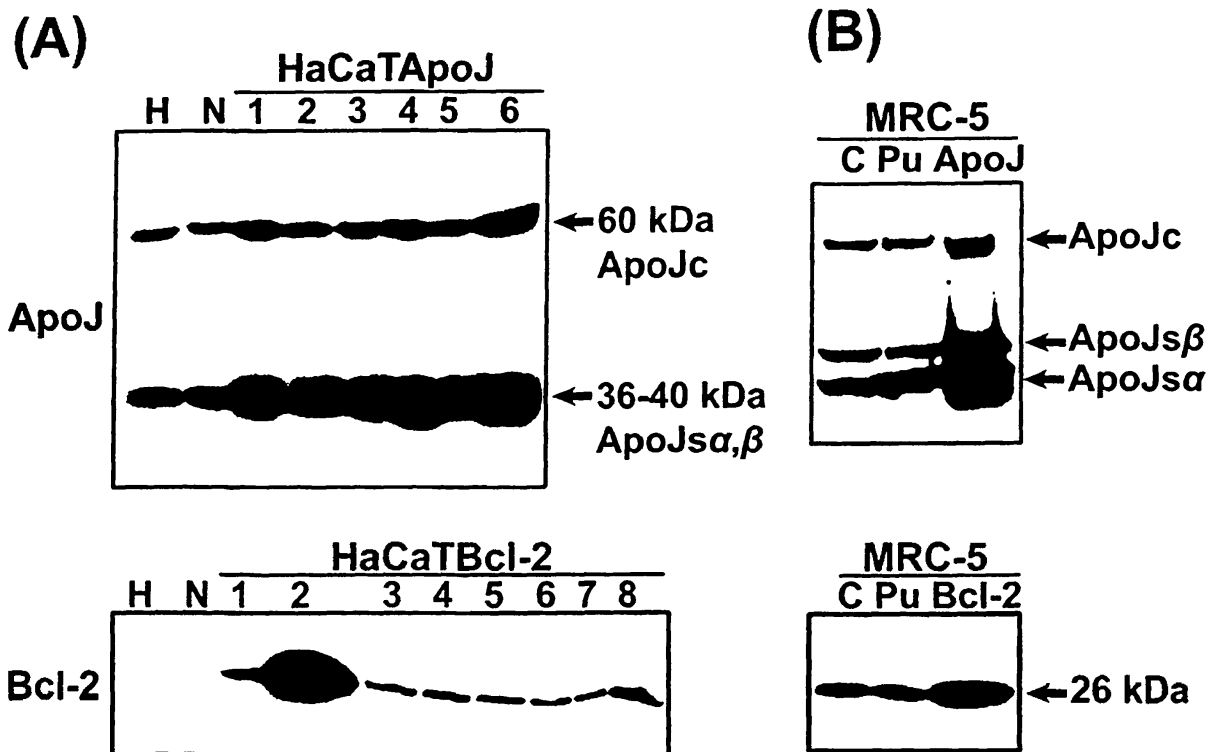


υπερέκφραζε την ανθρώπινη κλαστρίνη/ΑροJ (θα αναφέρεται εφεξής ως HaCaTΑροJ/6) επιλέχθηκε για περαιτέρω ανάλυση (Σχήμα 8.3A, άνω πλαίσιο).

Με παρόμοιο τρόπο απεικονίζεται η έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, στα φυσιολογικά κύτταρα HaCaT και στους σταθερά διαμολυσμένους κυτταρικούς κλώνους (Σχήμα. 3A, κάτω πλαίσιο). Τα κύτταρα HaCaT εκφράζανε χαμηλά ως μη-ανιχνεύσιμα επίπεδα της 26 kDa Bcl-2 πρωτεΐνης σε σχέση με την κλαστρίνη/ΑροJ. Ενώ δεν ανιχνεύθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 στα μη-διαμολυσμένα κύτταρα HaCaT ή στα κύτταρα HaCaTneo, όλοι οι απομονωμένοι κυτταρικοί κλώνοι εκφράζανε τη Bcl-2, αλλά σε διαφορετικά επίπεδα (Σχήμα 8.3A, κάτω πλαίσιο). Οι κυτταρικοί κλώνοι 1, 2 και 8 υπερεκφράζανε την 26 kDa Bcl-2 πρωτεΐνη. Όμως, ο κλώνος 2 των διαμολυσμένων κυττάρων HaCaTBcl-2 υπερέκφραζε την ανθρώπινη Bcl-2 πρωτεΐνη (η οποία εφεξής θα αναφέρεται ως HaCaTBcl-2/2) σε υψηλά επίπεδα και ο οποίος επιλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε κατ'αντιστοιχία με τον κλώνο HaCaTΑροJ/6 για περαιτέρω ανάλυση.

Για την κατασκευή κυττάρων MRC-5 που θα υπερέκφραζαν τις πρωτεΐνες κλαστρίνη/ΑροJ ή Bcl-2, φυσιολογικά κύτταρα MRC-5 επιμολύνθηκαν με τους ανασυνδυασμένους ρετροϊούς ελαττωματικής αντιγραφής Babe-Puro, Babe-Puro/ΑροJ ή Babe-Puro/Bcl-2 και επιλέχθηκαν στο αντιβιοτικό πουρομυκίνη, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Κύτταρα MRC-5 ανθεκτικά στην πουρομυκίνη αναλύθηκαν για την έκφραση της ανθρώπινης κλαστρίνης/ΑροJ (Σχήμα 8.3B, άνω πλαίσιο) ή της Bcl-2 (Σχήμα 8.3B, κάτω πλαίσιο) με ανοσο-αποτύπωμα κατά western. Επιμολυσμένα κύτταρα MRC-5 με Babe-Puro/ΑροJ βρέθηκαν να εκφράζουν υψηλά επίπεδα κλαστρίνης/ΑροJ συγκρινόμενα με τα μη-επιμολυσμένα κύτταρα MRC-5 ή με τα κύτταρα MRC-5 επιμολυσμένα με τον πρότυπο ρετροϊικό φορέα Babe-Puro (Σχήμα 8.3B, άνω πλαίσιο). Ομοίως, κύτταρα MRC-5 που επιμολύνθηκαν με τον ανασυνδυασμένο ρετροϊό Babe-Puro/Bcl-2 εκφράζανε υψηλά επίπεδα της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 συγκρινόμενα με μη-επιμολυσμένα κύτταρα MRC-5 ή με τα κύτταρα MRC-5 επιμολυσμένα με τον πρότυπο ρετροϊικό φορέα Babe-Puro (Σχήμα 8.3B, κάτω πλαίσιο).





**Σχήμα 8.3.** Έκφραση της κλαστρίνης/ApoJ και της Bcl-2 στους διαμολυσμένους κλώνους HaCaTBcl-2 και HaCaTApoJ ή στα επιμολυσμένα κύτταρα MRC-5ApoJ και MRC-5Bcl-2 με ανοσο-αποτύπωμα κατά western. 40μg πρωτεΐνης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε 10% (ApoJ) ή σε 15% (Bcl-2) πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυταρίνης και η έκφραση της κλαστρίνης/ApoJ και Bcl-2 ανιχνεύθηκε με ένα πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός εναντίον της κλαστρίνης/ApoJ (sc-6419) σε αραιώση 1:1500 ή με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα μύς εναντίον της Bcl-2 πρωτεΐνης (sc-509) σε αραιώση 1:500, αντίστοιχα. **(A)** Έκφραση της κλαστρίνης/ApoJ και της Bcl-2 σε μη-διαμολυσμένα κύτταρα HaCaT, σε κύτταρα HaCaT διαμολυσμένα με τον πρότυπο φορέα rcDNA και στους σταθερά διαμολυσμένους κλώνους HaCaTApoJ (άνω πλαίσιο) και HaCaTBcl-2 (κάτω πλαίσιο). **(B)** Έκφραση της κλαστρίνης/ApoJ και της Bcl-2 σε μη-επιμολυσμένα κύτταρα MRC-5, σε κύτταρα MRC-5 επιμολυσμένα με τον πρότυπο φορέα Babe-Puro και στους σταθερά επιμολυσμένους κυτταρικούς πληθυσμούς MRC-5ApoJ (άνω πλαίσιο) και MRC-5Bcl-2 (κάτω πλαίσιο). H, HaCaT; N, HaCaTNeo; C (control), μη-επιμολυσμένα κύτταρα MRC-5; Pu (puromycin), κύτταρα MRC-5 επιμολυσμένα με τον πρότυπο ρετροϊκό φορέα Babe-Puro και ανθεκτικά στην πουρομυκίνη; ApoJ ή Bcl-2, κύτταρα MRC-5 επιμολυσμένα με τους ρετροϊκούς φορείς Babe-Puro/ApoJ ή Babe-Puro/Bcl-2 και ανθεκτικά στην πουρομυκίνη. Χρόνος έκθεσης: (A) ApoJ, 3 λεπτά, Bcl-2, 1.5 λεπτό, (B) ApoJ, 1 λεπτό, Bcl-2, 2 λεπτά.

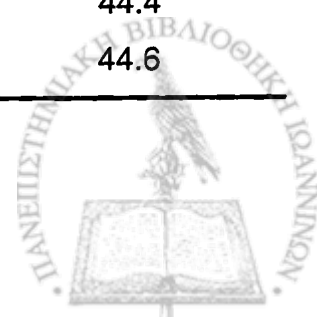
Για να μελετήσουμε τις επιδράσεις της κλαστρίνης/ApoJ και Bcl-2 στην κυτταρική αύξηση και την απόπτωση ελέγχθηκαν αρχικά ορισμένες ιδιότητες αύξησης των κυττάρων HaCaT, HaCaTneo, HaCaTBcl-2/2 και HaCaTApoJ/6, καθώς επίσης και των κυττάρων MRC-5, MRC-5Puro, MRC-5Bcl-2 και MRC-5ApoJ.

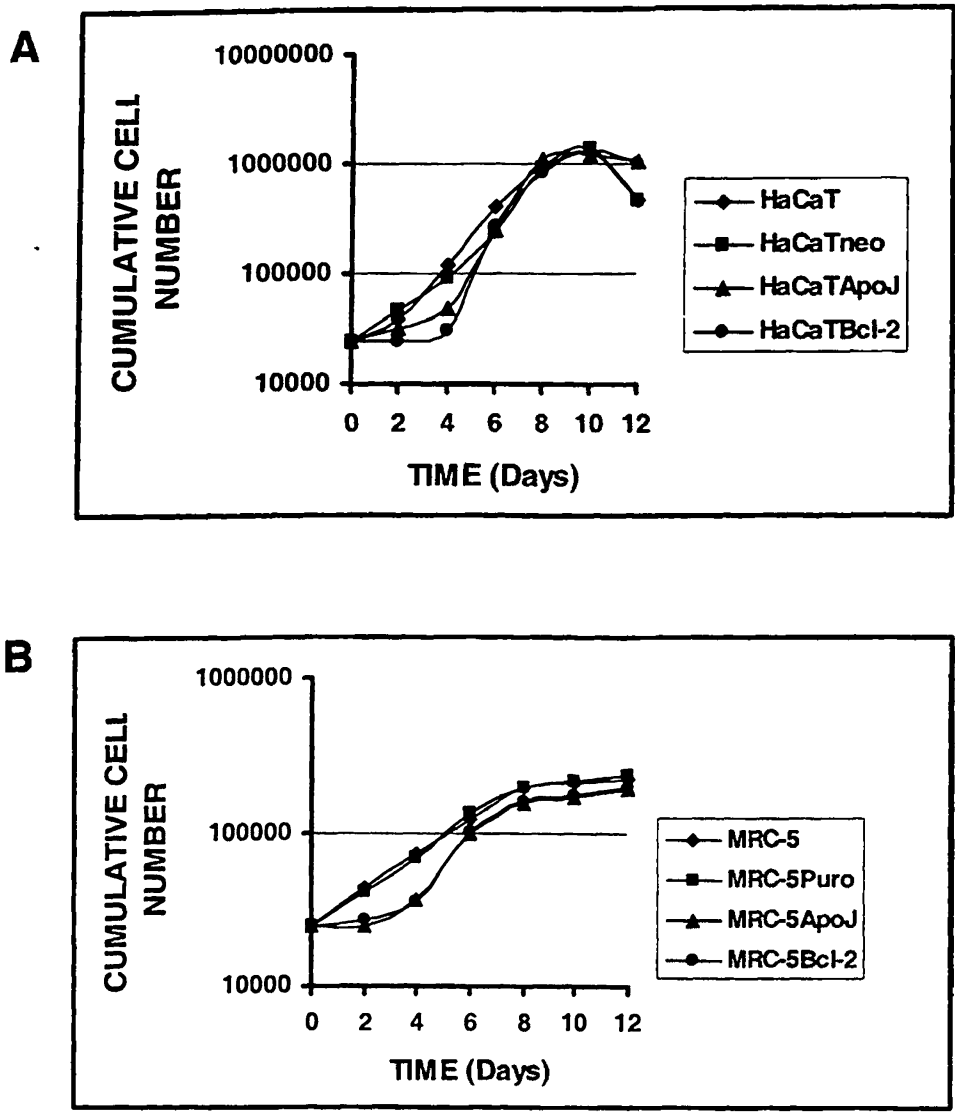
Είχε δειχθεί ότι η υπερέκφραση της Bcl-2 σε διάφορους κυτταρικούς τύπους επιβραδύνει ή και καταστέλλει την αύξηση φυσιολογικών (Kumazaki et al., 2002; Rincheval et al., 2002; Kumazaki et al., 2003; Tombor et al., 2003) αλλά και κυτταρικών σειρών (O'Reilly et al., 1996; Vairo et al., 1996; Vairo et al., 2000; Crescenzi et al., 2003; Borner, 2003; Schinzel et al., 2004) και ότι η η υπερέκφραση ή η χορήγηση της κλαστρίνης/ApoJ σε διάφορες κυτταρικές σειρές έχει αντι-πολλαπλασιαστικό ρόλο (Zhu et al., 1996; Bettuzzi et al., 2002; Bettuzzi et al., 2003). Προκειμένου να μελετηθούν οι επιδράσεις της υπερέκφρασης της κλαστρίνης/ApoJ και της Bcl-2 στους ρυθμούς αύξησης των κερατινοκυττάρων HaCaT και των φυσιολογικών ινοβλαστών MRC-5, κατασκευάσθηκαν καμπύλες αύξησης, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι (Σχήμα 9.3). Η υπερέκφραση της κλαστρίνης/ApoJ ή της Bcl-2 στα HaCaT ή στα MRC-5 δεν μετέβαλε τους ρυθμούς αύξησης των κυττάρων που μελετήθηκαν σε σύγκριση με τα αντίστοιχα πρότυπα κύτταρα (Σχήμα 9.3 και Πίνακας 6.3). Όμως, παρατηρήθηκε από τις καμπύλες αύξησης μία περίοδος καθυστέρησης στην ανάπτυξη των κυττάρων HaCaT και MRC-5 που υπερεκφράζανε την κλαστρίνη/ApoJ ή την Bcl-2, ιδιαίτερα κατά τις 4 πρώτες ημέρες μετά τη σπορά των κυττάρων (Σχήμα 9.3).

Προκειμένου να μελετηθούν επιπλέον οι ιδιότητες αύξησης των κυττάρων HaCaT και MRC-5, αναλύθηκε η κυτταρική πυκνότητα και η ικανότητα σποράς (plating efficiency) τους (Πίνακας 1.3).

**Πίνακας 1.3. Ιδιότητες αύξησης των HaCaT, HaCaTneo, HaCaTBcl-2/2 και HaCaTApoJ/6**

Κυτταρική σειρά	Ρυθμός αύξησης (ώρες)	Κυτταρική πυκνότητα (κύτταρα/cm <sup>2</sup> )	Ικανότητα σποράς (%)
HaCaT	26.95	4.96 x 10 <sup>4</sup>	47.2
HaCaTneo	24.70	5.09 x 10 <sup>4</sup>	45.8
HaCaTBcl-2/2	28.30	5.06 x 10 <sup>4</sup>	44.4
HaCaTApoJ/6	29.20	5.05 x 10 <sup>4</sup>	44.6





**Σχήμα 9.3.** Καμπύλες αύξησης των κυττάρων HaCaT και MRC-5. **(A)**  $2.5 \times 10^4$  κύτταρα HaCaT, HaCaTneo και HaCaT που υπερεκφράζανε την κλαστρίνη/ApoJ ή την Bcl-2, ή **(B)**  $2.5 \times 10^4$  κύτταρα MRC-5, MRC-5Puro και MRC-5 που υπερεκφράζανε την κλαστρίνη/ApoJ ή την Bcl-2 τοποθετήθηκαν σε πηγαδάκια ενός πολυτρυβλίου και τα κύτταρα επωάστηκαν για 12-14 ημέρες. Ο αριθμός των κυττάρων υπολογιζόταν κάθε 2 ημέρες με τη βοήθεια ενός αιμοκυτταρομέτρου για το σχεδιασμό των καμπύλων αύξησης.





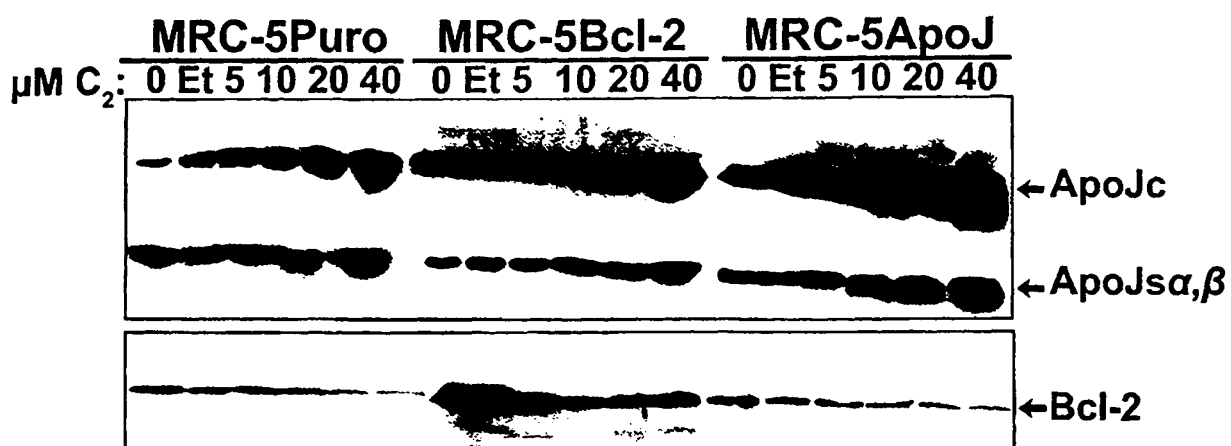
Η υπερέκφραση του Bcl-2 ή της κλαστρίνης/ApoJ στα HaCaT δεν μετέβαλε σημαντικά καμμία από τις ιδιότητες αύξησης των κυττάρων που μελετήθηκαν σε σύγκριση με τα μη-διαμολυσμένα κύτταρα HaCaT ή με τα HaCaTneo, μολονότι παρατηρήθηκε μια ελάχιστη μείωση της ικανότητας σποράς τους (Πίνακας 1.3) προφανώς λόγω της αρχικής καθυστέρησης της αύξησής τους.

### 9.3. Έκφραση της κλαστρίνης/ApoJ και της Bcl-2 στα επιμολυσμένα κύτταρα MRC-5 μετά τη χορήγηση C<sub>2</sub>-κεραμιδίου

Καθώς η έκφραση των πρωτεϊνών κλαστρίνη/ApoJ και Bcl-2 δεν μεταβλήθηκε μετά τη χορήγηση του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου στα κύτταρα HaCaT, η έκφραση των δύο αυτών πρωτεϊνών αναλύθηκε με ανοσο-αποτύπωμα κατά western σε κύτταρα MRC-5Puro, MRC-5ApoJ και MRC-5Bcl-2 μετά τη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων C<sub>2</sub>-κεραμιδίου (Σχήμα 10.3). Όπως αναμενόταν η παρουσία C<sub>2</sub>-κεραμιδίου είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της κλαστρίνης/ApoJ στα κύτταρα MRC-5Puro, MRC-5Bcl-2 και MRC-5ApoJ με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, με τα τελευταία να υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη κλαστρίνη/ApoJ συγκρινόμενα με τα υπόλοιπα (Σχήμα 10.3). Αντίθετα, η χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων C<sub>2</sub>-κεραμιδίου οδήγησε στη μειορρύθμιση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 στα κύτταρα MRC-5Puro και στα MRC-5ApoJ, αλλά όχι στα επιμολυσμένα με το ρετροϊό Babe Puro/Bcl-2 κύτταρα MRC-5, ιδιαίτερα με συγκεντρώσεις C<sub>2</sub>-κεραμιδίου της τάξης των 20 και 40 μM (Σχήμα 10.3).

Να σημειωθεί επίσης, ότι δεν υπήρχε αμοιβαία ρύθμιση της έκφρασης της κλαστρίνης/ApoJ ή της Bcl-2. Με άλλα λόγια, η υπερέκφραση της Bcl-2 στα κύτταρα MRC-5 δεν επηρέασε την αυξορρύθμιση της κλαστρίνης/ApoJ και αντίστροφα, η υπερέκφραση της κλαστρίνης/ApoJ στα κύτταρα MRC-5 δεν επηρέασε την μειορρύθμιση της Bcl-2 στα κύτταρα MRC-5 μετά τη χορήγηση των αυξανόμενων συγκεντρώσεων του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου (Σχήμα 10.3).





**Σχήμα 10.3.** Έκφραση της κλαστρίνης/ApoJ και της Bcl-2 σε επιμολυσμένα κύτταρα MRC-5 πριν και μετά τη χορήγηση C<sub>2</sub>-κεραμιδίου. 40μg πρωτεΐνης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε 10% (ApoJ) ή 15% (Bcl-2) πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυταρίνης και η έκφραση της κλαστρίνης/ApoJ και της Bcl-2 σε ανθρώπινους ινοβλάστες MRC-5Puro, MRC-5Bcl-2 και MRC-5ApoJ ανιχνεύθηκαν με ένα πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός ενάντια της κλαστρίνης/ApoJ (sc-6419) σε αραιώση 1:1500 ή με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα μύος ενάντια της Bcl-2 πρωτεΐνης (sc-509) σε αραιώση 1:500, αντίστοιχα. Et, αιθανόλη

### 10.3. Αποκρίσεις των κυττάρων HaCaT και MRC-5 που υπερέκφραζαν την κλαστρίνη/ApoJ ή τη Bcl-2 μετά τη χορήγηση C<sub>2</sub>-κεραμιδίου

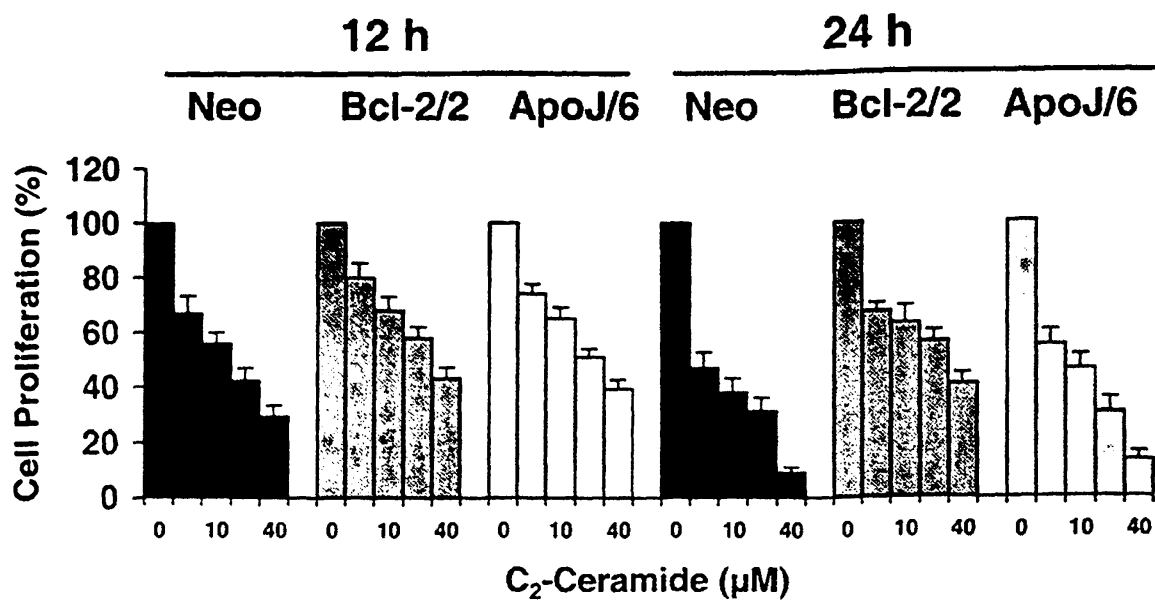
Προκειμένου να μελετηθούν επιπλέον οι επιδράσεις της ApoJ στην κυτταρική αύξηση και στην απόπτωση των κυττάρων HaCaT επαγόμενη από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο, αλλά και να συγκρίνουμε το ρόλο αυτής της δυνητικά αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης με τον καλά μελετημένο αντι-αποπτωτικό ρόλο της Bcl-2, χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις C<sub>2</sub>-κεραμιδίου (5-40μM) σε κύτταρα HaCaTneo, HaCaTBcl-2/2 και HaCaTApoJ/6 ή 0,4% αιθανόλης (0 μM κεραμιδίου) που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό ελεύθερου ορού για 12 και 24 ώρες στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν: η κυτταρική αύξηση, οι μορφολογικές μεταβολές των κυττάρων και η θραυσματοποίηση του DNA.

#### Επιδράσεις του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου στην αύξηση των διαμολυσμένων κυττάρων HaCaT

Η χορήγηση C<sub>2</sub>-κεραμιδίου ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HaCaTneo κατά χρόνο και δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (Σχήμα 11.3). Η χορήγηση 5–40 μM κεραμιδίου για 12 ή 24 ώρες σε κύτταρα HaCaTBcl-2/2 ή HaCaTApoJ έδειξε ότι ενώ η συνεχής υπερέκφραση της ανθρώπινης πρωτεΐνης Bcl-2 επέφερε ανθεκτικότητα στην επαγόμενη από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο αναστολή της αύξησης, η κλαστρίνη/ApoJ κατέστειλε μερικώς την επαγόμενη από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού συγκρινόμενη με τα κύτταρα HaCaTneo ή HaCaTBcl-2/2 (Σχήμα 11.3).

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα στις διαφορετικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου, ενώ η υπερέκφραση του Bcl-2 επιφέρει πλήρη ανθεκτικότητα στην επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων HaCaT από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο με χρόνο και δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, η υπερέκφραση της κλαστρίνης/ApoJ επέφερε μερική καταστολή της απόπτωσης των κυττάρων HaCaT που επάγεται από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο, σε σχέση με τα κύτταρα HaCaTneo ή με τα HaCaTBcl-2/2. Η διαφορά αυτή γίνεται εμφανής ιδιαίτερα μετά από επώαση των κυττάρων για 24 ώρες.





**Σχήμα 11.3.** Οι επιδράσεις του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου στα κερατινοκύτταρα HaCaT. Αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HaCaT από C<sub>2</sub>-κεραμίδιο. Σε κύτταρα HaCaT χορηγήθηκαν αυξανόμενες δόσεις C<sub>2</sub>-κεραμιδίου (5-40 μM) ή 0,4% αιθανόλης (0 μM) για 12h και 24h. Η βιωσιμότητα των κυττάρων που εκτέθηκαν σε κεραμίδιο εκφράστηκε ως επί τοις % των κυττάρων εκτεθειμένων σε αιθανόλη. Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών πειραμάτων εις διπλούν ± SD (n=6).

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ανικανότητα της κλαστρίνης/ΑροJ να επιφέρει ανθεκτικότητα στο C<sub>2</sub>-κεραμίδιο και να συγκριθεί με την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2, υπολογίστηκε η ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων HaCaT μετά τη χορήγηση C<sub>2</sub>-κεραμιδίου (Πίνακας 2.3).

**Πίνακας 2.3. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών των HaCaT, HaCaTneo, HaCaTBcl-2/2 και HaCaTΑροJ/6 μετά τη χορήγηση C<sub>2</sub>-κεραμιδίου για 24h σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό**

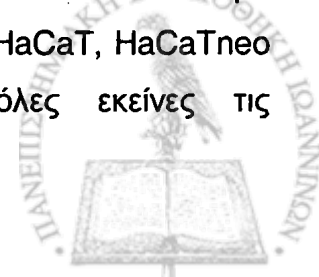
C <sub>2</sub> (μM)	HaCaT		HaCaTneo		HaCaTBcl-2/2		HaCaTΑροJ/6	
	Αποικίες	%	Αποικίες	%	Αποικίες	%	Αποικίες	%
0 (Et)	92	100	83	100	95	100	93	100
5	18	19.6	16	19.3	66	69.5	21	22.6
10	2	2.2	1	1.2	42	44.2	6	6.5
20	0	0	0	0	17	17.9	0	0
40	0	0	0	0	2	2.1	0	0

200 κύτταρα επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις C<sub>2</sub>-κεραμιδίου για 24h και μετά καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό για 14 ημέρες προκειμένου να σχηματισθούν αποικίες

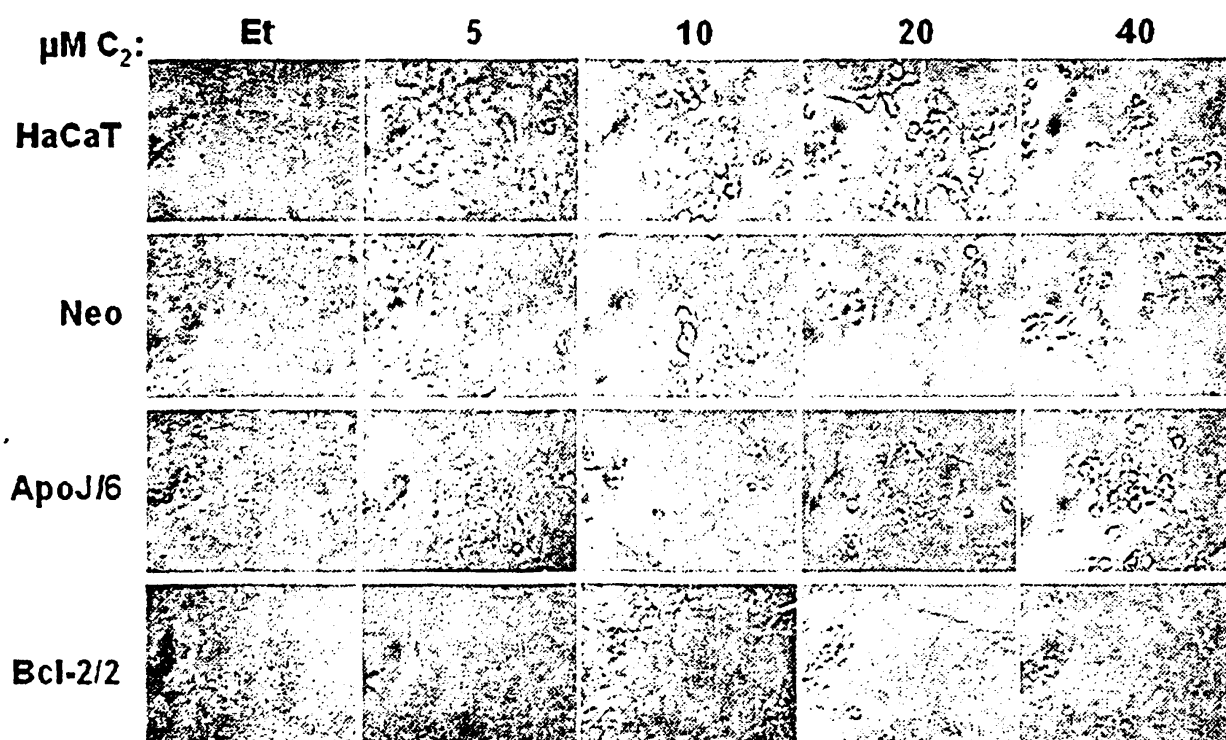
Είναι φανερό ότι η χορήγηση του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου επηρέασε την ανάπτυξη όλων των διαφορετικών κυττάρων HaCaT, αλλά σε διαφορετικό βαθμό, προφανώς λόγω της επαγωγής της απόπτωσης, όπως προκύπτει από το προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων (Σχήμα 11.3), αλλά και από τις μορφολογικές μεταβολές (Σχήμα 12.3). Όμως, ενώ η υπερέκφραση της Bcl-2 στα HaCaT αύξησε τον ανθεκτικό φαινότυπο στο C<sub>2</sub>-κεραμίδιο, η κλαστρίνη/ΑροJ δεν επέφερε ανθεκτικότητα στο κεραμίδιο (Πίνακας 2.3).

#### Επιδράσεις του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου στη μορφολογία των κυττάρων HaCaT και MRC-5

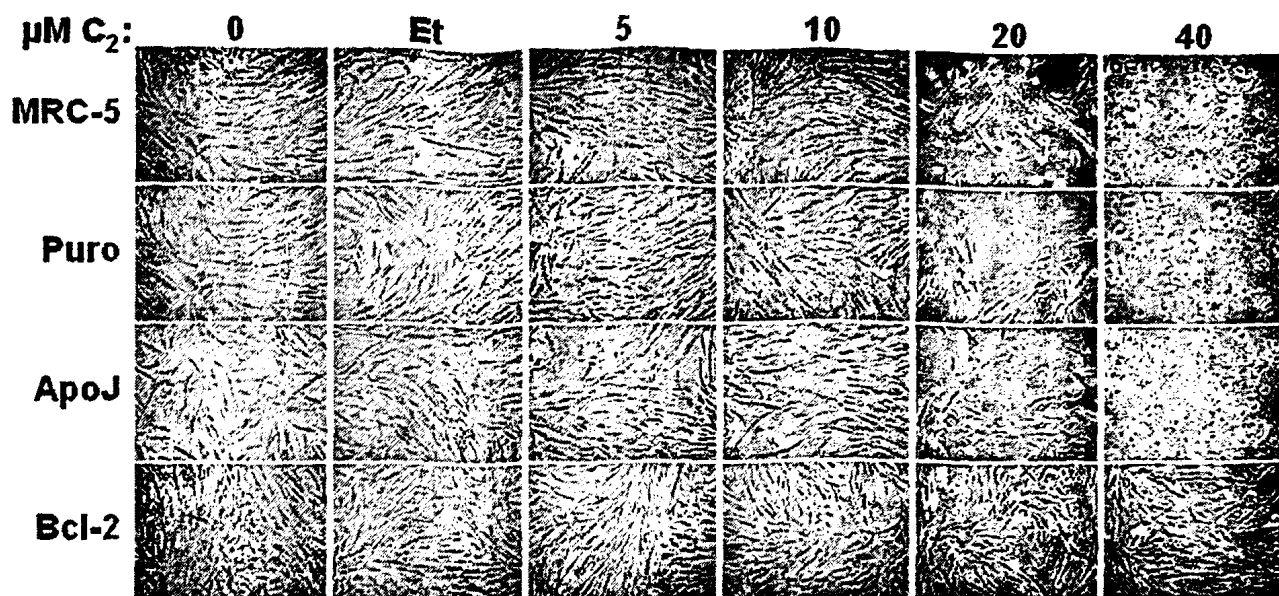
Για να μελετηθούν οι επιδράσεις της χορήγησης C<sub>2</sub>-κεραμιδίου στη μορφολογία των κυττάρων, κύτταρα HaCaT, HaCaTneo, HaCaTBcl-2/2 και HaCaTΑροJ/2 εξετάστηκαν σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων, μετά τη χορήγηση 5-40μM C<sub>2</sub>-κεραμιδίου ή 0,4% αιθανόλης (0 μM κεραμίδιο) για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό ελεύθερο ορού (Σχήμα 12.3). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ενώ τα κύτταρα παρουσία αιθανόλης είχαν φυσιολογική μορφολογία τα κύτταρα HaCaT, HaCaTneo ή HaCaTΑροJ/6 παρουσία C<sub>2</sub>-κεραμιδίου επιδεικνύουν όλες εκείνες τις



χαρακτηριστικές μορφολογικές μεταβολές της απόπτωσης, όπως κυτταρική συρρίκνωση, στρογγυλοποίηση και αποκόλληση από το υπόστρωμα με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Τα κύτταρα άρχιζαν να στρογγυλοποιούνται στη συγκέντρωση των 10  $\mu\text{M}$   $\text{C}_2$ -κεραμιδίου. Παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό των κυττάρων που υφίσταντο τις χαρακτηριστικές μεταβολές ήταν αναλογικά αυξανόμενο με την αύξηση των συγκεντρώσεων του  $\text{C}_2$ -κεραμιδίου (20  $\mu\text{M}$  και 40  $\mu\text{M}$ ). Στη συγκέντρωση των 40  $\mu\text{M}$   $\text{C}_2$ -κεραμιδίου σχεδόν όλα τα κύτταρα HaCaT, HaCaTneo και HaCaTApoJ/6 αποκολλήθηκαν από το υπόστρωμα. Σε αντίθεση τα κύτταρα HaCaTBcl-2/2 ήταν ανθεκτικά στην κυτταροτοξικότητα επαγόμενη από το  $\text{C}_2$ -κεραμίδιο χωρίς μορφολογικές μεταβολές (Σχήμα 12.3).



