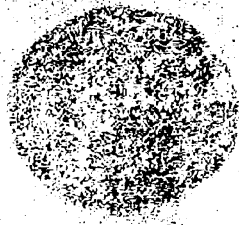


ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000265275





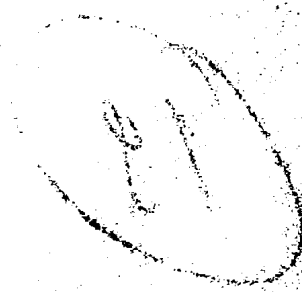
19

... KATHI ENIMEN THE ...
... KAI TOY ...
... XIMATIMOTY

... ATATA ...



Αρ. υπ. 1937 2008



School
of



Medicine

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

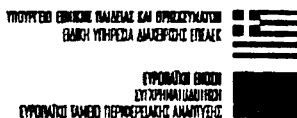
ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ & ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘ. ΑΓΓ. ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ

**ΟΓΚΟΓΟΝΟ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ:
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΟΓΚΟΓΟΝΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ, ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ
ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ**

ΣΟΥΛΤΑΝΑ ΜΑΡΚΟΠΟΥΛΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2006



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



Ημερομηνία αίτησης: 2-10-2002

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 484α/15-10-2002

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Χαραλαμπίδης Κωνσταντίνος Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Ευαγγέλου Άγγελος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τζαβάρας Θεόδωρος, Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής 485^α/12-11-2002

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Κωλέττας Ευάγγελος Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Ευαγγέλου Άγγελος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τζαβάρας Θεόδωρος, Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 18-10-2002

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 592^α/24-10-2006

Ευαγγέλου Άγγελος, Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καναβάρος Παναγιώτης Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει κα την Ιστολογία-Εμβρυολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μαλάμου -Μήτση Βασιλική , Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καλφακάκου Βασιλική , Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κούκλης Παναγιώτης , Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



Κωλέττας Ευάγγελος,

Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας, με ιδιαίτερη
έμφαση στην επιδημιολογία Ιατρικής Σχολής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τζαβάρας Θεόδωρος

Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής
Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 22-11-2006

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Επαμεινώνδας Τσιάνος

Καθηγητής Παθολογίας



**Στους γονείς μου
Γιώργο και Ζωή**



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες προς τον Επίκουρο Καθηγητή κύριο Ευάγγελο Κωλέττα για την ανάθεση του θέματος της διατριβής, την πολύπλευρη στήριξη και την αμέριστη συμπαράστασή του καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης. Το Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Καθηγητή κύριο Άγγελο Ευαγγέλου και τον Επίκουρο Καθηγητή Γενικής Βιολογίας κύριο Θεόδωρο Τζαβάρα, μέλη της συμβουλευτικής μου επιτροπής για τη στήριξη και το ενδιαφέρον τους για την εξέλιξη της διατριβής.

Απευθύνω τις ευχαριστίες μου για τα την συμβολή τους στην επιτυχή έκβαση της διατριβής στα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, την Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας κυρία Βασιλική Μαλάμου-Μήτση, τον Καθηγητή Ανατομίας και Ιστολογίας-Εμβρυολογίας κύριο Παναγιώτη Καναβάρο την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κυρία Βασιλική Καλφακάκου και τον Επίκουρο Καθηγητή Γενικής Βιολογίας κύριο Παναγιώτη Κούκλη.

Ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη ΔΕΠ και ΕΤΕΠ του εργαστηρίου Φυσιολογίας για τη βοήθεια και τη φιλική συμπεριφορά τους, καθώς και την κυρία Χριστίνα Μπάτση για τη συνεργασία και τη συμπαράσταση της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τις συναδέλφους κυρία Αγγελική Δασούλα και κυρία Αθανασία Σαλμά τόσο για την ηθική στήριξη όσο και για τη βοήθεια που μου παρείχαν όποτε τους ζητήθηκε.

Ευχαριστώ τον ερευνητή του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών κύριο Βασίλη Ζουμπουρλή για τη βοήθεια του στα πειράματα των αθυμικών επίμυων.

Η εργασία αυτή συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση, στα πλαίσια του προγράμματος με τίτλο «Ηράκλειτος», του προγράμματος ΕΠΕΑΕΚ II του 3^{ου} Κοινοτικού Πλαισίου Στήριξης του ΥΠ.Ε.Π.Θ., με χρηματοδότηση κατά 25% από εθνικούς πόρους και κατά 75% από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ),

This research was co-funded by the European Union in the framework of the program "Heraklitos" of the "Operational Program for Education and Initial Vocational Training" of the 3rd Community Support Framework of the Hellenic Ministry of Education, funded by 25% from national sources and by 75% from the European Social Fund (ESF).



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

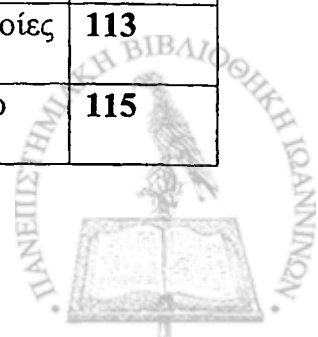
1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	Προοίμιο	1
1.2	Ογκογονίδια	1
1.3	Ογκοκατασταλτικά γονίδια	6
1.4	Ογκογόνο στρες	9
1.5	Κυτταρική γήρανση	19
1.6	Πορεία απόκρισης σε βλάβες του DNA	13
1.7	Απόπτωση	16
1.8	Κυτταρικός μετασχηματισμός	19
1.9	hTERT	20
1.10	Δομή και λειτουργία του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53	21
1.11	Ras	26
1.12	Σκοπός της διατριβής	29
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	31
	Υλικά	31
2.1	Βακτηριακές τεχνικές	32
2.1.1	Παρασκευή L-broth (Luria-Bertani; LB) και τριβλίων με L-άγαρ (L- agar)	32
2.1.2	Παρασκευή βακτηρίων επιδεκτικών προς μετασχηματισμό (competent cells)	32
2.1.3	Μετασχηματισμός βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA	34
2.1.4	Ανάπτυξη υγρών καλλιεργειών βακτηρίων	34
2.1.5	Παρασκευή βακτηρισκών αποθεμάτων γλυκερόλης	35
2.1.6	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρούς όγκους (mini-prep)	35
2.1.7	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλους όγκους (maxi prep)	36
2.2	Κυτταρική καλλιέργεια	37
2.2.1	Κυτταρικές σειρές και καλλιέργεια	37
2.2.2	Ανακαλλιέργεια κυττάρων	38



2.2.3	Διατήρηση των κυττάρων - Πάγωμα κυττάρων	39
2.2.4	Ανασύσταση κυττάρων - Ξεπάγωμα κυττάρων	40
2.2.5	Καταμέτρηση κυττάρων με το αιμοκυτταρόμετρο	40
2.2.6	Χρώση κυττάρων με κρυσταλλικό ιώδες	40
2.2.7	Καμπύλες αύξησης	41
2.2.8	Χρώση για την ανίχνευση της β-γαλακτοσιδάσης	41
2.3	Απομόνωση και ανάλυση νουκλεϊκών οξέων	42
2.3.1	Απομόνωση χαμηλού μοριακού βάρους γενωμικού DNA	42
2.3.2	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης	43
2.3.3	Κοπή πλασμιδίων με περιοριστικά ένζυμα	45
2.3.4	Ανάκτηση τμημάτων DNA από πηκτή αгарόζης με ηλεκτροδιήθηση	45
2.3.5	Παρασκευή μεμβρανών διαπίδησης (dialysis tubing)	46
2.3.6	Αποφωσφορυλίωση του DNA	47
2.3.7	Σύνδεση τμημάτων DNA	47
2.4	Απομόνωση και ανάλυση πρωτεϊνών	48
2.4.1	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	49
2.4.2	Χρώση της πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου	51
2.4.3	Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσο-αποτύπωμα κατά Western (Western blot)	51
2.5	Εισαγωγή γονιδίων σε κύτταρα θηλαστικών	53
2.5.1	Ρετροϊικοί φορείς (Retroviral vectors)	53
2.5.2	Παραγωγή ρετροϊών με διαμόλυνση DNA	59
2.6	Τεχνικές προσδιορισμού του μετασχηματισμού των κυττάρων	61
2.6.1	<i>In vitro</i> τεχνικές προσδιορισμού του μετασχηματισμού.	61
2.6.2	<i>In vivo</i> τεχνικές προσδιορισμού του μετασχηματισμού.	62
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	63



ΕΝΟΤΗΤΑ Ι ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ MRC-5 ΠΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΟΥΝ <i>hTERT</i>, <i>Ha-RasV12</i> ή/και <i>p53^{143ala}</i>		
3.1	Σχεδιασμός πειραματικής μελέτης.	63
3.2	Κατασκευή κυττάρων που εκφράζουν <i>hTERT</i> , ογκογόνο <i>Ha-RasV12</i> ή/και <i>p53^{143ala}</i>	66
ΕΝΟΤΗΤΑ ΙΙ: ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ <i>Ha-RasV12</i> ή/και <i>p53^{143ala}</i> ΣΤΙΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ MRC-5		
3.3	Το ογκογόνο <i>Ha-Ras</i> δεν προκάλεσε την πρόωρη κυτταρική γήρανση των ινοβλαστών MRC-5	69
3.4	Οι επιδράσεις του ογκογόνου <i>Ha-RasV12</i> και της μεταλλαγμένης μορφής της <i>p53</i> , <i>p53^{143ala}</i> , στις ιδιότητες αύξησης των ινοβλαστών MRC-5	71
3.5	Οι επιδράσεις του ογκογόνου <i>Ha-RasV12</i> ή/και της <i>p53^{143ala}</i> στην έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου των MRC-5	76
3.6	Ρύθμιση της έκφρασης της <i>Cdc6</i> από το <i>Ha-RasV12</i> ή/και <i>p53^{143ala}</i> και οι επιδράσεις της στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών MRC-5	80
3.7	Οι επιδράσεις του ογκογόνου <i>Ha-RasV12</i> ή/και της <i>p53^{143ala}</i> στις αποκρίσεις των MRC-5 σε βλάβες στο DNA	82
3.8	Το <i>Ha-RasV12</i> και η <i>p53^{143ala}</i> δρουν συνεργειακά και επάγουν έναν αποπτωτικό φαινότυπο υπεύθυνο για τον περιορισμό των κυτταρικών διαιρέσεων των ινοβλαστών MRC-5	86
3.9	Ιδιότητες μετασχηματισμού των ινοβλαστών MRC-5 που υπερεκφράζανε <i>Ha-RasV12</i> ή/και <i>p53^{143ala}</i>	90
ΕΝΟΤΗΤΑ ΙΙΙ: ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ <i>Ha-RasV12</i> ή/και <i>p53^{143ala}</i> ΣΤΙΣ ΤΕΛΟΜΕΡΙΣΜΕΝΕΣ ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ MRC-5TERT		
3.10	Οι επιδράσεις του ογκογόνου <i>Ha-RasV12</i> και της μεταλλαγμένης μορφής της <i>p53</i> , <i>p53^{143ala}</i> , στις ιδιότητες αύξησης των ινοβλαστών MRC-5TERT	93
3.11	Οι επιδράσεις του ογκογόνου <i>Ha-RasV12</i> και της <i>p53^{143ala}</i> στην έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου των ινοβλαστών MRC-5TERT	99
3.12	Έκφραση της <i>Cdc6</i> και οι επιδράσεις της στις ινοβλάστες MRC-5TERT	102
3.13	Το ογκογόνο <i>Ha-RasV12</i> επήγαγε την πορεία απόκρισης βλαβών DNA, η οποία κατεστάλη από την <i>p53^{143ala}</i> στις ινοβλάστες MRC-5TERT	105
3.14	Η υπερέκφραση της <i>p53^{143ala}</i> κατέστειλε την απόπτωση των ινοβλαστών MRC-5TERT που επάχθηκε από το ογκογόνο <i>Ha-RasV12</i>	109
3.15	Χαρακτηρισμός ινοβλαστών MRC-5TERT στις οποίες μειορρυθμίστηκε η ενδογενής αγρίου-τύπου <i>p53</i>	113
3.16	Ιδιότητες μετασχηματισμού των ινοβλαστών MRC-5TERT που υπερέκφραζαν <i>Ha-RasV12</i> ή/και <i>p53^{143ala}</i>	115



	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	121
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	131
	ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ	133
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	141
	ΣΧΗΜΑΤΑ	151
	ΠΙΝΑΚΕΣ	153



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Προοίμιο

Τα φυσιολογικά κύτταρα διαθέτουν αμυντικούς μηχανισμούς οι οποίοι στοχεύουν στην ελαχιστοποίηση των καταστροφικών αποτελεσμάτων των μεταλλάξεων. Οι προστατευτικοί μηχανισμοί εμφανίζονται ως αντί-πολλαπλασιαστικές αποκρίσεις (διακοπή της αύξησης ή πρόωρη γήρανση και απόπτωση) σε υπερβολικά μιτογόνα μηνύματα ή σε ογκογόνο στρες. Η καρκινογένεση αποτελεί μια σταδιακή συσσώρευση γενετικών αλλαγών οι οποίες εξαλείφουν τους ομοιοστατικούς μηχανισμούς που εποπτεύουν την κυτταρική αύξηση (Hahn 2002, Garrett and Mittnacht 2005). Τα γονίδια των οποίων οι μεταλλάξεις συνεισφέρουν στο νεοπλασματικό μετασχηματισμό διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, 1) στα ογκογονίδια, των οποίων η φυσιολογική λειτουργία ενεργοποιείται ανεξέλεγκτα από μία μετάλλαξη και 2) στα ογκο-κατασταλτικά γονίδια των οποίων η φυσιολογική λειτουργία καταστέλλει την ογκογένεση.

1.2 Ογκογονίδια

Μία από τις δύο κατηγορίες γονιδίων των οποίων η γενετική μεταλλαγή μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό μετασχηματισμό και ογκογένεση είναι τα ογκογονίδια (oncogenes). Η ανακάλυψη τους πραγματοποιήθηκε μέσω της μελέτης ρετροϊών στους οποίους συγκεκριμένα γονίδια ταυτοποιήθηκαν ως υπεύθυνα για το μετασχηματισμό των ξενιστών. Περαιτέρω μελέτες οδήγησαν στην ανεύρεση ομόλογων ογκογονιδίων σε ευκαρυωτικά κύτταρα τα οποία ονομάστηκαν πρώτο-ογκογονίδια (proto-oncogenes). Για τον ευκρινέστερο διαχωρισμό μεταξύ των ιϊκών ογκογονιδίων και των κυτταρικών ομολόγων τους υιοθετήθηκαν οι όροι v-onc (viral oncogenes) και c-onc (cellular oncogenes) αντίστοιχα.