**Σχήμα 12.3.** Επιδράσεις του  $\text{C}_2$ -κεραμιδίου στη μορφολογία των κερατινοκυττάρων HaCaT, HaCaTneo, HaCaTApoJ/6 και HaCaTBcl-2/2. Στα διαφορετικά κύτταρα HaCaT χορηγήθηκαν αυξανόμενες δόσεις  $\text{C}_2$ -κεραμιδίου (5-40  $\mu\text{M}$ ) ή 0,4% αιθανόλη (0  $\mu\text{M}$ ) ως πρότυπο για 24 h. Η μορφολογία των διαφορετικών κυττάρων HaCaT που υφίστανται απόπτωση μετά τη χορήγηση  $\text{C}_2$ -κεραμιδίου για 24 h εξετάστηκε σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων.



**Σχήμα 13.3.** Επιδράσεις του  $\text{C}_2$ -κεραμιδίου στη μορφολογία των εμβρυϊκών ινοβλαστών MRC-5, PRC-5Puro, MRC-5ApoJ και MRC-5Bcl-2. Στα διαφορετικά κύτταρα MRC-5 χορηγήθηκαν αυξανόμενες δόσεις  $\text{C}_2$ -κεραμιδίου (5-40  $\mu\text{M}$ ) ή 0,4% αιθανόλη (0  $\mu\text{M}$ ) ως πρότυπο για 24 h. Η μορφολογία των διαφορετικών κυττάρων MRC-5 που υφίστανται απόπτωση μετά τη χορήγηση  $\text{C}_2$ -κεραμιδίου για 24 h εξετάστηκε σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων.

Όμοια, η χορήγηση αναλογικά αυξημένων συγκεντρώσεων  $C_2$ -κεραμιδίου για 24 ώρες σε κύτταρα MRC-5, MRC-5Puro, MRC-5ApoJ και MRC-5Bcl-2 είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή των μορφολογικών μεταβολών των κυττάρων MRC-5, MRC-5Puro και MRC-5ApoJ σε συγκεντρώσεις κεραμιδίου 20  $\mu$ M και 40  $\mu$ M (Σχήμα 13.3). Ενώ τα κύτταρα σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό παρουσία 0,4% αιθανόλης παρουσίασαν φυσιολογική μορφολογία (Σχήμα 8.3), τα κύτταρα επεξεργασμένα με  $C_2$ -κεραμίδιο εμφάνισαν το χαρακτηριστικό φαινότυπο των αποπτωτικών κυττάρων. Ενώ σε συγκεντρώσεις 5 και 10  $\mu$ M  $C_2$ -κεραμιδίου διατηρήθηκε ο χαρακτηριστικός φαινότυπος των φυσιολογικών ινοβλαστών όπως επιμήκη, αστεροειδή κύτταρα που επιδεικνύουν αύξηση σε παράλληλη κατεύθυνση, κύτταρα MRC-5, MRC-5Puro και MRC-5ApoJ επεξεργασμένα με συγκεντρώσεις 20 και 40  $\mu$ M  $C_2$ -κεραμιδίου παρουσίασαν μορφολογικές μεταβολές χαρακτηριστικές αποπτωτικών κυττάρων με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (Σχήμα 13.3). Αρκετά κύτταρα επεξεργασμένα με 20  $\mu$ M  $C_2$ -κεραμιδίου παρουσίασαν συρρίκνωση, απώλεια κυτταρικής επαφής και αποκόλληση από το υπόστρωμα, ενώ η συγκέντρωση των 40  $\mu$ M  $C_2$ -κεραμιδίου ήταν καταστροφική καθώς όλα τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το υπόστρωμα, επέπλεαν στο θρεπτικό υλικό και εμφάνισαν στρογγυλή μορφολογία (Σχήμα 13.3).

Σε αντίθεση τα κύτταρα MRC-5Bcl-2 διατήρησαν τη φυσιολογική μορφολογία τους μετά τη χορήγηση  $C_2$ -κεραμιδίου συγκρινόμενα με τα κύτταρα μάρτυρες (control counterparts) ή τα MRC-5ApoJ ακόμη και στις υψηλές συγκεντρώσεις των 20 και 40  $\mu$ M  $C_2$ -κεραμιδίου (Σχήμα 13.3). Καθίσταται λοιπόν φανερό ότι μόνο η πρωτεΐνη Bcl-2, αλλά όχι η κλαστρίνη/ApoJ προστατεύει αμφότερα τα κύτταρα MRC-5 και HaCaT από τις μορφολογικές μεταβολές, χαρακτηριστικές αποπτωτικού φαινοτύπου, που επάγονται από το  $C_2$ -κεραμίδιο.





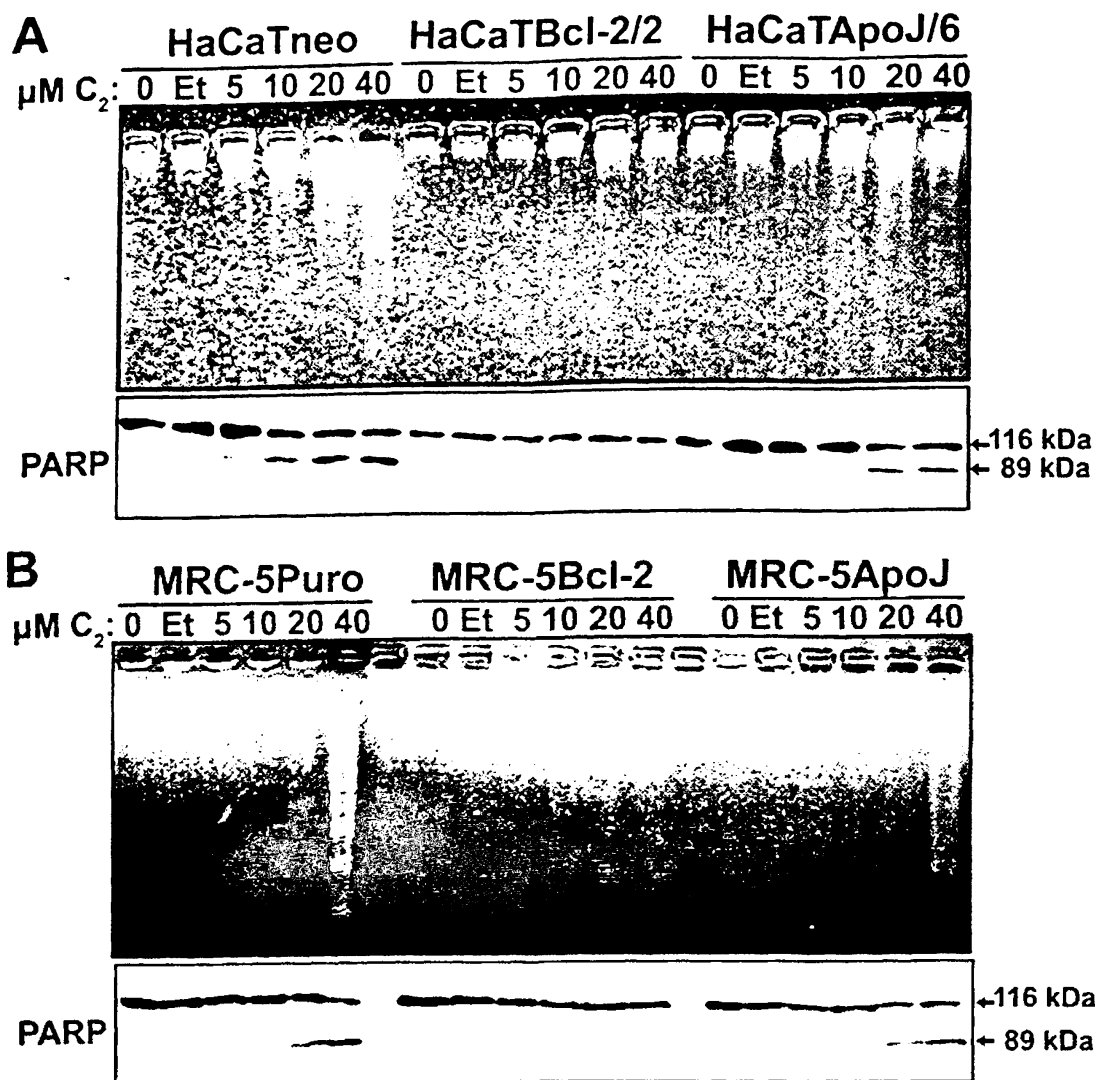
### Επιδράσεις του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου στην απόπτωση των κυττάρων HaCaT και MRC-5

Προκειμένου να διερευνηθεί αν οι μορφολογικές μεταβολές των κυττάρων HaCaT και MRC-5, χαρακτηριστικές αποπτωτικού φαινοτύπου, επαγόμενες από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο οφείλονταν στην κυτταρική απόπτωση, χαμηλού μοριακού βάρους DNA απομονώθηκε από επιπλέοντα και επικολλημένα κύτταρα HaCaTneo, HaCaTBcl-2/2 και HaCaTApoJ/6 ή MRC-5Puro, MRC-5ApoJ και MRC-5Bcl-2 μετά τη χορήγηση C<sub>2</sub>-κεραμιδίου σε συγκεντρώσεις 5-40μM ή 0,4% αιθανόλης και αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι.

Η χορήγηση C<sub>2</sub>-κεραμιδίου σε κύτταρα HaCaTneo επήγαγε την θραυσματοποίηση του DNA με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, συγκρινόμενη με τα κύτταρα στα οποία είχε χορηγηθεί αιθανόλη (Σχήμα 9.3A, άνω πλαίσιο), αποτέλεσμα σε απόλυτη συμφωνία με τις παρατηρούμενες μορφολογικές μεταβολές (Σχήμα 12.3). Ενώ η εκτοπική έκφραση της Bcl-2 ανέστειλε πλήρως τη δόσο-εξαρτώμενη επαγωγή της απόπτωσης από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο, η υπερέκφραση της κλαστρίνης/ApoJ απέτυχε να επιδείξει παρόμοιο αποτέλεσμα, παρότι η έκταση της θραυσματοποίησης του DNA (DNA laddering), χαρακτηριστική της κυτταρικής αποπτωτικής διαδικασίας, ήταν λιγότερο εμφανής από την παρατηρούμενη σε κύτταρα HaCaTneo παρουσία C<sub>2</sub>-κεραμιδίου (Σχήμα 9.3A, άνω πλαίσιο), αποδεικνύοντας μία επουσιώδη ή δευτερεύουσα κατασταλτική επίδραση στην επαγόμενη από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο απόπτωση.

Η επώαση των MRC-5Puro, MRC-5ApoJ ή MRC-5Bcl-2 με αυξανόμενες συγκεντρώσεις C<sub>2</sub>-κεραμιδίου για 24 ώρες, είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της θραυσματοποίησης του DNA στη συγκέντρωση των 40 μM στα MRC-5Puro και MRC-5ApoJ, μολονότι στα MRC-5ApoJ η ένταση του τμηματοποιημένου DNA ήταν μικρότερη από αυτή που παρατηρήθηκε στα MRC-5Puro (Σχήμα 14.3B, άνω πλαίσιο). Αντιθέτως η χορήγηση 40 μM C<sub>2</sub>-κεραμιδίου στα κύτταρα MRC-5Bcl-2 δεν χαρακτηρίστηκε με την θραυσματοποίηση του DNA (Σχήμα 14.3B, άνω πλαίσιο) αναγόντας ως γενικό συμπέρασμα ότι ενώ η υπερέκφραση του Bcl-2 στα κύτταρα HaCaT και στους ινοβλάστες MRC-5 επάγει ένα φαινότυπο ανθεκτικό στην απόπτωση που επάγεται από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο, η υπερέκφραση της κλαστρίνης/ApoJ δεν επέφερε ανθεκτικότητα, αλλά πιθανά κατέστειλε μερικώς την επαγόμενη από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο απόπτωση.





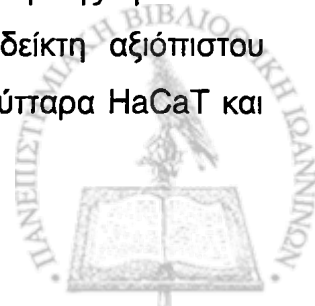
**Σχήμα 14.3.** Προσδιορισμός της απόπτωσης των κυττάρων HaCaT και MRC-5. Σε **(A)** κερατινοκύτταρα HaCaTneo, HaCaTBcl-2/2 και HaCaTApoJ/6, και **(B)** ινοβλάστες MRC-5Puro, MRC-5Bcl-2 και MRC-5ApoJ χορηγήθηκαν 0-40  $\mu\text{M C}_2$ -κεραμιδίου ή 0,4% αιθανόλης (Et) ως πρότυπο για 24 h. DNA απομονώθηκε από επικολλημένα και επιπλέοντα κύτταρα και αναλύθηκε σε 1.6% πηκτική αгарόζης για τον προσδιορισμό της ενδονουκλεοσωμικής θραυσματοποίησης του DNA (**A και B, άνω πλαίσιο**). Η έκφραση της PARP στα διαφορετικά κύτταρα HaCaT και MRC-5 μετά την χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων  $\text{C}_2$ -κεραμιδίου αναλύθηκε με SDS-PAGE και με ανοσο-αποτύπωμα κατά western χρησιμοποιώντας ένα μονοκλωνικό αντίσωμα μύς για την PARP σε αναλογία 1:1000 (C-1110, BD Pharmingen, 556362) (**A και B, κάτω πλαίσιο**).

Έτσι αδιαμφισβήτητα συνάγεται το συμπέρασμα ότι οι μορφολογικές μεταβολές που παρατηρήθηκαν με τη χορήγηση εξωγενούς C<sub>2</sub>-κεραμιδίου οφείλονταν σε ενδονουκλεοσωμική θραυσματοποίηση του DNA.

Η PARP (πολυ-ADP-ριβосуλο-πολυμεράση) είναι ένα πυρηνικό ένζυμο 115 kDa που βρίσκεται στη χρωματίνη και καταλύει την μεταφορά των μονάδων ADP-ριβόζης από το NAD<sup>+</sup> σε διάφορες πυρηνικές πρωτεΐνες, όπως οι ιστόνες, και οι τοποϊσομεράσες. Η καταλυτική ενεργότητα της PARP αυξάνεται σε μη αποπτωτικά κύτταρα μετά από επαγωγή βλάβης στο DNA. Επιπλέον η PARP είναι στόχος της δράσης των κασπασών, ενζύμων που εμπλέκονται στην απόπτωση των κυττάρων. Κατά την απόπτωση, η 115 kDa PARP διασπάται σε δύο τμήματα 89 kDa και 25 kDa, διαχωρίζοντας έτσι το αμινοτελικό τμήμα του ενζύμου που προσδένει στο DNA από το καρβοξυτελικό τμήμα, με αποτέλεσμα την απώλεια της δράσης του.

Έτσι η διάσπαση της PARP θεωρείται ένας αξιόπιστος δείκτης της απόπτωσης των κυττάρων και η PARP ως παράγοντας διατήρησης της ακεραιότητας του DNA. Σε κύτταρα HaCaT, HaCaTneo, HaCaT Bcl-2/2 και HaCaT AroJ/6 χορηγήθηκε C<sub>2</sub>-κεραμίδιο σε συγκεντρώσεις 0-40 μM για 24 ώρες και τα κυτταρικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν αναλύθηκαν σε πηκτή SDS πολυακρυλαμιδίου και με ανοσοαποτύπωμα κατά western για την έκφραση της PARP (Σχήμα 14.3A, κάτω πλαίσιο). Τα κύτταρα HaCaT, HaCaTneo και HaCaT AroJ εμφάνιζαν δύο ζώνες 115 kDa και 89 kDa, που απεικονίζουν τη φυσιολογική και την αποκομμένη μορφή του ενζύμου, αντίστοιχα. Η ένταση της 89 kDa ζώνης αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου, επιβεβαιώνοντας έτσι ότι το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο επάγει την απόπτωση των κυττάρων HaCaT με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Αντιθέτως, η υπερέκφραση της Bcl-2 στα κύτταρα HaCaTBcl-2/2 ανέστειλε πλήρως τη διάσπαση της PARP σε σχέση με τα HaCaTneo και HaCaT AroJ/6 (Σχήμα 14.3A, κάτω πλαίσιο).

Κατά παρόμοιο τρόπο η διάσπαση της PARP ανιχνεύτηκε στους ινοβλάστες MRC-5, MRC-5Puro και MRC-5AroJ μετά από επώαση των κυττάρων με 40 μM C<sub>2</sub>-κεραμιδίου, ενώ η υπερέκφραση της Bcl-2 στα κύτταρα MRC-5 ανέστειλε πλήρως τη διάσπαση της PARP (Σχήμα 14.3B, κάτω πλαίσιο). Επομένως με τα πειραματικά στοιχεία μας αποδεικνύεται ότι η υπερέκφραση της κλαστρίνης/AroJ δεν παρεμποδίζει την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP, ενός δείκτη αξιόπιστου απόπτωσης των κυττάρων, ενώ η υπερέκφραση της Bcl-2 στα κύτταρα HaCaT και



MRC-5 ανέστειλε πλήρως την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP που επάγεται από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο, επιβεβαιώνοντας έτσι την αντι-αποπτωτική δράση της.

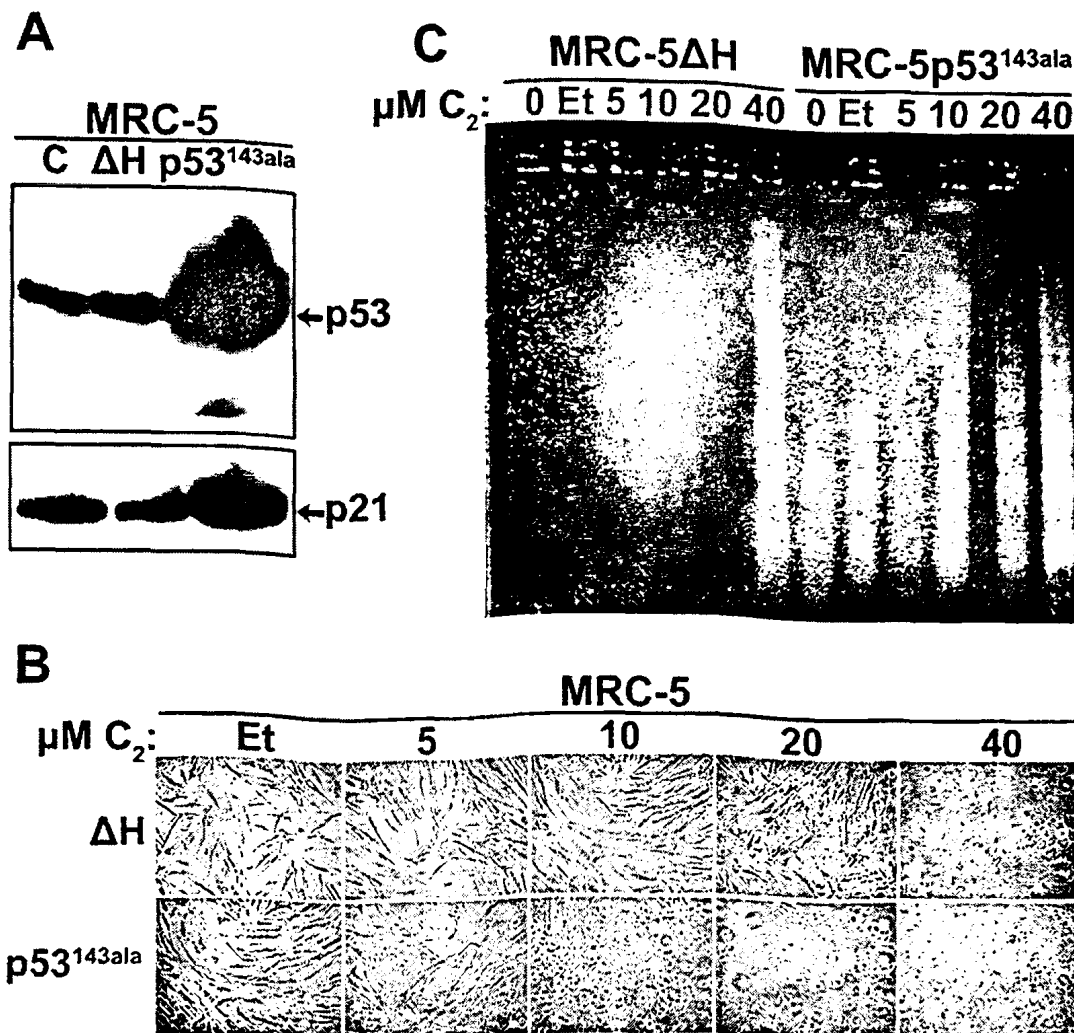
### **11.3. Η υπερέκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου p53<sup>143ala</sup> επαύξησε την ευαισθησία των φυσιολογικών ινοβλαστών MRC-5 στην επαγόμενη από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο απόπτωση.**

Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 εμπλέκεται στις αποκρίσεις των κυττάρων στο γονοτοξικό στρες. Παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA σταθεροποιούν και ενεργοποιούν την p53, η οποία ρυθμίζει αρκετούς ρυθμιστές της απόπτωσης (Levine, 1997; Vousden, 2002; Vousden and Lu, 2002, Sharpless and DePinho, 2002; Oren, 2003).

Καθώς τα κύτταρα HaCaT φέρουν μεταλλαγμένες μορφές της p53 (Lehman et al., 1993) και τα κύτταρα MRC-5 φέρουν άγριου-τύπου p53, και καθόσον γνωρίζουμε ότι τα κύτταρα HaCaT είναι πιο ευαίσθητα στην απόπτωση που επάγεται από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο (Σχήμα 6.3), ερευνήθηκε ο ρόλος της p53 στην επαγόμενη από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο απόπτωση. Γι' αυτό το λόγο κατασκευάστηκε ένας ρετροϊικός φορέας, ΔΗ-SCX3, που μετέφερε ένα κυρίαρχα-αρνητικό ανθρώπινο μεταλλαγμένο γονίδιο p53<sup>143ala</sup>, για το οποίο είχε αποδειχθεί προηγουμένως ότι παρατείνει το χρόνο ζωής και παρέχει πλεονέκτημα στο ρυθμό ανάπτυξης των ανθρώπινων διπλοειδών ινοβλαστών (Bond et al., 1999, Wyllie et al., 1999, Collahon and Shay, 1996).

Ο ρετροϊικός φορέας εισήχθη στα κύτταρα MRC-5 με επιμόλυνση όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι, ώστε να κατασκευασθούν κύτταρα MRC-5p53<sup>143ala</sup>. Μετά από επιλογή των επιμολυσμένων κυττάρων στο αντιβιοτικό υγρομυκίνη, τα ανθεκτικά στην υγρομυκίνη κύτταρα αναλύθηκαν για την έκφραση της p53 με ανοσο-αποτύπωμα κατά western(Σχήμα 15.3A). Τα κύτταρα MRC-5p53<sup>143ala</sup>, εκφράζανε σε υψηλότερα επίπεδα την p53, συγκρινόμενα με την έκφραση της στα κύτταρα MRC-5 ή MRC-5ΔΗ (hygro), λόγω της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης του μεταλλαγμένου γονιδίου p53.





**Σχήμα 15.3.** Οι επιδράσεις μιας μεταλλαγμένης μορφής της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 (p53<sup>143ala</sup>) στην απόπτωση των ινοβλαστών MRC-5 που επάγεται από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο. **(A)** Έκφραση της p53 στα επιμολυσμένα κύτταρα MRC-5: κύτταρα MRC-5 σταθερά επιμολυσμένα με τον πρότυπο ρετροϊκό φορέα ΔH ή το ΔH-SCX3 (p53<sup>143ala</sup>) αναλύθηκαν για την έκφραση της p53 με ανοσο-αποτύπωμα κατά western. **(B)** Μορφολογικές μεταβολές των κυττάρων MRC-5 ΔH και MRC-5ΔH-SCX3 (p53<sup>143ala</sup>) από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο: Σε κύτταρα MRC-5 ΔH και MRC-5ΔH-SCX3 (p53<sup>143ala</sup>) χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις C<sub>2</sub>-κεραμιδίου (0-40 μM) ή 0,4% αιθανόλη για 24 h και η μορφολογία των κυττάρων εξετάσθηκε με μικροσκόπιο αντιθέτων φάσεων και φωτογραφήθηκε. **(Γ)** Απόπτωση των κυττάρων MRC-5 ΔH και MRC-5ΔH-SCX3 (p53<sup>143ala</sup>) από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο: Σε κύτταρα MRC-5 ΔH και MRC-5ΔH-SCX3 (p53<sup>143ala</sup>) χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις C<sub>2</sub>-κεραμιδίου (0-40 μM) ή 0,4% αιθανόλη για 24 h και χαμηλού μοριακού βάρους DNA που απομονώθηκε, αναλύθηκε σε 1.6% πηκτή αгарόζης.



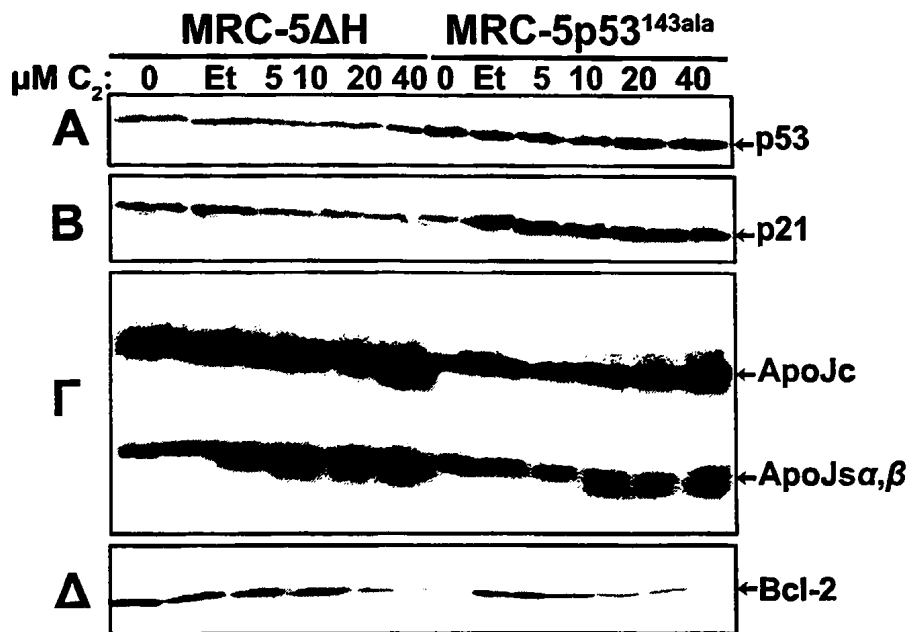
Για να ερευνηθεί εάν η μεταλλαγμένη μορφή p53<sup>143ala</sup> μεταβάλλει την ευαισθησία των κυττάρων MRC-5 στην επαγόμενη από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο απόπτωση, κύτταρα MRC-5ΔH και MRC-5p53<sup>143ala</sup> επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις C<sub>2</sub>-κεραμιδίου (0-40 μM) ή με 0,4% αιθανόλη ως μάρτυρα και αναλύθηκαν περαιτέρω για να διαπιστωθούν τυχόν μορφολογικές μεταβολές (Σχήμα 15.3B). Η έκφραση της μεταλλαγμένης p53<sup>143ala</sup> στα κύτταρα MRC-5 οδήγησε σε σημαντικές και βαθύτατες μορφολογικές μεταβολές στα κύτταρα αυτά, με προεξάρχουσες τη συρρίκνωση και τη στρογγυλοποίηση σε συγκέντρωση 5 μM C<sub>2</sub>-κεραμιδίου και σε αποκόλληση από το υπόστρωμα σε συγκέντρωση 10 μM C<sub>2</sub>-κεραμιδίου ή υψηλότερες, μεταβολές χαρακτηριστικές των αποπτωτικών κυττάρων, συγκρινόμενα με τα κύτταρα MRC-5ΔH (Σχήμα 15.3B).

Για να αποδειχθεί αν αυτές οι δραματικές μορφολογικές μεταβολές που παρατηρήθηκαν με τη χορήγηση του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου συνδέονται με την θραυσματοποίηση του DNA, χαμηλού μοριακού βάρους DNA απομονώθηκε από τα επικολλημένα και επιπλέοντα κύτταρα MRC5ΔH και MRC5p53<sup>143ala</sup> επεξεργασμένα με αυξανόμενες συγκεντρώσεις C<sub>2</sub>-κεραμιδίου για 24 ώρες και αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε 1.6% πηκτή αгарόζης (Σχήμα 15.3Γ). Η έκφραση της μεταλλαγμένης p53<sup>143ala</sup> στα κύτταρα MRC-5 είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της θραυσματοποίησης του DNA σε συγκέντρωση 5 μM C<sub>2</sub>-κεραμιδίου, η οποία αυξήθηκε με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, επιβεβαιώνοντας τις διαπιστωμένες μορφολογικές μεταβολές των κυττάρων. Τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η μεταλλαγμένη αρνητικά-κυρίαρχη μορφή της p53, p53<sup>143ala</sup>, ευαισθητοποίησε τα κύτταρα MRC-5 στην επαγόμενη από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο απόπτωση.

### 12.3. Η αυξημένη ευαισθησία των ινοβλαστών MRC-5 που εκφράζουν τη μεταλλαγμένη μορφή p53<sup>143ala</sup> συνδέεται με μεταβολές στην έκφραση της κλαστρίνης/ApoJ και της Bcl-2

Η p53 καταστέλλει την έκφραση της Bcl-2 συμβάλλοντας στην αποπτωτική διαδικασία με την παρεμπόδιση των πορειών επιβίωσης που ελέγχονται από τη Bcl-2 (Miyashita et al., 1994; Haldar et al., 1994; Budhram-Mahadeo et al., 1999). Όμως, έχει επίσης αναφερθεί ότι η Bcl-2 ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση





**Σχήμα 16.3.** Επιδράσεις του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου και της μεταλλαγμένης μορφής της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 (p53<sup>143ala</sup>) στην έκφραση της p53, της p21<sup>Cip1/Waf1</sup>, της κλαστρίνης/ApoJ και της Bcl-2 στους ινοβλάστες MRC-5ΔH και MRC-5p53<sup>143ala</sup>. Κύτταρα MRC-5 σταθερά επιμολυσμένα με τον πρότυπο ρετροϊκό φορέα ΔH ή το ΔH-SCX3 (p53<sup>143ala</sup>), παρουσία ή απουσία αυξανόμενων δόσεων C<sub>2</sub>-κεραμιδίου (5-40 μM) ή 0,4% αιθανόλης για 24 h αναλύθηκαν για την έκφραση της (A) p53, (B) p21<sup>Cip1/Waf1</sup>, (Γ) κλαστρίνης/ApoJ και (Δ) Bcl-2, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου και με ανοσο-αποτύπωμα κατά western χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα.

της p53 (Froesch et al., 1999; Zhan et al., 1999). Επιπλέον η άγριου-τύπου p53 φέρεται και ως αρνητικός ρυθμιστής της κλαστρίνης/ApoJ (Criswell et al., 2003).

Προκειμένου να μελετηθεί ο μηχανισμός με τον οποίο η p53<sup>143ala</sup> ευαισθητοποιεί τα κύτταρα MRC-5 στο κεραμίδιο, μελετήθηκε η έκφραση της κλαστρίνης/ApoJ και της Bcl-2, καθώς επίσης και η έκφραση της p53 και του αναστολέα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών, p21<sup>Cip1/Waf1</sup>, ενός μεταγραφικού στόχου της p53, ώστε να μπορεί να συσχετισθεί η έκφρασή τους.

Κυτταρικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν από τα κύτταρα MRC-5ΔH και MRC-5p53<sup>143ala</sup> απουσία και παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων C<sub>2</sub>-κεραμιδίου αναλύθηκαν με ανοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση της p53, p21<sup>Cip1/Waf1</sup>, κλαστρίνης/ApoJ και Bcl-2. (Σχήμα 16.3).

Η χορήγηση C<sub>2</sub>-κεραμιδίου δεν μετέβαλε την έκφραση της p53 στα φυσιολογικά κύτταρα MRC-5 αλλά ούτε και στα MRC-5p53<sup>143ala</sup>, τα οποία έφεραν υψηλότερα επίπεδα p53 από ότι τα MRC-5 (Σχήμα 16.3A). Επιπλέον, ουδεμία μεταβολή στην έκφραση της p21<sup>Cip1/Waf1</sup>, ενός καλά χαρακτηρισμένου μεταγραφικού στόχου της p53, στα κύτταρα MRC-5 ή MRC-5p53<sup>143ala</sup> ανιχνεύθηκε μετά τη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων C<sub>2</sub>-κεραμιδίου, μολονότι τα κύτταρα MRC-5p53<sup>143ala</sup>, όπως ήταν αναμενόμενο, έφεραν υψηλότερα επίπεδα p21<sup>Cip1/Waf1</sup> από ότι τα MRC-5 (Σχήμα 16.3B).

Η έκφραση της κλαστρίνης/ApoJ στα φυσιολογικά κύτταρα MRC-5 μετά τη χορήγηση C<sub>2</sub>-κεραμιδίου αυξήθηκε με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (Σχήμα 16.3Γ), σύμφωνα με προηγούμενα αποτελέσματα (Σχήμα 7.3 και Σχήμα 10.3). Η υπερέκφραση όμως της ανθρώπινης μεταλλαγμένης μορφής p53<sup>143ala</sup> φαίνεται ότι κατέστειλε τα ενδογενή επίπεδα της κλαστρίνης/ApoJ, αλλά και την δόσο-εξαρτώμενη επαγωγή της μετά από επώαση με C<sub>2</sub>-κεραμίδιο στα κύτταρα MRC-5p53<sup>143ala</sup> (Σχήμα 16.3Γ). Αντιθέτως, η έκφραση της p53<sup>143ala</sup> δεν κατέστειλε τα ενδογενή επίπεδα της Bcl-2 (Σχήμα 16.3Δ), κατέστειλε όμως τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2 στα κύτταρα MRC-5 επεξεργασμένα με C<sub>2</sub>-κεραμίδιο (Σχήμα 16.3Δ). Ενώ τα επίπεδα της Bcl-2 στα κύτταρα MRC-5ΔH μειώνονταν παρουσία 20 μM C<sub>2</sub>-κεραμιδίου, με παρατηρούμενη επιπλέον ελάττωση σε συγκέντρωση 40 μM C<sub>2</sub>-κεραμιδίου, η έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 στα κύτταρα MRC-5p53<sup>143ala</sup> μειώθηκε κατά δόσο-εξαρτώμενο τρόπο και αυτή η ελάττωση κατέστη φανερή από πολύ μικρές συγκεντρώσεις C<sub>2</sub>-κεραμιδίου της τάξης των 5 μM, ενώ η έκφραση της





πρωτεΐνης Bcl-2 αναστάληκε σχεδόν τελείως στα κύτταρα MRC-5p53<sup>143ala</sup> που είχαν επωαστεί παρουσία 40  $\mu$ M C<sub>2</sub>-κεραμιδίου (Σχήμα 16.3Δ).

Είναι φανερό ότι η p53<sup>143ala</sup> ευαισθητοποιεί τους ανθρώπινους φυσιολογικούς ινοβλάστες MRC-5 στην απόπτωση που επάγεται από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο καταστέλλοντας την έκφραση δύο αντι-αποπτωτικών γονιδίων, μολονότι παρουσιάζουν διαφορετική αντι-αποπτωτική δράση, της κλαστρίνης/ApoJ και της ογκοπρωτεΐνης Bcl-2.



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 1.4. Επιδράσεις του βαναδίου στον πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση κυττάρων θηλαστικών: Ο ρόλος των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών κλαστρίνης/Apoc και Bcl-2 και του μεταγραφικού παράγοντα AP-1.

Η ρύθμιση συγκεκριμένων ενδοκυττάρων πορειών σήματος από ενώσεις βαναδίου μπορεί να επηρεάσει κυτταρικές λειτουργίες, όπως τον κυτταρικό ρυθμό αύξησης, τη διαφοροποίηση, το μετασχηματισμό, το ρυθμό προσκόλλησης και τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Ένα σύνολο καθοριστικών πειραμάτων υποδηλώνουν ότι οι ενώσεις βαναδίου ρυθμίζουν τη διάρκεια και το μέγεθος φωσφορυλίωσης ενός αριθμού πρωτεϊνών, όπως η AP-1, η MEK-1, η ERK-1, η JNK-1, η PI-3K και ο NF-κB (Huang et al., 1998), πρωτεϊνών κλειδιά των πορειών σήματος που οδηγούν στη δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου και στην καταστροφή του DNA.

Η επιδερμίδα είναι ένας συνεχώς ανανεούμενος ιστός και η ακεραιότητα και λειτουργία της εξαρτάται από τη ρύθμιση του ισοζυγίου μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού, κυτταρικής διαφοροποίησης και κυτταρικού θανάτου. Πιο ειδικά, στα κύτταρα της επιδερμίδας (κερατινοκύτταρα, ινοβλάστες), η οποία είναι και ο πλέον εκτεθειμένος ιστός σε οξειδωτικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η ακτινοβολία και οι χημικές ενώσεις, η απόπτωση παίζει σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση των κατεστραμμένων κυττάρων. Το δέρμα επίσης αποτελεί ένα πολύ ειδικό τμήμα του σώματος ιδιαίτερα προσβάσιμο για αποκόμιση σημαντικών πληροφοριών σε σχέση με τη ρύθμιση και λειτουργία του AP-1 και των AP-1 ρυθμιζόμενων γονιδίων σε πολλαπλές βιολογικές πορείες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η κυτταρική διαφοροποίηση (Angel et al., 2001). Επιπρόσθετα, η επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων στρες (ακτινοβολία, χημικών ξενοβιοτικών, τραυματισμοί από μηχανικό στρες) εκθέτει κυρίως το δέρμα σε ποικίλες ανταποκρίσεις, αφού αποτελεί τον εξώτερο προστατευτικό φραγμό του σώματος στις επιδράσεις στρεσογόνων, ενώ στο δέρμα ενεργοποιούνται ταυτόχρονα γενετικά προγράμματα που ελέγχουν την κυτταρική ανταπόκριση στο στρες ή την αναγέννησή τους κατά τη διάρκεια επίδρασης ενός παράγοντα στρες.