Οι σημαντικότερες λειτουργικές κατηγορίες των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα ογκογονίδια είναι:

- 1) Αυξητικοί παράγοντες (growth factors).
- 2) Υποδοχείς αυξητικών παραγόντων (growth factor receptors)
- 3) Κινάσες που φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα τυροσίνης (tyrosine specific protein kinases)
- 4) Κινάσες σερίνης/θρεονίνης (serine/threonine kinases)
- 5) Μεταγραφικοί παράγοντες (transcription factors)

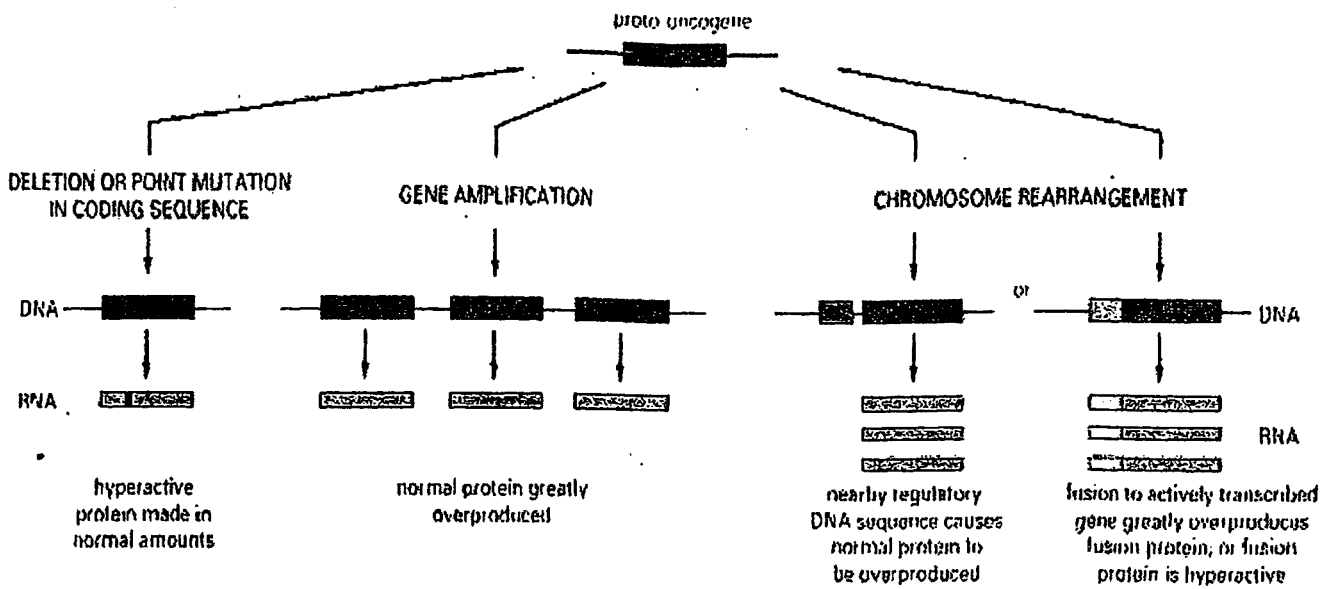


Οι φυσιολογικές λειτουργίες των κυτταρικών ογκογονιδίων περιλαμβάνουν τη ρύθμιση της απόπτωσης, της γήρανσης, του κυτταρικού κύκλου καθώς και της κυτταρικής αύξησης. Τα παραπάνω καταδεικνύουν τον ζωτικό ρόλο των πρώτο-ογκογονιδίων και συνεπώς τις σοβαρές συνέπειες των πιθανών δυσλειτουργιών τους. Οι μηχανισμοί μετατροπής (Σχήμα 1) ενός σημαντικού για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης πρώτο-ογκογονιδίου σε ενεργό ογκογονίδιο εμπλεκόμενο στην καρκινογένεση περιλαμβάνουν: *σημειακή μετάλλαξη* (c-ras), *απάλειψη* (c-erb B), *μετατόπιση* (c-myc, c-abl), *αμοιβαία μετατόπιση* (c-myc), *γονιδιακή ενίσχυση* (c-myc). Οι τροποποιήσεις αυτές οδηγούν στην ενεργοποίηση των ογκογονιδίων η οποία χαρακτηρίζεται ως κέρδος λειτουργίας (gain of function). Η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων μπορεί ακόμα να γίνει μέσω της ενσωμάτωσης ρετροϊκού γενετικού υλικού, κυρίως της περιοχής LTR (Long Terminal Repeat). Η LTR περιέχει έναν ισχυρό προαγωγέα ο οποίος ευθύνεται για την υπερέκφραση πολλών κυτταρικών ογκογονιδίων (c-myc, c-mos, c-erbB).

Ενεργοποιημένα ογκογονίδια έχουν ανιχνευθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου (Bos 1989, Field and Spandidos 1990, Caldeira et al. 2003). Η βιβλιογραφία προσφέρει πολλά παραδείγματα της δράσης των ενεργών ογκογονιδίων στην καρκινογένεση. Ιικές ογκοπρωτείνες όπως το μεγάλο αντιγόνο T του Simian Virus 40 (SV40), η πρωτεΐνη E1a του αδενοϊού και η πρωτεΐνη E7 του ιού του ανθρώπινου θηλώματος, απενεργοποιούν το ογκοκατασταλτικό γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (Rb) υποβοηθώντας έτσι την αθανатоποίηση των κυττάρων (Jansen-Durr 1996, Yeager and Reddel 1999).

Ένα ακόμη παράδειγμα είναι το ογκογονίδιο Bmi-1 το οποίο ανήκει στην οικογένεια Polycomb και δρα ως απενεργοποιητής της χρωματίνης. Υπερέκφραση του Bmi-1 οδήγησε στην ανάπτυξη λευχαιμίας σε ποντίκια. Η ογκογόνος δράση του είναι πιθανό αποτέλεσμα της καταστολής της έκφρασης δύο γονιδίων που επάγουν την γήρανση, των p16 και ARF (Jacobs et al. 1999). Πιο πρόσφατες έρευνες αναφέρουν την έκφραση της bmi-1 σε αρκετές περιπτώσεις μη-μικροκυτταρικού καρκινώματος του πνεύμονα (Vonlanthen 2001), σε κυτταρικές σειρές καρκινώματος του μαστού καθώς και σε αθανатоποιημένα επιθηλιακά





Σχήμα 1. Τρόποι μετατροπής ενός ογκογονιδίου σε ενεργό ογκογονίδιο



κύτταρα μαστού (Dimigi 2002). Το πρώτο-ογκογονίδιο Bcl-2 ανακαλύφθηκε στη θέση χρωμοσωμικής θραύσης t(14;18) στο θυλακιώδες (οζώδες) B-κυτταρικό λέμφωμα (Bakhshi et al. 1985, Cleary and Sklar 1985, Tsujimoto et al. 1985). Οι μελέτες που ακολούθησαν έδειξαν ότι το Bcl-2 ανήκει σε μία κατηγορία ογκογονιδίων τα οποία ρυθμίζουν την απόπτωση. Συγκεκριμένα το Bcl-2 ρυθμίζει την διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης και επιδεικνύει αντι-αποπτωτική δράση (Antonsson and Martinou 2000, Gross et al. 2000). Η ογκογόνος δράση του οφείλεται στην καταστολή της απόπτωσης που προκαλεί η υπερέκφραση του Bcl-2 και έχει ως συνέπεια την αυξημένη επιβίωση των B-κυττάρων (McDonnell et al. 1989).

Το ras είναι το πλέον συχνά ενεργοποιημένο ογκογονίδιο σε ανθρώπινους όγκους (Bos 1989). Το φυσιολογικό προϊόν του είναι μια G πρωτεΐνη με μεμβρανική εντόπιση η οποία επιδρά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καθώς και στην προαγωγή και καταστολή της απόπτωσης (Vermeulen et al. 2003). Πειραματικές μελέτες σε κύτταρα ποντικού κατέδειξαν την ικανότητα του ογκογόνου Ras να προκαλεί μετασχηματισμό μέσω της αυτόματης αθανατοποίησης (Newbold and Overell 1983). Όμως, η ογκογόνος δράση του οφείλεται κυρίως, στη συνέργεια με άλλα ογκογονίδια όπως τα c-myc και SV40 LT (Weinberg 1989, Weinberg 1989, Serrano et al. 1997). Το πρώτο-ογκογονίδιο c-myc κωδικοποιεί μία πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη η οποία ενεργεί ως μεταγραφικός παράγοντας και η δράση του σχετίζεται με την απόπτωση, την κυτταρική αύξηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Vermeulen et al. 2003). *In vitro* και *in vivo* μελέτες, συμπεραίνουν ότι η ογκογονικότητα του c-myc συμμετέχει στην δημιουργία όγκων μέσω της ανεξέλεγκτης κυτταρικής αύξησης και της απώλειας της τελικής διαφοροποίησης που προκαλεί (Pelengaris et al. 2002).

Ανάλογα με την εντόπιση των γονιδιακών προϊόντων τους τα περισσότερα ογκογονίδια κατατάσσονται σε δυο κατηγορίες, κυτταροπλασματικά ογκογονίδια και πυρηνικά ογκογονίδια (Land et al. 1983, Weinberg 1985, Land et al. 1986). Η πρώτη κατηγορία κωδικοποιεί κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και περιλαμβάνει τα ογκογονίδια Ras, Abl, Src, ErbB1, ErbB-2, sis, fms and Bcl-2. Τα ογκογονίδια της δεύτερης κατηγορίας κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εντοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου και περιλαμβάνουν την οικογένεια myc, fos, jun, myb και τα ήικά ογκογονίδια SV40 LT και E1A του αδενοϊού (Πίνακας 1).



Πίνακας 1. Κυτταρικά ογκογονίδια

Γονίδιο	Βιοχημική λειτουργία	Πρωτεϊνική/Γονιδιακή κατηγορία
c-met	Υποδοχέας του ηπατοκυτταρικού αυξητικού παράγοντα	Κυτταροπλασματικές Ογκοπρωτεΐνες
sis	β-αλυσίδα του PDGF	
erbB	Υποδοχέας του EGF	
fms	Πρωτεϊνική κινάση ειδική για κατάλοιπα τυροσίνης	
Ha-ras1 Ki-ras 2 N-ras	Μεταγωγέας σήματος, πρωτεΐνη πρόσδεσης με GTP	Πυρηνικές Ογκοπρωτεΐνες
abl	Μεταγωγέας σήματος, Πρωτεϊνική κινάση ειδική για κατάλοιπα τυροσίνης	
src	Μεταγωγέας σήματος, Πρωτεϊνική κινάση ειδική για κατάλοιπα τυροσίνης	
bcl-2	Πρωτεΐνη της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνη	
erbA	Ορμονικός υποδοχέας της τριωδοθειονίνης	
fos jun	Πρωτεΐνες πρόσδεσης στο DNA	
myc	Πρωτεΐνη πρόσδεσης στο DNA, μεταγραφικός παράγοντας	

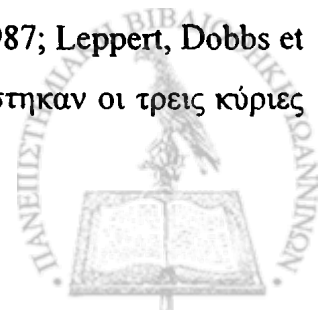


Τα περισσότερα πυρηνικά ογκογονίδια έχουν την ικανότητα να «αθανατοποιούν» τα κύτταρα στα οποία είναι ενεργά αλλά δεν επηρεάζουν σημαντικά την αναγκαιότητα προσκόλλησης και τη μορφολογία των κυττάρων. Αντιθέτως τα κυτταροπλασματικά ογκογονίδια είναι λιγότερο αποτελεσματικά στην αθανατοποίηση των κυττάρων. Επηρεάζουν όμως ισχυρά τις μορφολογικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά τον μετασχηματισμό και συνδράμουν στην άρση της αναγκαιότητας προσκόλλησης των καλλιεργούμενων κυττάρων σε στερεή επιφάνεια. Η συνέργεια μεταξύ πυρηνικών και κυτταροπλασματικών ογκογονιδίων μπορεί να επιφέρει το νεοπλασματικό μετασχηματισμό. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η συνέργεια του c-myc με το Ras στον μετασχηματισμό εμβρυικών ινοβλαστών αρουραίου (Land, Chen et al. 1986) όπως και η συνέργεια Ras, c-Myc και SV40 LT για το μετασχηματισμό ανθρώπινων κυττάρων (Hahn and Weinberg 2002; Hahn and Weinberg 2002). Το c-Myc συνεργάζεται επίσης με το Bcl2 όπως έχει βρεθεί μετά από την έκφραση τους σε διαγονιδιακά ποντίκια όπου επιτάχυναν το ρυθμό ανάπτυξης λεμφώματος (Strasser, Harris et al. 1990).

1.3. Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Η δεύτερη κατηγορία γονιδίων τα οποία ρυθμίζουν βασικές κυτταρικές λειτουργίες και εμπλέκονται στις διαδικασίες της ογκογένεσης είναι τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα σημαντικότερα από τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Τα ογκοκατασταλτικά ελέγχουν μία σειρά από κυτταρικές δραστηριότητες όπως, τις αποκρίσεις των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, την ανίχνευση και επιδιόρθωση των βλαβών του DNA, την ουβικιτίνωση και αποδόμηση των πρωτεϊνών, τη μιτογόνο σηματοδότηση, κυτταρική ειδίκευση, τη διαφοροποίηση και μετανάστευση και την αγγειογένεση των όγκων (Sherr 2004).

Η ανακάλυψη των ογκογονιδίων πυροδότησε την υπόθεση πως υπάρχει μία κατηγορία ογκοκατασταλτικών γονιδίων και έδωσε το έναυσμα για τα πρώτα πειράματα σύντηξης σωματικών κυττάρων και χρωμοσωμικού διαχωρισμού που επιβεβαίωσαν την υπόθεση αυτή (Harris, Sidebottom et al. 1969; Stanbridge 1976). Τα ευρήματα αυτά ενισχύθηκαν από τη μελέτη των κληρονομικών καρκίνων όπως το ρετινοβλάστωμα (Knudson 1971; Knudson, Meadows et al. 1976; Benedict, Murphee et al. 1983), ο όγκος του Wilm (Benedict, Srivatsan et al. 1987) και οικογενής πολυποδίαση (FAP) (Bodmer, Bailey et al. 1987; Leppert, Dobbs et al. 1987). Με βάση το σύνολο των προαναφερθεισών μελετών καθορίστηκαν οι τρεις κύριες ιδιότητες των τυπικών ογκοκατασταλτικών γονιδίων:



Πίνακας 2. Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Γονίδιο	Βιοχημική λειτουργία	Παθολογική κατάσταση
Rb1	Φωσφοπρωτεΐνη, ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου	Ρετινοβλάστομα, Οστεοσάρκωμα
P53	Φωσφοπρωτεΐνη, ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου	Σύνδρομο Li-Fraumeni
FAP		Καρκίνωμα παχέως εντέρου
WT1	Πρωτεΐνη ρυθμιστής της μεταγραφής	Όγκος του Wilm



1. Τα γονίδια αυτά είναι υποτελή και στους όγκους απενεργοποιούνται και τα δύο αλληλόμορφα.
2. Ένα κληρονομούμενο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο αυξάνει τις πιθανότητες ανάπτυξης όγκου διότι μόνο μία ακόμη μετάλλαξη θα οδηγήσει στην ολοκληρωτική απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου.
3. Το ίδιο γονίδιο είναι συχνά απενεργοποιημένο σε σποραδικούς καρκίνους (Sherr 2004).

Πρόσφατα έχει περιγραφεί μία καινούργια κατηγορία ογκοκατασταλτικών γονιδίων τα οποία χαρακτηρίζονται ως απλο-ανεπαρκή (haplo-insufficient). Ο όρος αυτός περιγράφει περιπτώσεις γονιδίων όπου η λειτουργική απώλεια του ενός αλληλόμορφου παρέχει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα για ανάπτυξη όγκου. Ένα τέτοιο ογκοκατασταλτικό γονίδιο είναι ο αναστολέας της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης (inhibitor of cyclin-dependent kinase; *ckI*), *p27^{kip1}*.

Το πλέον γνωστό ογκοκατασταλτικό γονίδιο είναι το *p53* το οποίο εμφανίζει τη μεγαλύτερη συχνότητα απενεργοποίησης στους καρκίνους στον άνθρωπο (Olivier, Eeles et al. 2002). Εκτενέστερη αναφορά για το *p53* γίνεται στο κεφάλαιο 1.8. Το πρώτο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που χαρακτηρίστηκε είναι το γονίδιο του αμφιβληστροειδοβλαστώματος (ρετινοβλαστώματος) (Knudson 1971; Knudson, Meadows et al. 1976). Στην ανακάλυψη του οδήγησαν οι παρατηρήσεις του παιδίατρου Knudson σε κληρονομικούς καρκίνους της παιδικής ηλικίας. Ο ίδιος διατύπωσε την άποψη πως το ρετινοβλάστωμα οφείλεται σε δύο μεταλλάξεις και τουλάχιστον η μία κληρονομείται μέσω της βλαστικής σειράς. Οι μελέτες που ακολούθησαν οδήγησαν στην κλωνοποίηση και στον αναλυτικότερο χαρακτηρισμό του γονιδίου (Cavenee, Dryja et al. 1983). Σήμερα γνωρίζουμε πως το *Rb* είναι μέλος μίας οικογένειας γονιδίων με άλλα δύο μέλη το *p107* και το *p130* τα οποία ρυθμίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, την απόπτωση και την κυτταρική διαφοροποίηση. Οι πρωτεΐνες *Rb* μέσω τις πρόσδεσης τους με μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι *E2F* ελέγχουν την έκφραση πολλών γονιδίων τα οποία συντονίζουν το μεταβολισμό και την αντιγραφή του DNA καθώς και τη μετάβαση από τη *G1* στην *S* φάση του κυτταρικού κύκλου. Οι πρωτεΐνες *Rb* και *p53* ρυθμίζουν σημεία κυτταρικού ελέγχου. Μιτογόνα σήματα ενεργοποιούν τις εξαρτώμενες από την κυκλίνη *D* κινάσες οι οποίες φωσφορυλιώνουν τις πρωτεΐνες *Rb*, *p107* και προωθούν την είσοδο των κυττάρων στη φάση *S*. Ο αναστολέας της *cdk2*, *p27^{kip1}* ο οποίος εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στη φάση *G0* φωσφορυλιώνεται από την κυκλίνη *E-cdk2* στο τέλος της *G1* και αποδομείται μόλις τα κύτταρα εισέλθουν στη φάση *S*. Συνεχόμενα ογκογόνα σήματα ενεργοποιούν τον γονιδιακό τόπο *INK4a/ARF* ο οποίος

κωδικοποιεί τα γονίδια p16^{INK4a} και ARF (p14^{ARF} στους ανθρώπους). Το p16^{INK4a} ανταγωνίζεται τις εξαρτώμενες από την κυκλίνη D κινάσες, ενεργοποιεί το Rb και αποτρέπει την είσοδο του κυττάρου στη φάση S. Το Mdm2 είναι ένα επαγόμενο από το p53 γονίδιο και ο ρόλος του είναι η επαγωγή της απόδομησης της p53. Η p14^{ARF} αναστέλλει τη δράση της Mdm2 οδηγώντας το κύτταρο είτε σε εξαρτώμενη από το p53 απόπτωση είτε σε επαγωγή του αναστολέα της cdk2, p21^{Cip1/Kip1} και σε εξαρτώμενη από την pRb παύση του κυτταρικού κύκλου. Κυτταρικά σήματα προερχόμενα από βλάβες του DNA ενεργοποιούν το DNA μέσω ανεξάρτητων από το ARF μονοπατιών. Συνοψίζοντας, p53 και Rb αποτελούν μέλη ενός δικτύου μετάδοσης σημάτων το οποίο ανιχνεύει τα μιτογόνα σήματα και αποτρέπει λανθασμένα σήματα να προωθήσουν τον κυτταρικό κύκλο. Απενεργοποίηση του δικτύου αυτού έχει παρατηρηθεί στη συντριπτική πλειοψηφία των καρκίνων στον άνθρωπο (Sheer 2004).

1.4. Ογκογόνο στρες.

Το ογκογόνο στρες προκαλείται από την εισαγωγή ενεργοποιημένων ογκογονιδίων σε πρωτογενή κύτταρα και πυροδοτεί προστατευτικούς μηχανισμούς που αποτρέπουν τον πολλαπλασιασμό κλώνων που φέρουν τα γονίδια αυτά. Βασικές αποκρίσεις των κυττάρων στο ογκογόνο στρες είναι η γήρανση και η απόπτωση οι οποίες στοχεύουν στην προστασία του κυττάρου από το μετασχηματισμό και την επακόλουθη μετατροπή του σε καρκινικό.

1.5 Κυτταρική γήρανση

Το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Hayflick και την ομάδα του ως το πεπερασμένο διάστημα αναπαραγωγής των ανθρωπίνων ινοβλαστών στην καλλιέργεια. (όριο Hayflick; Hayflick limit) (Hayflick 1965). Ο έρευνες που ακολούθησαν στις επόμενες δεκαετίες οδήγησαν στο συμπέρασμα πως τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα φθάνουν στο όριο Hayflick διότι η επαναλαμβανόμενη αντιγραφή του DNA απουσία τελομεράσης ελαττώνει διαρκώς το μήκος των τελομερών (Campisi 2005). Τα τελομερή είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της ακεραιότητας του DNA συνεπώς η δυσλειτουργία τους οδηγεί σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες και σε κακοήθη κυτταρικό μετασχηματισμό (Artandi, Chang et al. 2000). Η γήρανση οδηγεί το κύτταρο σε



μία μορφή μόνιμης κυτταρικής παύσης εξασφαλίζοντας την απομάκρυνση των κυττάρων με μη λειτουργικά τελομερή και αποτρέποντας την ανάπτυξη καρκίνου.

Τα κύτταρα που βρίσκονται σε φάση γήρανσης παρουσιάζουν τρεις βασικές διαφορές σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα: 1) η τους αύξηση σταματά και τα κύτταρα –παρόλο που παραμένουν μεταβολικώς ενεργά- δεν αποκρίνονται σε φυσιολογικά μιτογόνα ερεθίσματα ώστε να επανέλθουν στον κυτταρικό κύκλο, 2) είναι ανθεκτικά στον αποπτωτικό θάνατο και 3) αποκτούν αλλοιωμένες διαφοροποιημένες λειτουργίες (Campisi 2000). Τα γηρασμένα κύτταρα μπορούν να αναγνωριστούν με την ανίχνευση μαρτύρων γήρανσης όπως:

1) Φαινότυπος, οι γηρασμένοι ινοβλάστες είναι περισσότερο επίπεδοι μορφολογικά, με αυξημένο κυτταρικό μέγεθος και μεγαλύτερους πυρήνες και πυρηνίσκους. Παρατηρείται αύξηση του αριθμού των λυσοσωμάτων, των συσκευών Golgi και των κυτταροπλασματικών μικροινιδίων καθώς και εμφάνιση κενοτοπίων και ενδοπλασματικού δικτύου στο κυτταρόπλασμα. Επίσης αυξάνεται και ο αριθμός των πολυπύρηνων κυττάρων (Cristofalo, Lorenzini et al. 2004).

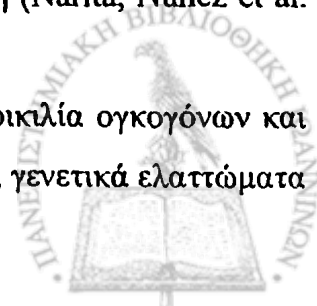
2) Χρώση για τη β-γαλακτοσιδάση, στα γηρασμένα κύτταρα παρατηρείται πλειορρύθμιση στην δραστικότητα της συνδεδεμένης με τη γήρανση β-γαλακτοσιδάσης (SA-β-gal) (Dimigi and Campisi 1994).

3) Ρυθμός κυτταρικής αύξησης, ο ρυθμός αύξησης των κυττάρων μειώνεται προοδευτικά λόγω της επιμήκυνσης του κυτταρικού κύκλου εξαιτίας της παρατεταμένης G1 φάσης (Cristofalo, Lorenzini et al. 2004). Η ανίχνευση του ελαττωμένου δείκτη πολλαπλασιασμού πραγματοποιείται με ανοσοκυτταροχημική εντόπιση για την πρωτεΐνη Ki-67 (Collado, Gil et al. 2005).

4) Βιομοριακοί δείκτες, στα γηρασμένα κύτταρα παρατηρείται υπερέκφραση των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών $p16^{INK4a}$, $p21^{Cip1}$ και $p27^{kip1}$. Στην επαγόμενη από ογκογονίδια γήρανση αναφέρεται και υπερέκφραση των $p15^{INK4b}$, $Dec1$ και $DcR2$ (Serrano, Lin et al. 1997; Collado, Gil et al. 2005).

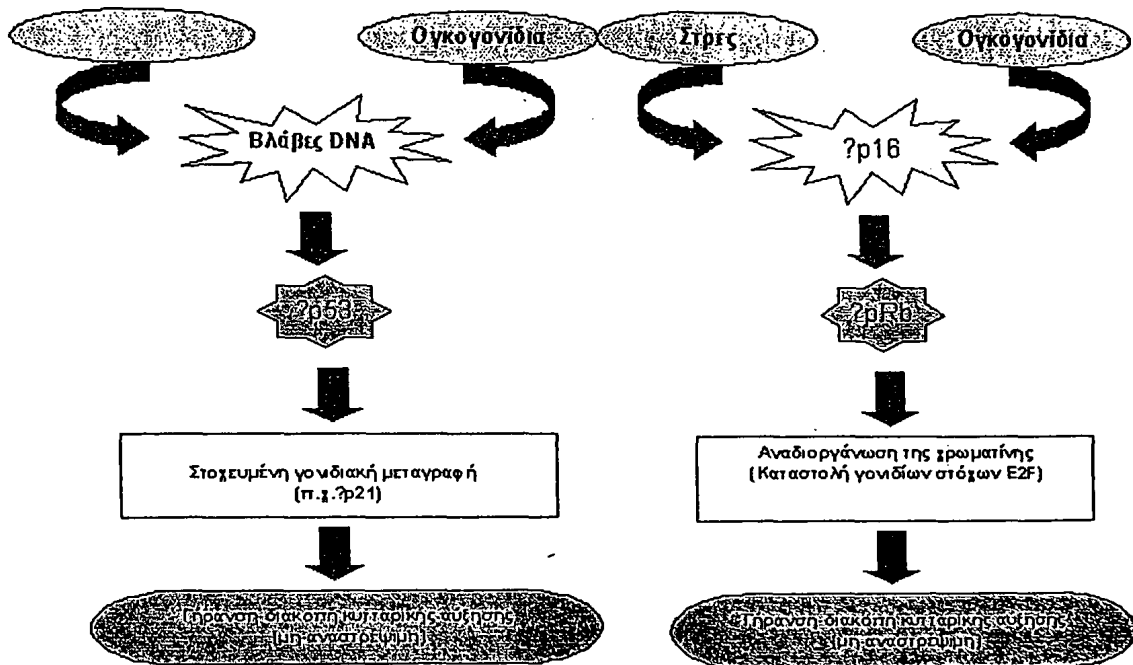
5) Σχηματισμός εστιών ετεροχρωματίνης η εμφάνιση των οποίων επιβεβαιώνεται με την ανίχνευση των πρωτεϊνών HP1 με ανοσοφθορισμό. Οι πρωτεΐνες HP1 αποτελούν μία οικογένεια μορίων-προσαρμοστών τα οποία απαιτούνται για τη συγκρότηση της ετεροχρωματίνης και εμπλέκονται στην επιγενετική γονιδιακή ρύθμιση (Narita, Nunez et al. 2003).

Η γήρανση (senescence) αποτελεί απόκριση του κυττάρου σε ποικιλία ογκογόνων και στρεσογόνων ερεθισμάτων όπως βλάβες του DNA, οξειδωτικές βλάβες, γενετικά ελαττώματα



και υπερέκφραση ογκογονιδίων (Campisi 2005). Η επαγομένη από ογκογονίδια γήρανση (oncogene-induced senescence, OIS) παρατηρήθηκε αρχικά σε καλλιεργούμενα κύτταρα και μέχρι πρόσφατα όλες οι μελέτες διεξάγονταν σε κύτταρα σε καλλιέργεια στα οποία υπερεκφραζόταν κάποιο ογκογονίδιο (Collado, Gil et al. 2005; Sharpless and DePinho 2005). Η υπόθεση ότι η OIS αποτελεί μηχανισμό προστασίας ενάντια στην ανάπτυξη καρκίνου αντικρούστηκε από την άποψη ότι η OIS μπορεί να προκαλείται από το στρες στο οποίο υπόκεινται τα κύτταρα σε συνθήκες καλλιέργειας (Sheen and DePinho 2000). Τα αποτελέσματα προσφάτων μελετών δείχνουν πως η OIS συμβαίνει *in vivo* και παρατηρείται σε πολλούς και διαφορετικούς προκαρκινωματώδεις ιστούς στον άνθρωπο και στον ποντικό (Serrano, Lin et al. 1997; Braig, Lee et al. 2005; Chen, Trotman et al. 2005; Collado, Gil et al. 2005; Michaloglou, Vredevelde et al. 2005). Οι Collado et al. με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων τους συμπεραίνουν πως σημαντικός αριθμός κυττάρων σε προκαρκινωματώδεις νεοπλασίες υπόκεινται σε OIS, σε αντίθεση με τα κύτταρα των κακοήθων όγκων τα οποία έχουν χάσει τους ενεργοποιητές της OIS όπως είναι το p16^{INK4a} και το p53 (Collado, Gil et al. 2005). Στο Σχήμα 2 συνοψίζεται ο ρόλος σημαντικότερων μονοπατιών της OIS, του p16^{INK4a}/pRB και του p53. Δυσλειτουργικά τελομερή και γονιδιοτοξικό στρες (ογκογονίδια) ενεργοποιούν την απόκριση κυτταρικής βλάβης της p53 γεγονός και τη μεταγραφή εξαρτώμενων από την p53 γονιδίων, όπως το γονίδιο της p21^{cip1/waf1} οδηγώντας έτσι το κύτταρο στη γήρανση. Η συγκεκριμένη μορφή γήρανσης είναι αναστρέψιμη σε περίπτωση απενεργοποίησης της p53. Τα ογκογονίδια και άλλες μορφές στρες επάγουν την p16^{INK4a} η οποία ενεργοποιεί την pRB. Η pRB οδηγεί στην απενεργοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν κυκλίνες και άλλα γονίδια τα οποία προωθούν την κυτταρική αύξηση. Η διαμεσολαβούμενη από την pRb γήρανση είναι μη-αναστρέψιμη ακόμη και μετά την απενεργοποίηση της p53, της pRb ή και των δύο (Campisi 2005). Η υπερέκφραση του ογκογονιδίου Ras τόσο σε κύτταρα τρωκτικών όσο και σε ανθρώπινα κύτταρα την επάγει πρόωρη γήρανση τους ενεργοποιώντας και τις δύο πορείες (Serrano, Lin et al. 1997).





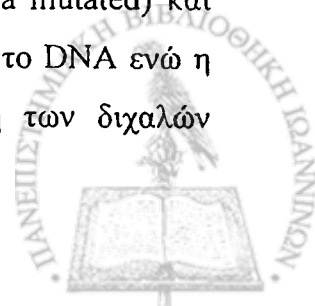
Σχήμα 2. Σύνοψη των κυριότερων πορειών που οδηγούν στη γήρανση.