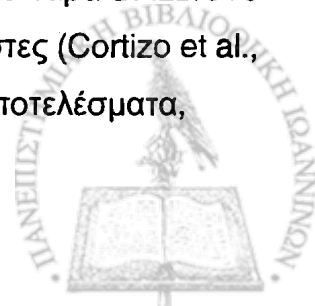


Στο πειραματικό μας μελετήθηκε η επίδραση του θειικού βαναδύλιου στον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων, κυττάρων HaCaT και βρέθηκε ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Η αναστολή του πολλαπλασιασμού ήταν εμφανής ακόμα και στις μικρότερες συγκεντρώσεις του θειικού βαναδύλιου (25  $\mu\text{M}$ ) και συσχετιζόταν με την επαγωγή της κυτταρικής απόπτωσης. Η χορήγηση θειικού βαναδύλιου μείωσε την επιβίωση των κυττάρων HaCaT με επίσης δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, οδηγώντας σε μορφολογικές μεταβολές χαρακτηριστικές της απόπτωσης, όπως συρρίκνωση, στρογγυλοποίηση και αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα. Η απόπτωση των κυττάρων HaCaT ήταν εμφανής μετά από την επώαση των κυττάρων για 24 h σε συγκέντρωση 25 και 50  $\mu\text{M}$  με αντίστοιχη βιωσιμότητα 40% και 20%. Περαιτέρω αύξηση των συγκεντρώσεων του θειικού βαναδύλιου (200-1000  $\mu\text{M}$ ) δεν φαίνεται να είχε διαφορετικά αποτελέσματα στην επιβιωσιμότητα των κυττάρων, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις 500-1000  $\mu\text{M}$  φαίνεται να οδήγησαν σε νεκρωτικό θάνατο.

Ανεξάρτητα από τη διαφορετική μορφή κυτταρικού θανάτου σε χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου, είναι φανερό ότι το ιχνοστοιχείο αυτό είναι ισχυρός τοξικός παράγοντας στα κύτταρα HaCaT.

Η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HaCaT και η επαγωγή της απόπτωσης επιβεβαιώθηκε από την ανάλυση της ικανότητας σχηματισμού αποικιών και την ανάλυση DNA, καθώς επίσης και από την πρωτεολυτική διάσπαση της πολυ-ADP-ριβουσυλο-πολυμεράσης (PARP), όντας αξιόπιστος δείκτης της κυτταρικής απόπτωσης. Το θειικό βαναδύλιο προκάλεσε τη θραυσματοποίηση του DNA σε χαμηλές συγκεντρώσεις (25–100  $\mu\text{M}$ ), ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις  $\text{VOSO}_4$  (200, 500 και 1000  $\mu\text{M}$ ) υπάρχει απώλεια του προφίλ της θραυσματοποίησης του DNA και εμφανίζεται ως επίχρισμα, χαρακτηριστικό των νεκρωτικών κυττάρων (Majno and Joris, 1995).

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση συμπλόκων ή ενώσεων βαναδίου επάγει την ενδοκυττάρια απενεργοποίηση των PTPs και η *in vivo* δράση τους στην αναστολή των PTPs συσχετίζεται ενεργά με την απόπτωση διαφόρων κυτταρικών τύπων, όπως επιθηλιακά προστατικά κύτταρα (Boissonneault et al., 1998), κύτταρα ηπατώματος ποντικού (Schwochan et al., 1998) κύτταρα BALB/3T3 (Sakai, 1997), οστεοσαρκωματικά κύτταρα UMR106 και οστεοβλάστες (Cortizo et al., 1994), γεγονός που αποδείχθηκε και με τα δικά μας πειραματικά αποτελέσματα,



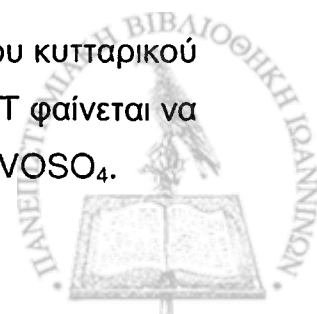
όπου η χορήγηση θειικού βαναδύλιου συσχετίστηκε με την επαγωγή απόπτωσης σε κερατινοκύτταρα HaCaT.

Ο μεταγραφικός παράγοντας AP-1 τροποποιεί τη ρύθμιση γονιδίων ως απόκριση σε ποικίλα εξωκυτταρικά ερεθίσματα που περιλαμβάνουν αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες, ογκογονίδια, προαγωγούς όγκων και χημικά καρκινογόνα (Karin et al., 1997) και επομένως εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής διαφοροποίησης και απόπτωσης των επιδερμικών κυττάρων (Angel et al., 2001; Shaulian and Karin, 2002).

Τα διαφορετικά πρότυπα έκφρασης των πρωτεϊνών Jun και Fos στην επιδερμίδα αποδεικνύουν τον εξειδικευμένο ρόλο μεμονωμένων υπομονάδων του AP-1 στην κυτταρική λειτουργία (Angel et al., 2001; Nead et al., 1998). Το πρότυπο έκφρασης των Fos και Jun στο μυ υποδεικνύει τον κρίσιμο ρόλο που επιτελούν οι πρωτεΐνες c-fos, c-Jun στον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και στα πρόδρομα στάδια της διαφοροποίησής τους (Jochum et al., 2001). Επιπλέον, υπάρχουν αποδείξεις ότι πορείες μεταγωγής σήματος που ρυθμίζονται από τη δράση του AP-1 είναι κύριοι ρυθμιστές του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης των κερατινοκυττάρων (Jang and Surh, 2003). Πρόσφατες επίσης μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση αλάτων βαναδίου σε επιδερμικά κύτταρα μύς επάγει απόπτωση διαμέσου της παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου, της ενεργοποίησης της p53, ενός ογκοκατασταλτικού προϊόντος που ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επηρεάζει την αποπτωτική διαδικασία (Levine, 1997; Canman and Kastan, 1998).

Προκειμένου να εξεταστεί εάν η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HaCaT οφείλεται στη μεταβολή της έκφρασης του πρωτο - ογκογονιδίου c-fos, λόγω του ότι το c-fos έχει εμπλακεί στην ομοιοστασία των κερατινοκυττάρων, αλλά και στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Sinha et al., 2000; Angel et al., 2001), μελετήθηκαν τα επίπεδα c-fos mRNA πριν και μετά τη χορήγηση θειικού βαναδύλιου στα κύτταρα HaCaT. Το θειικό βαναδύλιο κατέστειλε την έκφραση του c-fos mRNA με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Η μείωση της έκφρασης του c-fos mRNA ήταν ορατή στα 25  $\mu\text{M}$   $\text{VOSO}_4$ , σημαντική στα 50  $\mu\text{M}$  και απύσαστα στα 100  $\mu\text{M}$   $\text{VOSO}_4$ .

Αποδείχθηκε λοιπόν στο ερευνητικό μας μέρος ότι η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και η επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων HaCaT φαίνεται να συσχετίζεται με τη μειορρύθμιση της έκφρασης του c-fos mRNA από το  $\text{VOSO}_4$ .



Το σύμπλοκο c-fos/AP-1 είναι κύριος ενεργοποιητής γονιδίων ως απόκριση σε παράγοντες πρόκλησης βλάβης στο DNA (Angel et al., 2001; Shaulian and Karin, 2002) και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα κυτάρων σε χημειοθεραπευτικά. Προκειμένου να μελετηθεί εάν η υπερέκφραση της Fos επηρεάζει το αποτέλεσμα της χρήσης του θειικού βαναδύλιου σε σχέση με την κυτταρική απόπτωση επιμολύνθηκαν κύτταρα HaCaT με ρετροϊκούς φορείς που έφεραν το φυσιολογικό c-fos cDNA, καθώς και το ρετροϊκό v-fos ογκογονίδιο (μεταλλαγμένη μορφή του πρωτο-ογκογονιδίου c-fos (Roux et al., 1990; Roux et al., 1991). Η μείωση της επιβίωσης των κυτάρων HaCaTneo επήλθε με δόσο-εξαρτώμενο και παρόμοιο τρόπο με τη μείωση της επιβίωσης των μη-επιμολυσμένων κυτάρων. Σε συγκέντρωση VOSO<sub>4</sub> 25 μM η βιωσιμότητα των HaCaTneo ήταν 42%, των HaCaT c-fos 60% και των HaCaTv-fos 90%, ενώ στη δόση των 1000 μM VOSO<sub>4</sub> η βιωσιμότητα των HaCaTneo ήταν 0%, των HaCaT c-fos 11% και των HaCaTv-fos 60%. Συμπεράνουμε ότι η υπερέκφραση του ογκογονιδίου v-fos είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης σε σχέση με τα κύτταρα HaCaTneo και HaCaT c-fos. Παράλληλα σε μια σειρά πειραμάτων χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου (0–1000 μM) σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα HaCaTneo, HaCaT c-fos και HaCaTv-fos για 24h, και η ανάλυση του DNA έδειξε ότι η υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης v-fos, αλλά όχι της c-fos παρεμπόδιζε σημαντικά την επαγόμενη από VOSO<sub>4</sub> απόπτωση των κυτάρων HaCaT σε σύγκριση με τα κύτταρα HaCaTneo ή HaCaTc-fos, ενώ η υπερέκφραση της πρωτεΐνης του πρωτο-ογκογονιδίου c-fos δεν επέφερε ανθεκτικότητα, πιθανά διότι συμπεριφέρεται όπως και η ενδογενής πρωτεΐνη c-fos και υπόκειται στην ενδογενή κυτταρική ρύθμιση.

Ως μέλος του συμπλόκου του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 η πρωτεΐνη c-fos έχει ενοχοποιηθεί ως μόριο «κλειδί» για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Bravo, 1990; Curran, 1992), την κυτταρική διαφοροποίηση (Field et al., 1992; Rahm et al., 1989; Smeyne et al., 1992) και το μετασχηματισμό (Lee et al., 1993; Miller et al., 1984). Η πρωτεΐνη c-fos έχει συσχετιστεί με τον αποπτωτικό θάνατο κυτάρων που επάγεται από αντι-υπερπλαστικές συνθήκες (Colotta et al., 1992; Smeyne et al., 1993) και σε ανταπόκριση κυτταρικής καταπόνησης (Hollander and Fornace, 1989).

Η καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας από το c-fos έχει αποδειχθεί κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της εξέλιξης του μαστικού αδένου (Miller et al., 1984), σε θυμκύτταρα παρουσία δεξαμεθαζόνης (Shemshedini et al., 1991) και σε



οστεοβλάστες παρουσία βιταμίνης D<sub>3</sub> (Schule et al., 1990). Η παρουσία ενδογενούς c-fos σε κυτταρικές σειρές κρινητού (hamster) έδειξαν ότι αυξημένη συγκέντρωσή του συνδυαζόταν με υψηλό ρυθμό αποπτωτικού θανάτου κυττάρων σε σύγκριση με κύτταρα μάρτυρες που είχαν μικρότερες συγκεντρώσεις ενδογενούς c-fos.

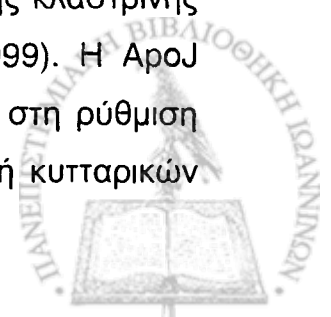
Οι παρατηρήσεις μας είναι σημαντικές δεδομένου ότι η αναστολή του πολλαπλασιασμού και η επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων HaCaT από το θειικό βαναδύλιο συσχετίζεται με τη μειορρύθμιση του c-fos mRNA και αποτελούν ενδείξεις που επιβεβαιώνουν το ρόλο του Fos στην ομοίωση των κερατινοκυττάρων (Angel et al., 2001).

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την ογκογόνο δράση του v-Fos, αλλά και έναν μηχανισμό μέσω της μειορρύθμισης του c-fos, με τον οποίο το θειικό βαναδύλιο αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και επάγει την απόπτωση, τουλάχιστον των κερατινοκυττάρων. Συνολικά, τα ευρήματα της δράσης του θειικού βαναδύλιου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση των κερατινοκυττάρων είναι ιδιαίτερα σημαντικά δεδομένου ότι τα μέλη της οικογένειας του fos έχουν ογκογόνο δράση και υπερεκφράζονται σε πολλούς διαφορετικούς τύπους καρκίνων.

Ταυτόχρονη υπερέκφραση της Bcl-2, μιας καλά χαρακτηρισμένης αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης σε κύτταρα που εκφράζουν c-fos, ανέστειλε τον επαγόμενο από τη c-fos κυτταρικό θάνατο, αποδεικνύοντας ότι η πρωτεΐνη Bcl-2 αναστέλλει την επαγόμενη από τη c-fos απόπτωση. Η υπερέκφραση του γονιδίου Bcl-2 είναι κοινό χαρακτηριστικό σε πολλών ειδών κυτταρικές κακοήθειες (λεμφώματα, λευχαιμίες), ενοχοποιώντας τη Bcl-2 ως σημαντικό παράγοντα καρκινογένεσης (Mc Donnell et al., 1992, Carpos et al., 1993). Η υπερέκφραση του Bcl-2 στην κυτταρική σειρά JB6 επιδερμικών κυττάρων μύς επιτάχυνε το νεοπλαστικό μηχανισμό των κυττάρων (Amstad et al., 1997).

Ο ρόλος του c-fos και του Bcl-2 στην απόπτωση έχει παρατηρηθεί στην κυτταρική σειρά WCH / 7.2 μύς, όπου η Bcl-2 δεν εκφράζεται σε ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις και επάγεται απόπτωση σε ανταπόκριση χορήγησης δεξαμεθαζόνης (Lam, 1994; Flonerfelt and Miesfeld, 1994).

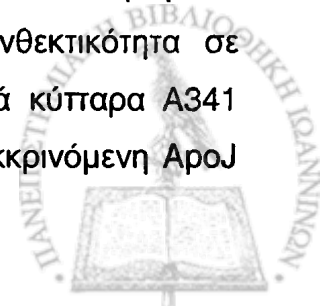
Ταυτόχρονα πολλαπλά μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων Fos και Jun δύνανται να προσδεθούν στις θέσεις AP-1 του γονιδίου της κλαστρίνης (ApoJ) σε πνευμονικά επιθηλιακά κύτταρα mink (Jin and Howe, 1999). Η ApoJ φαίνεται να εμπλέκεται σε μια σειρά φυσιολογικών λειτουργιών όπως στη ρύθμιση του συμπληρώματος, στην ωρίμανση του σπέρματος, στην προαγωγή κυτταρικών



αλληλεπιδράσεων, στη ρύθμιση της απόπτωσης, στην προστασία των μεμβρανών και στο μεταβολισμό των λιπιδίων (Jenne and Tschopp, 1992). Η έκφραση της AroJ επάγεται επίσης από πολλούς στρεσογόνους παράγοντες, όπως το θερμικό, το χημικό και το οξειδωτικό στρες (Schwochan et al., 1998; Petropoulou et al., 2001), από κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες, όπως ο TGFβ, ο TNFα, από έκθεση σε UV, σε ιονίζουσα ακτινοβολία (Viard et al., 1999; Yang et al., 2000) και χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Miyake et al., 2000 a,b; Muenchen et al., 2001; Trougakos and Gonos, 2002).

Μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη c-fos δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης της AroJ (Jin and Howe, 1999) και ότι η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 παρεμποδίζει την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης c-fos που υφίσταται από το πρωτεόσωμα κατά την απόπτωση κυττάρων μετά τη χρήση δεξαμεθαζόνης (He et al., 1998) και επαυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης c-fos και τη μεταγραφική ενεργότητα του συμπλόκου c-fos/AP-1 σε κερατινοκύτταρα (Amstad et al., 1997).

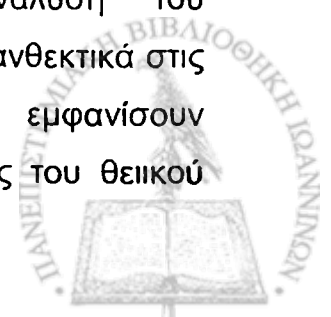
Στην παρούσα έρευνα για να μελετήσουμε τις επιδράσεις των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών κλαστρίνης/AroJ και Bcl-2 στην επαγόμενη από το θειικό βαναδύλιο απόπτωση των κερατινοκυττάρων τα οποία εμφανίζουν μειορρύθμιση των επιπέδων έκφρασης του c-fos mRNA μετά τη χορήγηση θειικού βαναδύλιου κατασκευάστηκαν κύτταρα HaCaT που υπερέκφραζαν την κλαστρίνη/AroJ και την Bcl-2. Η ανάλυση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων μετά τη χορήγηση θειικού βαναδύλιου έδειξε χαρακτηριστικά αποπτωτικού φαινοτύπου στα κύτταρα HaCaT και HaCaTneo με συρρίκνωση και στρογγυλοποίησή τους σε συγκέντρωση ίση ή μεγαλύτερη των 50 μM. Ο αποπτωτικός φαινότυπος επιδεινώθηκε με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο ώστε στα 200 μM VOSO<sub>4</sub> τα κύτταρα να εμφανίζουν απώλεια επαφής με το υπόστρωμα και στα 500 μM VOSO<sub>4</sub> αποκόλληση. Η ανάλυση του πολλαπλασιασμού στα κύτταρα HaCaT AroJ/6 έδειξε ότι η υπερέκφραση της AroJ παρεμπόδιζε τις χαρακτηριστικές μορφολογικές μεταβολές του αποπτωτικού φαινοτύπου των κυττάρων HaCaT που προκαλούνται από το θειικό βαναδύλιο σε συγκεντρώσεις 25-200 μM VOSO<sub>4</sub> και με ελάχιστα αποπτωτικά κύτταρα να υπάρχουν σε συγκεντρώσεις 200 και 500 μM VOSO<sub>4</sub> χωρίς να εμφανίζουν απώλεια επαφής με το υπόστρωμα. Η υπερέκφραση της AroJ σε ανθρώπινα ανδρογονο-εξαρτώμενα προστατικά καρκινικά κύτταρα LNCaP επέφερε ανθεκτικότητα σε αιθανόλη και τερτβουτυλουδροπεροξειδίο σε καρκινικά επιδερμικά κύτταρα A341 (Dumont et al., 2002). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν επίσης ότι η εκκρινόμενη AroJ



μειώνει το ρυθμό πολλαπλασιασμού προστατικών επιθηλιακών κυττάρων αθανатоποιημένων με SV40 (Bettazi et al., 2002) ή ινοβλαστών μετασχηματισμένων με το SV40, αλλά όχι φυσιολογικών ανθρώπινων ινοβλαστών (Petroroulou et al., 2001) Η αντι-αποπτωτική δράση της AroJ αποδείχθηκε επίσης στην επαγόμενη απόπτωση κυττάρων MCF 7 από τη βιταμίνη D<sub>3</sub> (Wilson et al., 1995).

Η μελέτη των επιδράσεων του θειικού βαναδύλιου στη βιωσιμότητα των κυττάρων HaCaT έδειξε ότι η μείωση της κυτταρικής επιβίωσης στα κύτταρα HaCaTneo παρουσία θειικού βαναδύλιου ακολουθούσε δοσο-εξαρτώμενη πορεία. Η μείωση της βιωσιμότητας στα κύτταρα HaCaTneo σε δόση VOSO<sub>4</sub> 25 μM ήταν 60%, ενώ στα κύτταρα HaCaTAroJ/6 ήταν 20% στην ίδια συγκέντρωση VOSO<sub>4</sub>. Η μείωση της επιβιωσιμότητας των κυττάρων HaCaT δεν ήταν γραμμική και στη συγκέντρωση των 1000 μM VOSO<sub>4</sub> η επιβιωσιμότητα των κυττάρων HaCaTneo ήταν 0% και των HaCaTAroJ/6 38%. Χορήγηση θειικού βαναδύλιου σε κύτταρα HaCaTneo επήγαγε τη θραυσματοποίηση του DNA, η οποία ήταν εμφανής στη χαμηλή συγκέντρωση των 25 μM VOSO<sub>4</sub>. Χορήγηση θειικού βαναδύλιου σε κύτταρα HaCaTAroJ/6 επέφερε ανθεκτικότητα στην επαγωγή της απόπτωσης. Σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 100 μM VOSO<sub>4</sub>, δηλαδή 200–1000 μM VOSO<sub>4</sub> τα κύτταρα HaCaTneo παρουσίασαν απώλεια του προφίλ της θραυσματοποίησης του DNA με εμφάνιση επιχρίσματος, χαρακτηριστικό των νεκρωτικών κυττάρων. Η πρωτεολυτική διάσπαση της PARP επιβεβαίωσε την κυτταρική απόπτωση που επάγεται από το θειικό βαναδύλιο και προκλήθηκε σε όλες τις συγκεντρώσεις VOSO<sub>4</sub> που χρησιμοποιήθηκαν (25–1000 μM) στα κύτταρα HaCaTneo. Η πρωτεολυτική διάσπαση της PARP ανιχνεύθηκε ακόμη και στη χαμηλή συγκέντρωση των 25 μM και συσχετίζεται με τη θραυσματοποίηση του DNA. Αντίθετα η υπερέκφραση της κλαστρίνης/AroJ στα κύτταρα HaCaTAroJ/6 ανέστειλε την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP σε συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου έως 200 μM, αλλά όχι και στις υψηλότερες των 500 και 1000 μM.

Προκειμένου να ερευνηθεί ο αντι-αποπτωτικός ρόλος του Bcl-2 στην επαγόμενη από το VOSO<sub>4</sub> απόπτωση κύτταρα HaCaT που υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη Bcl-2 (HaCaTBcl-2/2) καλλιεργήθηκαν παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων θειικού βαναδύλιου (25–1000 μM). Η ανάλυση του πολλαπλασιασμού σε κύτταρα HaCaTBcl-2/2 έδειξε ότι ήταν πλήρως ανθεκτικά στις μορφολογικές μεταβολές επαγόμενες από το VOSO<sub>4</sub>, χωρίς να εμφανίσουν χαρακτηριστικά αποπτωτικού φαινοτύπου σε όλες τις συγκεντρώσεις του θειικού



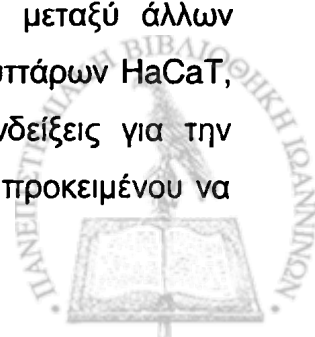


βαναδύλιου που χρησιμοποιήθηκαν. Η υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης Bcl-2 επαύξησε την κυτταρική επιβίωση στα κύτταρα HaCaTBcl-2/2 σε σχέση και με τα κύτταρα HaCaTAroJ/6 και με τα κύτταρα HaCaTneo. Ομοίως τα κύτταρα HaCaTBcl-2/2 ήταν πιο ανθεκτικά στην κυτταροτοξική δράση του θειικού βαναδύλιου από ότι τα κύτταρα HaCaTAroJ/6. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 ανέστειλε πλήρως την επαγόμενη από VOSO<sub>4</sub> απόπτωση σε σχέση με τα κύτταρα HaCaTneo με τη μη εμφάνιση θραυσματοποιημένου DNA σε όλες τις συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ η εκτοπική έκφραση της Bcl-2 στα κύτταρα HaCaT ανέστειλε πλήρως την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP από το θειικό βαναδύλιο.

Η παρούσα μελέτη εστιάστηκε στην επαγόμενη απόπτωση των κερατινοκυττάρων HaCaT από το θειικό βαναδύλιο και τη σύγκριση του ρόλου του Bcl-2 και της κλαστρίνης/AroJ. Η πρώτη παρατήρησή μας είναι ότι το βανάδιο επάγει την αναστολή του πολλαπλασιασμού και την απόπτωση των κερατινοκυττάρων με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, όπως μελετήθηκε με την ανάλυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων, την ενδονουκλεοσωμική θραυσματοποίηση του DNA και την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP. Η δεύτερη παρατήρησή μας είναι ότι το Bcl-2 επιφέρει στα HaCaT ένα φαινότυπο ανθεκτικό στην απόπτωση που επάγεται από το θειικό βαναδύλιο. Η επόμενη παρατήρησή μας αφορά την κλαστρίνη/AroJ, η οποία καταστέλλει την απόπτωση των κυττάρων HaCaT σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0-200μM). Επομένως η υπερέκφραση της κλαστρίνης/AroJ παρεμποδίζει, ενώ της Bcl-2 καταστέλλει πλήρως τις μορφολογικές μεταβολές με χαρακτηριστικά αποπτωτικού φαινότυπου των κυττάρων HaCaT που προκαλείται από το θειικό βαναδύλιο. Ακόμη, ενώ η υπερέκφραση της AroJ επέφερε ανθεκτικότητα, η υπερέκφραση της Bcl-2 ανέστειλε πλήρως την επαγόμενη από το VOSO<sub>4</sub> απόπτωση σε σχέση με τα κύτταρα HaCaTneo.

Τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν ότι η Bcl-2 έχει ισχυρότερη αντι-αποπτωτική δράση από αυτή της AroJ, τουλάχιστον για την απόπτωση που επάγεται από το θειικό βαναδύλιο σε κερατινοκύτταρα HaCaT.

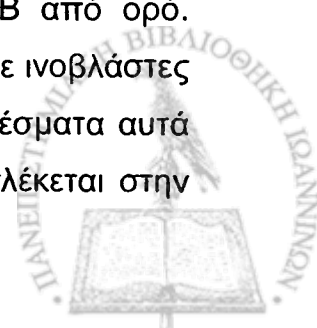
Επιπλέον τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι πιθανά η ογκοπρωτεΐνη v-fos να δρα μέσω της διατήρησης της έκφρασης της κλαστρίνης/AroJ, μεταξύ άλλων παραγόντων, παρεμποδίζοντας έτσι την απόπτωση των κερατινοκυττάρων HaCaT, που επάγεται από το θειικό βαναδύλιο. Μολονότι υπάρχουν ενδείξεις για την επιπλέον υπόθεση, είναι βέβαιο ότι χρήζει περισσότερο ανάλυσης, προκειμένου να



αποδειχθεί ότι όντως η υπερέκφραση της *v-fos* διατηρεί, ενώ της *c-fos* μειώνει τα επίπεδα έκφρασης της κλαστρίνης/*ApoJ*.

#### **2.4. Επιδράσεις του κεραμιδίου στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση κυττάρων θηλαστικών: Ο ρόλος των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών κλαστρίνης/*ApoJ* και *Bcl-2***

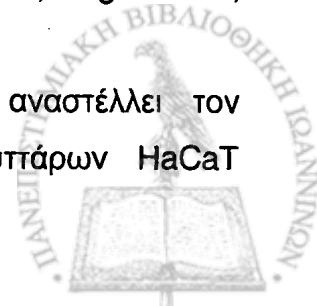
Η υδρόλυση της σφιγγομυελίνης στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης από τις σφιγγομυελινάσες επάγει την ενδοκυττάρια συσσώρευση κεραμιδίων. Το κεραμίδιο μπορεί να μεταβάλει την ενεργότητα διαφόρων κινασών και φωσφατασών και κατ' αυτόν τον τρόπο εμπλέκεται σε διάφορες πορείες μεταγωγής σήματος, δρώντας έτσι ως ενδοκυττάριος αγγελιοφόρος (Geilen et al., 1997; Mathias et al., 1998; Hannun and Luberto, 2000; Smith and Merrill, 2002; Merrill, 2002; Hannun and Obeid, 2002; Spiegel and Milstien, 2002; Kolesnick, 2002). Ο σχηματισμός του κεραμιδίου μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση διαφορετικών πορειών και διαδικασιών που εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο. Για παράδειγμα, το κεραμίδιο επάγει τη διαφοροποίηση λευχαιμικών κυτταρικών σειρών (Geilen et al., 1997; Mathias et al., 1998; Ragg et al., 1998; Pillai et al., 1999) και την αναστολή της αύξησης τους μέσω της επαγωγής της *p21* και της αποφωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (*pRb*) (Jayadev et al., 1995; Dbaiibo et al., 1995; Zhang et al., 1996; Geilen et al., 1997), αλλά και την κυτταρική απόπτωση της ανθρώπινης προ-B λευχαιμικής σειράς ALL-697 (Zhang et al., 1996) και της κυτταρικής σειράς ιστιοκυτώματος αρουραίου AK-5 μέσω της απελευθέρωσης κυτοχρώματος *c* από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα (Anjum and Khar, 2001). Η χορήγηση κεραμιδίου σε μεσεγχυματικές σειρές, όπως ανθρώπινοι φυσιολογικοί ινοβλάστες, επάγει την αναστολή του πολλαπλασιασμού τους, αλλά όχι την απόπτωση μέσω της επαγωγής της *p21* (Lee et al., 1998; Lee et al., 2001). Η χορήγηση σφιγγομυελινάσης σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ινοβλάστες WI-38 οδήγησε στην αύξηση του ενδοκυττάριου κεραμιδίου και παρεμπόδισε την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB από ορό. Όμως τέτοια αναστολή της ενεργότητας του NF-κB δεν παρατηρήθηκε σε ινοβλάστες WI-38 μετασχηματισμένους με SV40 (Luberto et al., 2000). Τα αποτελέσματα αυτά με φυσιολογικούς ινοβλάστες είναι σημαντικά καθότι το κεραμίδιο εμπλέκεται στην



κυτταρική γήρανση (Venable and Obeid, 1999; Hannun and Luberto, 2000). Όμοια, η χρήση αναστολέων των κεραμιδασών βρέθηκε ότι επάγει την απόπτωση κερατινοκυττάρων (Raisova et al., 2002). Επομένως ο μεταβολικός χειρισμός των ενδοκυττάρων επιπέδων των κεραμιδίων με την προσθήκη σφιγγομυελινάσης ή αναστολέων κεραμιδασών προκαλεί τη συσσώρευση του ενδοκυττάρου κεραμιδίου και επομένως τη διέγερση των κυτταρικών βιολογικών αποκρίσεων στο κεραμίδιο, όπως αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και απόπτωση. Επίσης το κεραμίδιο αναστέλλει την αύξηση και επάγει την απόπτωση διαφόρων επιθηλιακών κυττάρων, όπως ανθρώπινων προστατικών (LNCaP) κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης της JNK1 (Hermann et al., 1997), αδenoκαρκινικών κυττάρων (MCF-7) μαστού (EL-Asaad et al., 1998) και ανθρώπινων ηπατοκαρκινικών (SK-Hep-1) κυττάρων μέσω της επαγωγής της p21 (Kang et al., 1999). Η χορήγηση κεραμιδίου στην ανθρώπινη αδenoκαρκινική σειρά πνεύμονα A549 επάγει την αναστολή της αύξησής της και της απόπτωσής της μέσω της αναστολής της έκφρασης και της ενεργότητας της τελομεράσης (hTERT), της μείωσης της δεσμευτικής ικανότητας του μεταγραφικού παράγοντα c-myc στην αλληλουχία του E-box του προαγωγέα της hTERT και τη ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος των mRNAs της κασπάσης-9 και του Bcl-x<sub>L</sub>, δύο γονιδίων που εμπλέκονται στην απόπτωση (Ogretment et al., 2001a,b; Chalfant et al., 2002).

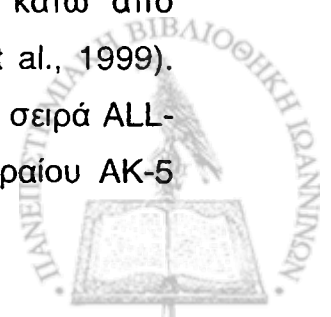
Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση των διαπερατών κεραμιδίων C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub> ή C<sub>8</sub> επάγουν τη διαφοροποίηση και αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό της ανθρώπινης καρκινικής κερατινοκυτταρικής σειράς DJM-1, (Wakita et al., 1994) και πρωτογενών επιδερμικών κερατινοκυττάρων μύος (Jung et al., 1998) και ανθρώπου (Gniadecki et al., 1998; Di Nardo et al., 2000) με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι η προσθήκη κεραμιδίου αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και επάγει την απόπτωση διαφόρων κερατινοκυτταρικών σειρών, όπως φυσιολογικών ανθρώπινων κερατινοκυττάρων, μιας καρκινικής σειράς του πλακώδους επιθηλίου, της HSC-I, και μιας αυθόρμητα αθανοτοποιημένης κερατινοκυτταρικής σειράς, της HaCaT με δόσο- και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο (Gniadecki et al., 1998; Iwasaki-Bessho et al., 1998; Bektas et al., 1998; Buisson-Legendre et al., 1999; Di Nardo et al., 2000; Müller-Wieprecht, 2000; Sugiki et al., 2000).

Στην παρούσα μελέτη, βρέθηκε ότι το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και επάγει την απόπτωση των κερατινοκυττάρων HaCaT



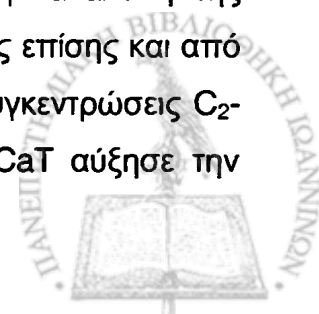
(Boukamp et al., 1988), με χρονο- και δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, και τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες (Iwasaki-Bessho et al., 1998; Bektas et al., 1998; Müller-Wieprecht, 2000). Η χορήγηση του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου στα HaCaT οδήγησε σε διάφορες μορφολογικές μεταβολές των κυττάρων, χαρακτηριστικές της απόπτωσης, όπως συρρίκνωση, στρογγυλοποίηση και αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα. Η απόπτωση των HaCaT ήταν εμφανής μετά από την επώαση των κυττάρων για 12h, σημαντική μετά από 24h και σχεδόν ολοκληρωτική μετά από επώαση για 48h σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις C<sub>2</sub>-κεραμιδίου. Η ανάλυση του πολλαπλασιασμού, της ικανότητας σχηματισμού αποικιών, των μορφολογικών μεταβολών και του DNA των HaCaT επεξεργασμένων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις C<sub>2</sub>-κεραμιδίου για 24h έδειξε ότι η απόπτωση των κυττάρων έγινε εμφανής σε συγκέντρωση 10 μM C<sub>2</sub>-κεραμιδίου (50% των κυττάρων) και αυξήθηκε σημαντικά μετά από επώαση 20 και 40 μM C<sub>2</sub>-κεραμιδίου, με σχεδόν 70% και 85% των κυττάρων, αντίστοιχα να παρουσιάζουν χαρακτηριστικά απόπτωσης. Ιδιαίτερα, η επαγωγή της ενδονουκλεοσωμικής θραυσματοποίησης (DNA ladder), ήταν εμφανής και αυξήθηκε σημαντικά μετά την επώαση των κυττάρων με συγκεντρώσεις από 10 μM ως 40 μM C<sub>2</sub>-κεραμιδίου για 24h. Ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους το κεραμίδιο αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και επάγει την απόπτωση των HaCaT αλλά και άλλων κερατινοκυττάρων είναι μέσω της μείωσης της ενεργότητας της φωσφολιπάσης D (PLD), η οποία υδρολύει τη φωσφατιδυλοχολίνη προς σχηματισμό φωσφατιδικού οξέος και χολίνης και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης (Müller-Wieprecht et al., 1994; Iwasaki-Bessho et al., 1998; Jung et al., 1998), αλλά και μέσω της παραγωγής της ζελατινάσης ή εξωκυττάριας μεταλλοπρωτεϊνάσης-9 (MMP-9; Matrix metalloproteinase-9) (Buisson-Legendre et al., 1999).