1.6 Πορεία απόκρισης σε βλάβες του DNA

Μία από τις πιο καταστροφικές μορφές βλάβης που μπορούν να συμβούν σε ένα ευκαρυωτικό γονιδίωμα είναι οι αμφίκλωνες ρήξεις του DNA (DNA double-strand breaks; DSBs). Στην περίπτωση που το κύτταρο δεν καταφέρει να τις επιδιορθώσει μπορούν να προκαλέσουν απώλεια γενετικής πληροφορίας και χρωμοσωμικές επαναδιατάξεις οδηγώντας το κύτταρο στην γενωμική αστάθεια και στην καρκινογένεση. DSBs προκαλούνται είτε από λάθη κατά την αντιγραφή του DNA, είτε από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η ιοντίζουσα ακτινοβολία και τα ραδιομημητικά χημικά. Επίσης η διάβρωση των τελομερών δημιουργεί DSBs και οδηγεί στην ενεργοποίηση των πορειών απόκρισης σε βλάβες του DNA (DNA damage response; DDR) με αποτέλεσμα την απόπτωση ή/και την κυτταρική γήρανση (Longhese, Mantiero et al. 2006). Έχει ακόμη παρατηρηθεί πως ενεργοποιημένα ογκογονίδια είναι δυνατόν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA κυττάρων σε συνθήκες κυτταρο-καλλιέργειας. Η περιορισμένη ενεργοποίηση του c-Myc μπορεί να προκαλέσει πριν τη φάση S βλάβες στο DNA φυσιολογικών ανθρωπίνων ινοβλαστών (Vafa, Wade et al. 2002) και υπάρχουν επίσης αναφορές πως τα c-Myc και Ras προκαλούν χρωμοσωμικές θραύσεις και αυξάνουν τη συχνότητα της γονιδιακής ενίσχυσης (Denko, Giaccia et al. 1994).

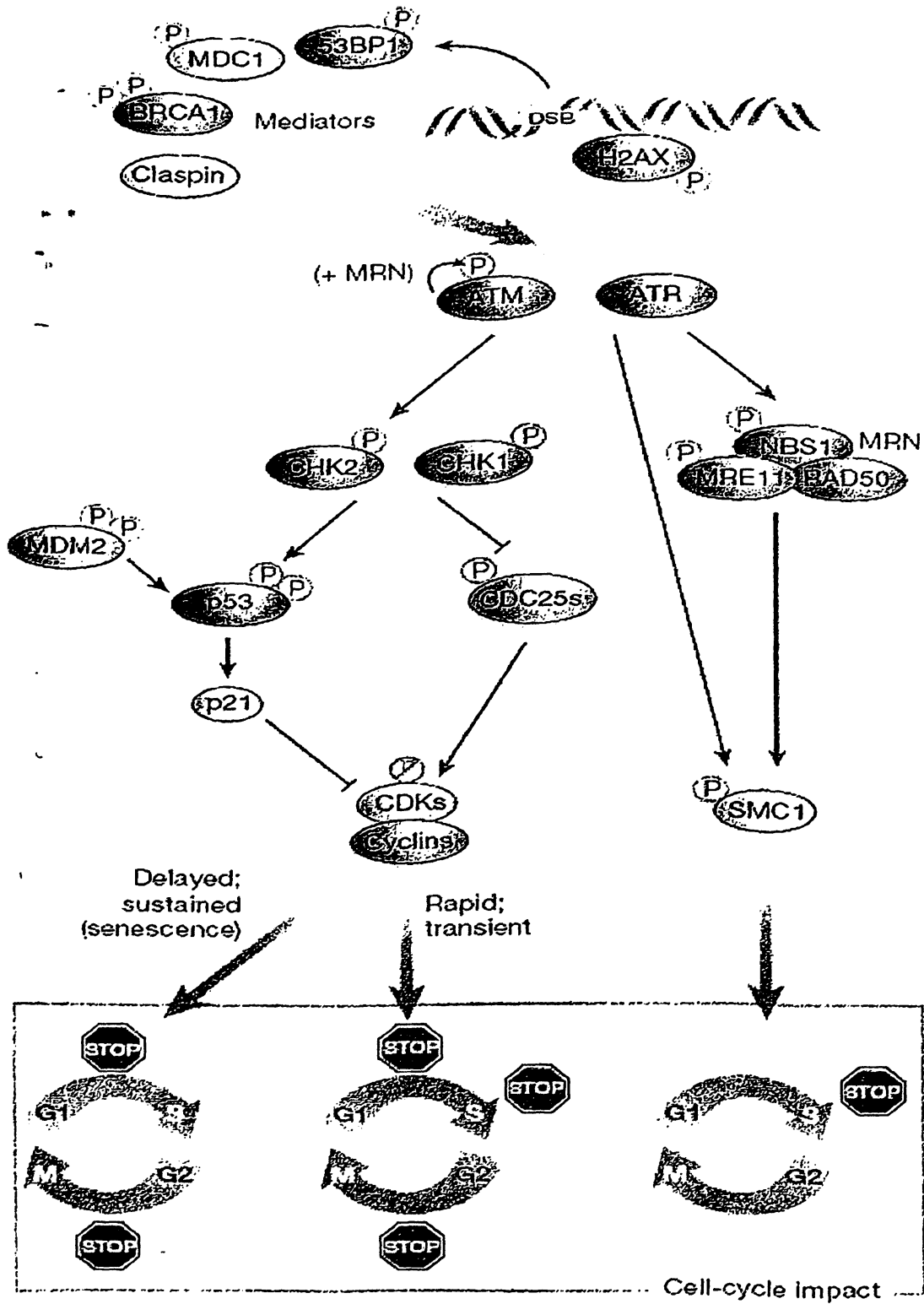
Η αποτελεσματική επιδιόρθωση των DSBs είναι αναγκαία για την ακεραιότητα του γονιδιώματος και η επίτευξη της απαιτεί την ενεργοποίηση σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (cell-cycle checkpoints) και πορειών απόκρισης σε βλάβες του DNA. Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί διαθέτουν μία σειρά από ευρέως συντηρημένες πρωτεΐνες οι οποίες συναθροίζονται στο σημείο κοπής του DNA και προάγουν την επιδιόρθωση του (Lisby and Rothstein 2004). Τα κύτταρα αποκρίνονται στις βλάβες του DNA όχι μόνο με την άμεση επιδιόρθωση τους αλλά και με την παύση του κυτταρικού κύκλου και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Η παρουσία DSBs γίνεται αντιληπτή από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου μέσω του σημείου ελέγχου βλαβών του DNA (DNA damage checkpoint) το οποίο είναι υπεύθυνο για την παύση του κυτταρικού κύκλου και για τη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων της DDR (Longhese, Mantiero et al. 2006)

Η έναρξη των πορειών μεταγωγής σήματος με στόχο την αναστολή του κυτταρικού κύκλου επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση των κινασών ATM (ataxia telangiectasia mutated) και ATR (AMT and Rad3-related). Η ATM ενεργοποιείται κυρίως από βλάβες στο DNA ενώ η ATR εμπλέκεται σε κυτταρικές αποκρίσεις που στοχεύουν στην παύση των διχαλών



διπλασιασμού του DNA –εξαιτίας βλαβών του DNA και άλλων στρεσογόνων παραγόντων. Η ATM σε μη-στρεσαρισμένα κύτταρα απαντάται ως ένα ανενεργό διμερές το οποίο μεταπίπτει στην ενεργή μονομερή μορφή του παρουσία DSBs. Το ενεργοποιημένο ATM είναι ικανό να φωσφορυλιώσει πληθώρα υποστρωμάτων ανάμεσα τους και την p53, τη BRCA1 (breast cancer 1) και τη SMC1 (structural maintenance of chromosomes 1) (Bakkenist and Kastan 2004; Kastan and Bartek 2004). Στο Σχήμα 4 συνοψίζονται οι δύο πορείες του σημείου ελέγχου βλαβών του DNA. Οι κινάσες ATM και ATR φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν στην πορεία μεταγωγής σήματος της DDR, είτε άμεσα είτε μέσω των κινασών Chk1 και Chk2. Η πρωτεΐνη BRCA1 συμβάλει στην παύση του κυτταρικού κύκλου και στην επιδιόρθωση του DNA ενώ η p53 ελέγχει γονίδια υπεύθυνα για τον κυτταρικό θάνατο, την κυτταρική γήρανση και την επιδιόρθωση του DNA. Η συγκέντρωση πρωτεϊνών που διαμεσολαβούν στην επιδιόρθωση του DNA στα σημεία των DSBs οφείλεται στη φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX από την ATM γεγονός που οδηγεί στο σχηματισμό εστιών (foci) οι οποίες είναι μικροσκοπικά διακριτές (Bakkenist and Kastan 2004; Kastan and Bartek 2004). Η ενεργοποίηση μιας απόκρισης σε βλάβες του DNA επιβεβαιώνεται με την ανίχνευση της φωσφορυλίωσης της ιστόνης H2AX (γ -H2AX), την ενδοκυττάρια εντόπιση της 53BP1, τη φωσφορυλίωση της Chk2 (στη θέση Thr68) και της p53 (στη θέση Ser20) (Bartkova, Horejsi et al. 2005; Gorgoulis, Vassiliou et al. 2005).





Σχήμα 3. Οι πορείες ελέγχου του κυτταρικού κύκλου που ενεργοποιούνται ως απόκριση σε βλάβες του DNA (Bakkenist and Kastan 2004; Kastan and Bartek 2004).



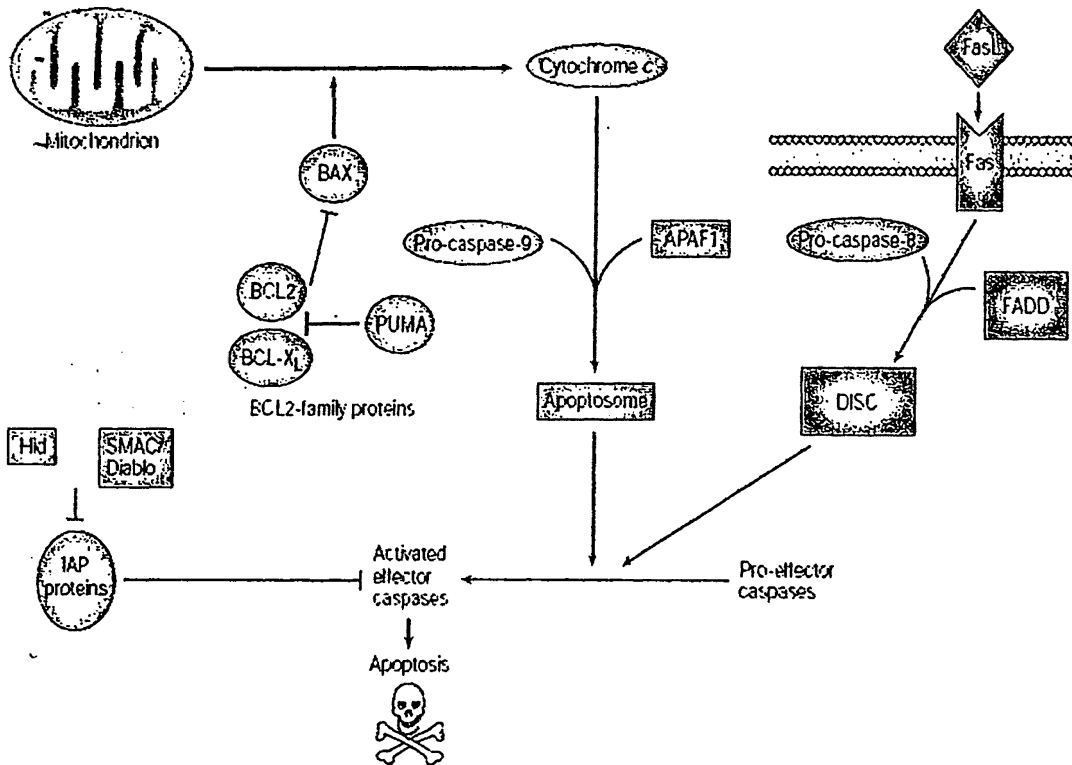
1.7 Απόπτωση.

Οι πολυκύτταροι οργανισμοί χρειάζεται συχνά να εξαλείψουν κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί βλάβη, φλεγμονή ή είναι πλεονάζοντα. Για το λόγω αυτό στους μεταζωικούς οργανισμούς έχει αναπτυχθεί ένας μηχανισμός κυτταρικού θανάτου που ονομάζουμε απόπτωση (Kerr, Wyllie et al. 1972). Το γενετικό αυτό πρόγραμμα είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική εμβρυική ανάπτυξη και για τη διατήρηση της ομοιόστασης στους ενήλικους ιστούς. Η απορρύθμιση του αποπτωτικού μηχανισμού εμπλέκεται σε αυτοάνοσα νοσήματα, εκφυλιστικές διαταραχές (π.χ. νόσος του Huntington) και στον καρκίνο. Μέσω της απόπτωσης καταστρέφονται τα μεταλλαγμένα κύτταρα και συνεπώς η απενεργοποίηση της είναι σημαντική για την ογκογένεση (Johnstone, Ruefli et al. 2002).

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που διακρίνουν την απόπτωση από άλλες μορφές κυτταρικού θανάτου περιλαμβάνουν την κυτταρική συρρίκνωση, τη θραυσματοποίηση του DNA και τη συμπύκνωση της χρωματίνης. Η πλειοψηφία των χαρακτηριστικών αυτών καθώς και των βιοχημικών αλλαγών της απόπτωσης οφείλεται σε μία ομάδα πρωτεασών κυστεΐνης, τις κασπάσες. Δύο πορείες (Σχήμα 4) έχουν αναγνωριστεί ως υπεύθυνες για την ενεργοποίηση των κασπασών, η εξωγενής (extrinsic pathway), η οποία μεσολαβείται από υποδοχείς κυτταρικού θανάτου (death receptors) στην επιφάνεια του κυττάρου και η ενδογενής πορεία (intrinsic or mitochondrial pathway), η οποία μεσολαβείται από τα μιτοχόνδρια.

Στην εξωγενή πορεία εμπλέκονται υποδοχείς κυτταρικού θανάτου που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου και ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF-R), μέλη της οποίας είναι TNF-R1, Fas/CD95, DR3, DR4, DR5 και DR6. Οι υποδοχείς αυτοί χαρακτηρίζονται από μία εξωκυττάρια πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή και από μία ενδοκυττάρια περιοχή κυτταρικού θανάτου εξαιρετικά σημαντική για τη μεταγωγή του αποπτωτικού σήματος. Οι συγκεκριμένοι προσδέτες για την οικογένεια TNF-R ανήκουν στην οικογένεια TNF η οποία περιλαμβάνει τους TNF α , Fas-ligand, LT α , apo-3-ligand και TRAIL. Δέσμευση ενός προσδέματος θανάτου από έναν υποδοχέα κυτταρικού θανάτου επάγει την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Μόλις ενεργοποιηθούν, οι περιοχές θανάτου των υποδοχέων στρατολογούν προσαρμοστικές πρωτεΐνες, όπως η FADD για τον Fas/CD95.





Σχήμα 4. Συνοπτικό μοντέλο της εξωγενούς και ενδογενούς πορείας της απόπτωσης (Hirfner and Cohen 2004).

Οι προσαρμοστικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν την περιοχή ενεργοποίησης θανάτου (DED) η οποία αλληλεπιδρά με τις DED των εναρκτήριων προκασπασών -2, -8, -10 και -12. Το σύμπλοκο που δημιουργείται ονομάζεται σύμπλοκο επαγωγής κυτταρικού θανάτου (DISC; death inducing signalling complex) και αποτελείται από τον υποδοχέα θανάτου, την προσαρμοστική πρωτεΐνη και την προκασπάση. Μέσω του DISC οι εναρκτήριες προκασπάσες ενεργοποιούνται με αυτο-πρωτεολυτική διάσπαση.