Μελέτες έδειξαν ότι η αναστολή του πολλαπλασιασμού των λευχαιμικών κυττάρων HL-60 και U937 (Geilen et al., 1997; Ragg et al., 1998) καθώς επίσης και η επαγωγή της απόπτωσης στα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (Di Nardo et al., 2000) από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο ακολουθείται από τη μείωση των επιπέδων της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2. Όμως σε ηπατοκαρκινικά κύτταρα (SK-Hep1), η χορήγηση του C<sub>6</sub>-κεραμιδίου δεν μετέβαλε την έκφραση του Bcl-2 κάτω από συγκεντρώσεις στις οποίες τα κύτταρα υφίστανται απόπτωση (Kang et al., 1999). Επιπλέον, η υπερέκφραση του Bcl-2 στην ανθρώπινη προ-B λευχαιμική σειρά ALL-697 (Zhang et al., 1996), στην κυτταρική σειρά ιστοκυτώματος αρουραίου AK-5



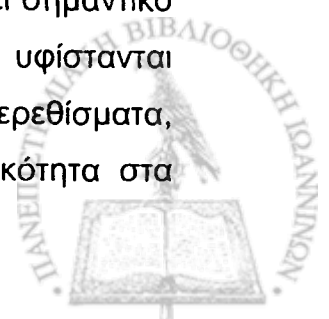
(Anjum and Khar, 2001), στην καρκινική προστατική σειρά LNCaP (Hermann et al., 1997), στην αδενοκαρκινική κυτταρική σειρά μαστού MCF-7 (EL-Asaad et al., 1998) και στην ηπατοκαρκινική σειρά SK-Hep-1 (Kang et al., 1999) επέφερε ανθεκτικότητα στην επαγόμενη απόπτωση από C<sub>2</sub>- C<sub>6</sub>- ή C<sub>8</sub>-κεραμίδιο. Όμοια, η υπερέκφραση του Bcl-2 ποντικού στα κερατινοκύτταρα HaCaT βρέθηκε να επιφέρει ανθεκτικότητα στην επαγόμενη απόπτωση από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο, αλλά λεπτομέρειες του μηχανισμού αυτού δεν έχουν παρουσιαστεί (Müller-Wieprecht, 2000).

Μελέτες έδειξαν ότι η υπερέκφραση της Bcl-2 μπορεί να προστατεύσει τα κύτταρα από ποικίλους παράγοντες που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο, όπως οι ακτινοβολίες UV και γ, τα κυτταροτοξικά φάρμακα, ο TNFα, οι υπεροξυδάσες, τα ανδρογόνα (Reed, 1998, Adams and Cory 1998, Gross et al., 1999). Πιο ειδικά στα κύτταρα της επιδερμίδας η οποία είναι ο πλέον εκτεθειμένος ιστός σε οξειδωτικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, η απόπτωση παίζει σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση κατεστραμμένων κυττάρων. Η έκφραση του Bcl-2 σε αυτές τις περιπτώσεις ελαττώνεται, επιτρέποντας έτσι τη διεξαγωγή της απόπτωσης. Η υπερέκφραση της Bcl-2 είναι ικανή συνθήκη για το μετασχηματισμό αθανατοποιημένων ινοβλαστών μύος (κυτταρική σειρά Rat1A) και για το μετασχηματισμό ινοβλαστών εμβρύου όρνιθας (Bos et al., 1990). Στην παρούσα μελέτη, η χορήγηση αυξανόμενων δόσεων C<sub>2</sub>-κεραμιδίου για 24h δεν μετέβαλε την έκφραση των χαμηλών επιπέδων της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2. Προκειμένου να μελετηθεί ο αντι-αποπτωτικός ρόλος του Bcl-2 στην επαγόμενη απόπτωση των κυττάρων HaCaT από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο κατασκευάστηκαν κύτταρα HaCaT που υπερέκφραζαν την ανθρώπινη πρωτεΐνη Bcl-2 (HaCaTBcl-2/2). Η ανάλυση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HaCaTBcl-2/2 και η σύγκριση τους με τα HaCaTneo μετά από επώασή τους σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις C<sub>2</sub>-κεραμιδίου έδειξε ότι η υπερέκφραση του Bcl-2 στα κύτταρα HaCaT επέφερε ένα φαινότυπο ανθεκτικό στο C<sub>2</sub>-κεραμίδιο, ακόμη και στη συγκέντρωση των 40 μM C<sub>2</sub>-κεραμιδίου για 24h, σε σύγκριση με τα HaCaTneo. Ελάχιστες και ασήμαντες μορφολογικές μεταβολές χαρακτηριστικές αποπτωτικών κυττάρων παρατηρήθηκαν στα κύτταρα HaCaTBcl-2/2 σε σύγκριση με τα HaCaTneo. Η αναστολή της απόπτωσης των HaCaT από την υπερέκφραση του Bcl-2 επιβεβαιώθηκε από την ανάλυση της ικανότητας σχηματισμού αποικιών και την ανάλυση του DNA, καθώς επίσης και από την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP κάτω από αυξανόμενες συγκεντρώσεις C<sub>2</sub>-κεραμιδίου για 24h. Η υπερέκφραση του Bcl-2 στα κύτταρα HaCaT αύξησε την



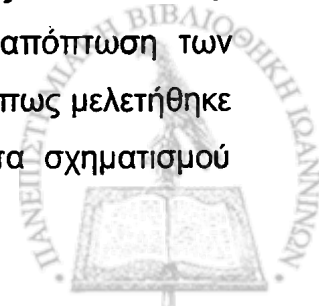
ικανότητα σχηματισμού αποικιών και παρεμπόδισε πλήρως την ενδονουκλεοσωμική θραυσματοποίηση του DNA και την πρωτεολυτική διάσπαση της 115 kDa PARP, δύο σημαντικών και αξιόπιστων δεικτών της απόπτωσης των κυττάρων. Συνολικά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο επάγει την αναστολή του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση των κυττάρων HaCaT, αλλά το Bcl-2 παρεμποδίζει επιλεκτικά την αποπτωτική πορεία των κυττάρων, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες σε διάφορους κυτταρικούς τύπους όπως Molt-4 λευχαιμικά κύτταρα (Zhang et al., 1996), SK-Hep-1 ηπατοκαρκινικά κύτταρα (Kang et al., 1999) και κερατινοκύτταρα HaCaT (Müller-Wieprecht, 2000). Σχετικά ελάχιστα υπάρχουν για αυτόν το διαφορικό μηχανισμό, αλλά προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η υπερέκφραση του Bcl-2 δεν παρεμπόδισε την αποφωσφορυλίωση της pRb από το C<sub>6</sub>-κεραμίδιο και ακόλουθα την παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> στα κύτταρα Molt-4 (Zhang et al., 1996). Σε σχέση με την απόπτωση, η υπερέκφραση του Bcl-2 βρέθηκε να παρεμποδίζει την ενεργοποίηση της αμινοτελικής κινάσης-1 p46 c-jun (JNK1) από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο στα προστατικά καρκινικά κύτταρα LNCaP (Hermann et al., 1997) και την επαγωγή της p21 στα ηπατοκαρκινικά κύτταρα SK-Hep-1 (Kang et al., 1999), αλλά όχι την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7 (Anjum and Khar, 2001), μολονότι και στις τρεις περιπτώσεις επέφερε ένα φαινότυπο ανθεκτικό στο κεραμίδιο. Επομένως είναι φανερό ότι μολονότι υπάρχουν αυτές οι παρατηρήσεις ο μηχανισμός δράσης του κεραμιδίου αλλά και του Bcl-2 δεν έχει γίνει ακόμη κατανοητός. Επιπλέον, το κεραμίδιο φαίνεται ότι εμπλέκεται στα ενδιάμεσα στάδια της ενεργοποίησης ή της μεταβίβασης του μηνύματος κυτταρικού θανάτου (death signal) (Farschon et al., 1997) και το Bcl-2 παρεμποδίζει την απόπτωση που επάγεται από το κεραμίδιο χωρίς να παρεμβαίνει σημαντικά στη συσσώρευση του κεραμιδίου (Zhang et al., 1996; Dbaiibo et al., 1997; Allouche et al., 1997; EL-Assaad et al., 1998). Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι η συσσώρευση του κεραμιδίου δεν είναι ένα τελικό στάδιο και λαμβάνει χώρα πριν η αποπτωτική διαδικασία φθάσει στο σημείο χωρίς επιστροφή.

Η κλαστρίνη/απολιποπρωτεΐνη J (ApoJ), μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη μεταφορά των λιπιδίων και δρα ως πρωτεΐνη συνοδός, φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση των κυττάρων, αφού επάγεται σε κύτταρα που υφίστανται απόπτωση μετά από τη διέγερση ή την έκθεσή τους σε διαφορετικά ερεθίσματα, αλλά και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις και επιφέρει ανθεκτικότητα στα

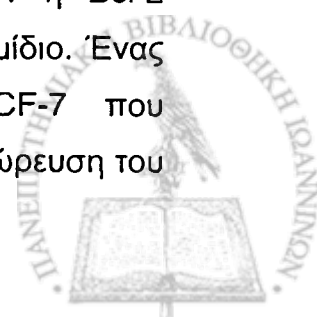


περισσότερα απ' αυτά τα ερεθίσματα που επάγουν απόπτωση (βλέπε εισαγωγή, παρ. 7.1; Jenne and Tschopp, 1992; Rosenberg and Silkensen, 1995; Jones and Jomary, 2002). Είναι γνωστό ότι ο TNFα διεγείρει την παραγωγή και τη συσσώρευση του ενδοκυττάριου κεραμιδίου και επάγει την απόπτωση διαφόρων κυτταρικών τύπων (Geilen et al., 1997; Hannun and Luberto, 2000; Hannun and Obeid, 2002). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η υπερέκφραση της κλαστρίνης/ApoJ επάγει την ανθεκτικότητα των ανθρώπινων ανδρογόνου-εξαρτώμενων προστατικών καρκινικών κυττάρων LNCaP στον TNFα (Sensibar et al., 1995; Sintich et al., 1999) και ότι η χορήγηση 20  $\mu$ M κεραμιδίου για 24h σε παγκρεατικά κύτταρα AR4-2J επάγει την απόπτωσή τους, ακολουθούμενη από την επαγωγή της έκφρασης της κλαστρίνης/ApoJ (Calvo et al., 1998). Αυτές οι σχετικά ελάχιστες μελέτες μας παρακίνησαν να εξετάσουμε τον πιθανό αντι-αποπτωτικό ρόλο της κλαστρίνης/ApoJ στο C<sub>2</sub>-κεραμίδιο και να τον συγκρίνουμε με τον καλά μελετημένο αντι-αποπτωτικό ρόλο της Bcl-2 σε διάφορα κυτταρικά συστήματα και κάτω από διαφορετικά ερεθίσματα, αλλά και με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης. Η χορήγηση αυξανόμενων δόσεων C<sub>2</sub>-κεραμιδίου για 24h δεν μετέβαλε τα επίπεδα έκφρασης της κλαστρίνης/ApoJ στα κύτταρα HaCaT. Η υπερέκφραση της εκκρινόμενης μορφής της κλαστρίνης/ApoJ δεν ήταν ικανή να μεταβάλει τις επιδράσεις του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή να επιφέρει ανθεκτικότητα στις μορφολογικές μεταβολές, χαρακτηριστικές αποπτωτικών κυττάρων και να αυξήσει την ικανότητα σχηματισμού αποικιών μετά την επώαση των κυττάρων HaCaT/ApoJ/2 με αυξανόμενες συγκεντρώσεις C<sub>2</sub>-κεραμιδίου για 24h σε σύγκριση με τα HaCaTneo. Η ανάλυση της ενδονουκλεοσωμικής θραυσματοποίησης του DNA και της πρωτεολυτικής διάσπασης της PARP από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο επιβεβαίωσε την ανικανότητα της υπερέκφρασης της κλαστρίνης/ApoJ να επαυξήσει το φαινότυπο των HaCaT ανθεκτικό στο C<sub>2</sub>-κεραμίδιο. Επομένως, ενώ η Bcl-2 προστατεύει τα κερατινοκύτταρα HaCaT από την απόπτωση που επάγεται από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο, η υπερέκφραση της κλαστρίνης/ApoJ δεν επιφέρει ανθεκτικότητα στο κεραμίδιο.

Για να ανακεφαλαιώσουμε, η παρούσα μελέτη εστιάστηκε στην επαγόμενη απόπτωση των κερατινοκυττάρων HaCaT από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο και τη σύγκριση του ρόλου της Bcl-2 και της κλαστρίνης/ApoJ. Η πρώτη παρατήρηση μας είναι ότι το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο επάγει την αναστολή του πολλαπλασιασμού και την απόπτωση των κερατινοκυττάρων HaCaT με χρονο- και δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, όπως μελετήθηκε με την ανάλυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την ικανότητα σχηματισμού



αποικιών των κυττάρων, την ενδονουκλεοσωμική θραυσματοποίηση του DNA και την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP. Η δεύτερη παρατήρησή μας είναι ότι το Bcl-2 επιφέρει στα HaCaT έναν φαινότυπο ανθεκτικό στην απόπτωση που επάγεται από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο. Η τρίτη παρατήρηση μας είναι ότι η κλαστρίνη/ApoJ δεν προστατεύει τα κερατινοκύτταρα HaCaT από την C<sub>2</sub>-επαγόμενη απόπτωση, σε αντίθεση με το Bcl-2. Αυτό δείχνει ότι οι καθοδικοί (κατάρρους) στόχοι οι οποίοι ενεργοποιούνται από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο δεν είναι ευαίσθητοι στην αναστολή από την κλαστρίνη/ApoJ. Είναι γνωστό ότι ο TNFα διεγείρει τη συσσώρευση του κεραμιδίου και οδηγεί στην απόπτωση των κυττάρων θηλαστικών, αποδεικνύοντας ότι το κεραμίδιο είναι ένα σημαντικό μόριο στην πορεία μεταγωγής του σήματος του TNFα (Jäättelä et al., 1995; Hannun and Luberto, 2000; Hannun and Obeid, 2002), συμπεριλαμβανομένων και των κερατινοκυττάρων (Geilen et al., 1997; Müller-Wieprecht et al., 2000). Επίσης είναι γνωστό ότι η Bcl-2 προστατεύει τα κύτταρα από την TNFα-επαγόμενη απόπτωση ή από άλλους στρεσογόνους παράγοντες που οδηγούν στην αύξηση των επιπέδων του ενδοκυττάρου κεραμιδίου χωρίς να μεταβάλει την επακόλουθη συσσώρευση του κεραμιδίου, δείχνοντας ότι δρά σε κάποιο σημείο μετά τη συσσώρευση του κεραμιδίου (Zhang et al., 1996; Dbaiibo et al., 1997; Allouche et al., 1997; EL-Assaad et al., 1998). Επιπλέον, ενώ και η Bcl-2 (Zhang et al., 1996; Dbaiibo et al., 1997; Allouche et al., 1997; EL-Assaad et al., 1998; Müller-Wieprecht et al., 2000) και η κλαστρίνη/ApoJ (Sensibar et al., 1995; Sintich et al., 1999) αναστέλλουν την απόπτωση που επάγεται από τον TNFα φαίνεται ότι ρυθμίζουν διαφορετικά αυτή την πορεία μεταγωγής του σήματος που οδηγεί στην ενεργοποίηση της αποπτωτικής διαδικασίας. Η παρούσα μελέτη μολονότι από μόνη της δεν επιτρέπει να εξάγουμε συμπεράσματα σε σχέση με τον κυτταρικό στόχο, μας επιτρέπει να υποθέσουμε ότι η κλαστρίνη/ApoJ μπορεί να παρεμποδίζει έναν κυτταρικό στόχο του οποίου η ενεργοποίηση προηγείται της συσσώρευσης του κεραμιδίου ή ο οποίος μπορεί να είναι απαραίτητος για τη συσσώρευση του κεραμιδίου και την επαγωγή της απόπτωσης. Αυτή η δράση πιθανά να είναι ανάλογη με τη διαφορετική δράση των Bcl-2 και Bcl-x<sub>L</sub> στα ανθρώπινα αδενοκαρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7, όπου ενώ και τα δύο γονίδια αναστέλλουν την απόπτωση των κυττάρων που επάγεται από τον TNFα, μόνον η Bcl-2 προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση που επάγεται από το κεραμίδιο. Ένας λόγος αυτής της διαφορετικής συμπεριφοράς των κυττάρων MCF-7 που υπερεκφράζουν Bcl-2 ή Bcl-x<sub>L</sub> είναι ότι το δεύτερο παρεμποδίζει τη συσσώρευση του

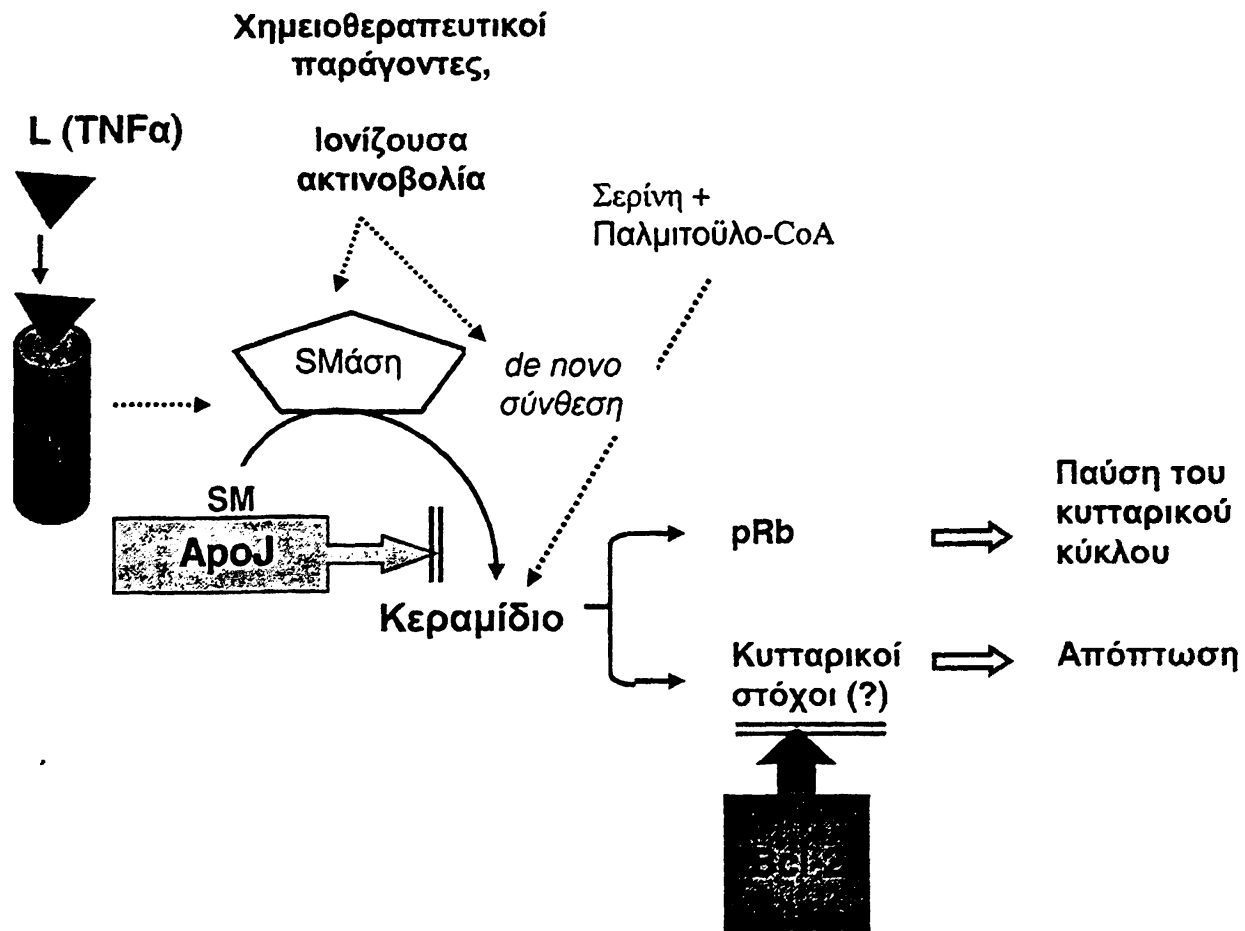




κεραμιδίου που επάγεται από τον TNF $\alpha$  και επομένως δρα ανάρρους της συσσώρευσης του κεραμιδίου σε αντίθεση με τη Bcl-2 που δεν είχε καμιά επίδραση στη συσσώρευση του κεραμιδίου (EL-Assaad et al., 1998). Ένα από τα μόρια-στόχους του Bcl-x<sub>L</sub> ήταν η κασπάση-8 καθώς η διέγερση του υποδοχέα του TNF $\alpha$  (TNFR) οδηγεί στη γρήγορη στρατολόγηση της κασπάσης-8 στον TNFR και στην ενεργοποίησή της. Η ενεργοποίηση των πιο απομακρυσμένων κασπασών (π.χ. κασπάσης-3 ή κασπάσης-7) γίνεται μετά από αρκετές ώρες. Η υπερέκφραση της Bcl-x<sub>L</sub> αλλά όχι της Bcl-2 παρεμποδίζει την ενεργοποίηση της κασπάσης-8 από τον TNF $\alpha$  στα κύτταρα MCF-7 (EL-Assaad et al., 1998). Ένα ανάλογο παράδειγμα της δράσης του Bcl-x<sub>L</sub> είναι αυτό της CrmA (Cytokine-response modifier), η οποία παρεμποδίζει τη συσσώρευση του κεραμιδίου ως απόκριση στον TNF $\alpha$ , και επιλεκτικά αναστέλλει την ενεργότητα της κασπάσης-8 (Dbaiibo et al., 1997).

Οι μελέτες αυτές μαζί με τα ευρήματα της παρούσας εργασίας μας επιτρέπουν να προτείνουμε ένα απλό υποθετικό μοντέλο της αντι-αποπτωτικής δράσης του Bcl-2 και της κλαστρίνης/ApoJ σε σχέση με την πορεία της μεταγωγής του σήματος του TNF $\alpha$ /κεραμιδίου (Σχήμα 1.4). Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο το κεραμίδιο δρα για την αναστολή του κυτταρικού κύκλου και την επαγωγή της απόπτωσης δεν είναι ακόμη κατανοητός, μολονότι έχουν προταθεί αρκετοί έμμεσοι ή άμεσοι στόχοι, όπως φωσφατάσες (CAPP) και κινάσες (CAPK, PKC). Ανεξάρτητα όμως αυτού του γεγονότος, η τοποθέτηση του Bcl-2 και της κλαστρίνης/ApoJ στην πορεία μεταγωγής του σήματος του κεραμιδίου μπορεί να επιτρέψει την ανάπτυξη του μηχανισμού δράσης των δύο αυτών γονιδίων.

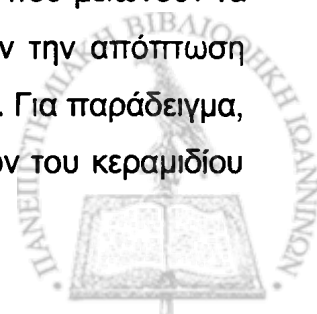




**Σχήμα 1.4.** Υποθετικό σχήμα του ρόλου του κεραμιδίου στην παύση του κυτταρικού κύκλου και στην επαγωγή της απόπτωσης και οι πιθανές θέσεις δράσης του Bcl-2 και της κλαστρίνης/ApoJ. L, παράγοντας (Ligand), R, υποδοχέας (Receptor), SM, σφιγγομελίνη; Σμάση, σφιγγομελινάση, pRb, πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος

Τα δεδομένα έως σήμερα δείχνουν ότι ούτε το Bcl-2, αλλά ούτε και η κλαστρίνη/ApoJ επηρεάζει τις επιδράσεις του κεραμιδίου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η πορεία αναστολής της κυτταρικής αύξησης ενεργοποιείται είτε από έναν εξωκυττάριο παράγοντα (π.χ. TNFα, Fas) ή από ενδοκυττάρια βλάβες (π.χ. ως επακόλουθο της δράσης χημειοθεραπευτικών παραγόντων και ιονίζουσας ακτινοβολίας) που συγκλίνουν σε ένα σημείο που οδηγεί στη συσσώρευση του ενδοκυττάρου κεραμιδίου. Ως επακόλουθο, το κεραμίδιο ενεργοποιεί αντιμιτωτικές αποκρίσεις που εξαρτώνται κυρίως από την pRb, αλλά και αποπτωτικές αποκρίσεις που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο. Καθώς το Bcl-2 δεν επηρεάζει τη συσσώρευση του κεραμιδίου στο κύτταρο φαίνεται ότι επηρεάζει την ενεργοποίηση κυτταρικών στόχων κατάρρους του σημείου συσσώρευσης του κεραμιδίου και παρεμποδίζει την κυτταρική απόπτωση (Σχήμα 1.4). Σε αντίθεση, αφού η κλαστρίνη/ApoJ παρεμποδίζει την TNFα αλλά όχι την C<sub>2</sub>-επαγόμενη απόπτωση, φαίνεται ότι επηρεάζει κυτταρικούς στόχους ανάρρους του σημείου συσσώρευσης του ενδοκυττάρου κεραμιδίου (Σχήμα 1.4). Ένας τέτοιος πιθανός στόχος μπορεί να είναι η κασπάση-8. Πειράματα σε εξέλιξη στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, αποσκοπούν στην εξέταση αυτού του υποθετικού μοντέλου δράσης της κλαστρίνης/ApoJ χρησιμοποιώντας TNFα και προσδιορίζοντας τα επίπεδα του ενδοκυττάρου κεραμιδίου και της απόπτωσης στις διαφορετικές κυτταρικές σειρές HaCaT.

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον στην έρευνα του ρόλου του κεραμιδίου και των μεταβολιτών του στην ιστοφυσιολογία και παθοφυσιολογία. Ο χειρισμός των επιπέδων του κεραμιδίου από διάφορα φάρμακα και παράγοντες εξετάζονται σήμερα σε προκλινικές και κλινικές μελέτες. Η γνώση της ενεργοποίησης των σφιγγολιπιδιο-εξαρτώμενων πορειών μεταγωγής του σήματος σε διάφορους κυτταρικούς τύπους που παράγεται από το πλήθος βιοχημικών, γενετικών και φυσιολογικών μελετών, παρέχει ισχυρή ώθηση για αυτού του είδους την έρευνα και το σχεδιασμό πιθανής θεραπείας ασθενειών. Χαρακτηριστικά, οι στρατηγικές που αυξάνουν τα επίπεδα του ενδοκυττάρου κεραμιδίου χρησιμοποιούνται για θεραπείες που αποσκοπούν στην καταστολή της κυτταρικής αύξησης ή στην προαγωγή της απόπτωσης. Αντίθετα, παράγοντες που μειώνουν τα επίπεδα του ενδοκυττάρου κεραμιδίου τείνουν να παρεμποδίσουν την απόπτωση και να προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Kolesnick, 2002). Για παράδειγμα, η πρώτη δραματική προσέγγιση ήταν η άμεση εφαρμογή αναλόγων του κεραμιδίου



σε κατεστραμμένες αρτηρίες με αποτέλεσμα την παύση του κυτταρικού κύκλου και επομένως την καταστολή της υπερπλασίας (Kolesnick, 2002). Ο χειρισμός των επιπέδων του κεραμιδίου έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την αύξηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας ορισμένων καρκίνων. Η χορήγηση κεραμιδίου μαζί με το συγκεκριμένο χημειοθεραπευτικό παράγοντα αύξησε την απόπτωση καρκινικών κυττάρων λαιμού και κεφαλής, εντέρου και ήπατος. Η παρεμπόδιση του σχηματισμού του κεραμιδίου μπορεί επίσης να προστατεύσει ορισμένους ιστούς από τις παρενέργειες θεραπειών νεοπλασμάτων (Kolesnick, 2002). Είναι λοιπόν πιθανόν η έκφραση του Bcl-2 ή και της κλαστρίνης/ApoJ σε ορισμένους όγκους να επηρεάσει το αποτέλεσμα της θεραπείας.

#### **3.4. Ο ρόλος της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 στην απόπτωση που επάγεται από κυτταροτοξικούς παράγοντες**

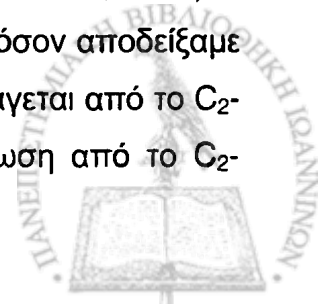
Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 είναι εξαιρετικά αποτελεσματικός αναστολέας του κυτταρικού πολλαπλασιασμού προκαλώντας είτε παύση του κυτταρικού κύκλου, είτε αποπτωτικό θάνατο, γεγονός εξαρτώμενο από τον κυτταρικό τύπο (Vousden, 2000). Η ρύθμιση της p53 συνεπώς αποτελεί κρίσιμο σημείο, αφενός για τη φυσιολογική κυτταρική διαίρεση και αφετέρου για την καταστολή των όγκων. Το γονίδιο p53 και το πρωτεϊνικό του προϊόν αποτελούν το κέντρο εντατικών ερευνών από τότε που αποδείχθηκε ότι άνω του 50% των καρκίνων περιέχουν μεταλλάξεις του γονιδίου (Levine, 1997). Η πρωτεΐνη p53 εμπλέκεται στις αποκρίσεις κυττάρων σε γονοτοξικό στρες. Η ακτινοβολία γ, η υπεριώδης ακτινοβολία και χημικοί στρεσογόνοι παράγοντες που καταστρέφουν το DNA ενεργοποιούν την p53, η οποία επάγει και αρκετούς ρυθμιστές της απόπτωσης (Vousden, 2002; Oren, 2003). Αριθμός πειραματικών δεδομένων αποδεικνύει ότι η p53 έχει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της απόπτωσης ως ανταπόκριση σε καταστροφή ή βλάβη στο DNA, ενώ θυμοκύτταρα μύς με p53<sup>-/-</sup> δεν υφίστανται απόπτωση σε ανταπόκριση του ίδιου ερεθίσματος. (Tokino and Nakamura, 2000). Όμοια, σε μύς που υπόκεινται ακτινοβολία τα στελεχιακά (stem) κύτταρα του λεπτού και του παχέος εντέρου αποπίπτουν, φαινόμενο που συμβαίνει σε p53<sup>-/-</sup> μύς. Όμως, είναι φανερό ότι όλα τα αποπτωτικά φαινόμενα δεν ρυθμίζονται αποκλειστικά από την έκφραση ή όχι του p53, όπως άωρων θυμοκυττάρων μύς p53<sup>-/-</sup>.



Τα φυσιολογικά κύτταρα εκφράζουν χαμηλά επίπεδα p53, όμως τα καρκινικά κύτταρα (σαρκώματα, νευροβλαστώματα) περιέχουν μεταλλαγμένες μορφές της p53 (Levine, 1997). Η θεραπεία νεοπλασιών με ακτινοβολία ή χημειοθεραπεία έχει ως αποτέλεσμα την εκτεταμένη καταστροφή του DNA και την πορεία επαγωγής του p53. Σε επιλεγμένα περιστατικά η επαγόμενη από το p53 απόπτωση μπορεί να ρυθμίσει τα τοξικά αποτελέσματα των αντικαρκινικών παραγόντων. Κύτταρα που ενεργοποιούνται από την έκφραση του ογκογόνου αδενοϊού E1A υφίστανται απόπτωση επαγόμενη από την p53 σε απόκριση ιονίζουσας ακτινοβολίας ή θεραπείας με 5-φθοροουρακίλη, ετοποσίδιο η ανδριαμυκίνη. Όλα τα τερατοκαρκινώματα όρχεων του ανθρώπου και του μύος περιέχουν τον άγριο τύπο του γονιδίου p53 (Sharples and RePinho, 2002), γι' αυτό και οι προαναφερόμενοι όγκοι ανταποκρίνονται πολύ καλά (95% θεραπεία) σε χημειοθεραπεία με cis-πλατίνα. Ο άγριος τύπος του γονιδίου p53 περιέχεται και σε κύτταρα οξείας λεμφοπλαστικής λευχαιμίας που ανταποκρίνονται εξαιρετικά σε χημειοθεραπευτικές ουσίες, όπως το ετοποσίδιο (Froesch, 1999). Η τυχόν αναποτελεσματικότητα στη θεραπεία και η επανεμφάνιση του καρκίνου συσχετίζεται με μεταλλάξεις του γονιδίου p53. Επιπρόσθετα, όγκοι που περιέχουν μια μεταλλαγμένη μορφή της p53 (μελάνωμα, καρκίνοι πνεύμονα, κολοτυφλικοί καρκίνοι, καρκίνοι της κύστης και του προστάτη) ανταποκρίνονται σε μικρό ποσοστό στη χημειοθεραπεία ή στην ακτινοβολία. Σε καρκινικά κύτταρα μαστού το μεταλλαγμένο γονίδιο p53 συνδέεται με την de novo ανθεκτικότητα του κυττάρου σε θεραπεία δοξορουβικίνης, όπως και με μικρότερο διάστημα επιβιωσιμότητας των ασθενών (Miyashita, et al., 1994).

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 εμπλέκεται στην επαγωγή της απόπτωσης των κερατινοκυττάρων από ενώσεις βαναδίου (Huang et al., 2000).

Τα ευρήματά της παρούσης εργασίας είναι σημαντικά διότι τα HaCaT φέρουν μεταλλαγμένες μορφές της p53 (μεταλλάξεις της p53 τύπου UV) (Lehman et al., 1993), όπως οι περισσότεροι τύποι/μορφές καρκίνων οι οποίοι είναι ανθεκτικοί στα χημειοθεραπευτικά. Έτσι αποδείξαμε ότι το θειικό βαναδύλιο επάγει την απόπτωση κερατινοκυττάρων ανεξάρτητα από την παρουσία άγριου τύπου p53. Καθώς επίσης τα κύτταρα HaCaT φέρουν μεταλλαγμένες μορφές της p53 (Lehman et al., 1993) οι φυσιολογικοί ινοβλάστες MRC-5 φέρουν άγριου τύπου p53 και καθόσον αποδείξαμε ότι τα κύτταρα HaCaT είναι πιο ευαίσθητα στην απόπτωση που επάγεται από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο, ερευνήσαμε το ρόλο της p53 στην επαγόμενη απόπτωση από το C<sub>2</sub>-



κεραμίδιο. Σε ηπατοκαρκινικά κύτταρα, το κεραμίδιο επάγει την έκφραση του κυκλινο-εξαρτώμενου αναστολέα των κινασών p21 με τρόπο που δεν εξαρτάται από την παρουσία του γονιδίου, μολονότι η p53 είναι μεταγραφικός ενεργοποιητής της p21 και επάγει την απόπτωσή τους (Kang et al., 1999). Εισαγωγή της p21 με χρήση αδενοϊών σε ανθρώπινα κύτταρα μελανώματος παρεμποδίζει την απόπτωσή τους από την εκτοπική έκφραση της p53 (Gorospe et al., 1997; Spyridopoulos et al., 2001). Η εκτοπική υπερέκφραση ενός μεταλλαγμένου p53 γονιδίου–του p53<sup>143ala</sup> (κυρίαρχο αρνητικό ανθρώπινο μεταλλαγμένο γονίδιο), για το οποίο είχε αποδειχθεί προηγουμένως ότι παρατείνει το χρόνο ζωής και παρέχει πλεονέκτημα στο ρυθμό ανάπτυξης των ανθρώπινων διπλοειδών ινοβλαστών (Bond et. al., 1999; Wyllie et. al. 1999), επαύξησε την ευαισθησία των φυσιολογικών ινοβλαστών MRC-5 στην επαγόμενη από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο απόπτωση, φαινόμενο που δεν συνάδει με συμπεράσματα άλλων ερευνών, που αναφέρουν ότι η έκφραση του μεταλλαγμένου p53 δεν επιφέρει βιολογικές δράσεις που εμφανίζονται ως αναστολή του κυτταρικού κύκλου, του πολλαπλασιασμού και έναρξης του αποπτωτικού θανάτου (Wu et. al., 1997; Canman et. al., 1998; Wyllie et. al., 1999; Vousden, 2002). Ο άγριος τύπος του p53 φυσιολογικά δρα ως γονίδιο καταστολής των όγκων, ενώ η μεταλλαγμένη μορφή είναι γνωστό πως επιλέγεται σε κύτταρα που έχουν πλεονέκτημα αύξησης (Takashi and Nakamura, 2000).

Πρόσφατες μελέτες όμως δείχνουν ότι η άγριου τύπου μορφή p53 πρωτεΐνη έχει άμεσο αποπτογόνο ρόλο στα μιτοχόνδρια (Mihara et. al., 2003), αλλά και η καταστολή της κυτταρικής απόπτωσης από μεταλλαγμένες μορφές p53 εξαρτάται από συγκεκριμένο τύπο της μετάλλαξης (Ohiro et. al., 2003). Για παράδειγμα η p53<sup>143ala</sup> που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη δεν έχει την ικανότητα καταστολής της κυτταρικής απόπτωσης όπως οι μεταλλάξεις της p53 175RH ή 173RH (Ohiro et. al. 2003). Είναι επίσης γνωστό ότι η βιολογική δράση της p53 εξαρτάται από το σχηματισμό ενός ενεργού τετραμερούς που δρα ως μεταγραφικός παράγοντας. Αυτός ο τετραμερής μεταγραφικός παράγοντας άγριου τύπου p53 δύναται να απενεργοποιηθεί με την εισαγωγή στο τετραμερές μιας μεταλλαγμένης μορφής p53. Η στοιχειομετρία για την απενεργοποίηση του τετραμερούς άγριου τύπου από μεταλλάκτη φαίνεται ότι είναι ο σημαντικότερος παράγοντας (Chan et al., 2004). Στην παρούσα μελέτη η στοιχειομετρία άγριου τύπου p53 προς p53<sup>143ala</sup> δεν είναι γνωστή.

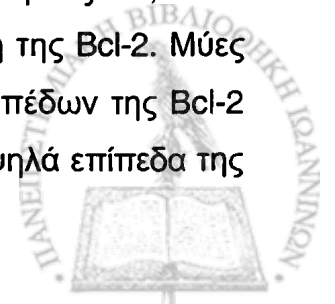


Τα πειραματικά μας δεδομένα έδειξαν ότι η έκφραση της μεταλλαγμένης μορφής p53 στα κύτταρα MRC-5 οδήγησε σε μορφολογικές μεταβολές, χαρακτηριστικές των αποπτωτικών κυττάρων και ευαισθητοποίησε τα κύτταρα MRC-5 στην επαγόμενη από το C<sub>2</sub>-κεραμιδίο απόπτωση. Παρόμοια στοιχεία έχουν βρεθεί στην καρκινική κυτταρική σειρά H358, (Miyashita et al., 1994) σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα θυροειδούς (Wyllie et al., 1999) και σε κύτταρα MCF7 (Froesch et al., 1999).

Η p53 καταστέλλει την έκφραση της Bcl-2 συμβάλλοντας στην αποπτωτική διαδικασία (Haldar et al., 1994; Budhram-Mahadeo et al., 1999). Παράλληλα έχει αναφερθεί ότι η Bcl-2 ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση της p53 (Froesch et al., 1999) και ότι η άγριου τύπου p53 φέρεται και ως αρνητικός ρυθμιστής ενός άλλου πιθανού αντιαποπτωτικού γονιδίου του ApoJ (Criswell et al., 2003).

Στο ερευνητικό μας έργο μελετήθηκε ο μηχανισμός με τον οποίο η μεταλλαγμένη μορφή p53<sup>143ala</sup> ευαισθητοποιεί τα κύτταρα MRC-5 στο κεραμίδιο, όπως και η συσχέτιση έκφρασης της p53 και των δύο αντι-αποπτωτικών γονιδίων ApoJ και Bcl-2. Ταυτόχρονα, επειδή γνωρίζουμε ότι η p21 (αναστολέας των κυκλινοεξαρτημένων κινασών) ενεργοποιείται από την έκφραση του p53, ως μεταγραφικός στόχος της, μελετήθηκε η έκφραση της p21 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων κεραμιδίου σε κύτταρα MRC-5 (Takashi and Nakamura, 2002; Vousden, 2002; Sharples and RePinho, 2002). Τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν ότι η p53<sup>143ala</sup> ευαισθητοποιεί τους φυσιολογικούς ινοβλάστες MRC-5 στην απόπτωση που επάγεται από το κεραμίδιο καταστέλλοντας την έκφραση δύο αντι-αποπτωτικών γονιδίων. Η υπερέκφραση της p53<sup>143ala</sup> καταστέλλει τα ενδογενή επίπεδα ApoJ, αλλά και τη δόσο-εξαρτώμενη επαγωγή της μετά από επώαση με C<sub>2</sub>-κεραμίδιο στα κύτταρα MRC-5 p53<sup>143ala</sup>. Αντίθετα τα ενδογενή επίπεδα της Bcl-2 δεν καταστάληκαν, όμως κατέστη εμφανές ότι η έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 αναστάληκε σχεδόν τελείως στα κύτταρα που υπερέκφραζαν την p53<sup>143ala</sup> παρουσία κεραμιδίου.

Τα αποτελέσματά μας συμφώνησαν με αυτά του Miyashita, όπου στην καρκινική σειρά του πνεύμονα H358 η υπερέκφραση της p53 ανέστειλε την έκφραση του γονιδίου Bcl-2 (Miyashita, 1994), ενώ έχει επίσης αναφερθεί πως παρόμοια δράση έχει η υπερέκφραση της p53 στη λευχαιμική κυτταρική σειρά μύος M1, όπου αυξάνει την έκφραση της Bax, μειώνοντας αντίστοιχα την έκφραση της Bcl-2. Μύες με απάλειψη της έκφρασης της p53 επιδεικνύουν αύξηση των επιπέδων της Bcl-2 και μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης Bax (Miyashita, 1994). Υψηλά επίπεδα της



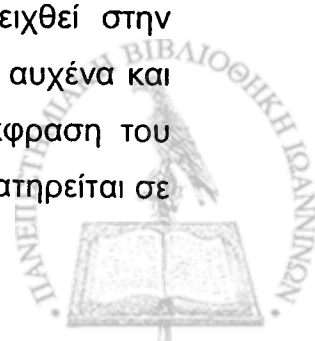
ογκοπρωτεΐνης Bcl-2 σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF7 επιδεινώνουν την από το p53 επαγόμενη αναστολή της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης p21 μετά από καταστροφή του DNA (Froesch et al., 1999). Έτσι αποδεικνύεται ότι η Bcl-2 μπορεί να παρεμποδίζει τη λειτουργία της p53 μέσω αναστολής της μεταγραφικής της ενεργότητας. Αυτό μπορεί να έχει επιπτώσεις στην απόκριση καρκινικών κυττάρων σε κυτταροτοξικά φάρμακα και συνεπώς να συνεισφέρει στην ικανότητα της Bcl-2 να επάγει χημειοανθεκτικότητα. Έτσι και τα ερευνητικά μας δεδομένα κάνουν φανερό ότι η p53<sup>143ala</sup> ευαισθητοποιεί τους φυσιολογικούς ινοβλάστες MRC-5 στην επαγόμενη από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο απόπτωση, καταστέλλοντας την έκφραση δύο αντι-αποπτωτικών γονιδίων, υπορρυθμίζοντας μερικώς την έκφραση της ApoJ και σε υψηλότερο βαθμό την έκφραση της Bcl-2, τουλάχιστον σε ινοβλάστες MRC-5.

#### 4.4. Ο ρόλος του βαναδίου και του κεραμιδίου στη χημειοθεραπεία

Κατά τα τελευταία χρόνια έχει επιδειχθεί υψηλό επιστημονικό ενδιαφέρον για την ανάπτυξη και εξήγηση του ρόλου του κεραμιδίου και των μεταβολιτών του στη φυσιολογία και παθοφυσιολογία των ιστών, όπως και ως δυνητικού χημειοθεραπευτικού παράγοντα. Η γνώση της κυτταροεξαρτώμενης ενεργοποίησης πορειών σήματος επαγόμενων από τα σφιγγολιπίδια (κεραμίδια) παρέχει τη δυνατότητα της χρήσης του κεραμιδίου ως χημειοθεραπευτικού μέσου.

Τυπικά οι στρατηγικές που επαυξάνουν τις συγκεντρώσεις κεραμιδίου στα κύτταρα χρησιμοποιούνται για θεραπείες που επιδιώκουν αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επάγουν αποπτωτικό θάνατο. Χαρακτηριστικό μοντέλο δράσης του κεραμιδίου αποτελεί ο αντι-πολλαπλασιαστικός του ρόλος όταν επαλείφεται απευθείας σε κατεστραμμένες αρτηρίες (Charles, 2000) και η προφύλαξη των στεφανιαίων αρτηριών από στένωση μετά από επεμβατική αγγειοπλαστική (stent) λόγω της αναστολής που επιφέρει το κεραμίδιο στις πορείες ERK και KAT με αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στα λεία μυϊκά κύτταρα του ενδοθηλίου των τραυματισμένων αγγείων (Bourbon et al., 2001).

Οι χημειοπροστατευτικές δράσεις του κεραμιδίου έχουν αποδειχθεί στην αναστολή κυτταρικών καρκινικών σειρών του πλακώδους επιθηλίου του αυχένα και της κεφαλής (Tu 138) (Kolesnick, 2002), στη μειωμένη κατά 50% έκφραση του κεραμιδίου σε καρκίνο του κόλου σε σχέση με τη συγκέντρωση που παρατηρείται σε





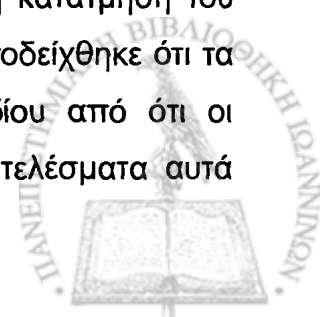
φυσιολογικά κύτταρα του κόλου (Selzner, 2001), ενώ προλαμβάνεται ο επαγόμενος από ακτινοβολία καρκίνος των ωοθηκών θηλυκών μών με τη χορήγηση κεραμιδίου πριν την ακτινοβολία (Morita, 2000).

Ταυτόχρονα, πλειάδα χημειοθεραπευτικών ουσιών διεγείρει την παραγωγή κεραμιδίου, με αποτέλεσμα η αυξημένη συγκέντρωσή του σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, όπως σε κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος, (Wang et al., 2001), σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7 και MDR (Lucci et al., 1999; Kundu et al., 2002), σε προστατικά καρκινικά κύτταρα (Kundu et al., 2002) και να επάγει απόπτωση σε λευχαιμικά T κύτταρα Jurkat (Murick et al., 1999), σε κύτταρα γλοιώματος C6, όπου καταστέλλει την έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, σε καρκινικά κύτταρα του κόλου HT29 (Chauvier et al., 2002), σε προστατικά καρκινικά κύτταρα LNCaP (Akao et al., 2002), σε ενεργοποιημένα περιφερειακά λεμφοκύτταρα και σε ανθρώπινες επιθηλιακές κυτταρικές σειρές (Radin, 2003), σε θυμικά T λεμφοκύτταρα και σε κύτταρα κινέζικων hamster V79 που εκφράζουν την πρωτεΐνη p53 (Karmakar et al., 2001).

Η αποπτωτική διαδικασία ενεργοποιήθηκε παρουσία κεραμιδίου ακόμα και εξωγενώς χορηγούμενου, σε κύτταρα μυελώματος μυός, σε καρκινικά πνευμονικά κύτταρα Lewis, σε ανθρώπινους ινοβλάστες (Senchenkov et al., 2001), σε μετασχηματισμένους από SV40 ανθρώπινους πνευμονικούς ινοβλάστες (Ramos et al., 2000) και σε κύτταρα HaCaT, όπου ταυτόχρονα αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους και επάγει την απόπτωση τους (Iwasaki-Bessho, 1998; Bektas et al., 1998; Muller-Wieprecht et al., 2000).

Η παρούσα μελέτη επιβεβαίωσε την αποπτωτική δράση του C<sub>2</sub> κεραμιδίου σε κερατινοκύτταρα HaCaT και ινοβλάστες MRC-5 η οποία επέρχεται με δόσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο, ενώ η χορήγηση C<sub>2</sub> κεραμιδίου στα κύτταρα HaCaT προκάλεσε ενδονουκλεοσωμική θραυσματοποίηση του DNA με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο.

Η χορήγηση C<sub>2</sub> κεραμιδίου σε κύτταρα MRC-5 είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της ενδονουκλεοσωμικής θραυσματοποίησης μόνο στη συγκέντρωση των 40 μM C<sub>2</sub> κεραμιδίου σε σύγκριση με τα κύτταρα HaCaT όπου η κατάτμηση του DNA ήταν εμφανής σε συγκεντρώσεις C<sub>2</sub> κεραμιδίου 5 μM. Έτσι αποδείχθηκε ότι τα κύτταρα HaCaT είναι πλέον ευαίσθητα στην παρουσία κεραμιδίου από ότι οι φυσιολογικοί ανθρώπινοι διπλοειδείς ινοβλάστες MRC-5. Τα αποτελέσματα αυτά

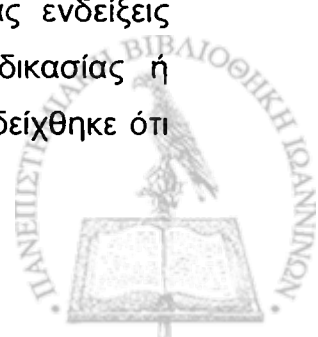


επιτρέπουν τη χρήση του C<sub>2</sub> κεραμιδίου ως μέσου για τη μελέτη ενός δυνητικά αντι-αποπτωτικού γονιδίου, της κλαστρίνης/απολιποπρωτεΐνης J (ApoJ) και στη σύγκρισή του με το Bcl-2, ενός καλά χαρακτηρισμένου αντι-αποπτωτικού γονιδίου ακόμη και στα κύτταρα HaCaT (Muller–Wieprecht et al., 2000).

Η γνώση ότι η απόπτωση μπορεί να συνεισφέρει στη χημειοθεραπεία μέσω του σχεδιασμού δραστικών ουσιών που επάγουν απόπτωση, παρέχει έδαφος στη μελέτη προ- και αντι-αποπτωτικών σημάτων που έχουν επίδραση στα μέλη της οικογένειας των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2, οικογένειας που ελέγχει κατά μεγάλο μέρος την κυτταρική τύχη (Makin and Dive, 2001).

Από προηγούμενες μελέτες είναι γνωστό ότι το κεραμίδιο ενεργοποιεί την πορεία σήματος SARK/JNK με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της c-Jun (Ruvolo, 2001), την υπερφωσφορυλίωση ή την αποφωσφορυλίωση της Bcl-2 (Ruvolo et al., 1999). Η υπερφωσφορυλίωση του Bcl-2 από το JNK απενεργοποιεί την αντι-αποπτωτική λειτουργία του (Haldar et al., 1998) και η πορεία της αμινοτελικής πρωτεϊνικής κινάσης Jun καταστέλλει τη Bcl-2 που ενεργοποιείται στο στάδιο G<sub>2</sub>/M (Ruvolo et al., 1999). Παράλληλα, ο μηχανισμός δράσης του κεραμιδίου περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών φωσφατασών PP2A και PP1, όπου η PP2A ρυθμίζει κατασταλτικά την αντι-αποπτωτική δράση μορίων βασικών για τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, όπως τη Bcl-2 και τη Bad (Kolesnick et al., 2000). Το κεραμίδιο επάγει την αποφωσφορυλίωση της Bcl-2 μέσω της PP2A με αποτέλεσμα την απώλεια της προστατευτικής του δράσης. Η έκφραση μιας μη φωσφορυλιωμένης μορφής της Bcl-2, της Bcl-2S70E, προστατεύει τα κύτταρα από την επαγόμενη από το κεραμίδιο απόπτωση. Έτσι η στρατολόγηση της PP2A στα μιτοχόνδρια από το κεραμίδιο ενεργοποιεί τη φωσφατάση της Bcl-2 και επάγει την αποφωσφορυλίωση της Bcl-2 και την τελική του αδρανοποίηση (Basu and Kolesnick, 1998; Ruvolo, 2003).

Στην παρούσα μελέτη τα κύτταρα HaCaT εκφράζανε χαμηλά επίπεδα της 26 KDa Bcl-2 πρωτεΐνης σε σχέση με την ApoJ και η έκφρασή τους παρέμεινε αμετάβλητη μετά τη χορήγηση C<sub>2</sub>-κεραμιδίου σε κυτταροκαλλιέργειες κυττάρων HaCaT. Αντίθετα η παρουσία C<sub>2</sub>-κεραμιδίου σε κύτταρα MRC-5 είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή κατά δοσο-εξαρτώμενο τρόπο της ApoJ δημιουργώντας ενδείξεις συσχέτισης μεταξύ των επιπέδων ApoJ και της αποπτωτικής διαδικασίας ή κυτταρικής επιβιωσιμότητας. Ταυτόχρονα με τον πειραματισμό μας αποδείχθηκε ότι



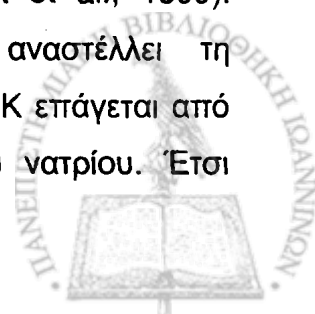
η χορήγηση κεραμιδίου επάγει μέσω της μείωσης της έκφρασης του κύριου αντι-αποπτωτικού γονιδίου Bcl-2 την απόπτωση των ινοβλαστών MRC-5.

Έχει δειχθεί ότι η υπερέκφραση της Bcl-2 σε διάφορους κυτταρικούς τύπους επιβραδύνει ή καταστέλλει την αύξηση φυσιολογικών κυτταρικών σειρών (Kumazaki et al., 2003) και ότι η υπερέκφραση ή η χορήγηση της ApoJ σε διάφορες κυτταρικές σειρές έχει αντι-πολλαπλασιαστικό ρόλο (Zhou et al., 2002; Bettuzzi et al., 2002).

Στην παρούσα ερευνητική εργασία η υπερέκφραση της Bcl-2 στα κύτταρα HaCaT επιφέρει έναν κυτταρικό φαινότυπο ανθεκτικό στην απόπτωση που επάγεται από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο, γεγονός που μπορεί να επιφέρει χημειοανθεκτικότητα σε κύτταρα που εκφράζουν πρωτεΐνες της υπεροικογένειας Bcl-2 (Reed, 1998).

Όμοια, η χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων C<sub>2</sub>-κεραμιδίου σε κύτταρα MRC-5 είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή μορφολογικών διαφορών χαρακτηριστικών της απόπτωσης. Σε αντίθεση με τα προαναφερθέντα αποτελέσματα τα κύτταρα MRC-5Bcl-2 διατήρησαν τη φυσιολογική τους μορφολογία, ενώ η ApoJ δεν ήταν ικανή να παρεμποδίσει την απόπτωση από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την αντιαποπτωτική δράση της Bcl-2 και το ρόλο της στην στρατηγική υπέρβασης της χημειοανθεκτικότητας κυτταρικών τύπων σε δραστικές ουσίες που στοχεύουν σε καρκινικά κύτταρα μέσω απόπτωσης επαγόμενης από το κεραμίδιο και καρκίνων κυττάρων της επιδερμίδας. Άλλωστε αλοιφές που περιέχουν κεραμίδιο ή διαλύματα κεραμιδίου μπορεί να χρησιμοποιηθούν in vivo σε ψηλαφώμενους όγκους του δέρματος (Ji et al., 1995), όπως και η διαιτητική χορήγηση σφιγγολιπιδίων (0,3 g/ημέρα) τα οποία υδρολύονται κατά ένα ποσοστό στο πεπτικό σύστημα μπορούν να αποτελέσουν φυσικά αντικαρκινογόνα (Vesper et al., 1999).

Η ενδοκυττάρια συσσώρευση κεραμιδίου επάγεται και από την επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων, καθώς επίσης και των ενώσεων βαναδίου. Παρουσία ορθοβαναδικού άλατος του νατρίου αποδείχθηκε ότι επάγεται ο κυτταρικός θάνατος και αυξάνεται η συσσώρευση κεραμιδίου, με αποτέλεσμα την κυτταρική απόπτωση. Σε ινοβλάστες IGF-IR<sup>+</sup> (υποδοχέας ινσουλινομιμητικού αυξητικού παράγοντα) η συμπαρουσία C<sub>2</sub>-κεραμιδίου και ορθοβαναδικού άλατος του νατρίου οδηγεί σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Stewart et al., 1999). Χορήγηση C<sub>6</sub>-κεραμιδίου στην κυτταρική σειρά RBL-2H3 αναστέλλει τη φωσφορυλίωση του ERK. Η αναγωγή της φωσφορυλίωσης της ERK επάγεται από το κεραμίδιο και αναστέλλεται από το ορθοβαναδικό άλας του νατρίου. Έτσι



αποδεικνύεται ότι η παρουσία βαναδίου οδηγεί σε αποσφωρυλίωση και αδρανοποίηση του ERK (που επάγεται από το κεραμίδιο) ως συνέπεια της ενεργοποίησης των πρωτεϊνικών φωσφατασών της τυροσίνης (PTPs), με συνέπεια την έναρξη του αποπτωτικού προγράμματος (Kitatani et al., 2001). Σύμπλοκα βαναδίου επάγουν απόπτωση στην κυτταρική σειρά Ramos, ενώ η χορήγησή τους οδήγησε σε τετραπλασιασμό της συγκέντρωσης κεραμιδίου ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της σφιγγομυελινάσης, διότι το βανάδιο εξήρε ανασταλτική δράση στη φωσφορυλίωση της τυροσίνης εξειδικευμένων πρωτεϊνών και κατά συνέπεια στην ενεργοποίηση της πορείας αποπτωτικού θανάτου (Dawson et al., 2000).

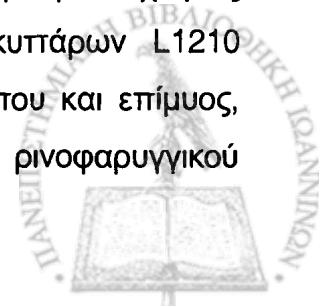
Η δράση του θειικού βαναδύλιου στα κύτταρα HaCaT πιθανά οφείλεται στην καταστολή του πρωτο-ογκονιδίου c-fos. Το σύμπλοκο c-fos/AP-1, είναι κυρίως ενεργοποιητής γονιδίων ως απόκριση σε παράγοντες πρόκλησης βλαβών στο DNA (Angel et al., 2001; Karin, 2002) και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα κυττάρων σε χημειοθεραπευτικά (Dempke et al., 2000). Τα πειραματικά μας δεδομένα απέδειξαν ότι το θειικό βαναδύλιο επάγει την αποπτωτική διαδικασία καταστέλλοντας την έκφραση του c-fos mRNA, άρα επάγοντας αντι-νεοπλαστική δράση, αφού τα μέλη της οικογένειας του fos έχουν ογκογόνο δράση και υπερεκφράζονται σε πολλούς διαφορετικούς τύπους καρκίνων (Angel et al., 2001). Μεταξύ των γονιδίων που εμπλέκονται στην αναστολή της κυτταρικής απόπτωσης μετά από χορήγηση στρεσογόνων ή αποπτωτικών παραγόντων είναι η AroJ (Trougkos and Gonos, 2002) και η Bcl-2 (Cory and Adams, 2002). Έχει αποδειχθεί ότι η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 παρεμποδίζει την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης c-fos που υφίσταται από το πρωτεόσωμα κατά την απόπτωση κυττάρων μετά τη χορήγηση διξαμεθαζόνης (He et al., 1998) και επαυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης c-fos και τη μεταγραφική ενεργότητα του συμπλόκου c-fos/AP-1 σε κερατινοκύτταρα (Amstard et al., 1997). Στην παρούσα μελέτη η εκτοπική έκφραση της Bcl-2 στα κύτταρα HaCaT ανέστειλε πλήρως την επαγόμενη από το θειικό βαναδύλιο απόπτωση σε συγκεντρώσεις από 25  $\mu\text{M}$  έως 1000  $\mu\text{M}$ , ενώ η υπερέκφραση της AroJ ανέστειλε την κυτταρική απόπτωση σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις θειικού βαναδύλιου έως 200  $\mu\text{M}$ , φανερώνοντας ότι η Bcl-2 έχει ισχυρότερη αντι-αποπτωτική δράση από αυτή της AroJ. Παρά ταύτα, η AroJ όντως παρεμπόδισε την απόπτωση των κυττάρων HacaT από το θειικό βαναδύλιο, γεγονός που δείχνει ότι η αναστολή της απόπτωσης από το v-fos πιθανά να οφείλεται στη διατήρηση των επιπέδων της AroJ.



Τα συμπεράσματα που εξάγονται από την ερευνητική μας εργασία αποδεικνύουν ότι το βανάδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως χημειοθεραπευτικό μέσο εφόσον επάγει απόπτωση σε κερατινοκύτταρα και ινοβλάστες, καταστέλλει την έκφραση του c-fos και επάγει απόπτωση κερατινοκυττάρων ανεξάρτητα από την παρουσία άγριου-τύπου p53, αφού προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 εμπλέκεται στην επαγωγή της απόπτωσης των κερατινοκυττάρων από ενώσεις βαναδίου (Huang et al., 2000). Οι χημειοθεραπευτικές δράσεις των ενώσεων βαναδίου έχουν ερευνηθεί σε σειρά πειραματικών πρωτοκόλλων με επίμυς Sprague Dawley, όπου η ημερήσια χορήγηση ενώσεων βαναδίου είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συχνότητας του καρκίνου, τη μείωση του αριθμού των ηπατικών όγκων, καθώς και την επιμήκυνση του μέσου χρόνου άνευ νόσου (Thompson, 1995). Ανάλογες, *in vivo* μελέτες με διάφορες ενώσεις βαναδίου είχαν τα ίδια αποτελέσματα (Cruz et al., 1995; Djordjevitc et al., 1995; Chakvadorty et al., 1995; Harding and Moksai, 2000). Πειράματα στο εργαστήριο φυσιολογίας με θειικό βαναδύλιο και οργανικά σύμπλοκα του βαναδίου (III) με κυστεΐνη, χορηγούμενα *per os*, είχαν σημαντικό θεραπευτικό αποτέλεσμα σε επίμυς Wistar που έφεραν λειομυοσάρκωμα (Evangelou et al., 1997; Liasko et al., 2000).

Οι ενώσεις βαναδίου από τις ανωτέρω πειραματικές μελέτες δείχνουν ότι ασκούν χημειοπροστατευτική δράση κατά της επαγόμενης καρκινογένεσης, κυρίως μέσω απενεργοποίησης των ενεργών μεταβολιτών που προκύπτουν από τα καρκινογόνα, μέσω της τροποποίησης της δραστηριότητας διαφόρων ηπατικών ενζύμων μεταβολισμού ξеноβιοτικών ουσιών, καθώς και των υποστρωμάτων τους (PU50) ή και μέσω της αύξησης της αντιοξειδωτικής κατάστασης των οργάνων στόχων των καρκινογόνων. Επιπλέον, μέσω της συσσώρευσης βαναδίου σε περιοχές πλούσιες σε νουκλεϊκά οξέα, ασκούν αντικαρκινική δράση σε ζώα με όγκους αναστέλλοντας τη σύνθεση DNA και RNA ή και επάγοντας δραστικές μορφές οξειδίου που είναι κυτταροτοξικές σε καρκινικά κύτταρα (Evangelou, 2002).

Οι αντικαρκινικοί μηχανισμοί και δράσεις των ενώσεων βαναδίου έχουν ερευνηθεί σε ποικιλία κυτταρικών σειρών (*in vitro*), μεταξύ των οποίων ανθρώπινου Β λεμφώματος, λευχαιμίας Τ κυττάρων (Kresja et al., 1997), ερυθρολευχαιμίας επίμυος, βασοφιλικής λευχαιμίας των επίμυων, λευχαιμικών κυττάρων L1210 (Djordjevitc et al., 1998), HC-60 και MO7e, ηπατώματος ανθρώπου και επίμυος, ανθρώπινου καρκινώματος ωοθηκών, καρκίνου όρχεος, ρινοφαρυγγικού

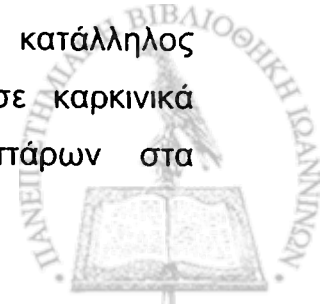


καρκινώματος, καρκινώματος του λάρυγγα, οστεοσαρκώματος, ασκητικού σαρκώματος του Erlich, νευροβλαστώματος μυών και επίμυων, γλοιώματος επίμυων, επιδερμικών κυττάρων μυός JB6P<sup>+</sup>, καρκινώματος πνεύμονα κατά Lewis και κυττάρων HeLa (Morinville et al., 1998).

Τα σύμπλοκα βαναδίου αναστέλλουν ή μειώνουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού κυττάρων γεγονός που οφείλεται στην επίδραση του στοιχείου στον κυτταρικό κύκλο. Τα σύμπλοκα του υπεροξυβαναδίου παρεμποδίζουν αναστρέψιμα σε χαμηλές συγκεντρώσεις και μη αναστρέψιμα σε υψηλές συγκεντρώσεις τον κυτταρικό κύκλο από τη φάση G στη φάση M. Η αναστολή του κυτταρικού κύκλου από το βανάδιο επάγεται δια μέσω της αναστολής των φωσφατασών των πρωτεϊνικών τυροσινών (PTPs) που αποφωσφορυλιώνουν υπομονάδες του συμπλόκου των κυκλικών B. Επιπλέον, η αναστολή του κυτταρικού κύκλου από το βανάδιο εκδηλώνεται από την ενεργοποίηση πορειών σήματος των πρωτεϊνικών κινασών της υπεροικογένειας MARKs επάγοντας τη μεταγραφή του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα κB (NF-κB), παράγοντα εξαιρετικά σημαντικού στον προγραμματισμό του κυτταρικού κύκλου, όπως και της απόπτωσης σε κυτταρικές σειρές επιθηλίου των βρόγχων (Jaspers et al., 2000).

Ταυτόχρονα ενώσεις του βαναδίου επάγουν την κατάρτηση του DNA, όπως αποδείχθηκε και από τους πειραματισμούς σε κύτταρα HaCaT, κυρίως μη δρώντας απευθείας, αλλά εμμέσως με την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, ειδικότερα ιόντων υδροξυλίου (OH<sup>-</sup>) εντός των κυττάρων (Sakurai, 1995). Οι μηχανισμοί διέγερσης της κυτταρικής απόπτωσης διαμέσου των ενώσεων βαναδίου συσχετίζονται με τη δράση της οικογένειας MAPK (Clutton, 1997; Canman and Kastan, 1996).

Τα αποτελέσματα της παρούσης ερευνητικής εργασίας αποδεικνύουν την αντι-ογκογόνο δράση του θειικού βαναδύλιου, όπου μέσω της μειορρύθμισης του c-fos αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και επάγει την απόπτωση των κερατινοκυττάρων HaCaT. Τα ευρήματά της δράσης του θειικού βαναδύλιου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κερατινοκυττάρων είναι σημαντικά, αφού τα μέλη της οικογένειας του fos έχουν ογκογόνο δράση και εκφράζονται σε αρκετές μορφές καρκίνων. Επίσης, αν το θειικό βαναδύλιο δρα μέσω της συσσώρευσης κεραμιδίου, τότε μπορεί να θεωρηθεί ως ένας κατάλληλος χημειοθεραπευτικός παράγοντας, καθώς τα επίπεδα κεραμιδίου σε καρκινικά κύτταρα καθορίζουν και τις αποκρίσεις των καρκινικών κυττάρων στα



χημειοθεραπευτικά. Επιπλέον, οι επιδράσεις των ογκογόνων παραγόντων Fos, καθώς επίσης και της κλαστρίνης/AroJ στην επαγόμενη απόπτωση των κυττάρων από το βανάδιο και το κεραμίδιο δείχνουν ένα μοριακό μηχανισμό δράσης των ενώσεων βαναδίου υπεύθυνο για τις αντι-πολλαπλασιαστικές αποκρίσεις κυττάρων θηλαστικών.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη των επιδράσεων του στρες υπό τη μορφή χημειοθεραπευτικών παραγόντων (θειικό βαναδύλιο) ή του κεραμιδίου (παράγοντας που εμπλέκεται στη δράση των χημειοθεραπευτικών) σε κύτταρα θηλαστικών, ιδιαίτερα σε ινοβλάστες και κερατινοκύτταρα, στα πλαίσια του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (αποπτωτικός θάνατος) και ο ρόλος στη διαδικασία αυτή των αντι-αποπτωτικών γονιδίων Bcl-2 και κλαστρίνης/ApoJ.

Η επιδερμίδα των θηλαστικών είναι ένας ιστός συνεχώς ανανεούμενος με την ακεραιότητα και λειτουργία του να εξαρτάται από τη ρύθμιση του ισοζυγίου μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού, κυτταρικής διαφοροποίησης και κυτταρικού θανάτου. Ελάχιστες όμως έρευνες υπάρχουν για την απόπτωση των επιδερμικών κερατινοκυττάρων. Χαρακτηριστικό της διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων αποτελεί η de novo σύνθεση μεγάλων ποσοτήτων κεραμιδίων που ανήκουν στα σφιγγολιπίδια και αποτελούν το 40% των λιπιδίων της επιδερμίδας. Τα κεραμίδια δρουν ως ενδοκυττάριοι αγγελιοφόροι και εμπλέκονται στην επαγωγή της απόπτωσης και στη μείωση ή στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Μεταξύ των φυσικών και χημικών παραγόντων που αυξάνουν τα ενδοκυττάρια επίπεδα του κεραμιδίου περιλαμβάνονται και παράγοντες στρες, όπως οι ενώσεις του βαναδίου. Έχει αποδειχθεί ότι το κεραμίδιο μειώνει τα επίπεδα έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 σε φυσιολογικά κερατινοκύτταρα και η υπερέκφραση της Bcl-2 μύς σε μια αυθόρμητα αθανατοποιημένη κερατινοκυτταρική σειρά HaCaT, επιφέρει ανθεκτικότητα στην επαγόμενη απόπτωση από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο. Επίσης ένα προϊόν γονιδίου που εμπλέκεται στο λιπιδικό μεταβολισμό, η κλαστρίνη/απολιποπρωτεΐνη J (ApoJ) φαίνεται να δρα ως αντι-αποπτωτικό γονίδιο. Η έκφρασή της επάγεται από πολλούς παράγοντες στρες μεταξύ των οποίων και οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες.

Η υπεροικογένεια του Bcl-2 αποτελεί μια από τις σημαντικότερες ομάδες ρυθμιστικών πρωτεϊνών της απόπτωσης. Η υπερέκφραση της Bcl-2 μπορεί να προστατεύει τα κύτταρα από ποικίλους παράγοντες που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο, όπως τα κυτταροτοξικά φάρμακα.



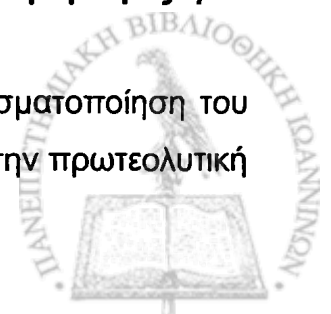


Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επαγόμενη απόπτωση των κερατινοκυττάρων HaCaT και των ινοβλαστών MRC-5 από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο και έγινε σύγκριση των επιδράσεων της Bcl-2 και της κλαστρίνης/ApoJ στην κυτταρική απόπτωση. Το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο ανέστειλε την ανάπτυξη και επήγαγε απόπτωση σε κύτταρα HaCaT κατά χρόνο και δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, όπως μελετήθηκε με την ανάλυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων, την ενδονουκλεωσμική θραυματοποίηση του DNA και την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP. Αντιθέτως η παρουσία του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου σε κύτταρα MRC-5 επάγει απόπτωση μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις. **Συμπερασματικά αποδεικνύεται ότι τα κύτταρα HaCaT είναι πλέον ευαίσθητα στην αποπτωτική διαδικασία επαγόμενη από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο, από τους φυσιολογικούς διπλοειδείς ινοβλάστες MRC-5, διαμέσου μηχανισμών που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων της ApoJ και της Bcl-2.**

Για να αναλυθεί και να εξεταστεί ο ρόλος της κλαστρίνης/ApoJ στην απόπτωση των κυττάρων HaCaT και MRC-5 και να συγκριθεί με τον καλά μελετημένο αντι-αποπτωτικό ρόλο της Bcl-2 στην επαγόμενη κυτταρική απόπτωση από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο παράχθηκαν με διαμόλυνση σταθεροί κλώνοι HaCaT και με ρετροϊκή επιμόλυνση σταθεροί κλώνοι MRC-5 που υπερέκφραζαν την ApoJ και την Bcl-2. Μετά την επιλογή των διαμολυσμένων/επιμολυσμένων κυττάρων στο συνθετικό αντιβιοτικό G418, διάφοροι κλώνοι ανθεκτικοί στο G418 απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν για την έκφραση της κλαστρίνης/ApoJ ή της Bcl-2.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα σε διαφορετικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις του C<sub>2</sub>-κεραμιδίου, ενώ η υπερέκφραση της Bcl-2 επέφερε πλήρη ανθεκτικότητα στην επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων HaCaT από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο με χρόνο και δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, η υπερέκφραση της κλαστρίνης/ApoJ επέφερε μερική καταστολή της απόπτωσης των κυττάρων HaCaT που επάγεται από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο. **Συμπερασματικά η υπερέκφραση της Bcl-2 στα κύτταρα HaCaT αύξησε τον ανθεκτικό τους φαινότυπο στο C<sub>2</sub>-κεραμίδιο, ενώ η κλαστρίνη (ApoJ) δεν επέφερε ανθεκτικότητα σ' αυτό. Επιπρόσθετα, τα κύτταρα MRC-5 που υπερέκφραζαν τη Bcl-2 διατήρησαν τη φυσιολογική μορφολογία τους μετά τη χορήγηση C<sub>2</sub>-κεραμιδίου, συγκρινόμενα με τα κύτταρα μάρτυρες ή τα κύτταρα MRC-5 που υπερέκφραζαν την ApoJ.**

Ταυτόχρονα, η υπερέκφραση της Bcl-2 ανέστειλε τη θραυματοποίηση του DNA στα κύτταρα HaCaT και στους ινοβλάστες MRC-5, όπως και την πρωτεολυτική



διάσπαση της PARP σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι ενώ η εκτοπική υπερέκφραση της Bcl-2 στους ινοβλάστες MRC-5 επάγει ένα φαινότυπο ανθεκτικό στην απόπτωση που επάγεται από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο, η υπερέκφραση της AroJ δεν επιφέρει ανθεκτικότητα, αλλά καταστέλλει μερικώς την επαγόμενη από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο απόπτωση. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι τα δύο αντι-αποπτωτικά γονίδια ενεργούν σε διαφορετικά σημεία της πορείας της κυτταρικής απόπτωσης που επάγεται από το κεραμίδιο. Ειδικότερα, η AroJ πιθανά δρα ανάρρους και η Bcl-2 κατάρρους της συσσώρευσης του κεραμιδίου, ώστε να ρυθμίσουν την επαγόμενη από το κεραμίδιο πορεία κυτταρικής απόπτωσης.