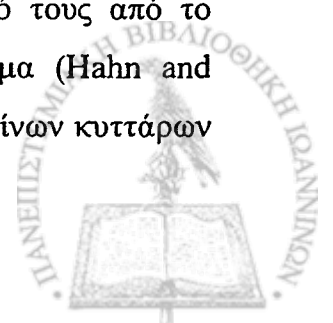
Η ενδογενής ή μιτοχονδριακή πορεία αποκρίνεται σε ερεθίσματα στρες όπως βλάβες του DNA προκαλούμενες από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, ακτινοβολία γ ή UV και από απομάκρυνση σημάτων επιβίωσης όπως παράγοντες αύξησης, κυτοκίνες ή ορμόνες. Η ενεργοποίηση του γίνεται μέσω της διέγερσης της μιτοχονδριακής μεμβράνης (π.χ. μετακίνηση στο μιτοχόνδριο πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2 οδηγεί σε αλλαγές στη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης) η οποία επάγει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και άλλων αποπτωγόνων παραγόντων στο κυτταρόπλασμα. Το κυτόχρωμα c στρατολογεί το προσαρμοστικό μόριο των κασπασών APAF1 (apoptotic protease-activating factor-1) και την εναρκτήρια προκασπάση 9. Το κυτόχρωμα c, ο APAF1 και η προκασπάση 9 μαζί με ATP δημιουργούν ένα ολοενζυμικό σύμπλοκο που ονομάζουμε αποπτώσωμα και στο οποίο συντελείται η αυτοενεργοποίηση της προκασπάσης 9. Τα δύο αποπτωτικά μονοπάτια είναι στενά συνδεδεμένα και συγκλίνουν σε ένα κοινό μονοπάτι προκαλώντας την ενεργοποίηση των κασπασών-τελεστών 3,6 και 7.

Ο αποπτωτικός μηχανισμός ρυθμίζεται αυστηρά σε όλα τα επίπεδα του από πλήθος πρωτεϊνών. Σημαντικό ρόλο έχουν οι πρωτεΐνες FLIP (FLICE inhibitory protein), οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 και οι πρωτεΐνες IAP (inhibitor of apoptosis proteins, πρωτεΐνες αναστολείς της απόπτωσης). Οι πρωτεΐνες FLIPP προσδένονται στο σύμπλοκο DISC αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο την ενεργοποίηση της προκασπάσης 8. . Οι πρωτεΐνες της οικογένειας IAP (XIAP, c-IAP1, c-IAP2, NAIP, surviving) φαίνεται πως καταστέλλουν την απόπτωση μέσω της πρόσδεσης τους στις κασπάσες και την επακόλουθη απενεργοποίηση τους. Η οικογένεια Bcl-2 αποτελείται από προ-αποπτωτικές και αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες οι οποίες κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες. Τα μέλη της πρώτης κατηγορίας, όπως το Bcl-2 και Bcl-X_L, χαρακτηρίζονται από τέσσερις συντηρημένες Bcl-2 περιοχές BH1-BH4 (BH=Bcl-2 homology) και έχουν όλες αντι-αποπτωτική δράση. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν πρωτεΐνες με προ-αποπτωτική δράση, όπως οι πρωτεΐνες Bax και Bak, και η δομή τους χαρακτηρίζεται από την έλλειψη της περιοχής BH4. Οι πρωτεΐνες της τρίτης κατηγορίας είναι οι περισσότερες αριθμητικά, έχουν μόνο την περιοχή BH3 και παρουσιάζουν διαφορετικές μεταξύ τους

λειτουργίες. Σε αυτή την ομάδα ανήκουν οι πρωτεΐνες Bid, Bik, Bad, PUMA και Bim. Η αναλογία μεταξύ των αντι-αποπτωτικών και προ-αποπτωτικών μελών της υπερ-οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών καθορίζει την ευαισθησία του κυττάρου σε ανασταλτικούς ή στρεσογόνους παράγοντες (Hengartner 2000).

1.8 Κυτταρικός μετασχηματισμός

Ο σχηματισμός ενός καρκινικού όγκου είναι μία πολύπλοκη διαδικασία η οποία απαιτεί τη σταδιακή συσσώρευση γενετικών και επιγενετικών μεταβολών. Στους ανθρώπους εκτιμάται πως απαιτούνται τέσσερις έως έξι μεταλλάξεις για την ανάπτυξη ενός καρκινώματος (Hahn and Weinberg 2002). Οι μεταλλάξεις φαίνεται πως επιτρέπουν στα κύτταρα να αποφύγουν τη γήρανση και να συνεχίσουν να διαιρούνται για απεριόριστο χρονικό διάστημα.. Πριν την αθανатоποίηση μεσολαβεί ένα στάδιο εκτεταμένου κυτταρικού θανάτου (όπως παρατηρείται στην κυτταροκαλλιέργεια) το οποίο ονομάζεται «κρίση». Στα κύτταρα που ξεπερνούν την κρίση μπορούν να συμβούν επιπρόσθετες μεταλλάξεις είτε σε ογκογονίδια είτε σε ογκοκατασταλτικά γονίδια και να τα οδηγήσουν στην αυθόρμητη αθανатоποίηση τους και στη συνέχεια στο μετασχηματισμό. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα, τα μετασχηματισμένα κύτταρα είναι ικανά να επιβιώνουν απουσία αυξητικών παραγόντων ή να έχουν μειωμένες απαιτήσεις σε αυξητικούς παράγοντες και να αναπτύσσονται ανεξάρτητα από προσφύσεις (Weitzman and Yaniv 1999). Η μελέτη του νεοπλασματικού μετασχηματισμού στην κυτταροκαλλιέργεια αποτελεί ένα σημαντικότερο εργαλείο για τη διερεύνηση των βιολογικών και βιοχημικών διεργασιών που συμβαίνουν κατά την καρκινογένεση. Η πλειοψηφία των μελετών έχει γίνει σε τρωκτικά και πολύ λιγότερο σε ανθρώπινα κύτταρα γεγονός που οφείλεται στη δυσκολία μετασχηματισμού των τελευταίων *in vitro*. Η αντίσταση των ανθρώπινων κυττάρων στην αθανатоποίηση η οποία αποτέλεσε το βασικότερο εμπόδιο στον μετασχηματισμό τους *in vitro* έχει πλέον ξεπεραστεί με την έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης τελομεράσης (hTERT). Η hTERT αποτρέπει την προκαλούμενη από την βράχυνση των τελομερών γήρανση καθιστώντας δυνατό τον μετασχηματισμό ανθρωπίνων κυττάρων με την εισαγωγή συνδυασμού ογκογονιδίων (Kakumoto, Sasai et al. 2006). Ενώ στα κύτταρα τρωκτικών η απενεργοποίηση του μονοπατιού της p53 επαρκεί για το μετασχηματισμό τους από το ενεργοποιημένο Ras, στα ανθρώπινα κύτταρα δεν έχει το ίδιο αποτέλεσμα (Hahn and Weinberg 2002). Η πρώτη αναφορά μετασχηματισμού φυσιολογικών ανθρωπίνων κυττάρων



με καθορισμένα γενετικά στοιχεία έγινε το 1999 από τους Hahn et al. (Hahn, Counter et al. 1999). Η έκφραση της hTERT σε συνδυασμό με δύο ογκογονίδια, το SV40LT και το Ha-ras-V12 είχε ως αποτέλεσμα το μετασχηματισμό φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων και ινοβλαστών. Ακολούθησαν μελέτες όπου το μοντέλο αυτό χρησιμοποιήθηκε για τον επιτυχή μετασχηματισμό και άλλων κυτταρικών τύπων. Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται πως για το μετασχηματισμό ανθρωπίνων κυττάρων απαιτούνται τα εξής: η διατήρηση των τελομερών (hTERT), η απενεργοποίηση των pRb και p53 (SV40LT) και η έκφραση της ογκοπρωτεΐνης Ras.

1.9 hTERT

Τα τελομερή είναι σύμπλοκα DNA-πρωτεΐνης εντοπιζόμενα στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Προστατεύουν από γεγονότα που μπορούν να προκαλέσουν γενωμική αστάθεια όπως η διάβρωση των τελικών χρωμοσωμικών περιοχών, η σύντηξη μεταξύ δύο τελομερών και ο λανθασμένος ανασυνδυασμός. Το τελομεριδιακό DNA αποτελείται από εκατοντάδες αντίγραφα μικρών επαναλαμβανομένων αλληλουχιών (5'-TTAGGG-3') συνολικού μήκους 10-15 Kb. Οι αλληλουχίες αυτές σχηματίζουν μία μοριακή κατασκευή πάνω στην οποία προσδένονται οι τελομερικές πρωτεΐνες. Το DNA των τελομερών συντίθεται από το ένζυμο τελομεράση μέσω ενός ανεξάρτητου από την κυτταρική διαίρεση μηχανισμού. Η τελομεράση είναι μία κυτταρική ριβονουκλεοπρωτεΐνη που δρα ως αντίστροφη μεταγραφάση. Η καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης στους ανθρώπους ονομάζεται hTERT (Elmore and Holt 2000; Blackburn 2005).

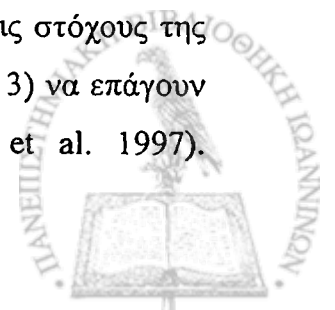
Στην πλειοψηφία των σωματικών κυττάρων, με εξαίρεση τα βλαστικά κύτταρα, δεν υπάρχει ενζυμική δράση της τελομεράσης με αποτέλεσμα το μήκος των τελομερών να μειώνεται προοδευτικά με κάθε κυτταρική διαίρεση κατά 50-200 bp. Όταν τα τελομερή μειωθούν στα 4-6 bp τότε τα ανθρώπινα κύτταρα εισέρχονται στη φάση της γήρανσης. Παροδική και σε χαμηλά επίπεδα έκφραση της τελομεράσης έχει επίσης παρατηρηθεί σε πρωτογενείς εμβρυϊκές ινοβλάστες ανθρώπου WI-38, BJ και TIG-3 (Masutomi, Yu et al. 2003). Στην ίδια κατηγορία ανήκει και το κυτταρικό στέλεχος MRC5 (Jacobs, Jones et al. 1970) που χρησιμοποιήσαμε για την παρούσα μελέτη, το οποίο είναι εμβρυϊκής προέλευσης και έχει φυσιολογικό δυναμικό αύξησης 55-65 πληθυσμιακούς διπλασιασμούς. Τα παραπάνω περιγράφουν μία πολύ σημαντική διαφορά ανάμεσα στα ανθρώπινα κύτταρα και στα κύτταρα των τρωκτικών τα οποία έχουν συνεχή και υψηλά επίπεδα ενεργής τελομεράσης και

συνεπώς πιο επιμήκη τελομερή (Weitzman and Yaniv 1999). Ενεργότητα της τελομεράσης παρατηρείται επίσης σε όλους σχεδόν τους ιστούς ανθρωπίνων καρκίνων και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές (Yan, Benhattar et al. 2004). Η διατήρηση του μήκους των τελομερών φαίνεται να είναι απαραίτητη για την αθανатоποίηση (απεριόριστη ικανότητα πολλαπλασιασμού) ανθρωπίνων κυττάρων. Οι αλλαγές που συμβαίνουν κατά την αθανатоποίηση διερευνήθηκαν με μελέτες σε κύτταρα μετασχηματισμένα από τον ιό SV40 στα οποία εισήχθη η hTERT. Τα κύτταρα αυτά κατάφεραν να αποφύγουν την κρίση και η μετέπειτα εισαγωγή του ενεργού ογκογονιδίου Ras τα οδήγησε στο μετασχηματισμό αποδεικνύοντας τον καθοριστικό ρόλο της τελομεράσης στην αθανатоποίηση (Hahn, Counter et al. 1999; Halvorsen, Leibowitz et al. 1999). Άλλες πηγές αναφέρουν ότι η υπερέκφραση της hTERT σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ινοβλάστες οδηγεί στην σταθεροποίηση του μήκους των τελομερών, στην αύξηση του αναπαραγωγικού δυναμικού και στην αθανатоποίηση (McSharry, Jones et al. 2001).

1.10 Δομή και λειτουργία του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17 και κωδικοποιεί μία πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη με ανοιχτό μεταγραφικό πλαίσιο αποτελούμενο από 393 αμινοξέα. Η p53 αποτελείται από τέσσερις πανομοιότυπες υπομονάδες και η δομή της κάθε μίας περιλαμβάνει τρεις κύριες περιοχές: 1) την ευρέως συντηρημένη κεντρική περιοχή υπεύθυνη για την πρόσδεση της στο DNA, 2) την καρβοξυτελική περιοχή η οποία είναι η περιοχή τετραμερισμού, και 3) την αμινοτελική περιοχή η οποία περιέχει την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης (Ko and Prives 1996). Η p53 δρα ως μεταγραφικός παράγοντας ρυθμίζοντας την έκφραση πολλών πρωτεϊνών οι οποίες σχετίζονται με σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως η επιδιόρθωση του DNA, η διακοπή του κυτταρικού κύκλου, η γήρανση και η απόπτωση (Hupp and Lane 2000; Vousden and Lu 2002).

Αντίστοιχη δομή με την p53 παρουσιάζουν και δύο άλλες πρωτεΐνες που ανακαλύφθηκαν πολύ αργότερα και ανήκουν στην ίδια οικογένεια. (Kaghad, Bonnet et al. 1997). Πρόκειται για τις πρωτεΐνες p63 και p73, οι οποίες εκτός από ομοιότητες στην αλληλουχία παρουσιάζουν και παρόμοιες με το p53 λειτουργικές ιδιότητες. Πειραματικές μελέτες έδειξαν πως η p63 και η p73 είναι ικανές: 1) να προσδεθούν σε θέσεις στόχους της p53 στο DNA, 2) να διενεργοποιήσουν ρυθμιζόμενα από την p53 γονίδια, και 3) να επάγουν απόπτωση όταν εκφραστούν εξωγενώς σε κύτταρα. (Kaghad, Bonnet et al. 1997).



Περισσότερο λεπτομερείς μελέτες αποκάλυψαν πώς τα γονίδια p63 και p73 είναι αρκετά πολύπλοκα και κωδικοποιούν πρωτεΐνες που μιμούνται τις δράσεις της p53 αλλά και πρωτεΐνες που τις ανταγωνίζονται. Συγκεκριμένα τα γονίδια p63 και p73 διαθέτουν δύο προαγωγείς το καθένα και μέσω εναλλακτικού ματίσματος παράγουν δύο κατηγορίες πρωτεϊνών: 1) εκείνες που περιέχουν ένα αμινο-τελικό άκρο ανάλογο με την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης του p53 (TA-p63, TA-p73) και 2) εκείνες με συρικνωμένο αμινο-τελικό άκρο από το οποίο απουσιάζει η περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης (ΔN-p63, ΔN-p73). Οι TA πρωτεϊνικοί ισότυποι παρουσιάζουν αντίστοιχες δράσεις με την p53 σε αντίθεση με τους ΔN ισότυπους οι οποίοι φαίνεται πως αποκλείουν όχι μόνο τη δράση της p53 αλλά και των TA ισότύπων (Yang and McKeon 2000).