Γνωρίζοντας από τα πειραματικά μας αποτελέσματα τη διαφορετική ευαισθησία των κυττάρων HaCaT και MRC-5 στην επαγόμενη από C<sub>2</sub>-κεραμίδιο απόπτωση και τη διαφορά των κυττάρων HaCaT και MRC-5 στη μορφή της p53 εξετάστηκαν οι επιδράσεις της p53. Κύτταρα MRC-5 επιμολύνθηκαν με ένα ρετροϊικό φορέα που έφερε την μεταλλαγμένη p53<sup>143ala</sup> μορφή και επιλέχθηκαν στο αντιβιοτικό υγρομυκίνη. Τα ανθεκτικά στην υγρομυκίνη κύτταρα αναλύθηκαν για την έκφραση της p53 με ανοσο-αποτύπωμα κατά western και χαρακτηρίστηκαν οι επιδράσεις της p53<sup>143ala</sup> στην επαγόμενη από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο απόπτωση κυττάρων MRC-5.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μεταλλαγμένη αρνητικά-κυρίαρχη μορφή της p53, η p53<sup>143ala</sup>, ευαισθητοποίησε τα κύτταρα MRC-5 στην επαγόμενη από το C<sub>2</sub>-κεραμίδιο απόπτωση διαμέσου της μειορρύθμισης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 και της καταστολής της έκφρασης της κλαστρίνης/AroJ, αποδεικνύοντας ότι η ενεργοποιημένη από το κεραμίδιο αποπτωτική πορεία των ινοβλαστών MRC-5 ρυθμίζεται από το p53.

Η δράση των ενώσεων βαναδίου, όπως το θειικό βαναδύλιο έχουν μελετηθεί σε πειράματα *in vivo* και *in vitro*, ώστε να χρησιμοποιηθεί δυνητικά ως χημειοθεραπευτική ουσία. Ταυτόχρονα είναι γνωστό ότι η χορήγηση βαναδικών συμπλόκων/ενώσεων οδηγεί στην αύξηση των ενδογενών επιπέδων του κεραμιδίου σε B λεμφοκύτταρα και σε ινοβλάστες, με αποτέλεσμα να επάγεται η κυτταρική απόπτωση.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία το θειικό βαναδύλιο χρησιμοποιήθηκε ως κυτταρικός παράγοντας στρες για να μελετηθούν οι επιδράσεις του στον πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση κερατινοκυττάρων HaCaT, όπως και ο ρόλος των αντι-αποπτωτικών γονιδίων κλαστρίνης/AroJ και Bcl-2.

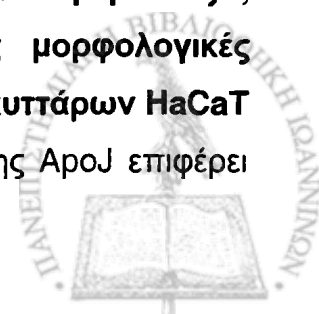


Το c-fos έχει εμπλακεί στην ομοιόσταση των κερατινοκύτταρων, αλλά και στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Στην έρευνα που πραγματοποιήσαμε το θειικό βαναδύλιο ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HaCaT καταστέλλοντας την έκφραση του πρωτο-ογκογονίδιου c-fos. Η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HaCaT συσχετιζόταν με τη μειορρύθμιση της έκφρασης του c-fos mRNA.

Χορήγηση θειικού βαναδύλιου επήγαγε την απόπτωση των κυττάρων HaCaT ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις με αποτέλεσμα την θραυσματοποίηση του DNA των κυττάρων και την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP. Επειδή τα HaCaT φέρουν μεταλλαγμένες μορφές της p53, όπως οι περισσότεροι τύποι καρκίνων οι οποίοι είναι ανθεκτικοί στα χημειοθεραπευτικά, δείξαμε ότι το θειικό βαναδύλιο επάγει την απόπτωση κερατινοκυττάρων ανεξάρτητα από την παρουσία άγριου-τύπου p53.

Επειδή το θειικό βαναδύλιο κατέστειλε την έκφραση του c-fos mRNA και προκάλεσε την αναστολή του πολλαπλασιασμού και την επαγωγή της απόπτωσης των κυττάρων HaCaT, επιμολύνθηκαν κύτταρα HaCaT με ρετροϊικούς φορείς που έφεραν το φυσιολογικό c-fos cDNA, καθώς και το ρετροϊικό v-fos ογκογονίδιο (μεταλλαγμένη μορφή του πρωτο-ογκογονίδιο c-fos), προκειμένου να μελετηθεί εάν η υπερέκφραση του fos επηρεάζει το αποτέλεσμα της χορήγησης του VOSO<sub>4</sub> σε σχέση με την κυτταρική απόπτωση. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την ογκογόνο δράση του v-fos, αφού η υπερέκφραση του v-fos, αλλά όχι του c-fos παρεμπόδιζε την απόπτωση των κυττάρων HaCaT που επάγεται από το θειικό βαναδύλιο, εύρημα σημαντικό, δεδομένου ότι τα μέλη της οικογένειας του fos έχουν ογκογόνο δράση και υπερεκφράζονται σε πολλές μορφές καρκίνων, επιβεβαιώνοντας ταυτόχρονα και το ρόλο του fos στην ομοιόσταση των κερατινοκυττάρων. Επειδή το c-fos είναι αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης της κλαστρίνης/ApoJ μελετήθηκαν και συγκρίθηκαν οι επιδράσεις των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών ApoJ και Bcl-2 στην επαγόμενη από το VOSO<sub>4</sub> απόπτωση των κερατινοκυττάρων. Γι' αυτό το σκοπό κατασκευάστηκαν με διαμόλυση σταθεροί κυτταρικοί κλώνοι HaCaT που υπερέκφραζαν την ApoJ και την Bcl-2.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπερέκφραση της ApoJ παρεμπόδιζει, ενώ της ογκοπρωτεΐνης Bcl-2 καταστέλλει πλήρως τις μορφολογικές μεταβολές με χαρακτηριστικά αποπτωτικού φαινοτύπου των κυττάρων HaCaT που προκαλείται από το θειικό βαναδύλιο. Η υπερέκφραση της ApoJ επιφέρει



ανθεκτικότητα και αναστέλλει την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP σε χαμηλές συγκεντρώσεις  $VOSO_4$ , ενώ η εκτοπική έκφραση της Bcl-2 στα κύτταρα HaCaT αναστέλλει πλήρως την από το  $VOSO_4$  επαγόμενη απόπτωση, όπως και την πρωτεολυτική διάσπαση της PARP σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκε. Μολονότι τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η Bcl-2 έχει ισχυρότερη αντι-αποπτωτική δράση από αυτή της AroJ, τουλάχιστον στην απόπτωση των κυττάρων HaCaT που επάγεται από το θειικό βαναδύλιο, η καταστολή της απόπτωσης από την AroJ δείχνει ότι πιθανά το Fos δρα μέσω της κλαστρίνης/AroJ .



## **ABSTRACT**

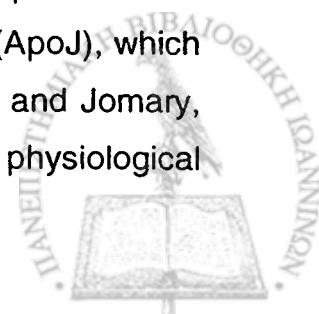
**Title: The effects of stress on mammalian cells: The role of anti-apoptotic genes**

**Ioannis A. Skoufos D.V.M., M.Sc.**

**Laboratory of Physiology, Faculty of Medicine, University of Ioannina**

The purpose of this dissertation was the study of the effects of stress factors, such as vanadyl sulphate, a potential chemotherapeutic agent or ceramide, on the proliferation and apoptosis of fibroblasts and keratinocytes and the role of the anti-apoptotic gene products Bcl-2 and clusterin/ApoJ in these processes.

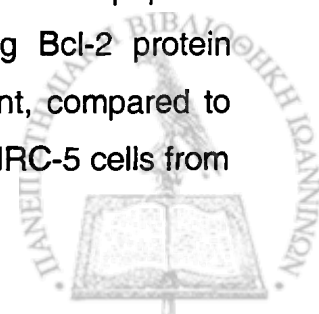
Mammalian epidermis is a continually renewed tissue, whose integrity and function depends on the regulated balance between cell multiplication, cell differentiation and cell death (Geillen et al., 1997). There are relatively a few events known, however, on the apoptosis of epidermal keratinocytes. Apoptosis is the programmed cell death characterised by chromatin condensation, extension of the cell membrane and fragmentation of DNA (Hengartner, 2000). The apoptotic death of keratinocytes actively removes the excessive and non-physiological cells from the epidermis. A characteristic of keratinocyte differentiation is the de novo synthesis of large quantities of ceramides, belonging to the class of sphingolipids and constituting 40% of the epidermal lipid molecules. Ceramides are also produced by the hydrolysis of sphingomyelin (via the sphingomyelin cycle) and act as intracellular messengers involved in signal transduction pathways, the induction of apoptosis and the inhibition of cell proliferation (Hannun and Obeit, 2002; Kolesnick, 2002). The intracellular levels of ceramides in keratinocytes can be increased by exposure to TNF $\alpha$ , 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, chemical stress factors (Gniardecki et al., 1998) and chemotherapeutic agents (Di Nardo et al., 2000). It was shown that ceramide caused a decrease in the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 in normal keratinocytes (Di Nardo et al., 2000) and overexpression of murine Bcl-2 in a spontaneously immortalised keratinocyte line HaCaT, conferred resistance to C<sub>2</sub>-ceramide-induced apoptosis (Muller-Wieprecht, 2000). Another gene product that potentially acts as an anti-apoptotic factor is clusterin/apolipoprotein J (ApoJ), which is also involved in lipid metabolism (Jenne and Tschopp, 1992; Jones and Jomary, 2002; Trougakos and Gonos, 2002). ApoJ is involved in a number of physiological



processes, but also on the regulation of cell proliferation and apoptosis (Jones and Jomary, 2002; Trougakos and Gonos, 2002). The expression of ApoJ is induced by several stress factors, such as oxidative stress, heat shock, by cytokines and growth factors, such as TGF $\beta$  and TNF $\alpha$  and by exposure to UV and ionising radiation and chemotherapeutic agents (Miyake et al., 2000a,b; Yang et al., 2000; Jones and Jomary, 2002; Trougakos and Gonos, 2002).

The superfamily of Bcl-2 proteins is one of the most important groups of regulatory proteins of apoptosis, and includes the pro-apoptotic members Bax, Bad and Bak and the anti-apoptotic members Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub>. The ratio of pro- to anti-apoptotic members determines the sensitivity of cells to various apoptotic stimuli. Overexpression of Bcl-2 protects cells from several apoptotic factors including cytotoxic drugs. In the epidermis, a tissue most exposed to oxidative and harmful environmental factors, apoptosis plays an important role in the removal of damaged cells. In such cases the expression of Bcl-2 is reduced during the process of cell differentiation, thus allowing apoptosis to occur.

In the present work we studied the apoptosis of spontaneously immortalized keratinocytes HaCaT and diploid fibroblasts MRC-5 induced by C<sub>2</sub>-ceramide and compared the effects of Bcl-2 and clusterin/ApoJ in this process. C<sub>2</sub>-ceramide inhibited the growth and induced apoptosis of HaCaT cells in a time- and dose-dependent manner, as evidenced by cell proliferation, cell colony formation assays, endonucleosomal DNA fragmentation and proteolytic cleavage of PARP (Poly-ADP Ribose Polymerase). In contrast, C<sub>2</sub>-ceramide induced apoptosis of MRC-5 cells only at high concentrations. Thus HaCaT cells were more sensitive to C<sub>2</sub>-ceramide-induced apoptosis than MRC-5 fibroblasts. In order to analyse and examine the role of clusterin/ApoJ in the apoptosis of HaCaT and MRC-5 cells and compare it to the well-studied anti-apoptotic role of Bcl-2 in C<sub>2</sub>-ceramide induced apoptosis, we generated stable cell clones that overexpressed ApoJ or Bcl-2. It was shown that while overexpression of Bcl-2 conferred complete resistance to C<sub>2</sub>-ceramide induced apoptosis of HaCaT cells in a dose-dependent manner, clusterin/ApoJ conferred only partial inhibition of C<sub>2</sub>-ceramide induced apoptosis of HaCaT cells. Thus HaCaT Bcl-2 cells expressed a more resistant phenotype to C<sub>2</sub>-ceramide-induced apoptosis than HaCaT ApoJ cells. Furthermore, MRC-5 cells overexpressing Bcl-2 protein maintained their normal morphology following C<sub>2</sub>-ceramide treatment, compared to their control counterparts. In contrast clusterin/ApoJ did not protect MRC-5 cells from



C<sub>2</sub>-ceramide induced apoptosis. Overexpression of Bcl-2 inhibited C<sub>2</sub>-ceramide induced DNA fragmentation and the proteolytic cleavage of PARP in HaCaT cells and in MRC-5 fibroblasts, compared to their control counterparts. We thus concluded that ectopic overexpression of Bcl-2 in MRC-5 fibroblasts induced a resistant phenotype to C<sub>2</sub>-ceramide-induced apoptosis, but clusterin/ApoJ failed to do so, suggesting that the two anti-apoptotic gene products probably act at different sites in regulating the C<sub>2</sub>-ceramide-induced apoptotic pathway.

Because of the experimentally demonstrated different sensitivity of HaCaT and MRC-5 cells in C<sub>2</sub>-ceramide-induced apoptosis and the different status of p53 in the two cell types (HaCaT cells bearing uv type p53 mutations and MRC-5 contain wild-type p53), we investigated the role of p53 in C<sub>2</sub>-ceramide induced apoptosis in MRC-5 cells. A mutant p53 gene (p53<sup>143ala</sup>) was introduced by retroviral infection in MRC-5 cells and was shown to increase their sensitivity to C<sub>2</sub>-ceramide-induced apoptosis by down-regulation Bcl-2 and suppressing the accumulation of clusterin/ApoJ protein, following treatment with C<sub>2</sub>-ceramide compared to their control counterparts. These results demonstrated a role of p53 in C<sub>2</sub>-ceramide-induced apoptosis.

There is a large number of factors stimulating sphingolipid metabolism resulting in the intracellular accumulation of ceramide. Among these are cytokines (TNF $\alpha$ , IL-6, and IFN- $\gamma$ ), Fas ligand, cytotoxic agents including chemotherapeutic drugs such as doxorubin, CPT-11 and etoposide, environmental stress factors such as heat shock, ionising and ultraviolet radiation, injuries and infections (Geilen et al., 1997; Hannun and Luberto, 2000; Hannun and Obeid, 2002).

Vanadium compounds such as vanadyl sulphate or its organic complexes have been extensively studied in the laboratory of Physiology of the University of Ioannina Medical School, for their growth-inhibitory actions and their role in inhibiting or delaying tumour formation in carcinogen-treated animals, demonstrating their potential as chemotherapeutic agents (Evangelou, 2002). It is also known that the administration of vanadate complexes leads to an increase in intracellular ceramide levels and to induction of apoptosis in various cell types (Stewart et al., 1999; Dawson et al., 2000).

In the present study vanadyl sulphate was used as a putative chemotherapeutic stress agent in order to study its effects on the proliferation and



apoptosis of HaCaT cells. Further, the role of the anti-apoptotic gene products of Bcl-2 and clusterin/ApoJ in VOSO<sub>4</sub>-induced changes were also studied.

Vanadyl sulphate inhibited the growth of HaCaT cells by inhibiting the expression of proto-oncogene c-fos mRNA. c-fos protein has been implicated in the homeostasis of keratinocytes and the regulation of cell growth (Sinha et al., 2000; Angel et al., 2001). Thus the inhibition of HaCaT cell growth by vanadyl sulphate was linked to the down-regulation of c-fos mRNA expression. The administration of vanadyl sulphate, even at low concentrations, induced apoptosis of HaCaT cells resulting in DNA fragmentation and the proteolytic cleavage of PARP. Because HaCaT cells, like most tumour cells that have mutated forms of p53, are resistant to chemotherapeutic agents, (Lehman et al., 1993), we showed that vanadyl sulphate induced apoptosis of HaCaT cells in a p53-independent manner. Overexpression of v-fos, but not c-fos, suppressed apoptosis of HaCaT cells induced by vanadyl sulphate, a significant finding in view of the fact that members of the fos family have oncogenic action and are often overexpressed in many cancer types. Thus, the results presented here confirmed the oncogenic properties of v-fos. Overexpression of c-fos failed to rescue HaCaT cells from VOSO<sub>4</sub>-induced apoptosis most likely because it is under the same regulatory mechanisms as the endogenous c-fos protein (Roux et al., 1991).

In order to study the effects of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and ApoJ in VOSO<sub>4</sub>-induced keratinocyte apoptosis, stable HaCaT cell clones overexpressing ApoJ or Bcl-2 were constructed. Our results demonstrated that overexpression of the former, partially prevented, while that of Bcl-2 completely suppressed the morphological changes induced by vanadyl sulphate, characteristic of an apoptotic phenotype. Overexpression of ApoJ conferred resistance and inhibited the proteolytic cleavage of PARP at low concentrations of VOSO<sub>4</sub>, while ectopic overexpression of Bcl-2 in HaCaT cells completely inhibited VOSO<sub>4</sub>-induced DNA fragmentation, as well as the proteolytic cleavage of PARP at all concentrations used. Our results showed that Bcl-2 has a stronger anti-apoptotic action than ApoJ at least in vanadyl sulphate induced apoptosis of HaCaT cells.



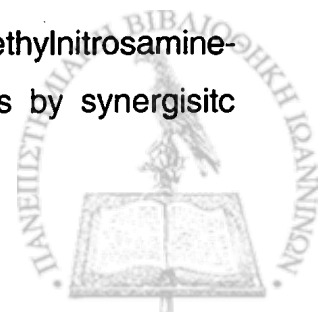


## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams, J.M. and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.
- Adams, J. M. and Cory, S. (1999). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326
- Ahuja, H.S., Tenniswood, M., Lockshin, R. and Zakeri, Z. F. (1994). Expression of clusterin in cell differentiation and cell death. *Biochem. Cell Biol.* 72, 523-530.
- Ahuja, H. S., Tenniswood, M. and Zakeri, Z. F. (1996). Differential expression of clusterin in the testis and epididymis of postnatal and germ cell deficient mice. *J. Androl.* 17, 491-501.
- Akao, M., Teshima, Y. and Markan, E. (2002) Anti apoptotic effect of nicorandil mediated by mitochondrial  $\alpha$ Ap-sensitive potassium channels in culture cardiac myocytes. *J. Am Coll Cardiol.* 40: 803–810.
- Allouche, M., Bettaieb, A., Vindis, C., Rousse, A., Grignon, C. and Laurent. G. (1997). Influence of *Bcl-2* overexpression on the ceramide pathway in daunorubicin-induced apoptosis of leukemic cells. *Oncogene* 14, 1837-45.
- Al-Bayati, M. A., Giri, S. N., Raabe, O. G., Rosenblatt, L. S. and Shifrine M. (1989). Time and dose-response study on the effects of vanadate on rats: morphological and biochemical changes in organs. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 9: 435-455.
- Altamirano-Lozano, M., Valverde, M., Alvarez-Barrera, L., Molina, B. and Rojas, E. (1999) Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) in male mice. II. Effects in several mouse tissues. *Teratog Carcinog Mutagen* 19:243-255.
- Amstad, P.A. Liu, H., Ichimiya, M., Chang, S., Berezesky, I. K. and Trump. B. F. (1997). Bcl-2 enhancement of malignant transformation in mouse epidermal JB6 cells. *Mol. Carcinog.* 20, 231–239.
- Angel, P. and Karin, M., (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* 1072, 129-157.
- Angel, P. E. and Herrlich, P. A. (1994). The Fos and Jun families of transcription Factors. CRC press, New York.
- Angel, P., Szabowski, A. and Schorpp–Kistner, M. (2001). Function and regulation of AP–1 Subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene* 19, 2413–2423.



- Anjum, R. and Khar, A. (2001). Differential regulation of apoptosis in AK-5 tumor cells by the proto-oncogene Bcl-2: presence of Bcl-2 dependent and independent pathways. *FEBS Lett.* 499, 166-170.
- Aronow, B. J., Lund, S. D., Brown, T. L., Harmony, J. A. and Witte, D. P. (1993). Apolipoprotein J expression at fluid-tissue interfaces: potential role in barrier cytoprotection. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:725-729.
- Auffray, C. and Rougeon, F. (1986). Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA-Gur. *J. Biochem.* 107(2):303-314.
- Ashkenazi, A. and Dixit, A.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
- Attisano, L., Wrana, J.L., Lopez-Casillas, F. and Massagne, J. (1994) TGF  $\beta$  receptors and actions. *Biochem. Biophys. Acta* 1222, 71-80.
- Bailey, R. W., Aronow, B., Harmony, J. A. and Griswold, M. D. (2002). Heat shock-initiated apoptosis is accelerated and removal of damaged cells is delayed in the testis of clusterin/ApoJ knock-out mice. *Biol. Reprod.* 66, 1042-1053.
- Baker, S. J., Markowitz, S., Fearon, E. R., Willson, J. K. and Vogelstein, B. (1990). Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild type p53. *Science* 249, 912-915.
- Baker, S.J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Paraskeva, C., Markowitz, S., Willson, J. K., Hamilton, S. and Vogelstein, B.(1990) p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 50: 7717-7722.
- Bakiri, L., Lallemand, D., Bossy-Wetzel, E. and Yaniv, M. (2000). Cell cycle-dependent variations in c-Jun and Jun B phosphorylation: a role in the control of cycle D1 expression. *EMBO J.* 19. 2056–2068.
- Band, G. J., Posner, B. I., Dumas, V., and Contreres, J. O. (1997). Early signalling events triggered by peroxovanadium [(bpv) phen] and insulin receptor kinase (IRK)-dependent: specificity of inhibition of inhibition of IRK-associated protein tyrosine phosphatase (s) by bpv (phen). *Mol. Endocrinol.* 11, 1899–1910.
- Barceloux, D. G. (1999). Vanadium. *J Clin. Toxicol.* 37: 265-278.
- Basak, R., Saha, B. K. and Chatterjee, M. (2000). Inhibition of diethylnitrosamine-induced rat liver chromosomal aberrations and DNA-stand breaks by synergistic



supplementation of vanadium and 1 $\alpha$ -25-dihydroxyvitamin D(3). *Biochim. Biophys. Acta.* 1500: 272-282.

Basu, S. and Kolesnick, R. (1998). Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun Kinase. *Oncogene* 17, 3277–3285.

Bay, B.H., Sit, K.H., Paramanathan, R. and Chan, H.L. (1997). Hydroxyl free radicals generated by vanadyl [IV] induce cell blebbing in mitotic human liver cells. *Biometals* 10, 119-122.

Behrens, A., Jochum, W., Sibilias, M., and Wagner, E. F. (2000). Oncogenic transformation by ras and fos is mediated by c-Jun N-terminal phosphorylation. *Oncogene* 19, 2657–2663.

Bektas, M., Dullin, Y., Wieder, T., Kolter, T., Sandhoff, K. Brossmer, R., Ihring, P., Orfanos, C. E. and Geilen, C. C. (1998). Induction of apoptosis by synthetic ceramide analogues in the human keratinocyte cell line, HaCaT. *Exp. Dermatol.* 7, 342-349.

Ben-Ari, E., Bernstein, L. and Colburn N. (1992). Differential c-jun expression in response to tumor promoters in JB6 cells sensitive or resistant to neoplastic transformation. *Mol. Carcinog.* 5, 62–74.

Bergamashi, G., Rosti, V., Danava, M., Ponchio, L., Lucotti, C. and Cazzola, M. (1993). Inhibitors of tyrosine phosphorylation induce apoptosis in human leukemic cell lines. *Leukemia*, 7: 2012-2018.

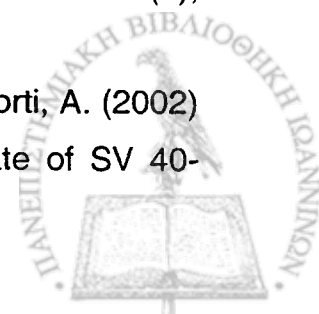
Bergman, C.A., Talavera, F., Christman, G.M., Baker, V.V., Roberts, J.A. and Menon, K.M.J. (1998). Transforming growth factor- $\beta$  negatively modulates proliferation and c-fos expression of the human endometrial adenocarcinoma cell line HEC-1-A. *Gynecol. Oncol.* 65, 63-68.

Bernerd, E. and Asselineau, D. (1998). UVA exposure of skin reconstructed in vitro induces apoptosis of dermal fibroblasts: subsequent connective tissues repair and implications in photoaging. *Cell. Death Differ* 5, 792–802.

Bernstein, L. and Colburn, N. (1989). AP 1/Jun function is differentially induced in promotion sensitive and resistant JB6 cells. *Science.* 244, 566–569.

Bettuzzi, S. (2003). The new anti-oncogene clusterin and the molecular profiling of prostate cancer progression and prognosis *Acta Biomed Ateneo Parmense.* 74 (2), 101-104.

Bettuzzi, S., Scorcioni, F., Astancolle, S., Davalli, P., Scaltriti, N. and Corti, A. (2002) Clusterin (SPG-2) transient overexpression decreases proliferation rate of SV 40-



immortalized human prostatic epithelial cells by slowing down cell cycle progression. *Oncogene* 21(27), 432-4331.

Bevan, A. P., Burgess, J. W., Yale, J. F. and Drake, P. G. (1995). In vivo insulin mimetic effects of pV compounds: role for tissue targeting in determining potency. *J Physiol* 268:60-66.

Bielawska, A., Linadie, C.M., Liota, D., Obeid, LM. and Hannun, Y.A. (1993). Selectivity of ceramide mediated biology: lack of activity of erythrodihydro ceramide. *J. Biol.Chem.* 268, 26226-26232.

Bishayee, A. and Chatterjee, M. (1995). Inhibitory effect of vanadium on rat liver carcinogenesis initiated with diethylnitrosamine and promoted by phenobarbital. *Br. J. Cancer* 71, 1214-1220.

Bishayee, A., Oinam, S., Basu, M. and Chatterjee, M. (2000). Vanadium chemoprevention of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced rat mammary carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat.* 63, 133-145.

Bond, J. A., Wekley K., Wyllie F. S., Jones C. J., Craig A., Hupp T. and Wynfond-Thomas D. (1999). p53 dependent growth arrest and altered p53-immunoreactivity following metabolic labelling with <sup>32</sup>P ortho-phosphate in human fibroblasts. *Oncogene* 18(25), 3788-3792.

Borner, C. (2003). The Bcl-2 protein family sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immun.* 39, 615-647.

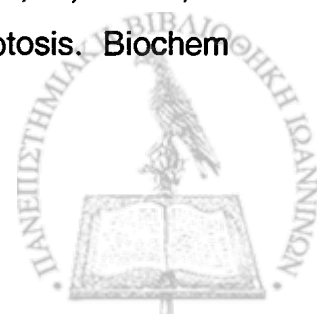
Bos, J. L. (1990). Ras oncogenes in human cancer: a review *Cancer Res* 49, 4682–4689.

Bossy-Wetzel, E., Bakiri, L. and Yaniv, M. (1997). Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. *EMBO J.* 16, 1695–1709.

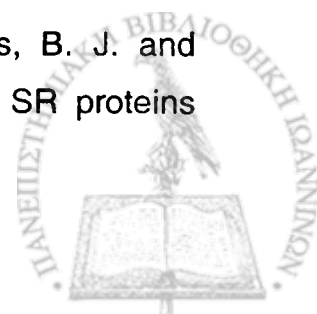
Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. and Fusenig, N.E. (1988). Normal keratinisation in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106, 761-771.

Bourbon, N.A., Yun, J., Berkey, D., Wang, Y. and Kester, M. (2001). Inhibitory actions of ceramide upon PKC-epsilon/ERK interactions. *Am. J. Physiol cell Physiol* 280: C 1403-1411.

Bours, V., Bentires-Alj, M., Hellin, A. C., Viatour, P., Robe, P., Delhale, S., Benoit, V. and Merville, N. P. (2000). Nuclear factor-κB, cancer and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 60:1085-1090.



- Bourteele, S., Hausser, A., Doppler, H., Horn-Muller, J., Ropke, C. and Schwarzmann, G. (1998). Tumor necrosis factor induces ceramide oscillations and negatively controls sphingolipids by caspases in apoptotic Kym-1 cells. *J Biol Chem* 273, 31245–31251.
- Bravo, R. (1990). Growth factor inducible genes in fibroblasts. p 324–343. In A Habenicht (ed). *Growth factors, differentiation factors and cytokines*. Springer-Verlag-Berlin.
- Budhram-Mahadeo, V., Morris, P. J., Smith, M. D., Midgley, C. A., Boxer, L. M. and Latchman, D. S. (1999) p53 suppresses the activation of the Bcl-2 promoter by the Brn-3a POU family transcription factor. *J. Biol Chem.* 274(21) 15237-15244.
- Buisson-Legendre, N., Bernard, P., Bobichon, H., Emonard, H., Schneider, C., Maquart, F.X., Haye, B. and Hornebeck, W. (1999). Involvement of the 92-kDa gelatinase (matrix metalloproteinase-9) in the ceramide-mediated inhibition of human keratinocyte growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 634-640.
- Bursch, W., Gleeson, T., Kleine, L. and Tenniswood, M. (1995) Expression of clusterin (testosterone-repressed prostate message-2) mRNA during growth and regeneration of rat liver. *Arch. Toxicol.* 69, 253-258.
- Calvo, E. L., Mallo, G. V., Fiedler, F., Malka, D., Vaccaro, M. I., Keim, V., Morisset, J., Dagorn, J. C. and Iovanna, J. L. (1998) *Eur. J. Biochem.* 254, 282-289.
- Campisi, J. (1996). Replicative senescence: An old lives' tale? *Cell* 84, 497-500.
- Campisi, J. (2001). Cellular senescence as a tumour suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.* 11, 27-31.
- Campisi, J. (2003). Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Exp. Gerontol.* 38, 5-11.
- Canman, C. E. and Kastan, M. B. (1998). Small contribution of G1 checkpoint control manipulation to modulation of p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 16, 957–966.
- Capmos, L., Roualt, J. and Sabido, O. (1993). High expression of bcl-2 protein in acute myelogenous leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood.* 81, 3091–3096.
- Carrasco, D. and Bravo, R (1995). Tissue specific expression at the fos-related transcription factor fra-2 during mouse development. *Oncogene* 10, 1069–1079.
- Chalfant, C. E., Ogretmen, B., Galadari, S., Kroesen, B. J., Pettus, B. J. and Hannun, Y. A. (2001). FAS activation induces dephosphorylation of SR proteins



dependence on the de novo generation of ceramide and activation of protein phosphatase Ia. *J Biol Chem* 276, 44848–44855.

Chalfant, C. E., Rathman, K., Pinkerman, R. L., Pinkerman, R. L., Wood, R. E., Obeid, L. M., Ogretmen, B. and Hannun, Y. A. (2002). De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. *J Biol. Chem.* 277, 12587-12595.

Chan, W. M., Siu, W. Y., Lau, A. and Poon, R. Y. (2004). How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer? *Mol. Cell Biol.* 24(8): 3536-3551.

Chang, Y., Abe, A. and Shayman, J. A. (1995). Ceramide formation during heat shock: a potential mediator of alpha B-crystalline transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 12275–12279.

Chakraborty, A., Ghosh, R., Roy, K., Ghosh, S., Chowdhury, P. and Chatterjee, M. (1995). Vanadium: A modifier of drug metabolizing enzyme patterns and its critical role in cellular proliferation in transplantable murine lymphoma. *Oncology*, 52: 310-314.

Charles, R. (2002). Ceramide-coated balloon catheters limit neointimal hyperplasia after stretch injury in carotid arteries. *Circ. Res.* 87, 282–288.

Chen, H., Tritton, T. R., Kenny, N., Absher, M. and Chin, J.F. (1996). Tamoxifen induces TGF $\beta$  1 activity and apoptosis of human MCF-7 breast cancer cells in vitro. *J. Cell Biochem.* 61, 9-17.

Chen, R. H., Juo, P.C., Curran, T. and Blenis, J. (1996) Phosphorylation of c-fos at the c-terminus enhances its transforming activity. *Oncogene* 12, 1493-1502.

Chen, Q. M., Prowse, K.R., Tu, VC, Purdom, S. and Linskens, M.H. (2001). Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 265: 294-303.

Chen, W. and Bowden G.T. (2000). Role of p38 mitogen-activated protein kinases in ultraviolet-B irradiation-induced activator protein 1 activation in human keratinocytes. *Mol. Carcinog.* 28, 196-202.

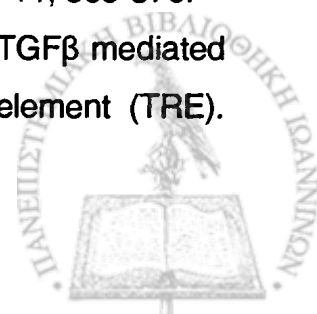
Chen, W., Dong, Z., Valcic, S., Timmermann, B. N. and Bowden G. T. (1999). Inhibition of ultraviolet B-induced c-fos gene expression and p38 mitogen-activated protein kinase activation by (-) epigallocatechin gallate in a human keratinocyte cell line. *Mol. Carcinog.* 24, 79-84.



- Chiu, R., Boyle, W. J., Meek, J., Smeal, T., Hunter, T. and Karin, M. (1998). The c-fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 54, 541–542.
- Choi-Miura, N. H., Sakamoto, T., Ohtaki, S., Nakamura, H., Shizawa, S., Takagi, Y., Gomi, K. and Tomita, M. (1993). Elevated complement activities of sera from patients with high density lipoprotein deficiency (Tangier disease): the presence of normal level of clusterin and the possible implication in the atherosclerosis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 93, 242–247.
- Ciechanover, A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 79, 13–21.
- Ciranni, R., Antonetti, M. and Migliore, L. (1995). Vanadium salts induce cytogenic effects in in vivo treated mice. *Mut. Res.* 343: 53-60.
- Coldberg, A. L. and Rock, K. L. (1992). Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 357, 375–379.
- Collahon, L. S. and Shay, J. W. (1996). Immortalization of human mammary epithelial cells transfected with mutant p53. *Oncogene* 12(4), 715-725
- Colotta, F., Polentarutti, N., Sironi, M. and Mantovani, A. (1992). Expression and involvement of c-fos and c-Jun protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. *J. Biol. Chem.* 267, 18278–18283.
- Coroneos, E., Wang, Y., Panuska, J. R., Templeton, D. J. and Kester, M. (1996). Sphingolipid metabolites differentially regulate extracellular signal-regulated kinase and stress-activated protein kinase cascades. *Biochem J* 316 (Pt 1), 13-17.
- Cortizo, A. M., Bruzzone, L., Molinueve, S. and Echeverry, S. B. (2000). A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity and the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines. *Toxicology* 147: 89-99.
- Cory, S. and Adams, J. M. (2002). The Bcl-2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Rev. Cancer* 2, 647-656.
- Crescenzi, E., Palumbo, G. and Brady, H. J. (2003). Bcl-2 activates a programme of premature senescence in human carcinoma cells. *Biochem J.* 375, 263-274.
- Criswell, T., Klovov, D., Beman, M., Lavik, J. P. and Boothman, D. A. (2003). Repression of IR-inducible clusterin expression by the p53 tumor suppressor protein. *Cancer. Biol. Ther.* 2(4), 372-380.
- Cruz, T. F., Morgan, A. and Min, W. (1995). In vitro and in vivo antineoplastic effects of orthovanadate. *Mol. Cell. Biochem.* 78, 829-847.

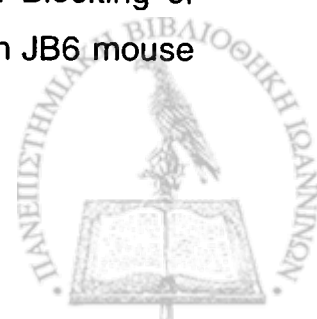


- Curran, T. (1992). Fos and Jun: oncogenic transcription factors. *J. Exp. Med.* 168, 169–174.
- Curran, T. and Franza, B.R.J. (1998) Fos and Jun: The AP-1 connection. *Cell* 55, 395-397.
- Curran T. (1988). The Fos oncogene, p. 307–326. In E. P. Reddy, A. M. Skalka . The oncogene handbook. Elsevier Science Publ., The Netherlands.
- Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A. and Gutkind, S. (1996). Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381, 800–803.
- Danik, M., Chabot, J. G., Hassan-Conzalez, D., Suh, M and Quirion, R. (1993). Localization of sulfated glycoprotein-2/clusterin mRNA in the rat brain by in situ hybridization, *J. Comp. Neurol.* 334: 209-227
- Dawson, G., Kilkus, J. and Schieven, G. L. (2000). Selective phosphotyrosine phosphatase inhibition and increased ceramide formation is associated with B-cell death by apoptosis. *FEBS. letters* 478, 233–236.
- Day, M. L., Zhao, X., Wa, S., Swanson, P. E. and Humphrey, P.A. (1994). Phorbol ester-induced apoptosis is accompanied by NGF1-A and c-fos activation in androgen-sensitive prostate cancer cells. *Cell Growth Differ.* 5, 735–741.
- Dbaiibo, G. S., Obeid, L. M. and Hannun, Y. A. (1993). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) signal transduction through ceramide. Dissociation of growth inhibitory effects of TNF-alpha from activation of nuclear factor-kappa B. *J. Biol Chem* 268, 17762–17766.
- Dbaiibo, G.S., Pushkareva, M. Y., Jayadev, S., Schwarz, J. K., Horowitz, J. M. and Obeid, L. M. (1995). Retinoblastoma gene product as a downstream target for a ceramide-dependent pathway of growth arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 1347–1351.
- D' Cruz, O. J. and Uckum, F. M. (2000). Vanadocene mediated in vivo male germ cell apoptosis. *Toxicol Appl. Pharmacol* 166:186-195.
- De Cesane, D., Vallone, D., Caracciolo, A., Sasone-Corsi, P., Nerlov, C. and Verde, P. (1995). Heterodimerization of c-Jun with ATF 02 and c-fos is required for positive and negative regulation of the human urokinase enhancer. *Oncogene* 11, 365-376.
- De Groot, R.P. and Kruijer, W. (1990). Transcriptional activation by TGFβ mediated by the dyad symmetry element (DSE) and the TPA responsive element (TRE). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168, 1074-1081.