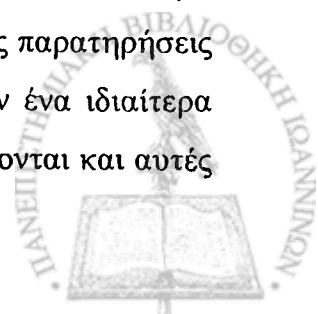
Η πρωτεΐνη p53 ανακαλύφθηκε αρχικά σε κύτταρα μετασχηματισμένα από τον ιό SV40, στα οποία βρέθηκε συνδεδεμένη με το SV40 LT. Επίσης παρατηρήθηκε πως η συγκέντρωση της p53 σε μετασχηματισμένα κύτταρα ήταν πολύ μεγαλύτερη από αυτή των φυσιολογικών κυττάρων (Lane and Crawford 1979; Linzer and Levine 1979). Μετέπειτα έρευνες οδήγησαν στο λανθασμένο συμπέρασμα ότι το p53 είναι ογκογονίδιο, σήμερα όμως γνωρίζουμε πως πρόκειται για ένα εξαιρετικά ισχυρό ογκοκατασταλτικό γονίδιο που έχει χαρακτηριστεί και ως «φύλακας του ανθρώπινου γονιδιώματος» (Vogelstein, Lane et al. 2000; Levine, Finlay et al. 2004). Σε φυσιολογικά κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας η p53 είναι σχεδόν μη-ανιχνεύσιμη. Ενεργοποιείται μόνο σε κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη ή έχουν εκτεθεί σε έντονο στρες. Τα κύτταρα αυτά πρέπει να απομονωθούν από τον υπόλοιπο πληθυσμό γιατί έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να μετατραπούν σε κακοήγη. Η p53 οδηγεί τα κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη σε παύση του κυτταρικού κύκλου μέχρι την επιδιόρθωση της βλάβης και αν αυτό δεν είναι εφικτό σε απόπτωση (Vogelstein, Lane et al. 2000).

Ποικίλλα σήματα πυροδοτούν την ενεργοποίηση του p53 και ανάλογα με τη φύση αυτών των σημάτων κινητοποιούνται τρεις διαφορετικές πορείες. Η πρώτη ενεργοποιείται από βλάβες του DNA, όπως αυτές που προκαλεί η ιονίζουσα ακτινοβολία. Οι βλάβες αυτές γίνονται αισθητές από τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (cell cycle checkpoints) μέσω συγκεκριμένων πρωτεϊνών όπως οι κινάσες DNA PK (DNA-dependent protein kinase), ATM (ataxia telangiectasia mutated) ChK1 (ChK=cyclin-dependent kinase) και Chk2. Όλες οι προαναφερθείσες κινάσες φωσφορυλιώνουν την p53 σε αμινο-τελικά σημεία κοντά στο σημείο πρόσδεσης της HDM2. Τα σήματα που πυροδοτούν τη δεύτερη πορεία δημιουργούνται από την έκφραση ογκογονιδίων. Η έκφραση του ογκογονιδίου Ras διεγείρει

την μεταγραφή της πρωτεΐνης p14^{ARF} η οποία προσδένεται στην πρωτεΐνη HDM2 με συνέπεια την αύξηση της συγκέντρωσης της p53 στο κύτταρο (Vogelstein, Lane et al. 2000; Palmero, Murga et al. 2002). Η ποσότητα της p53 καθορίζεται κυρίως από το ρυθμό αποδόμησης της. Η αποδόμηση αυτή περιγράφεται ως μία πρωτεολυτική διαδικασία διαμεσολαβούμενη από την ουβικιτίνη, ένα μικρό πεπτιδίο το οποίο προσδένεται στις πρωτεΐνες έτσι ώστε να αναγνωρίζονται και να αποδομούνται από το πρωτεόσωμα. Η HDM2 είναι μία E3 ουβικιτινική λιγάση, ένα ένζυμο που καταλύει την τελική πρόσδεση των ουβικιτινικών αλυσίδων σε κατάλοιπα λυσίνης στις πρωτεΐνες στόχους. Η p53 προσδένεται στη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου HDM2 και διεγείρει την μεταγραφή της πρωτεΐνης HDM2. Στη συνέχεια η πρωτεΐνη HDM2 καταλύει την προσθήκη ουμπικουιτινικών αλυσίδων στα μόρια της p53 και τα οδηγεί σε πρωτεοσωμική αποδόμηση. Συνεπώς η συγκέντρωση της p53 μειώνεται ακολουθούμενη από πτώση της μεταγραφής της HDM2 και τελικά εκ νέου αύξηση της συγκέντρωσης της p53 (Vousden and Lu 2002; Lu 2005). Η τρίτη πορεία ενεργοποιείται, μεταξύ άλλων, από την υπεριώδη ακτινοβολία και από χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Όπως και οι άλλες δύο πορείες, οδηγεί στη σταθεροποίηση της p53 στον πυρήνα, ο ακριβής μηχανισμός όμως δεν είναι απόλυτα κατανοητός (Vogelstein, Lane et al. 2000). Και οι τρεις πορείες ενεργοποίησης της p53 συνοψίζονται στο Σχήμα 6.

Η έκφραση της p53 έχει ως πρωταρχικό αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Η p53 διεγείρει την έκφραση της p21^{WAF1/CIP1} η οποία αναστέλλει την μετάβαση G1→S και G2→M. Με παρόμοιο τρόπο διεγείρει και την έκφραση της 14-3-3σ η οποία συγκρατεί τα σύμπλοκα κυκλίνη B1-CDK1 στον πυρήνα διατηρώντας το κύτταρο στη G2 φάση. Άλλοι ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου που επάγονται από την p53 είναι η GADD45 και η Reprimo (Rich, Allen et al. 2000; Vogelstein, Lane et al. 2000)

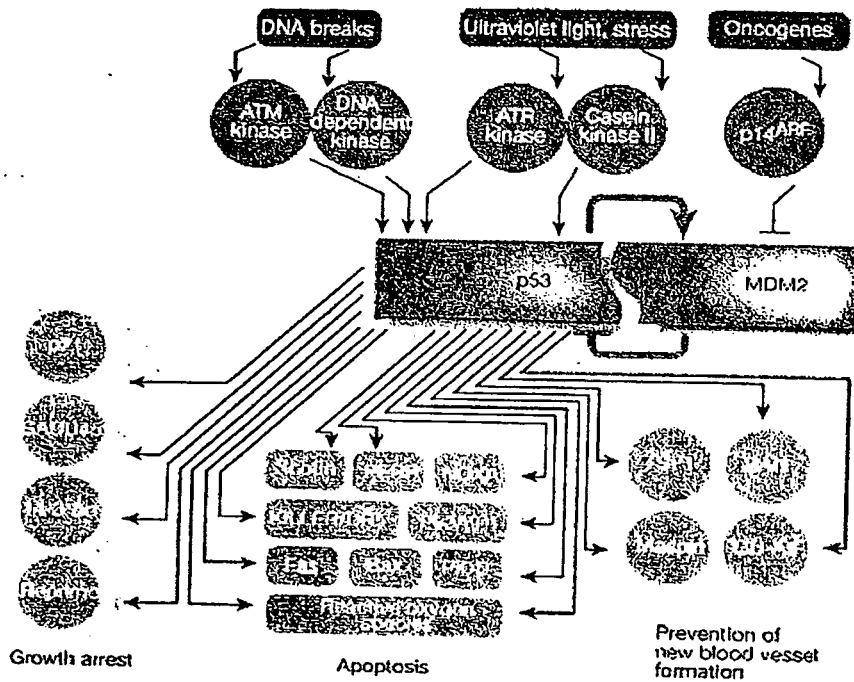
Η αποπτωτική δράση της p53 συνδέεται άμεσα με τις ιδιότητες ενεργοποίησης γονιδίων στόχων της. Μέσω της p53 επάγονται γονίδια εμπλεκόμενα στην κινητοποίηση των υποδοχέων θανάτου (Fas, DR5) αλλά και της μιτοχονδριακής πορείας της απόπτωσης. Ο κύριος ρόλος του όμως είναι η επαγωγή της μιτοχονδριακής πορείας που επιτυγχάνεται με τη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων όπως το Araf-1 και τα προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2: Bax, PUMA, Noxa και Bid. Το PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) πρωτοανακαλύφθηκε ως ένα γονίδιο ενεργοποιούμενο από το p53 σε αποπτωτικά κύτταρα και ως μία πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τη Bcl-2. Οι ακόλουθες ερευνητικές παρατηρήσεις διαχωρίζουν το PUMA από τους άλλους στόχους της p53 και το καθιστούν ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον αντικείμενο μελέτης είναι: 1) οι αλληλουχίες του (συμπεριλαμβάνονται και αυτές



που προσδένονται στο p53) είναι ευρέως συντηρημένες ανάμεσα σε διαφορετικά είδη, 2) επάγει εξαιρετικά αποτελεσματικά την απόπτωση, η έκφραση του οδηγεί τα κύτταρα σε θάνατο σε λίγες μόνο ώρες, 3) σε ποντίκια με απενεργοποιημένο PUMA και σε ποντίκια με απενεργοποιημένο p53 διαπιστώθηκε ο ίδιος βαθμός καταστολής της απόπτωσης και 4) σε πρωτογενείς εμβρυικούς ινοβλάστες η παρουσία του PUMA απαιτείται για την εξαρτώμενη από το p53 απόπτωση η οποία ενεργοποιείται από τα ογκογονίδια c-myc και E1A (Yu and Zhang 2003).

Η p53 έχει κεντρικό ρόλο και στις τρεις θεωρίες της γήρανσης. Οι πρώτες αποδείξεις για την εμπλοκή της p53 στη γήρανση δόθηκαν από έρευνες με το SV40 LT. Το αντιγόνο αυτό προσδένεται στην p53 και την Rb και τις απενεργοποιεί με συνέπειες την επιμήκυνση του αναπαραγωγικού δυναμικού των φυσιολογικών ανθρωπίνων ινοβλαστών (HF) και την επανεκκίνηση της αντιγραφής του DNA σε μετα-μιτωτικά γηρασμένα κύτταρα.





Σχήμα 5. Πορείες ενεργοποίησης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53.

Απενεργοποίηση μονό της p53 από το E6 του HPV επιμήκυνε το χρόνο ζωής των HFs και έπειτα τους οδήγησε σε παύση του κυτταρικού κύκλου τους με χαρακτηριστικά γήρανσης. Η p53 δείχνει να αντιλαμβάνεται τότε τα τελομερή μειώνονται σημαντικά (4-7 Kb) με συνέπεια τη διακοπή της κυτταρικής αύξησης. Προκύπτει επίσης πως είναι απαραίτητο και στην επαγομένη από το ογκογόνο Ras γήρανση αφού ανθρώπινα κύτταρα που υπερεκφράζουν το ογκογόνο Ras και δυσλειτουργεί το p53 δεν γηράσκουν. Ενδείξεις υπάρχουν ότι η p53 μπορεί να λειτουργεί και ως αισθητήρας των ROS και να ελέγχει τα επίπεδα τους μέσω της p66^{Shc} (Bond, Haughton et al. 1996; Itahana, Dimri et al. 2001; Sharpless and DePinho 2002).

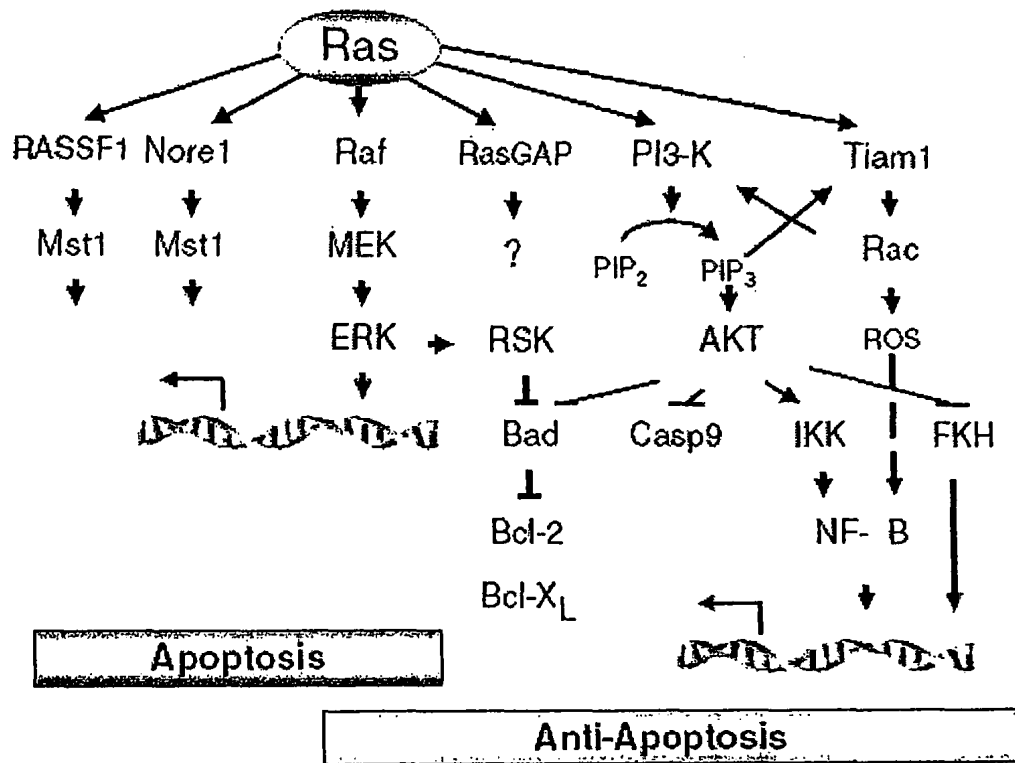
Μεταλλάξεις του p53 ανιχνεύονται σε πάνω από τους μισούς καρκίνους στον άνθρωπο αποτελώντας την πιο συνηθισμένη δυσλειτουργία που σχετίζεται με την ογκογένεση. Οι μεταλλάξεις της p53 στην αναπαραγωγική σειρά αποτελούν και την αιτία του συνδρόμου Li-Fraumeni, μιας σπάνιας μορφής κληρονομικού καρκίνου. Επιλέξαμε να μελετήσουμε τρεις μεταλλάξεις του p53. Η μετάλλαξη 143^{ala} επιλέχθηκε διότι έχει χαρακτηριστεί εκτενώς *in vitro* (Coursen, Bennett et al. 1997), γνωρίζουμε ότι σε HFs μπορεί να ακυρώσει επιτυχώς την λειτουργία της p53 δρώντας ως μία κυρίαρχη αρνητική μορφή (Bond, Wyllie et al. 1994; Wynford-Thomas and Blaydes 1998; Wyllie, Haughton et al. 2003) καθώς και ότι η έκφραση της σε HFs επιμηκύνει τη διάρκεια ζωής τους. Οι μεταλλάξεις 273^{his} και 249^{ser} αποτελούν *mutational hotspots* στα καρκινώματα του πνεύμονα. Συγκεκριμένα η 273^{his} θεωρείται μία από της δύο πιο συχνά παρατηρούμενες μεταλλάξεις σε ανθρώπινους όγκους και έχει δειχθεί πως αθανατοποιεί ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα μαστού (Gollahon and Shay 1996). Τέλος η μετάλλαξη 249^{ser} επιλέχθηκε διότι σύμφωνα με τους Coursen et al. μπορεί να επιφέρει ενίσχυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα βρόγχου και πιθανόν να συμμετέχει στα αρχικά στάδια ανάπτυξης του καρκινώματος του πνεύμονα προσφέροντας στα κύτταρα ένα πλεονέκτημα επιλογής (Coursen, Bennett et al. 1997).

1.11 Ras

Η οικογένεια των πρώτο-ογκογονιδίων *ras* εμπλέκεται σε μία πληθώρα βασικών κυτταρικών λειτουργιών όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η γήρανση, η απόπτωση και η κυτταρική επιβίωση. Έχουν ταυτοποιηθεί τρία γονίδια *ras* τα οποία κωδικοποιούν τέσσερις πρωτεΐνες G μεγέθους 21 KDa, τις N-Ras, Ha-Ras, K-RasA και K-RasB. Οι πρωτεΐνες *ras* συντίθενται στα ριβοσώματα ως ανενεργά μόρια και μετά από σειρά μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων μετακινούνται στις κυτταρικές μεμβράνες όπου παράγουν μιτογόνα σήματα

από υποδοχείς κινάσης-τυροσίνης (Serrano, Lin et al. 1997; Diaz, Lue et al. 2005). Σε κατάσταση ηρεμίας η p21^{ras} είναι συνδεδεμένη με το νουκλεοτίδιο GDP και ενεργοποιείται όταν συνδέεται με το νουκλεοτίδιο GTP. Το επίπεδο του σήματος που περνά μέσω της p21^{ras} εξαρτάται από την ισορροπία ανάμεσα στις ποσότητες ras-GDP και ras-GTP που υπάρχουν σε κάθε κύτταρο. Με αυτόν τον τρόπο λειτουργεί ως «μοριακός διακόπτης» πότε αναστέλλοντας και πότε ενεργοποιώντας καθοδικά γεγονότα. Πληθώρα διαφορετικών εξωκυττάρων ερεθισμάτων ενεργοποιούν τη ras η οποία στη συνέχεια διεγείρει πολλαπλές κλιμακωτές αντιδράσεις μεταγωγής σήματος. Η ενεργοποίηση των πορειών των MAPK και PI3K μονοπατιών οδηγεί σε ρύθμιση λειτουργιών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και σε αναστολή ή επαγωγή της απόπτωσης ενώ η ενεργοποίηση της Raf έχει ως τελικό αποτέλεσμα την έκφραση γονιδίων εμπλεκόμενων στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Σχήμα 6) (Shields, Pruit et al. 2000; Vermeulen, Berneman et al. 2003). Συγκεκριμένες σημειακές μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12, 13 και 61 των γονιδίων ras έχουν βρεθεί σε πολλούς και διαφορετικούς τύπους καρκίνου στον άνθρωπο. Η πιο συνηθισμένη ογκογόνος μετάλλαξη του Ha-ras είναι η αλλαγή της γλυκίνης σε βαλίνη στο κωδικόνιο 12. Η μετάλλαξη αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη διαρκή διατήρηση της p21^{ras} στην ενεργή μορφή της και την απορρύθμιση της φυσιολογικής του λειτουργίας (Barbacid 1987; Diaz, Lue et al. 2005). Οι κυτταρικές αποκρίσεις που ενεργοποιούνται από την p21^{Ha-ras} ποικίλουν ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Σε φαιά λιποκύτταρα προκαλεί επαγωγή της απόπτωσης (Nanvaro, 1999) και το ίδιο παρατηρείται και σε κύτταρα Jurkat απουσία δράσης της πρωτεϊνικής κινάσης C (Chen, Bartholomew et al. 1998). Αντίθετα σε κύτταρα Rat-1 το Ha-ras εμφανίζεται να συμμετέχει στην καταστολή της απόπτωσης (Tang, Tokumoto et al. 2001).





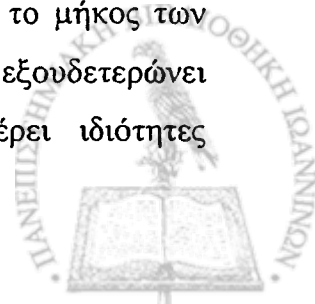
Σχήμα 6. Αντι-αποπτωτικές και προ-αποπτωτικές λειτουργίες του ογκογόνου Ras (Cox and Der 2003).

Μελέτες σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα οισοφάγου έδειξαν πως σε αυτόν τον κυτταρικό τύπο το ενεργό Ha-Ras-V12 επάγει την κυτταρική γήρανση ανεξάρτητα από το p53 και την ένεργότητα της τελομεράσης (Takaoka, Harada et al. 2004).

Το ογκογόνο Ras επάγει την κυτταρική γήρανση μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού Raf/MAPK το οποίο υποκινεί τη συσσώρευση ρυθμιστών της κυτταρικής αύξησης όπως τους αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών p16^{INK4a} και το p21^{WAF1/Cip1} (Serrano, Lin et al. 1997). Επίσης η κυτταρική γήρανση μέσω του Ras φαίνεται να επάγει την p19^{ARF} η οποία αποτελεί ρυθμιστή της p53 (Carnero and Beach 2004). Στις ανθρώπινες ινοβλάστες παρατηρείται πως διαφορετικά στελέχη οδηγούνται από το Ras στη γήρανση μέσω διαφορετικών πορειών. Με βάση μελέτες που δείχνουν πως οι προσφάτως απομονωθείσες ανθρώπινες ινοβλάστες είναι ανθεκτικές στην επαγομένη από το Ras γήρανση έχει σχηματιστεί η υπόθεση ότι τα επίπεδα έκφρασης της p16 καθορίζουν την κυτταρική απόκριση στο Ras (Benanti and Galloway 2004; Benanti and Galloway 2004). Η ίδια θεωρία υποστηρίζει πως τα επίπεδα του p16 αντικατοπτρίζουν τη συνολική ποσότητα στρες που δέχεται το κύτταρο (Benanti and Galloway 2004; Benanti and Galloway 2004).

1.11 Σκοπός της διατριβής

Τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν γενετικές μεταλλάξεις που υπερβαίνουν ή εξαλείφουν τους μηχανισμούς που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη γήρανση. Σε αντίθεση με τα κύτταρα τρωκτικών, τα ανθρώπινα κύτταρα είναι ανθεκτικά στον ογκογόνο μετασχηματισμό, δείχνοντας ότι υπάρχουν θεμελιώδεις διαφορές μεταξύ τους. Αυτές εντοπίζονται στη βιολογία των τελομερών (σε αντίθεση με τα κύτταρα τρωκτικών, τα ανθρώπινα δεν έχουν ενεργό τελομεράση και χάνουν DNA τελομερών μετά από μετά από κάθε κυτταρικό κύκλο με αποτέλεσμα να γηράσκουν) και στις πορείες των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών p53 και Rb, που ρυθμίζονται θετικά από τις ARF και p16^{INK4a} του γενετικού τόπου CDKN2A. Επαγωγή της p53 ή υποφωσφορυλίωση της Rb οδηγεί σε παύση του κυτταρικού κύκλου. Ενδείξεις για την εμπλοκή αυτών των πορειών στη ρύθμιση της γήρανσης και μετασχηματισμού προέρχονται από μελέτες όπου ή υπερέκφραση του SV40 LT σε συνδυασμό με την hTERT και το ογκογονίδιο Ha-RasV12 οδήγησε στη μετατροπή φυσιολογικών ανθρώπινων κυττάρων σε καρκινικά. Ενώ η hTERT διατηρεί το μήκος των τελομερών κατά την ανακαλλιέργεια των κυττάρων, το SV40 LT δεσμεύει και εξουδετερώνει τη δράση των p53 και Rb. Το ογκογονίδιο Ha-RasV12, ενώ επιφέρει ιδιότητες



μετασχηματισμού όταν δρα συνεργειακά με την hTERT ή/και το SV40 LT, επάγει την πρόωρη γήρανση ή την απόπτωση όταν υπερεκφραστεί σε μερικά στελέχη φυσιολογικών ινοβλαστών που εκφράζουν υψηλά ενδογενή επίπεδα της p16^{INK4a}.

Με σκοπό το διαχωρισμό των δράσεων του SV40 LT και τον καθορισμό του εάν όντως απαιτούνται και οι τρεις πορείες ρύθμισης της γήρανσης και του νεοπλασματικού μετασχηματισμού – διατήρηση των τελομερών και απενεργοποίηση των p53 και Rb – εισαγάγαμε με ρετροϊούς σε φυσιολογικές εμβρυικές ανθρώπινες ινοβλάστες MRC-5, οι οποίες εκφράζουν μη- ανιχνεύσιμα ή χαμηλά επίπεδα της p16^{INK4a}, μία μεταλλαγμένη μορφή της p53 (p53^{143ala}), η οποία βρέθηκε ότι μεταβάλλει το φαινότυπο μερικών στελεχών ανθρωπίνων ινοβλαστών, την ανθρώπινη καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης (hTERT), η οποία επιμηκώνει το αναπαραγωγικό δυναμικό φυσιολογικών ανθρωπίνων ινοβλαστών και το μεταλλαγμένο ογκογονίδιο Ha-RasV12.

Στόχοι της παρούσας διατριβής αποτελούν η διερεύνηση της υπόθεσης ότι η απενεργοποίηση της πορείας της p53 είναι αρκετή για τη μετατροπή φυσιολογικών ανθρωπίνων ινοβλαστών σε καρκινικά κύτταρα καθώς και η ευρύτερη μελέτη για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της κυτταρικής γήρανσης και του νεοπλασματικού μετασχηματισμού.



ΥΛΙΚΑ

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

Πίνακας 3. Υλικά	
Υλικό	Εταιρεία
DMEM	Biochrom KG, Germany
Ορός εμβρύου μόσχου (FCS)	Biochrom KG, Germany (Seromed)
Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη	Biochrom KG, Germany
L-γλουταμίνη (200 mM)	Biochrom KG, Germany
Θρυψίνη - EDTA	Biochrom KG, Germany
PBS	Sigma Chemical Co.
Αντιβιοτικά	Sigma Chemical Co.
Θρυπτόνη (Bacto-tryptone)	Sigma Chemical Co.
Εκχύλισμα ζύμης (Bacto-yeast extract)	Sigma Chemical Co.
Άγαρ	Sigma Chemical Co.
Διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO)	Sigma Chemical Co.
Πολυβρίνη (Polybrene)	Aldrich Chemical Co.
1 kb DNA ladder	Life Technologies Inc.
Lambda DNA-Hind III digest	Life Technologies Inc.
Lambda DNA-BstEII Digest	Life Technologies Inc.
Ένζυμα περιορισμού DNA	New England Biolabs
Αγαρόζη	Life Technologies Inc.
Πρότυποι μάρτυρες πρωτεϊνών	BIORad Laboratories, USA
Qiagen kit απομόνωσης πλασμιδιακού DNA	Qiagen, Germany
Nucleobond kit απομόνωσης πλασμιδιακού DNA	Nucleobond
Senescent Cells Staining Kit για Sen-β-Gal	Sigma Chemical Co.
Μεμβράνες νιτροκυτταρίνης	Schleicher and Schnell
ECL kit	Amersham International
Αντισώματα	SantaCruz Biotech USA, BD Transduction Laboratories, USA, Oncogene, DAKO, Upstate
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, ισοαμυλική αλκόλη, ισοπροπανόλη, οξικό οξύ, γλυκερόλη, β-μερκαπτοαιθανόλη, TEMED)	Riedel, Germany ή Sigma Chemical Co. ή BDH-Merck (Analar)
Πλαστικά υλικά κυτταροκαλλιέργειας	CellTek
Πλαστικοί σωλήνες (15 ml, 50 ml)	Falcon
Μικροσωλήνες	Eppendorff

ΜΕΘΟΔΟΙ



2.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

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

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

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

2.1.2 Παρασκευή βακτηρίων επιδεκτικών προς μετασχηματισμό (competent cells)

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

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



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

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

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

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

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



2.1.3 Μετασχηματισμός βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA

50-100 μl ικανών βακτηριακών στελεχών *E. Coli* αναμίχθηκαν με περίπου 20 μl πλασμιδιακού DNA (100-500 ng DNA) σε σωλήνες erpendorff και αφέθηκαν στον πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια εκτέθηκαν σε θερμοκρασία 42°C για δύο λεπτά έτσι ώστε να υποστούν θερμικό στρες (heat shock) και να γίνει εισαγωγή του πλασμιδίου στα βακτηριακά κύτταρα. Προστέθηκε 1 ml L-Broth στους σωλήνες erpendorff και 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 σύν 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).

2.1.4 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 ανεπτυγμένης βακτηριακής καλλιέργειας και επώαση σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C για όλη τη νύχτα.



2.1.5 Παρασκευή βακτηριακών 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.

2.1.6 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 pH5.2 υποβοηθεί στη καθίζηση πρωτεϊνών, RNA και χρηματοσωμικού DNA). Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, στις 13000 στροφές στους 4°C, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε έναν καθαρό αποστειρωμένο σωλήνα 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 pH8.0, 10 mM ml EDTA pH 8.0 και 4 mg/ml λυσοζύμη

Αλκαλικό διάλυμα: 0.2 NaOH, 1%SDS

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



2.1.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλους όγκους (maxi prep)

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

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

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



2.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

2.2.1 Κυτταρικές σειρές και καλλιέργεια

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

Πίνακας 1.- Περιγραφή κυτταρικών σειρών

Κυτταρική σειρά	Περιγραφή	Βιβλιογραφική αναφορά
MRC-5	Φυσιολογικό στέλεχος ανθρώπινων εμβρυϊκών ινοβλαστών	(Jacobs, Jones et al. 1970)
IMR90	Φυσιολογικό στέλεχος ανθρώπινων εμβρυϊκών ινοβλαστών	(Nichols, Murphy et al. 1977)
ΦΝΧ (Phoenix)	Αμφοτροπική κυτταρική σειρά πακεταρίσματος ρετροϊών	Αδημοσίευτη κυτταρική σειρά (ευγενική χορήγηση του Professor K. B. Marcu, State University of New York at Stony Brook)

Κύτταρα 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 1.4 mM L-γλουταμίνη στους 37°C, 5%CO₂. Όλα τα υλικά κυτταροκαλλιέργειας ήταν από τη Biochrom KG, Germany.

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

Η ανάπτυξη οποιασδήποτε κυτταρικής καλλιέργειας έχει συνήθως απαίτηση εμπλουτισμού του βασικού καλλιεργητικού υλικού με ορό. Μη ταυτοποιημένα ακόμη συστατικά του ορού, κυρίως αυξητικοί παράγοντες (growth factors), είναι αναγκαίοι για



τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Εξαιρετική πηγή των παραγόντων αυτών θεωρείται ο ορός από έμβρυο μόσχου ο οποίος και χρησιμοποιήθηκε.

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

Ρυθμιστικό διάλυμα φυσιολογικού ορού - φωσφορικού άλατος (Phosphate Buffered Saline; PBS): Μία ταμπλέτα PBS (Sigma chemical Co.) διαλύθηκε με ανάδευση σε 200 ml δις-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.

2.2.2 Ανακαλλιέργεια κυττάρων

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

Αρχικά επιλέχθηκαν τρυβλία των 90 mm, με κύτταρα σε πλήρες ταπήτιο (confluent) και το θρεπτικό υλικό DMEM αναρροφήθηκε με τη βοήθεια αποστειρωμένων πιπετών Pasteur. Στη συνέχεια τα τρυβλία εκκλύθηκαν δύο φορές με 10 ml PBS και ύστερα προστέθηκε 1 ml διάλυμα θρυψίνης – EDTA (Biochrom KG, Germany) σε αυτά. Το διάλυμα περιείχε 0.05% θρυψίνη / 0.02% EDTA (w/v) σε PBS χωρίς ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}) και μαγνησίου (Mg^{2+}). Τα κύτταρα αφέθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5%CO₂ για περίπου 2-5 λεπτά, ώστε να αποκολληθούν από το τρυβλίο. Μετά προστέθηκε ο κατάλληλος όγκος PBS στα τρυβλία, ώστε να γίνουν οι επιθυμητές διαιρέσεις, συνήθως σε αναλογίες 1:2, 1:4, 1:8 ή 1:16. Τέλος αφού προστέθηκε ο κατάλληλος όγκος εναιωρήματος κυττάρων στα νέα τρυβλία, ανάλογα με τη διαίρεση, προστέθηκαν και 10 ml πλήρους DMEM και τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5%CO₂, ώστε να αναπτυχθούν τα κύτταρα εκ νέου.