- De Jesus, V., Rios, I., Davis, C., Chen, Y., Calhoun, D., Zakeri, Z. and Hubbard, K. (2002). Induction of apoptosis in human replicative senescence. *Exp. Cell Res.* 274, 92-99.
- Dempke, W., Voigt, W., Grothey, A., Hill, B. T. and Schmoll, H. J. (2000). Cisplatin resistance and oncogenes—a review. *Anticancer Drugs* 11, 225-236.
- Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., Dijke, P., Huet, S and Gauthier, J.M. (1998). Direct binding of Smad 3 and Smad 4 to critical TGF $\beta$  inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-types gene. *EMBO J.* 17, 3091-3100.
- Devary, Y., Gottlieb, R. A., Lan, L.F. and Karin, M. (1991). Rapid and preferential activation of the v-jun gene during the mammalian UV response. *Cell.* 67, 1251–1266.
- De Vente, J., Kukoly, C. and Bryant, W. (1995). Phorbol ester induces death in MRF –7 breast cancer cells with altered expression of protein kinase C isoforms. Role of p53 independent induction of gadd–45 in initiating death. *J. Clin. Invest.* 96: 1874–1886.
- Di Nardo, A., Benassi, L., Magnoni, C., Cossarizza, A., Seidenari, S. and Giannetti, A. (2000). Ceramide 2 (N-acetyl sphingosine) is associated with reduction in Bcl-2 protein levels by western blotting and with apoptosis in cultured human keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* 143, 491-497.
- Ding, M., Li, J. J., Leonard S. S., Ye, J. P., Shi, X., Colburn, N. H., Castranova, V. and Vallyathan, V. (1999). Vanadate-induced activation of activator protein-1 role of reactive oxygen species. *Carcinogenesis*, 20: 663-668.
- Djordjevit, C. (1995). Antitumor activity of vanadium compounds. In: Siegel H, Siegel A, editors. *Metal ions in biological systems*. New York: Marcel-Decker, 595-616.
- Domingo, J. L. (2000) Vanadium and diabetes. What about vanadium toxicity? *Mol. Cell Biochem.* 203: 185-187.
- Domingo, J. L., Gomez, M., Sanchez, D. J., Liobet, J. M. and Keen, C. L. (1995). Toxicology of vanadium compounds in diabetic rats: the action of chelating agents on vanadium accumulation. *Mol. Cell Biochem.* 153: 233-240.
- Dong, Z., Birrer, M., Watts, R., Matrisian, L. and Colburn, N. (1994). Blocking of tumor promoter–induced AP–1 activity inhibits induced transformation in JB6 mouse epidermal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 609–613.



Dumont, P., Burton, M., Chen, Q.M., Gonos, E.S., Fripiat, C., Mazarati, J.B., Liaers, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2000). Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblasts. *Free Radic Biol Med*; 28: 361-373.

Dumont, P., Chainianx, F., Eliaers, F., Petropoulou, C., Gonos, E.S. and Toussaint, O. (2002). Overexpression of ApoJ in human fibroblasts protects against cytotoxicity and premature senescence induced by ethanol and tert-butylhydroperoxide. *Cell stress Chaperones*. 7:23-35.

Edel, J. and Sabbioni, E. (1988). Retention of intratracheally instilled and ingested tetravalent and pentavalent vanadium in rat. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis*. 21: 23-30.

Eferl, R., Sibilia, M., Hilberg, F., Kufferath, I., Guertl, B., Zenz, R., Wagner, E. F. and Zaltoukal, K. (1999). Functions of c-Jun in liver and heart development. *J. Cell Biol*. 145, 1049–1061.

El-Assaad, W., El-Sabban, M., Awarazi, C., Abboushi, N. and Dbaiibo, C.S. (1998). Distinct sites of action of Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub> in the ceramide pathway of apoptosis. *Biochem. J*. 336, 735-741.

English, L., Macara, J. G. and Cantley, L. C. (1983). Vanadium stimulates (Na,K) ATPase in friend erythroleukemia cells and blocks erythropoiesis. *J. Cell Biol*. 97: 1299-1302.

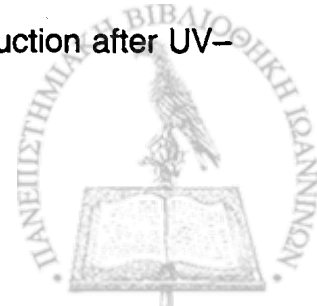
Evan, G. and Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science*. 281, 1317-1322.

Evangelou, A., Karkabounas, S., Kalpouzou, G., Malamas, M., Liasko, R., Stefanou, D., Vlahos, A. T. and Kabanos, T. A. (1997). Comparison of the therapeutic effects of two vanadium complexes administered at low doses on benzo[*a*]pyrene-induced malignant tumours in rats. *Cancer Lett*. 119, 221-225.

Evangelou, A. (2002). Vanadium in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 42, 249-265.

Fadeel, B., Zhivotovsky, B. and Orrenius, S. (1999). All along the watchtower: on the regulation of apoptosis regulators. *Faseb J* 13, 1647–1657.

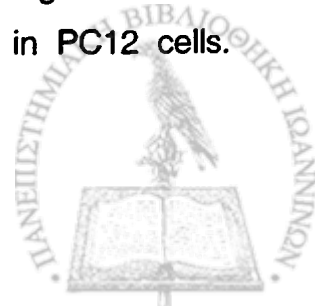
Fagot, D., Asselineau, D. and Bernerd, F. (2002). Direct role of dermal fibroblasts and indirect participation of epidermal keratinocytes in MMP-1 production after UV-B irradiation. *Arch. Dermatol. Res*. 293, 576–583.



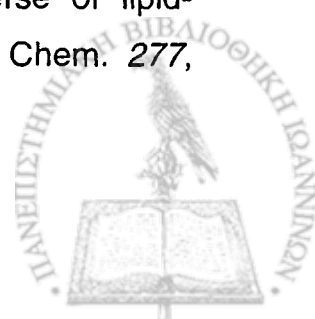
- Farber, E. (1994). Programmed cell death: necrosis versus apoptosis. *Mod. Pathol.* 7, 605-609.
- Faure, R., Vincent, M., Dufaur, M., Shaver, A. and Posner, B.I. (1995). Arrest at the G2/M transition of the cell cycle by protein-tyrosine phosphatase inhibition: studies on neuronal and a glial cell line. *J Cell. Biochem.* 59, 389-401.
- Fawcett, J. P., Farquhar, S. J., Thou, T. and Shand, B. I. (1997). Oral vanadyl sulfate does not affect blood cells, viscosity or biochemistry in humans. *Pharmacol Toxicol* 80: 202-206.
- Ferri, K. F. and Kroemer, G.(2000). Control of apoptotic DNA degradation *Nat. Cell Biol.* 2: E 63-64
- Field, S. J., Johnson, R. M., Mortensen, V. E., Papaioannou, B. M., Spiegelman, B.M. and Greenberg, M. E. (1992). Growth and differentiation of embryonic stem cells that lack an intact c-fos gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 9306-9310.
- Flomerfelt, F. A. and Miesfeld, R. L.(1994). Recessive mutations in a common pathway block thymocyte apoptosis induced by multiple signals. *J. Cell. Biol.* 127, 1729-1742.
- Fraser, A. and Evans, G.(1996). A license to kill. *Cell* 85, 781-784.
- French, L. E., Wohlwend, A., Sappino, A-P., Tschopp, J. and Schiffereli, J. A. (1994). Human clusterin gene expression is confined to surviving cells during in vitro programmed cell death. *J. Clin. Invest.* 93, 877-884.
- Froesch, B. A., AimeSempe, G., Leber, B., Andrews, D and Reed, J.C. (1999). Inhibition of p53 transcriptional activity by Bcl-2 requires its membrane-anchoring domain. *J. Biol. Chem.* 274 (10) 6469-6475
- Geilen, C. C., Bektas, M., Wieder, T. and Orfanos, C. E. (1996). The vitamin D3 analogue, calcipotriol, induces sphingomyelin hydrolysis in human keratinocytes. *FEBS lett* 378, 88-92.
- Geilen, C., Wieder, T. and Orfanos, C. (1997). Ceramide signalling: Regulatory role in cell proliferation, differentiation and apoptosis in human epidermis. *Arch. Dermatol. Res.* 289, 559-566.
- Gill, Z. P., Perks, C. M., Newcomb, P. V. and Holly, J. M. P. (1997). Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-3) predisposes breast cancer cells to programmed cell death in a non-IGF dependent manner. *J. Biol. Chem.* 272, 25602-25607.



- Ghosh, P., D' Cruz, O. J., Narla, R. K. and Uckum, F. M. (2000). Apoptosis-inducing vanadocene compounds against human testicular cancer. *Clin. Cancer Res.* 6: 1536-1543.
- Gniadecki, R., Gajkowska, B., Bartosik, J., Hansen, M. and Wulf, H.C. (1998). Variable expression of apoptotic phenotype in keratinocytes treated with ultraviolet radiation, ceramide, or suspended in semisolid methylcellulose. *Acta. Derm.Venereol.* 78, 248-257.
- Goldstein, S. (1990). Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science* 249, 1129-1133.
- Gonos, E. S. and Spandidos, D. A., (1993). Oncogenes in cellular immortalization and differentiation. *Anticancer Res.* 13(4):1117-1122.
- Gorman, C. M. Lane, D. L. and Rigby, P.W., (1985). High efficiency gene transfer into mammalian cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B. Biol. Su.* 307(1132):343-346.
- Gorman C. M., Howard B. H. and Reeves, R. (1983). Expression at recombinant plasmids in mammalian cells is enhanced by sodium butyrate. *Nucleid Acids Res.* 11(21):7631-7648.
- Gorman, L., Mercer, L. P. and Henning, B. (1996). Growth requirements of endothelial cells in culture: variation in serum and amino acids concentrations. *Nutrition* 12(4): 266-270.
- Gorospe, M., Cirielli, C., Wang, X., Seth, P., Capogrossi, M. C. and Holbrook, N. J. (1997). p21 protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene* 14 (8) 929-935.
- Grant, S. and Spiegel, S. (2002). A chicken-or-egg conundrum in apoptosis: which comes first? Ceramide or PKC $\delta$ ? *J. Clin. Invest.* 109, 717-719.
- Green, D. and Kroemer, G. (1998). The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* 8, 267-271.
- Green, D. R. and Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Gross, A., McDonnell, J. M. and Kosmeyer, S. J. (1999). *BCL-2* family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13, 1899-1911.
- Gutacker, C., Klock, G., Diel, P., and Koch-Brandt, C. (1999). Nerve growth factor and epidermal growth factor stimulate clusterin gene expression in PC12 cells. *Biochem J.* 339, 759-766.



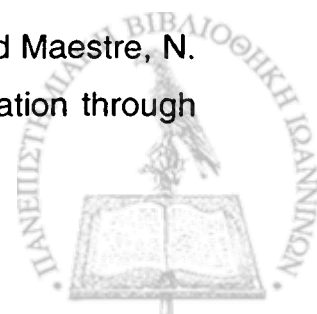
- Haake, A.R. and Polakowska, R. R. (1993). Cell death by apoptosis in epidermal biology. *J. Invest. Dermatol.* 101, 107-112.
- Haimovitz–Friedman, A., Kan, C. C., Ehleiter, D., Persaud, R. S., McLoughlin, M. and Fuks, Z. (1994). Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp. Med* 180, 525–535.
- Haimovitz–Friedman, A. (1998). Radiation–induced signal transduction and stress response. *Radiat Res* 150 (5 Suppl), 102–108
- Halazonetis, T. D., Georgopoulos, K., Greenberg, M. E. and Leder, P. (1998). C Jun dimerizes with itself and with c–Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell.* 55, 917–924.
- Haldar, S., Basu, A. and Croce, C. M. (1998). Serine–70 is one of the critical sites for drug–induced Bcl-2 phosphorylation in cancer cells. *Cancer Res.* 58, 1609–1615.
- Haldar, S., Negrini, M., Monne, M., Sabbioni, S. and Croce, C. M. (1994). Down-regulation of Bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res.* 54(8), 2095-2097.
- Hale, A. J., Smith, C. A., Sutherland, L.C., Stoneman, V. E., Longshorne, V., Culhane, A. C. and Williams, G. T. (1996). Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur. J. Biochem.* 236, 1–26.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1999). Free radicals “reactive species” and toxicology. In B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge eds. “Free Radicals In Biology and Medicine”, Oxford University Press, 544-616.
- Han, B. H., DeMattos, R. B., Dugan, J. S., Kim-Han, R. P., Brendza, J. D., Fryer, M., Kierson, J., Cirrito, K., Quick, J. A. K., Harmony, B. J., Aronow, B. J. and Holtzman, D. M. (2001). Clusterin contributes to caspase-3-independent brain injury following neonatal hypoxia-ischemia. *Nat. Med.* 3, 338-343.
- Hannun, Y.A. (1994). The sphingomyelin cycle and second messenger function of ceramide. *J. Biol.Chem.* 269, 3125-3128.
- Hannun, Y. A. (1996). Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 274, 1855-1859.
- Hannun, Y. A. and Luberto, C. (2000). Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol.* 24, 224–225.
- Hannun, Y.A. and Obeid, L.M. (2002). The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: Stress encounters of the lipid kind. *J. Biol Chem.* 277, 25847-25850.



- Hansen, T. V., Aaseth J. and Alexander J. (1982). The effects of chelating agents on vanadium distribution in the rat body and uptake by human erythrocytes. *Arch. Toxicol* 50: 195-202.
- Harding, M. M. and Moksdi, G. (2000). Antitumor metallocenes: structure-activity studies and interactions with biomolecules. *Curr. Med. Chem.* 7: 1289-1293.
- Haunstetter, A. and Izumo, S. (1998). Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ. Res.* 82, 1111–1129.
- He, H., Qi, X.M., Grossmann, J. and Distelhorst, C. W. (1998). c-fos degradation by the proteasome. An early, Bcl-2-regulated step in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 25015-25019.
- Heinz, A., Rubinson, K. A. and Grantham, J. J. (1982). The transport and accumulation of oxyvanadium compounds in human erythrocytes in vitro. *J Lab. Clin. Med.*, 100: 593-612.
- Helmberg, A., Auphan, N., Caelles, C. and Karin, M. (1995). Glucocorticoid induced apoptosis of human leucemic cells is caused by the repressive function of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 14, 452–460.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis, *Nature* 407: 770-776.
- Henkart, P. A. (1995). Apoptosis: O death, where is thy sting? *Immunol.* 154, 4905 – 4908.
- Henkart, P. A. and Grinstein, S. (1996). Apoptosis–mitochondria resurrected? *J. Exp. Med.* 183, 1293–1295.
- Hennigan, R. F., Hawker, K. I. and Ozanne, B. W.(1994). Fos transformation activates genes associated with invasion. *Oncogene* 9, 3591–3600.
- Herrmann, J. L., Beham, A. W., Sarkiss, M., Chiao, P. J., Rands, M. T., Bruckheimer, E. M., Brisbay, S. and Mc Donnell, T. J. (1997). Bcl-2 suppresses apoptosis resulting from disruption of the NF- $\kappa$ B survival pathway *Exp. Cell. Res.* 237, 101–109.
- Hermann, J., Menter, D., Beham, A., von Eschenbach, A. and McDonnell, T. (1997). Regulation of lipid signaling pathways for cell survival and apoptosis by bcl-2 in prostate carcinoma cells. *Exp. Cell. Res.* 234, 442-451.
- Heylinger, C. E., Tahiliani, A. G. and McNeill, J. H. (1985). Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science* 227, 1474–1477.



- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. and Karin, M. (1993). Identification of an oncoprotein–and UV–responsive protein kinase that binds and potentiates the c–Jun activation domain. *Genes Dev.* 7, 2135–2148.
- Hochgrebe, T., Humphreys, D., Wilson, M. and Smith, S. (1999). A reexamination of the role of clusterin as a complement regulator. *Exp. Cell. Res.* 249, 13-21.
- Hollander, M. C. and Fornace, A. J. (1989). Induction of Fos RNA by DNA-damaging agents. *Cancer Res.* 49: 1687–1691.
- Horne, H. F. and Vousden, K. H. (2000). Cancer: guarding the guarding? *Nature.* 427, 110–111.
- Huang, C., Zhang, Z., Ding, M., Li, J., Ye, J., Leonard, S.S., Shen, H.M., Butterworth, L., Lu, Y., Costa, M., Rojanasakul, Y., Castranova, V., Vallyathan, V. and Shi, X. (2000). Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275, 32516-32522.
- Huang, D. C., O' Reilly, L. A., Strasser, A. and Cory, S. (1997). The anti-apoptotic function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *EMBO J.* 16, 4628-4638.
- Humphreys, D., Hochgrebe, T. T., Easterbrook-Smith, S. B., Tenniswood, M. P. and Wilson, M.R. (1997). Effects of clusterin overexpression on TNFalpha- and TGFbeta-mediated death of L929 cells. *Biochemistry* 36, 15233-15243.
- Humphreys, D. T., Carver, J. A., Easterbrook-Smith, S. B. and Wilson, M. R.,(1999). Clusterin chaperone–like activity similar to that of small heat shock proteins. *J. Bio. Chem.* 274, 6875–6881.
- Ichijo, H. (1998). Molecular mechanisms for cell life and death. *Science* 275, 90-94.
- Iwasaki-Bessho, Y., Banno, Y., Yoshimura, S-I., Ito, Y., Kitajima, Y. and Nozawa, Y. (1998). Decreased phospholipase D (PLD) activity in ceramide-induced apoptosis of human keratinocyte cell line. *J. Invest. Dermatol.* 110, 376-387.
- Jaattela, M., Benedict, M., Tewari, M. Shayman, J.A. and Dixit, V.M. (1995) Bcl-x and Bcl-2 inhibit TNF and Fas-induced apoptosis and activation of phospholipase A2 in breast carcinoma cells. *Oncogene*, 10, 2297-22305.
- Jacobs, J. P., Jones, C. M. and Baille, J. P. (1970). Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* 227:168-170.
- Jaffrezou, J. P., Levade, T., Beltaieb, A., Andrieu, N., Bezombes, C. and Maestre, N. (1996). Daunorubicin–induced apoptosis: triggering of ceramide generation through sphingomyelin hydrolysis. *EMBO J* 15,2417-2424.



Jang, S. I., Steinert, P. M. and Markova, N. G. (1996). Activator protein 1 activity is involved in the regulation of the cell type-specific expression from the proximal promoter of the human profilaggrin gene. *J. Bio. Chem.* 271, 24105–24114.

Jang, J. H. and Surh, Y. J. (2003). Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2. Implications for its antiapoptotic function. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1371–1379.

Jarvis, W. D. and Grant, S. (1998). The role of ceramide in the cellular response to cytotoxic agents. *Curr Opin Oncol* 10, 552–559.

Jaspers, I., Samet, J. M., Erzurum, S. and Reed, W. (2000). Vanadium-induced  $\kappa$ B-dependent transcription depends upon peroxide-induced activation of the p38 mitogen-activated protein kinase. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23, 95-102.

Jayadev, S., Liu, B., Bielawska, A.K., Lee, J.Y., Nazaire, F., Puskareva, M.Y., Obeid, L.M. and Hannun, Y.A. (1995). Role for ceramide in cell cycle arrest. *J. Biol.Chem.* 270, 2047-2052.

Jenne, D.E. and Tschopp, J. (1992). Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein. *Trends Biochem. Sci.* 17, 154-159.

Ji, X., Lu, L., Xu, K., Hattori, H. and Terakawa, S. (1995) Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death by natural ceramide. *FEBS Lett.* 358 (2):211-214.

Jin, G. and Howe, P. H (1997) Regulation of clusterin gene expression by transforming growth factor  $\beta$ . *J. Biol. Chem.* 272, 26620-26626.

Jin, G. and Howe, P. H. (1999). Transforming growth factor beta regulates clusterin gene expression via modulation of transcription factor c-fos. *Eur. J. Biochem.* 263, 534-542.

Jochum, W., Passegue, E. and Wagner, E. F. (2001). AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *20*, 2401–2412.

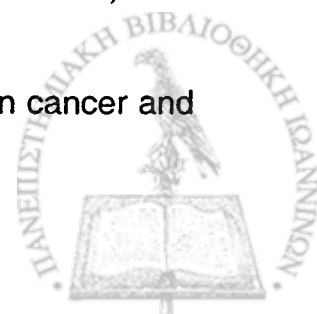
Johnson, R., Spiegelman, B., Hanahan, D. and Wisdom, R. (1996). Cellular transformation and malignancy induced by ras require c-jun expression. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4504–4511.

Jomary, C., Darrow, R. M., Wong, P., Organisciak, D. T., Neal, M. J., and Jones, S. E. (1999). Lack of causal relationship between clusterin expression and photoreceptor apoptosis in light induced retinal degeneration. *J. Neurochem.* 72, 1923–1929.

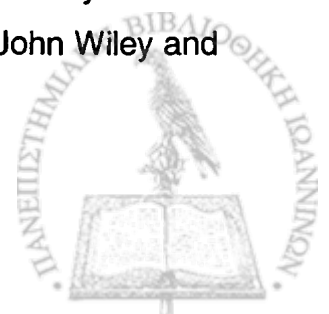




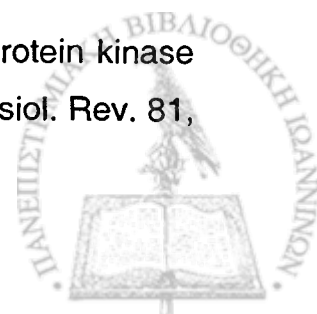
- Jomary, C., Chatelain, G., Michael, D., Weston, A., Neal, M. J. and Jones, S. E. (1999). Effect of targeted expression of clusterin in photoreceptor cells on retinal development and differentiation. *J. Cell Sci.* 112, 1455-1464.
- Jones, S.E. and Jomary, C. (2002). Clusterin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 34, 427-431.
- Jung, E.M, Griner, R.D, Mann-Blakeney, R. and Bollag, W.B.(1998). A potential role for ceramide in the regulation of mouse epidermal keratinocyte proliferation and differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 110, 318-323.
- Kaina, B., Haas, S. and Kappes, H.(1997). A general role of c-fos in cellular protection against DNA-damaging carcinogens and cytostatic drugs. *Cancer Res.* 57, 2721-2731.
- Kang, K., Kim, W. and Choi, K. (1999). p21 Promotes ceramide-induced apoptosis and antagonizes the antideath effect of Bcl-2 in human hepatocarcinoma cells. *Exp. Cell. Res.* 253, 403-412.
- Karmakar, P., Balajee, A.S. and Natarajan, A.T. (2001). Analysis of repair and PCNA complex formation induced by ionizing radiation in human fibroblast cell lines. *Mutagenesis.* 16: 225–232.
- Karin, M. and Shaulian, E. (2001). AP-1: linking hydrogen peroxide and oxidative stress to the control of cell proliferation and death. *Life* 52, 17-24.
- Karin, M., Lin, Z.G. and Zandi, E. (1997) AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 240-246.
- Karin, M. (1995). The regulation of AP–1 activity by mitogen–activated protein kinases. *J. Bio. Chem.* 270, 16483–16486.
- Kasibhatla, S., Brunner, T., Genestier, L., Echeverri, F., Mahboubi, A. and Green, D. R. (1998). DNA damaging agents induce expression of fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF–κB and AP-1. *Mol. Cell.* 1, 543–551.
- Kawahara, A., Kobayashi, T. and Nagata, S. (1998). Inhibition of Fas-induced apoptosis by Bcl-2. *Oncogene.* 17, 2549-2554.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26, 239-257.
- Kerr, J. F. R. and Winterford, C. M. (1993). Apoptosis, its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73, 2013–2026.



- Kerr, J.F.R., Gobe, G.C., Winterford, C.M., and Harmon, B.V. (1995). *Methods Cell Biol.* 46, 1-27
- Kim, B.C. and Kim, J.H. (1998). Exogenous C<sub>2</sub> Ceramide activates *c-fos* serum response element via Rac-dependent signaling pathway. *Biochem. J.* 330, 1009-1014.
- Kishikawa, K., Chalfant, C.E., Perry, D. K., Bielawska, A. and Hannun, Y. A. (1999). Phosphatidic acid is a potent and selective inhibitor of PP1 and inhibitor of ceramide-mediated responses. *J Biol. Chem.* 274, 21335–21351.
- Kitatani, K., Akiba, S., Hayama, M. and Sato, T. (2001). Ceramide accelerates dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase ½ to decrease prostaglandin D<sub>2</sub> production in RBL-2H3 cells. *Archives of biochemistry and biophysics* 395, 208–214.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R. and Newmeyer, D.D. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136.
- Kolbus, A., Herr, I., Schreiber, M., Debatin, K. M., Wagner, E. F. and Angel, P. (2000). c-Jun dependent CD95-L expression is a rate-limiting step in the induction of apoptosis by alkylating agents. *Mol. Cell. Biol.* 20, 575–582.
- Kolesnick, R. N. and Kronke, M. (1998). Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 60, 643–665.
- Kolesnick, R. and Hannun, Y. A. (1999). Ceramide and apoptosis. *Trends Biochem Sci* 24, 224–225.
- Kolesnick, R. N., Goni, F. M. and Alonso, A. (2000). Compartmentalization of ceramide signalling: physical foundations and biological effects. *J. cell. Physiol.* 184, 285–300.
- Kolesnick, R. (2002). The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J Clin Invest.* 110, 3-8.
- Kolettas, E. and Rosenberger, R. F., (1998). Suppression of decorin expression and partial induction of anchorage-independent growth by v-src oncogene in human fibroblasts. *Eur. J. Biochem*, 254(2):266-274.
- Kolettas, E., Gonos, E.S. and Spandidos, D. A. (1994). Retroviral gene –Myc. In *cell and tissue culture: Laboratory procedures, part 26H, Module 26H:1*, John Wiley and Sons Ltd.



- Kopf-Maier, P. (1994) Complexes of metals other than platinum as antitumor agents. *Eur J Clin. Pharmacol*, 47: 1-16.
- Kopf-Maier, P. and Krahl, D. (1983). Tumor inhibition by metalocenes: ultrastructural localization of titanium and vanadium in treated tumor cells by electron energy loss spectroscopy. *Chem. Biol. Interactions* 44: 317-328.
- Korsmeyer, S.J., Shutter, J.R., Veis D.J., Merry, D.E. and Oltvai, Z.N (1993) *Semin. Cancer. Biol.* 4, 327-332.
- Krady, M. M., Freyermuth, S., Rogue, P. and Malviya, A. N. (1997). Pervanadate elicits proliferation and mediates mitogen-activated protein (MAP). *FEBS Lett.* 412: 420-424.
- Kresja, C. M. and Schieven, G. L. (1998). Impact of oxidative stress on signal transduction control by phosphotyrosine phosphatases. *Environ Health Perspect*, 106 (Suppl. 5): 1179-1184.
- Kretschmar, M. and Massagne, V. (1998). SMADS: mediators and regulators of TGF $\beta$  signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 103-111.
- Kroemer, G. (1998). The mitochondrion as an integrator / coordinator of cell death pathways. *Cell Death Differ* 5, 547.
- Krumlant, R. (1994). Analysis of gene expression by northern blot. *Mol. Biotechnology* 2(3): 227-242.
- Kumazaki, T., Sasaki, M., Nishiyama, M. Teranishi, Y., Sumida, H. and Mitsui, Y. (2002). Effect of Bcl-2 down regulation on cellular life span. *Biogerontology* 3(5), 291-300.
- Kumazaki, T., Sasaki, M., Nishiyama, M. Teranishi, Y., Sumida, H., Eboshida, A. and Mitsui, Y. (2003). Life span shortening of normal fibroblasts by over expression of Bcl-2: a result of potent increase in cell death. *Exp. cell. Res.* 285(2), 299-308.
- Kummer, J. L., Rao, P. K. and Heidenreich, K. A. (1997). Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p 38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 272, 20490-20494.
- Kundu, N., Smyth, M.J, Samsel, L. and Fulton, A.M. (2002), Cyclooxygenase Inhibitors block cell growth, increase ceramide and inhibit cell cycle. *Breast Cancer Res Treat* 76: 57-64.
- Kyriakis, J. M. and Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* 81, 807-869.



Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259):680-685.

Lakins, J. N., Poon, S., Easterbook-Smith, S. B., Tenniswood, M. P. and Wilson, M. R. (2002). Evidence that clusterin has discrete chaperon and ligand binding sites. *Biochemistry* 41, 282–291.

Lam, M., Dubyak, G., Chen, L., Nunez, G., Miesfel, R. L. and Distelhorst, G. W.(1994). Evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca<sup>2+</sup> fluxes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 6569–6573.

Lau, K. H. and Baylink, D. J. (1993). Phosphotyrosyl protein phosphatases: potential regulators of cell proliferation and differentiation. *Crit. Rev. Oncog.* 4:451-471.

Lavoie, J. N., L' Allemain, G., Brunet, A., Muller, R. and Pouyssegur, J. (1996). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p 42/p44MAPK and negatively by the p 38 / HOG MAPK pathway. *J. Bio. Chem.* 271, 20608–20616.

Lee, M. S., Yang, J. H., Salehi, Z., Amstein, P., Chen, L.S., Jay, G. and Rhim. J. S. (1993). Neoplastic transformation of human keratinocyte cell line by the c-fos oncogene. *Oncogene* 8, 387–393

Lee, M., Hwang, I. and Choi, Y. (1997). EGF inhibits expression of WDNM1 and sulfated glycoprotein-2 genes in mammary epithelial cells. *Biochem.Biophys. Res Commun.* 240, 104-107.

Lee, J. Y., Leonhardt, L. G. and Obeid, L. M. (1998). Cell cycle-dependent changes in ceramide levels preceding retinoblastoma protein dephosphorylation in G<sub>2</sub>/M. *Biochem. J.* 334, 457-461.

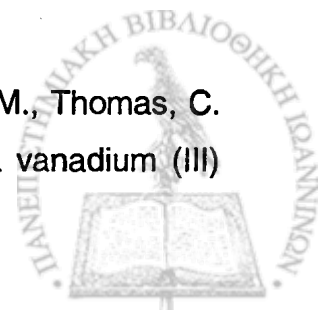
Lee, J. Y., Bielawska, A. E. and Obeid, L. M. (2000). Regulation of cyclin-dependent kinase 2 activity by ceramide. *Exp. Cell Res.* 261, 303-311.

Lehman, T. A., Modali, R., BouKamp, P., Stanek J. and Bennett W.P. (1993). p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis* 14(5), 833-839.

Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.

Liasko, R., Karkabounas, S., Kabanos, T. A., Malamas, M., Tasiopoulos, A. J., Stefanou, D., Collery, P. and Evangelou, A. (1998). Beneficial effects of vanadium at low doses on benzo[α]pyrene-induced leiomyosarcomas in wistar rats. *Anticancer Res.* 18, 3609-3614.

Liasko, R., Karkabounas, S., Kabanos, T. A., Collery, P., Malamas, M., Thomas, C. H., Stefanou, D. and Evangelou, A. (2000). Antitumour effects of a vanadium (III)



complex with cysteine on malignant cell lines and tumour bearing Wistar rats. In: *Metals in Biology and Medicine*. Centeno JA, Coltery PH, Vernet RB (Eds), Vol. 6, 577-579.

Liu, Y. Y., Han, T. Y., Giuliano, A. E., Ichikawa, S., Hirabayashi, Y. and Cabot, M. C. (1999). Glucosylation of ceramide potentiates cellular resistance to tumour necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis. *Exp Cell Res* 252, 464-470.

Loeffler, M. and Kroemer, G. (2000). Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis *FASEB J.* 14, 729-739.

Lopez-Bayghen, E., Vega, A., Cadena, A., Granados, S.E., Jave, L. F., Gariglio, P. and Alvarez-Salas, L. M. (1996). Transcriptional analysis of the 5'-noncoding region of the human involucrin gene. *J. Biol. Chem.* 271, 512-520.

Lorenzo, H. K., Susin, S. A., Penninger, J. and Kroemer, G. (1999). Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death. Differ.* 6, 516-524.

Lucci, A., Cho, W. I., Han, T. Y., Giuliano, A. E., Morton, D. L. and Cabot, M. C. (1998). Glucosylceramide: a marker for multiple-drug resistant cancers. *Anticancer Res* 18, 475-480.

Lucci, A., Han, T. Y., liu, Y. Y., Giuliano, A. E. and Cabot, M. C. (1999). Multidrug resistance modulators and doxorubicin synergize to elevate ceramide levels and elicit apoptosis in drug-resistant cancer cells. *Cancer* 86, 300-311.

Majno, G. and Jorjiss, I. (1995). Apoptosis, oncosis and necrosis. A review of cell death. *Am. J. Pathol.* 156, 3-15.

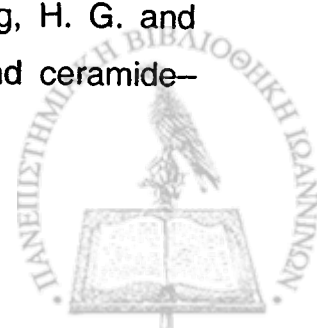
Makin, G. and Dive, C. (2001). Apoptosis and cancer chemotherapy. *Trends in cell Biology* 11, S22-S26.

Malisan, F. and Testi, R. (1998). Lipid signalling in CD95-mediated apoptosis. *FEBS Lett.* 452, 100-103.

Mandala, S. (2002). Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 296, 346-349.

Martin-Blanco E. (2000). p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions. *Bioessays* 22, 637-645.

Martin, S. J., Newmeyer, D. D., Mathias, S., Farschon, D. M., Wang, H. G. and Reed, J. C. (1995). Cell-free reconstitution of Fas-, UV radiation- and ceramide-induced apoptosis. *EMBO J* 14, 5191-5200.



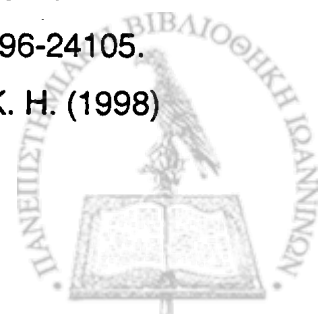
- Massagne, J. (1996) TGF $\beta$  signaling: receptors, transducers and Mad proteins. *Cell* 85, 947-950.
- Mathias, S., Dressler, K.A. and Kolesnic, R.N. (1991). Characterization of a ceramide-activated protein kinase; stimulation by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 10009-10013.
- Mathias, S., Pena, L.A. and Kolesnick, R.N. (1998). Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J.* 335, 465-480.
- Maurer, B. G., Metelitsa, L. S., Seeger, R. C., Cabot, M. C. and Reynolds, C. P. (1999). Increase of ceramide and induction of mixed apoptosis/necrosis by N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide in neuroblastoma cell lines. *J Natl Cancer Inst* 91,1138-1146.
- McBride, K. and Nemer, M. (1998). The c-terminal domain of c-fos is required for activation of an AP-1 site specific for Jun-Fos heterodimers. *Mol. Cell Biol.* 18, 5073-5081.
- McDonnell, T., Troncoso, T. and Brisday, S. (1992). Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 52: 6940-6944.
- McLaughlin, L., Zhu, G., Mistry, M., Ley-Ebert, C., Stuart, W. D., Florio, C. J., Groen, P. A., Witt, S. A., Kimball, T. R., Witte, D. P., Harmony, J. A. and Aronow, B. J. (2000). Apolipoprotein J/clusterin limits the severity of murine autoimmune myocarditis. *J. Clin. Invest.* 106, 1105-1113.
- Meacci, E., Vasta, V., Neri, S., Farnararo, M. and Bruni, P. (1996). Activation of phospholipase D in human fibroblasts by ceramide and sphingosine: evaluation of their modulatory role in bradykinin stimulation of phospholipase D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225, 392-399.
- Mehta, S., Blackington, D., Omar, I., Kouttab, N., Myrick, D. and Klostergaard, J. (2000). Combined cytotoxic action of paclitaxel and ceramide against the human Tu 138 head and neck squamous carcinoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* 46, 85-92.
- Mengubas, K., Riordan, F. A., Bravery, C. A., Lewin, J., Owens, D. L. and Mehta, A.B. (1999). Ceramide-induced killing of normal and malignant human lymphocytes is by a non-apoptotic mechanism. *Oncogene* 18, 2499-2506.
- Mercurio, F. and Manning A. M. (1999). Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:266-232.



- Merrill, A. H. Jr., Schmelz, E. M., Wang, E., Schroeder, J.J., Dillehay, D, L. and Riley, R. T. (1995). Role of dietary sphingolipids and inhibitors of sphingolipid metabolism in cancer and other diseases. *J Nutr* 125 (6 suppl), 1677–1682.
- Merrill, A.H. (2002). De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J. Biol Chem.* 277, 25843-25846.
- Miao, G. and Curran, T. (1994). Cell transformation by c-fos requires an extended period of expression and is independent of the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4295–4310.
- Michael, D., Chatelain, G., North, S. and Brun, G. Stress-induced transcription of the clusterin/ApoJ gene. *Biochem J* 1997: 328, 45-50.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A. and Moll, U. M. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell* 11(3):577-590.
- Miller, A. D., Curran, T. and Verma, I. M. (1984). c-fos protein can induce cellular transformation: a novel mechanism of activation of a cellular oncogene. *Cell* 36, 51–60.
- Milstien, S. and Spiegel, S. (2002). Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J. Biol. Chem.* 277:25851-25854.
- Miyake, H., Nelson, C., Rennie, P. S. and Gleave, M. E. (2000). Acquisition of chemoresistant phenotype by overexpression of the antiapoptotic gene testosterone-repressed prostate message-2 in prostate cancer xenograft models. *Cancer Res.* 60, 2547-2554.
- Miyake, H., Hara, I., Kamidono, S., Gleave, M. E. and Eto, H. (2003). Resistance to cytotoxic chemotherapy-induced apoptosis in human prostate cancer cells is associated with intracellular clusterin expression. *Oncol. Rep.* 10, 469-473.
- Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M. and Reed, J. C. (1994). Identification of a p53-dependent negative response element in the Bcl-2 gene. *Cancer res.* 54(12), 3131-3135.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Lieberman, D. A., Hoffman, B. and Reed J. C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of Bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo.
- Morgan, T. E., Laping, N. J., Rozovsky, I., Odo, T., Hogan, T. H, Finch, C.E. and Pasinetti, G.M. (1995). Clusterin expression by astrocytes is influenced by TGF $\beta$  and heterotypic cell interactions *J. Neuroimmunol.* 58, 101–110.

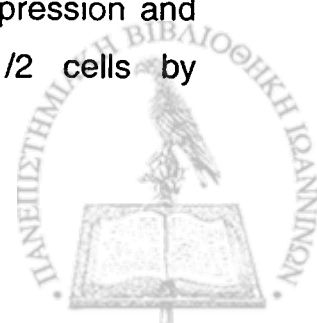


- Morgenstern, J. P. and Land, H. (1990). Advanced mammalian gene transfer high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell-line. *Nucleic Acids Res* 18(4):1068.
- Morinville, A., Mayasinger, D. and Shaver, A. (1998). From Vanadis to Atropos: Vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signaling. *Trends Physiol. Sci.* 19, 452-460.
- Morita, Y. (2000). Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat. Med.* 6, 1109–1114.
- Mouton, R. E. and Venable, M. E. (2000). Ceramide induces expression of the senescence histochemical marker,  $\beta$ -galactosidase, in human fibroblasts. *Mech. Ageing Dev.* 113, 169-181.
- Muller-Wieprecht, V., Riebeling, C., Stooss, A., Orfanos, C.E. and Geilen, C.C. (2000). *Bcl-2* transfected HaCaT keratinocytes resist apoptotic signals of ceramides, tumor necrosis factor alpha and 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Arch. Dermatol. Res.* 292, 455-462.
- Myrick, D., Blackinton, D., Klostergaard, J., Kouttab, N., Maizel, A. and Wanebo, H. (1999). Paclitaxel-induced apoptosis in Jurkat, a leukemic T cell line, is enhanced by ceramide. *Leuk Res* 23, 569–578.
- Nead, M. A., Baglia, L. A., Antinore, M. J., Ludlow, J. W. and McCance, D. J. (1998). Rb binds c-Jun and activates transcription. *EMBO J.* 17, 2342–2352.
- Neckay, B. R., Nannigna, L. D. and Nechay, P. S. (1986). Vanadyl (IV) and vanadate (V) binding to selected endogenous phosphate, carboxyl and amino ligands; calculations on cellular vanadium species distribution. *Arch. Biochem. Biophys* 251: 128-138.
- Nunez G., Seto M. and Seremetis S. (1989). Growth and tumor promoting effects of deregulated Bcl-2 in human lymphoblastoid cells *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 4589–4593.
- Obeid, L. M. and Venable, M. E. (1997). Signal transduction in cellular senescence. *J. Am. Geriatr. Soc.* 45, 361-366.
- Odajima, J., Matsumura, I. and Sonoyama J. Full oncogenic activities of v-src are mediated by multiple signaling pathways. *J Biol Chem* 2000: 275, 24096-24105.
- Oh, W. J., Kim, W. H., Kang, K. H., Kim, T. Y., Kim, M. Y., and Choi, K. H. (1998) *Cancer Lett.* 129, 215-222.





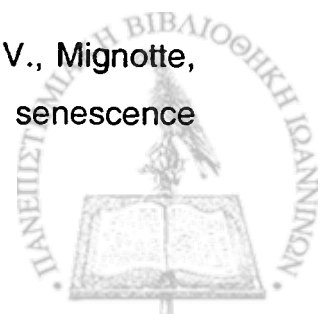
- Ohiro, Y., Ushera A., Kobayashi S., Duofy S. L., Nantz R. and Horikoshi N., (2003). Inhibition of stress-inducible kinase pathways by tumorigenic mutant p53. *Mol. Cell Biol.* 23(1):322-334.
- Okazaki, T., Bielawska, A., Bell, RM. and Hannun, YA. (1990). Role of ceramide as a lipid regulator of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced HL-60 cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 265, 15823-15831.
- Okazaki, T., Bielawska, A., Bell, R. M. and Hannun, Y. A. (1990). Role of ceramide as a lipid mediator of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced HL-60 cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 265, 15823-15831.
- Okazaki, K. and Sagata, N. (1995). The Mos/MAP kinase pathway stabilizes c-fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3 cells *EMBO J.* 14, 5048-5059.
- O' Reilly, L.A., Huang, D.C. and Strasser, A. (1996). The cell death inhibitor Bcl-2 and homologues influence control of cell arrest entry *EMBO J.* 15, 6979-6990.
- Oren M (2003). The p53 saga: the good, the bad and the dead. *Harvey Lect.* 2002 : 97, 57-82.
- Orgetmen, B., Kravka, J. M., Schady, D., Usta, J., Hannun, Y. A. and Obeid, L. M. (2001). Molecular mechanisms of ceramide-mediated telomerase inhibition in the A549 human lung adenocarcinoma cell line. *J. Biol. Chem.* 276, 32506-32514.
- Orgetmen, B., Schady, D., Usta, J., Wood, R., Kravka, J. M., Luberto, C., Birbes, H., Hannun, Y. A. and Obeid, L. M. (2001). Role of ceramide in mediating the inhibition of telomerase activity in A549 human lung adenocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 276, 24901-24910.
- Overell, R. W., Weisser, K. E. and Cosman, D. (1988). Stably transmitted triple-promoter retroviral vectors and their use in transformation of primary mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 8, 1803-1808.
- Pandey, S. K., Theberge, J. F., Bernier, M. and Srivastava, A. K. (1999). Phosphatidylinositol 3-kinase requirement in activation of the ras/C-raf-1/MEK/ERK and p70s6k signaling cascade by the insulinomimetic agent vanadyl sulfate. *Biochemistry* 38: 14667-14675.
- Parfett, C. L. and Pilon, R. (1995) Oxidative stress-regulated gene expression and promotion of morphological transformation induced in C3H/10T1/2 cells by ammonium metavanadate. *Food Chem. Toxicol.* 33:301-308.



- Paris, F. (2001). Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 293, 293–297.
- Pasenetti, G. M., Johnson, S. A., Oda, T., Rozovsky, I. and Finch, C. E. (1994). Clusterin (SGP-2): a multifunctional glycoprotein with regional expression in astrocytes and neurons of the adult rat brain *J. Comp. Neurol.* 339:387-400.
- Perkins, N.D. (2004). NF-kappaB: tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol.* 14: 64-69.
- Petropoulou, C., Trougakos, I.P., Kolettas, E., Toussaint, O. and Gonos, E.S. (2001). Clustering/apolipoprotein J is a novel biomarker of cellular senescence that does not affect the proliferative capacity of human diploid fibroblasts. *FEBS. Let.* 509, 287-297.
- Pettus, B. J., Chalfant, C. E. and Hannun, Y. A. (2002). Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim. Biophys. Acta* 1585, 114-125.
- Pillai, S., Cho, S., Mahajan, M., Frew, L. and Rawlings, A.V. (1996). Synergy between vitamin D precursor 25-hydroxyvitamin D and short chain ceramides on keratinocyte proliferation and differentiation. *J. Invest. Dermatol. Symp Proc.* 1, 39-43.
- Pillai, S., Mahajan, M. and Carlomusto, M. (1998). Ceramide potentiates but sphingomyelin inhibits vitamin D-induced keratinocyte differentiation: comparison between keratinocytes and HL-60 cells. *Arch. Dermatol. Res.* 291, 284-289.
- Poon, S., Easterbrook-Smith, S.B., Rybchyn, M.S., Carver, J.A. and Wilson, M.R. (2000). Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state. *Biochemistry* 39, 15953-15960.
- Poon, S., Treweek, T.M., Wilson, M.R., Easterbrook-Smith, S.B. and Carver, J.A. (2002). Clusterin is an extracellular chaperone that specifically interacts with slowly aggregating proteins on their off-folding pathway. *J. Biol. Chem.* 513, 259-266.
- Prinetti, A. (2001). Changes in the lipid turnover, composition, and organization, as sphingolipid-enriched membrane domains, in rat cerebellar granule cells developing in vitro. *J. Biol. Chem.* 276, 21136–21145.
- Radin, N. S. (2003). Killing tumours by ceramide-induced apoptosis: a critique of available drugs. *Biochem. J.* 371, 243–256.



- Ragg, S. A., Kaga, S., Berg, K. A. and Ochi, A. (1998). The mitogen-activated protein kinase pathway inhibits ceramide-induced terminal differentiation of a human monoclonal leukemia cell line, U937. *J. Immunol.* 161, 1390-1398.
- Rahm, M., Jin, P., Sumegi J. and Sejersen, T. (1989). Elevated c-fos expression inhibits differentiation of L6 rat myoblasts. *J. Cell. Physiol.* 139, 237-244.
- Rani, C. S. S., Abe, A., Chang, Y., Rosenzweig, N., Saltiel, A. R., Radin, N. S. and Shayman, J. A. (1995). Cell cycle arrest induced by an inhibitor of glucosylceramide synthesis: correlation with cyclin-dependent kinases. *J. Biol. Chem.* 270, 2859-2867.
- Raisova, M., Goltz, G., Bektas, M., Hannun, Y. A., Orfamos, G. E. and Geilen, C. C (2002) Bcl-2 overexpression prevents apoptosis induced by ceramidase inhibitors in malignant melanoma and HaCaT keratinocytes. *FEBS Lett* 516: 47–52.
- Reddy, K. B., Jin, G., Karode, M. C., Harmony, J. A. and Howe, P. H. (1996). Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ )-induced nuclear localization of apolipoprotein J/clusterin in epithelial cells. *Biochemistry* 35, 6157-6163.
- Reed, J. C. (1994). Bcl-2 and the regulation of programmed cell-death. *J. Cell. Biol.* 124, 1-8.
- Reed, J. C. (1998). *Bcl-2* family proteins and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 127-137.
- Reed, J. C. (1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17, 3225-3236.
- Reed, J. C. (1999). Disregulation of apoptosis in cancer. *J. Clin. Oncol.* 17: 2941-2953.
- Reed, J. C. (2000). Apoptosis and cancer: strategies for interpreting programmed cell death. *Semin. Hematol.* 37, suppl 7, 9–16.
- Reed, J. C. (2002). Apoptosis-based therapies *NAT Rev. Drug: Discov.* 1, 111–121.
- Relled, D., Raveh, T., Riebeling, C., Fridkin, M., Berissi, H., and Futerman, A. H. (2002). Death-associated protein (DAP) kinase plays a central role in ceramide-induced apoptosis in cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem* 277, 1957–1961.
- Reyes, J. G., Robayana, I. G., Delgado, P. S., Gonzalez, I. H., Aguiar, J. Q., Rosas, F. E., Fanjul, L. F. and Galaretta, C. M. C. (1996). c-jun is a downstream target for ceramide-activated protein phosphatase in A431 cells. *J. Biol. Chem.* 271, 21375-21380.
- Richeval, V., Renaud, F, Lemaire, C., Godefroy, N., Trotot, P., Boulo, V., Mignotte, B. and Vayssiere, J. L. (2002). Bcl-2 can promote p53- dependent senescence



versus apoptosis without affecting the G1/S transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298(2), 282-288.

Rogers, M. V., Buensuceso, C., Montague, G. and Mahadevan, L. (1994). Vanadate stimulates differentiation and neurite outgrowth in rat pheochromocytoma stimulates cells and neurite extension in human neuroblastoma. SH-SY5Y cells. *Neuroscience* 60, 479–494.

Roux, P., Verrier, B., Klein, B., Niccolino, M., Marty, L. and Piechaczyk, M. (1991). Retrovirus-mediated gene transfer of a human c-fos c DNA into mouse bone marrow stromal cells. *Oncogene* 6 (11): 2155-2160.

Roux P., Blanchard, J. M., Fernandez, A., Lamb, N. and Piechaczyk, M. (1990). Nuclear localization of c-fos, but not v-fos proteins, is controlled by extracellular signals. *Cell* 275 (8): 5911-5917.

Rosenberg, M.E. and Silkensen, J. (1995). Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 27, 633-645.

Rosenberger, R. F., Gounaris, E. G. and Kolettas, E. (1991). Mechanisms responsible for the limited and immortal phenotype in cultured mammalian cells. *J. Theor. Biol.* 148, 383-392.

Rutberg, S. E., Saez, E., Glick, A., Dlugosz, A., Spiegelman, A. and Yuspa, S. H. (1996). Differentiation of mouse keratinocytes is accompanied by PKC-dependent changes in AP-1 proteins. *Oncogene*. 13, 167–176.

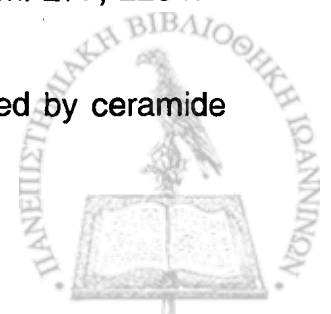
Ruther, O., Wagner, E. F. and Muller R. (1985). Analysis the differentiation-promoting potential of inducible c-fos genes introduced into embryonal cells, *EMBO J.* 4, 1775–1781.

Ruvolo, P.P., Deng, X., Ito, T., Carr, B. K. and May, W. S. (1999). Ceramide induces Bcl 2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J. Biol. Chem.* 274, 20296–20300.

Ruvolo, P. P. (2001). Ceramide regulates cellular homeostasis via diverse stress signalling pathways. *Leukemia* 15, 1153–1160.

Ruvolo, P.P., Clark, W., Mumby, M., Gao, F. and May, W. S. (2002). A functional role for the B56 alpha-subunit of protein phosphatase 2A in ceramide-mediated regulation of Bcl-2 phosphorylation status and function. *J. Biol. Chem.* 277, 22847–22852.

Ruvolo, P. (2003) Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacological research* 47, 383–392.



Ryseck, R. P. and Bravo, R. (1991). c-Jun, JunB, and JunD differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene* 6, 533-542.

Sabbioni, E. and Marafante, E. (1981). Relations between iron and vanadium metabolism. The exchange of vanadium between transferrin and ferritin. *J Toxicol Environ Health*, 8: 419-429.

Sakai, A. (1997). Orthovanadate, an inhibitor of protein tyrosine phosphatases acts more potently as a promoter than an inhibitor in the BALB/3T3 cell transformation. *Carcinogenesis*, 18:1395-1397.

Sakurai, H., Tamura, H. and Okatani, K. (1995). Mechanism for a new vanadium complex: hydroxyl radical-dependent DNA cleavage by 1,10-phenanthroline-vanadyl complex in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 206: 133-137.

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

Samet, J. M., Graves, L. M., Quay, J. and Dailey, L. A. (1998). Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals. *Am. J. Pneumonol*, 275: L551-L558.

Sanchez, D. J., Colomina, M. T. and Domingo, J. L. (1998). Effects of vanadium on activity and learning in rats. *Physiol Behav.* 63: 345-350.

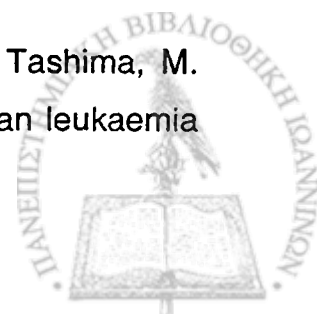
Santana, P., Pena, L.A., Haimovitz-Friedman, A., Martin, S., Green, D. and McLoughlin, M. (1996). Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* 86, 189-199.

Schieven, G. L., Wahl, A. F., Mydral, S., Grosmaire, L. and Ladbetter, J. A. (1995). Lineage-specific induction of B cell apoptosis and altered signal transduction by the phosphotyrosine inhibitor bis(maltolato) oxovanadium (iv). *J. Biol. Chem.* 270:20824-20831.

Shaulian, E. and Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20, 2390-2400.

Shaulian, E. and Karin, M. (2002). AP-1 a regulator at cell life and death. *Nat. Cell Biol.* 4, 131-136.

Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, H., Okano, H., Takeda, Y. and Tashima, M. (1995). Requirement of AP-1 for ceramide-induced apoptosis in human leukaemia HL-60 cells. *J Biol Chem* 270, 27326-27331.



Schinzel, A., Kaufmann, T. and Borner C. (2004). Bcl-2 family members: intracellular targeting, membrane-insertion and changes in subcellular localization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1644(2-3), 95-105.

Schmelz, E. M., Roberts, P. C., Kustin, E.M., Lemonnier, L. A., Sullards, M. C. and Dillehay, D. L. (2001). Modulation of intracellular beta-catenin localization and intestinal tumorigenesis in vivo and in vitro by sphingolipids. *Cancer Res* 61, 6723–6729.

Schorpp–Kistner, M., Wang, Z. O., Angel, P. and Wagner E. F. (1999). Jun B is essential for mammalian placentation *EMBO J.* 18, 934–948.

Schreiber, M., Baumann, B., Cotten, M., Angel, P. and Wagner, E. F. (1995). Fos is an essential component of the mammalian UV response. *EMBO J.* 14, 5338–5349.

Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Mohle–Steinlein, V., Tian, J., Karin, M., Angel, P. and Wanger, E.F. (1999). Control of cell cycle progression by c-Jun is p 53 dependent. *Genes Dev.* 13, 607–619.

Schule, R., Umesono, L., Mangelsdorf, D., Bolado, J., Pike, J.W. and Evans. R. M. (1990). Jun–Fos and receptors for vitamins A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene. *Cell* 61, 497–504.

Schwochaw, C.B., Nath, K.A. and Rosenberg, M.E. (1998). Clusterin protects against oxidative stress in vitro through aggregative and nonaggregative properties. *Kidney Int.* 53, 1647-1653.

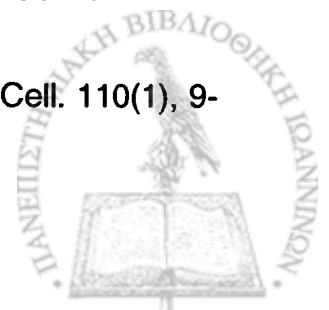
Seger, R. and Krebs, E. (1995). The MARK signaling cascade. *FASEB J.* 9, 726–735.

Selzner, M. (2001). Induction of apoptotic cell death and prevention of tumor growth by ceramide analogues in metastatic human colon cancer. *Cancer Res.* 61, 1233-1240.

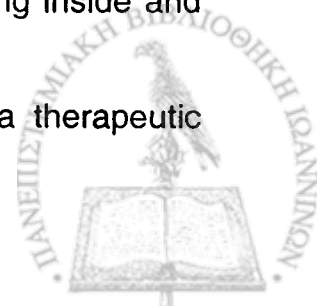
Senchenkov, A., Litvak, D. A. and Cabot, M. C. (2001). Targeting ceramide metabolism—a strategy for overcoming drug resistance. *J Natl cancer inst.* 93, 347–357.

Sensibar, J.A., Sutkwoski, D.M., Raffo, A., Buttyan, R., Griswold, M.D., Sylvester, S.R., Koslowski, J.M. and Leer, K. (1995). Prevention of cell death induced by tumor necrosis factor alpha in LNCaP cells by overexpression of sulfated glycoprotein-2 (clusterin). *Cancer Res.* 55, 2431-2437.

Sharpless, N. E. and De Pinho, R. A (2002). p53: good cop/bad cop. *Cell.* 110(1), 9-12.



- Shechter, Y. and Karlish, S. J. D. (1980). Insulin-like stimulation of glucose oxidation in rat adipocytes by vanadyl (iv) ions. *Nature* 284, 556-558.
- Shemshedini, L., Knauth, R., Sassone-Corsi, P., Porsnon, A. and Gronemeyer, H. (1991). Cell-specific inhibitory and stimulatory effects of Fos and Jun on transcription activation by nuclear receptors. *EMBO J.* 10, 3839–3849.
- Shaulian, E., Schreiber, M., Piu, F., Beeche, M., Wagner, E. F. and Karin, M. (2000). The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53 – imposed growth arrest. *Cell* 103, 897–907.
- Sinha, S., Degenstein, L., Copenhaver, G. and Fuchs, E. (2000). Defining the regulation factors required for epidermal gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2543-2555.
- Sintich, S.M, Steinberg, J., Kozlowski, J.M, Lee, C., Pruden, S., Sayeed, S. and Sensibar, J.A. (1999). Cytotoxic sensitivity to tumor necrosis factor-alpha in PC3 and LNCaP prostatic cancer cells is regulated by extracellular levels of SGP-2 (clusterin). *Prostate* 39, 87-93.
- Smeyne, R. J., Schilling, K., Robertson, L., Luk, D., Oberdick, J., Curran, T. and Morgan, I.J, (1992). Fos-lacZ transgenic mice: mapping sites of gene induction in the central nervous system. *Neuron* 8, 13–23.
- Smeyne, R. J. K., Vendrell, M., Hayward, S. J., Baker, G.G., Miao, K., Schilling, L., Robertson, M., Curran, T. and Morgan, I.J. (1993). Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature (London)* 363, 166–169.
- Smyth, M. L., Obeid, L. M. and Hannun, Y. A. (1997). Ceramide: a novel lipid mediator of apoptosis. *Adv. Pharm* 41, 133–154.
- Solary, E., Bertrand, R. and Pommier, Y. (1994). Apoptosis of human leukemic HL-60 cells induced to differentiate by phorbol ester treatment. *Leukemia* 8, 792–797.
- Sosnowski, R. G., Feldman, S. and Feramisco, J. R (2003). Interference with endogenous ras function inhibits cellular responses to wounding. *J. Cell. Biol.* 121, 113–119.
- Spiegel, S. and Merrill, A. H. (1996). Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J* 10, 1388–1397.
- Spiegel, S. and Milstien, S. (2000). Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. *FEBS Lett* 476, 55–57.
- Spiegel, S. and Kolesnick, R. (2002). Sphingosine1-phosphate as a therapeutic agent. *Leukemia* 16, 1596-1602.



Spiegel, S., and Milstien, S. (2002). Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J Biol Chem.* 277, 25851-25854.

Spyridopoulos, I., Maier, P., Shook, K.S., Alex, D. I., Viebahn, R. and Karsch, K.R. (2001). Loss of cyclin A and G1-cell cycle arrest are a prerequisite of ceramide – induced toxicity in human arterial endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 50 (1): 97-107.

Srinivasan, A., Li, F., Wong, A., Kodandapani, L., Smidt, R.J., Krebs, J.F., Fritz, L.C., Wu, J.C. and Tomaselli, K.J. (1998). Bcl-x<sub>L</sub> functions downstream of caspase-8 to inhibit Fas- and TNF receptor 1- induced apoptosis of MCF7 carcinoma cells. *J. Biol.Chem.* 273, 4523-4529.

Stancovski, I., Gonen, H., Oriam, A., Schwartz, A. L. and Ciechanover, A. (1995). Degradation of the proto-oncogene product c-fos by the ubiquitin proteolytic system in vivo and in vitro: identification and characterization of the conjugating enzymes. *Mol. Cell. Biol.* 15, 7106–7116.

Stewart, C. E. H., Mihai, R. and Holly, J. M. P. (1999). Increased tyrosine kinase activity but not calcium mobilization is required for ceramide-induced apoptosis. *Experimental cell research* 250, 329–338.

Strelow, A., Bernardo, K., Adam-Klages, S., Linke, T., Sandhoff, K. and Kronke, M. (2000). Overexpression of acid ceramidase protects from tumor necrosis factor-induced cell death. *J Exp Med* 192, 601–612.

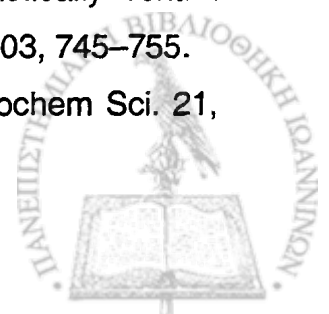
Sugiki, H., Hozumi, Y., Maeshima, H., Katagata, Y., Mitsuhashi, Y. and Kondo, S. (2000). C2-ceramide induces apoptosis in a human squamous cell carcinoma cell line. *Br. J. Dermatol.* 143, 1154-1163.

Sumitomo, M., Ohba, M., Asakuma, J., Asano, T., Kuroki, T., Asano, T. and Hayakawa, M. (2002). Protein kinase C $\delta$  amplifies ceramide formation via mitochondrial signaling in prostate cancer cells. *J. Clin Invest.* 109, 827-386.

Sun, S.Y., Yue, P., Zhou, J.Y., Wang, Y., Kim, H.R., Lotan, R. and Wu, G.C. (2001) Overexpression of *Bcl2* blocks TNF-Related Apoptosis inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in human lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 280, 788-797.

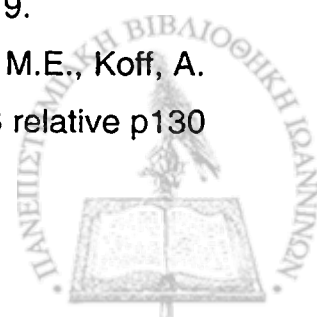
Szabowski, A., Maas – Szabowski, N., Andrecht, S., Kolbus, A., Schorpp-Kistner, M., Fusenig, N. E. and Angel, P. (2000). c-Jun and Jun B antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell* 103, 745–755.

Testi, R. (1996). Sphingomyelin breakdown and cell fate. *Trends Biochem Sci.* 21, 468–471.





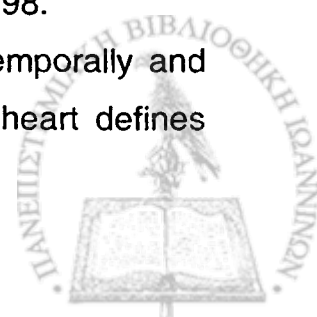
- Tang, D., Okada, H., Ruland, J., Liu, L., Stambolic, V., Mak, T.W. and Ingram, A. J. (2001). Akt is activated in response to an apoptotic signal. *J. Biol. Chem.* 276 (32): 30461-30466.
- Tassiopoulos, A. J., Troganis, A. N., Deligiannakis, Y. and Evangelou, A. (2000). Synthetic analogues for oxovanadium (IV/V)-glutathione interaction: an NMR, EPR, synthetic and structural study of oxovanadium (IV/V) compounds with sulfhydryl-containing pseudopeptides and dipeptides. *J Inorg Biochem.* 79: 159-166.
- Thomas-Salgar, S. and Millis, A. J. (1994). Clusterin expression in differentiating smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 269, 17879–17885.
- Thompson, H.J., Chasteen, N.D. and Meeker, L.D. (1984). Dietary vanadyl (IV) sulfate inhibits chemically-induced mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis* 5, 849-851.
- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998), Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- Tokino, T. and Nakamura, Y. (2000). The role of p53 – target genes in human target genes in human cancer. *Critical Rev. in Oncology/Hematology* 33 (1) 1-6.
- Tombor, B., Rundell, K. and Oltrai, Z.N. (2003). Bcl-2 promotes premature senescence induced by oncogenic Ras. *Biochem. Biophys. Res. CommUn.* 303(3), 800-807.
- Tournier, C., Hess, P., Yang, D. D. Xu, J., Turner, T. K., Nimnual, A., Bar – Sagi, D., Jones, S. N., Flavell, R. A. and Davis R. J. (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288, 870–874.
- Trougakos, I.P. and Gonos, E. S. (2002). Clusterin/Apolipoprotein J in human aging and cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 1430-1448.
- Tsiani, E., Abdullah, N. and Fantus, I. G (1997). Insulin-mimetic agents vanadate and pervanadate stimulate glucose but inhibit amino acid uptake. *Am. J. Physiol.* 272: C156-162.
- Tsiani, E. and Fantus I. G. (1997). Vanadium compounds. Biological actions and potential as pharmacological agents. *Trends Endocrinol Metab.* 8: 51-58.
- Vairo, G., Innes, K. M. and Adams J. M. Bcl-2 has a cell cycle inhibition function separable from its enhancement of cell survival. *Oncogene* 13, 1511-1519.
- Vairo, G, Soos, T. J., Upton, T. M., Zalvide, J., De Caprio, J. A., Ewen, M.E., Koff, A. and Adams. J. M. (2002). Bcl-2 retards cell cycle entry through p27, pRB relative p130 and altered E2F regulation. *Mol. Cell Biol* 20(13), 4745-4753.



- Van der Heiden, M.G., Chandel, N.S., Williamson, E.K., Schumacker, P.T. and Thompson, C.B. (1997). *Cell* 91, 627-637.
- Vaux, D.L. and Strasser, A. (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 2239-2244.
- Vaux, D.L. and Korsmeyer, S.J. (1999). Cell death in development *Cell*. 96, 245-254
- Venable, M. E., Lee, J. Y., Smyth, M. J., Bielawska, A. and Obeid, L. M. (1995). Role of ceramide in cellular senescence. *J. Biol. Chem.* 270, 30701-30708.
- Venable, M.E. and Obeid, L.M. (1999). Phospholipase D in cellular senescence. *Biochim. Biophys. Acta* 1439, 291-298.
- Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., Yao, B., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, M.J., Szabo, E., Zon, L.I., Kyriakis, J.M., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z. and Kolesnick, R.N. (1996). Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 380, 75-79.
- Verrier, B., Muller, D., Bravo, R. and Muller, R. (1986). Wounding a fibroblast monolayer results in the rapid induction of the c-fos proto-oncogene. *EMBO J.* 5, 913–917.
- Vesper, H., Schmelz, E. M., Lynch, D.V. and Merrill, A. H. (1999). Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *129 (7):1239-1250.*
- Viard, I., Wehrli, P., Jornot, L., Bullani, R., Vechietti, J.L, Schifferli, J.A., Tschopp, J. and French, L. (1999). Clusterin gene expression mediates resistance to apoptotic cell death induced by heat shock and oxidative stress. *J. Invest. Dermatol.* 112, 290-296.
- Virgili, F., Santini, M. P., Canali, R., Polakowska, R. R., Harake, A. and Perozzi, G. (1997). Bcl-2 overexpression in the HaCaT cell line is associated with a different membrane fatty acid composition and sensitivity to oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 24, 93-96.
- Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A. J. (2000). Surfing the p 53 network. *Nature* 408, 307–310.
- Vousden, K. H. (2000). p53: death star. *Cell* 103, 691–694.
- Vousden, K. H. (2002). Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1602(1), 47-59
- Vousden, K. H. and Lu, X. (2002). Live or let die: the cells response to p53. *Nat. Rev. Cancer.* 2(8), 594-604.



- Wakita, H., Tokura, Y., Yagi, H., Nishimura, K., Furukawa, F. and Takigawa, M. (1994). Keratinocyte differentiation is induced by cell-permeant ceramides and its proliferation is promoted by sphingosine. *Arch. Dermatol. Res.* 286, 350–354.
- Wang, X., Martindale, J. L., Liu, Y. and Holbrook, J. N. (1998). The cellular response to oxidative stress: Influences of mitogen-activated protein kinase signaling pathways on cell survival. *Biochem J.* 333:291-300.
- Watson, N.C., Di, Y.M., Orr, M.S., Fornari, F.A., Randolph, J.K., Magnet, K.J., Jain, P.T. and Gewirtz, D.A. (1997). Influence of ionizing radiation on proliferation, c-myc expression and the induction of apoptotic cell death in two breast tumour cell lines
- Wegrowski, Y., Perreau, C., Martiny, L., Haye, B., Maguart, F.X. and Bellon, G. (1999). Transforming growth factor beta-1 up-regulates clusterin synthesis in thyroid epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 247, 475-483.
- Wehrli, P., Charnay, Y. and Vallet, P. (2001). Inhibition of post-ischemic brain injury by clusterin overexpression. *Nat. Med.* 7, 977-979.
- Welter, J. F. and Eckert, R. L. (1995). Differential expression of the fos and jun family members c-fos, fos B, Fra-1, Fra-2, c-jun, jun B and D during human epidermal keratinocyte differentiation. *Oncogene.* 11, 2681–2687.
- Whitmarsh, A. and Davis, R. J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.* 74, 589–607.
- Whitmarsh, A. J. and Davis, R. J. (2000). A central control for cell growth. *Nature* 403, 255–256.
- Wieprecht, V.M., Riebeling, C., Stooss, A., Orfanos, C.E. and Geilen, C. (2000). *Bcl-2* transfected HaCaT keratinocytes resist apoptotic signals of ceramides, tumor necrosis factor  $\alpha$  and 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Arch. Dermatol. Res.* 292, 455-462.
- Wilson, T. and Treisman, R. (1988) Fos c-terminal mutations block down-regulation of c-fos transcription following serum stimulation. *EMBO J.* 7, 4193-4202.
- Wilson, M.R. and Easterbrook-Smith, K. (2000). Clusterin is a secreted mammalian chaperone. *Trends Biochem. Sci.* 25, 95-98.
- Wisdom, R., Johnson, R. and Moore, C. (1999). c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J.* 18, 189–198.
- Witte, D. P., Aronow, B. J., Dry, J. K. and Harmony, J.A. (1994). Temporally and spatially restricted expression of apolipoprotein J in the developing heart defines discrete stages of valve morphogenesis. *Dev. Dyn.* 201, 290–296.



- Wolff, R. A., Dobrowski, R. T., Kamibayashi, C., Mumby, M. C. and Hannun, Y. A. (1993). Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction. *J. Biol. Chem.* 268, 15523-15530.
- Wyllie, A. H. and Morries, R. G. (1985). Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death. *Immunology.* 56, 351–358.
- Wyllie, A. H. (1986). What is apoptosis? *Histopathology.* 10, 995–998.
- Wyllie, F. S., Haughton, M. F., Rowson, J. M. and Wynfond-Thomas, D. (1999). Human thyroid cancer cells on a source of iso-genic, iso-phenotypic cell lines with or without functional p53 *Br. J. Cancer* 79, 1111-1120.
- Yang, C-R., Yeh, S., Leskov, K., Odegaard, E., Hsu, H-L., Chang, C., Kinsella, T. J., Chen, D. J. and Boothman D. (1999). Isolation of Ku70-binding proteins (KUBs). *Nucleic Acids Res.* 27, 2165-2174.
- Yang, C-R., Leskov, K., Hosley-Eberlein, K., Criswell, T., Pink, J. J., Kinsella, T. J. and Boothman, D. (2000). Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 5907-5912.
- Yang, C. R., Wilson–Van, Patten, G., Planchon, S. M., Wuerzberger–Davis, S. M., Davis, T. W., Cuthill, S., Miyamoto, S. and Boothman, D. A. (2000). Coordinate modulation of Sp1, NF–κB, and p53 in confluent human malignant melanoma cells after ionizing radiation *FASEB J.* 14, 379–390.
- Ye, J., Ding, M., Leonard, S.S., Robinson, V.A., Millechia, L., Zhang, X., Castranona, V., Vallyathan, V. and Shi, X. (1999). Vanadate induces apoptosis in epidermal JB6P<sup>+</sup> cells via hydrogen peroxide-mediated reactions. *Mol. Cell. Biochem.* 202, 9-7.
- Yuspa, S. H. (1994). The pathogenesis of squamous cell cancer: Lessons learned from studies of skin carcinogenesis. Thirty–third G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* 54, 1178–1189.
- Zhan, Y., van de Water, B., Wang, Y. and Stevens J.V (1999). The roles of caspase –3 and Bcl-2 in chemically induced apoptosis but not necrosis of renal epithelial cells. *Oncogene* 18 (47) 6505-6512.
- Zhang, J., Alter, N., Reed, J.C., Borner, C., Obeid, L.M. and Hannun, Y.A. (1996). Bcl-2 interrupts the ceramide-mediated pathway of cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 5325-5328.
- Zhang, L. (2000). Role of bax in the apoptotic response to anticancer agents. *Science* 290, 989–992.



Zhu, W., Cavei, A., Wasty, G. W., Pech, L.Z., Leber, B. and Andrews, D. W. (1996) Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *EMBO J.* 15, 4130-4141

Zoumpourlis, V., Papassava, P., Linardopoulos, S., Gillespie, D., Balmain, A. and Pintzas, A. (2000). High levels of phosphorylated c-Jun, Fra-1, Fra-2 and ATF-2 proteins correlate with malignant phenotypes in the multistage mouse skin carcinogenesis model. *Oncogene* 19, 4011-4021.

Zundel, W. and Giaccia, A. (1998). Inhibitor of the anti-apoptotic PI(3)K/Akt/Bad pathway by stress. *Genes Dev.* 12, 1941-1946.