Ανάπτυξη, διατήρηση και αποθήκευση κυτταρικών σειρών

2.2.3 Διατήρηση των κυττάρων - Πάγωμα κυττάρων

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

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

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



2.2.4 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 25cm² όπου προστέθηκαν σιγά σιγά 8 ml πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM. Τα κύτταρα ανακινήθηκαν ελαφρά και τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5%CO₂.

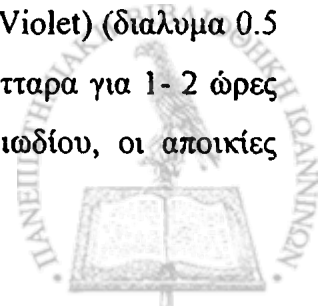
Την επόμενη ημέρα, αφού τα κύτταρα προσκολλήθηκαν στον πάτο των φλασκών, το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και προστέθηκαν 6 ml φρέσκου πλήρους DMEM και οι φλάσκες επανατοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο, ώσπου τα κύτταρα να σχηματίσουν πλήρες ταπήτιο. Όταν αυτά αναπτύχθηκαν σε πλήρες ταπήτιο θρυψινοποιήθηκαν και ανακαλλιεργήθηκαν σύμφωνα με την περιγραφή στη ενότητα παραπάνω (παρ. 2.9).

2.2.5 Καταμέτρηση κυττάρων με το αιμοκυτταρόμετρο

Μετά τη θρυψινοποίηση των κυττάρων και την αποκόλληση τους από τις φλάσκες ή τα τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας, 10 ml εναιωρήματος κυττάρων σε PBS τοποθετήθηκαν στο αιμοκυτταρόμετρο (Neubauer Chamber) όπου και έγινε η μέτρηση των κυττάρων σε δύο διαγώνια τετράγωνα από το σταυρό (τα οποία είναι διαιρεμένα σε 16 επιμέρους τετραγωνάκια, δηλαδή 2 x 16). Η μέτρηση επαναλήφθηκε τρεις φορές, υπολογίστηκε ο μέσος όρος των κυττάρων των μετρήσεων, διαιρέθηκε δια 100 και πολλαπλασιάστηκε x 10⁶ δίνοντας έτσι το συνολικό αριθμό των κυττάρων x 10⁶ ανά ml του αρχικού εναιωρήματος κυττάρων.

2.2.6 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 (φιξάρισμα) των κυττάρων και το διάλυμα παρέμεινε για 10 – 20 δευτερόλεπτα. Το μίγμα αναρροφήθηκε και προστέθηκαν 5 ml κρυσταλλικού ιωδίου (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 συνθήκες παρουσίας ή απουσίας ορού το κλάσμα του αριθμού αποικιών χωρίς επεξεργασία προς το κλάσμα των του αριθμού αποικιών με επεξεργασία αποτελούσε την επί τοις % βιωσιμότητα των κυττάρων κάτω από διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας.

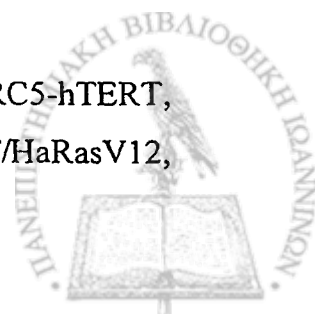
2.2.7 Καμπύλες αύξησης

Κύτταρα MRC-5 και IMR90 που εξέφραζαν διαφορετικά γονίδια (MRC-5-hTERT, MRC-5-HaRasV12, MRC-5-p53^{ala}, MRC-5-HaRasV12/p53^{ala}, MRC5-hTERT/HaRasV12, MRC5-hTERT/HaRasV12, MRC5-hTERT/HaRasV12/p53^{ala}, IMR90/Ras) σε πλήρες ταπήτιο θρυψινοποιήθηκαν και μετρήθηκαν σε αιμοκυτταρόμετρο. Έγινε σπορά 2.5×10^4 κυττάρων ανά πηγαδάκι σε πολυτριβλύο 24 πηγαδιών και διαμέτρου 18 mm και τα κύτταρα επώασθησαν για 12-14 ημέρες σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37°C, 5%CO₂. 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 ακολουθήθηκε για διάστημα 12-14 ημέρες, με μέτρηση σε αιμοκυτταρόμετρο των κυττάρων δύο πηγαδιών ανά κυτταρική σειρά κάθε 2 ημέρες, ώστε να κατασκευασθούν καμπύλες αύξησης και να υπολογισθεί ο ρυθμός αύξησης τους.

2.2.8 Χρώση για την ανίχνευση της β-γαλακτοσιδάσης

Η ανίχνευση της β-γαλακτοσιδάσης σε κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε φάση κυτταρικής γήρανσης έγινε με τη χρήση του "Senescent Cells Staining Kit" της Sigma.

Κύτταρα MRC5 και IMR90 που εξέφραζαν διαφορετικά γονίδια (MRC5-hTERT, MRC5-HaRasV12, MRC5-p53^{ala}, MRC5-HaRasV12/p53^{ala}, MRC5-hTERT/HaRasV12,



MRC5-hTERT/HaRasV12, MRC5-hTERT/HaRasV12/p53^{ala}, IMR-90/Ras) σε πλήρες ταπήτιο θρυψινοποιήθηκαν και μετρήθηκαν σε αιμοκυτταρόμετρο. Έγινε σπορά 2.5×10^4 κυττάρων ανά πηγαδάκι σε πολυτριβλύο 24 πηγαδιών και διαμέτρου 18 mm και τα κύτταρα επώασθησαν για 24h σε πλήρες θρεπτικό υλικό στους 37°C, 5%CO₂. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αναρροφήθηκε και τα κύτταρα εκπλύθηκαν δύο φορές με PBS. Προστέθηκαν 0.3 ml σταθεροποιητικού διαλύματος (1x Fixation Buffer) και τα κύτταρα επώαστηκαν για 6-7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στο χρονικό διάστημα της επώασης προετοιμάστηκε το μίγμα χρώσης (Staining Mixture). Ακολούθησε έκπλυση των κυττάρων για 3 φορές με PBS, προστέθηκαν 0.2 ml από το μίγμα χρώσης σε κάθε πηγάδι και τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37°C απουσία CO₂ για όλη τη νύχτα. Τα τρυβλία καλύφθηκαν με φιλμ παραφίνης. Τα κύτταρα που βρίσκονται σε φάση κυτταρικής γήρανσης θα παρουσιάσουν μία μπλε χρώση.

2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

(Α) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

2.3.1 Απομόνωση χαμηλού μοριακού βάρους γενωμικού DNA

Χαμηλού μοριακού βάρους γενωμικό DNA απομονώθηκε από επικολλημένα και επιπλέοντα στο θρεπτικό υλικό κύτταρα όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Sugiki, Hozumi 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 ξεπλύματα προστέθηκαν στον σωλήνα Falcon. Τα επικολλημένα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν, συλλέχθηκαν στον σωλήνα Falcon μαζί με τα επιπλέοντα κύτταρα και φυγοκεντρήθηκαν στις 2000 rpm στους 4°C. Το κυτταρικό ίζημα εναιωρήθηκε σε 1 ml PBS-1 mM EDTA pH8.0, μεταφέρθηκε σε σωλήνες 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 eppendorf και επώασθηκε διαδοχικά με 2 mg/ml RNάση A για 2 ώρες στους 37°C και με 250 μg/ml πρωτεΐνάση K για 2 ώρες στους 37°C.

Μετά τις επωάσεις, προστέθηκαν 20 μl 5 M NaCl και 120 μl ισοπροπανόλης και τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -20°C όλη τη νύχτα για την κατακρήμνιση του DNA. Μετά από φυγοκέντρηση στις 13000 rpm στους 4°C για 20 λεπτά, το DNA εκπλύθηκε με 70% αιθανόλη και το ίζημα του DNA αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά για να στεγνώσει. Στη συνέχεια εναιωρήθηκε σε 20 μl ρυθμιστικό διάλυμα 1XTE pH7.4.

Τα δείγματα του DNA αναλύθηκαν σε 1.6% πηκτή αγαρόζης που περιείχε 0.5 μg/ml βρωμιούχο εθίδιο 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 εκγύλισης DNA (DNA lysis buffer): 10 mM Tris-Cl pH7.4, 10 mM EDTA pH8.0, 0.5% Triton X-10

(B) ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

2.3.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

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

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

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

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



Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οριζόντιες πηκτές αγαρόζης 1% σε 0.5XTBE για την ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού ή ρετροϊκού DNA και πηκτές αγαρόζης 1.6% σε 0.5XTBE για την ηλεκτροφόρηση χαμηλού μοριακού βάρους γενωμικού DNA. Η στερεά αγαρόζη σε 0.5XTBE θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι βρασμού και αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία 50–56°C πριν την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/ml. Το διάλυμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και εισήχθη στο διάλυμα ένα κατάλληλο χτενάκι για τη δημιουργία επίπεδης πηκτής με υποδοχές ('πηγαδάκια'). Μετά το πολυμερισμό της αγαρόζης και το σχηματισμό της πηκτής (gel), προστέθηκε ο απαραίτητος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος 0.5XTBE ώστε να καλυφθεί η πηκτική αγαρόζης και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις υποδοχές ('πηγαδάκια') της πηκτής αφού αναμείχθηκαν σε αναλογία 1:10 με διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων (sample loading buffer) για την κατακρήμνιση του DNA και την παρακολούθηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης (ολικός όγκος δειγμάτων 25 μl). Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν και μάρτυρες DNA με γνωστά, κλιμακούμενα μοριακά βάρη όπως 1 kb DNA ladder, Lambda DNA-Hind III digest και Lambda DNA-BstEII Digest (Gibco BRL Life Technologies Inc.). Μπορούν έτσι να υπολογιστούν προσεγγιστικά τα μοριακά βάρη των προς έλεγχο τμημάτων του DNA.

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

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

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

10X Διάλυμα 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



(Γ) ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ DNA

2.3.3 Κοπή πλασμιδίων με περιοριστικά ένζυμα

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

Οι περιοριστικές ενδοουκλεάσες 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 ενδοουκλεάσες 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).

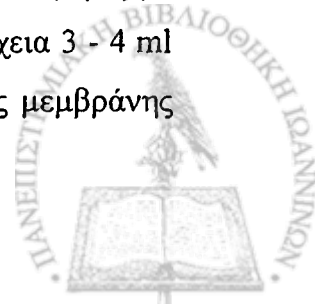
2.3.4 Ανάκτηση τμημάτων DNA από πηκτή αгарόζης με ηλεκτροδιήθηση

Η ανάκτηση τμημάτων DNA από πηκτές αгарόζης 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, ρετροϊκό φορέα) (παρ. 2.26, 2.35).

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

Το τμήμα της πηκτής αгарόζης που περιλαμβάνει τη ζώνη (μπάντα) με το επιθυμητό γονίδιο κόπηκε με αποστειρωμένη λεπίδα και μεταφέρθηκε σε ειδική μεμβράνη κυτταρίνης (μεμβράνη διαπίδησης, 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 αгарόζης. Τα άκρα της μεμβράνης



κλείστηκαν με ειδικά κλιπς. Η μεμβράνη τοποθετήθηκε στη οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και εφαρμόστηκε 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. Αν 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 σε 0.5XTBE μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο σωλήνα Falcon 15ml. Η μεμβράνη εκπλύθηκε με 2ml αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό τα οποία προστέθηκαν στο σωλήνα Falcon. Στη συνέχεια προστέθηκε ένας ίσος όγκος εξισοροπημένης 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 pH5.2. Αφού αναμείχθηκε καλά, διατηρήθηκε στους -40°C καθόλη τη διάρκεια της νύχτας για την κατακρήμνιση του DNA. Την επομένη ημέρα φυγοκεντρήθηκε στις 6000rpm 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 pH8.0. Το διάλυμα DNA μεταφέρθηκε σε ένα σωλήνα erpendorff και διατηρήθηκε στους -40°C μέχρι ότου χρησιμοποιηθεί.

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

2.3.5 Παρασκευή μεμβρανών διαπίδησης (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 βράσουν πάλι για άλλα 10 λεπτά. Μετά την έκπλυση τους με αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό, διατηρήθηκαν σε αιθανόλη στους 4°C.



2.3.6 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) επώαστηκαν με 1 unit 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 τη προσθήκη 300 mM EDTA pH8.0. Το DNA εκχυλίστηκε με φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (24:24:1) και κατακρυσνίσθηκε με τη προσθήκη 1/10 όγκων οξικού νατρίου pH5.2 και 2 όγκων 100% αιθανόλης στους -20°C (Sambrook et al., 1989).

Ρυθμιστικό διάλυμα 10XCIP: 100 mM Tris-Cl pH8.3, 10 mM ZnCl₂, 10 mM MgCl₂, 10 mM Σπερμιδίνη

2.3:7 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 1X ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης και 1 unit T4 DNA λιγάσης σε έναν όγκο 20 μl και επώαστηκαν για όλη τη νύχτα στους 16°C.

Ίκανά βακτήρια' μετασχηματίστηκαν στη συνέχεια με το μείγμα όπως περιγράφηκε παραπάνω (παρ. 2.3) και επιστρώθηκαν σε τριβλύα L-agar που περιείχαν 100 μg/ml αμπικικλλίνη (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)



2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

2.4.1 Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων για την ανάλυση πρωτεϊνών

Κύτταρα MRC-5, MRC-5/p53^{143ala}, MRC-5/Ha-RasV₁₂, MRC-5/p53^{143ala}, MRC-5-TERT, MRC-5-TERT/p53^{143ala}, MRC-5-TERT/Ha-RasV₁₂, MRC-5-TERT/p53^{143ala} και MRC-5-TERT/p53^{143ala}/Ha-Ras-V₁₂ χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων, σύμφωνα με προηγούμενες μεθόδους που έχουν περιγραφεί (Lane and Harlow, 1989; Sambrook et al., 1989).

Περιληπτικά, τρυβλία των 10 cm εκπλύθηκαν αρχικά δύο φορές με 5 ml ψυχρής PBS-1mM EDTA pH8.0 και στη συνέχεια προστέθηκε 1.0 ml ψυχρής PBS-1mM EDTA pH 8.0 και τα κύτταρα συλλέχθηκαν με ειδικό σιλικονούχο υλικό (rubber policeman) σε σωλήνα erpendorff. Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στις 6500 rpm για 2' στο ψυχρό θάλαμο (cold room) και το υπερκείμενο αφαιρέθηκε. Κατόπιν προστέθηκαν 100 – 150 μl διαλύματος RIPA το οποίο περιείχε αναστολείς πρωτεασών, ομογενοποιήθηκαν με δίνη (vortex) και το μίγμα παρέμενε στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολούθησε ανάδευση με δίνη (vortex) για περίπου 1 λεπτό και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό, αποστειρωμένο σωλήνα erpendorff και μικρή ποσότητα των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τα αντιδραστήρια της BioRad. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε μικρότερα (aliquots) των 25 μl και προστέθηκε ¼ του όγκου 4Χδιάλυμα 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.

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



2.4.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

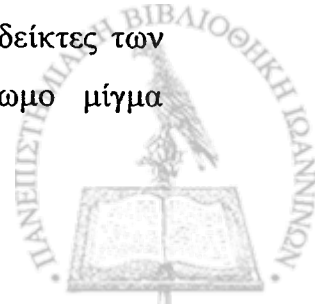
Με την ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Το ακρυλαμίδιο πολυμερίζεται με μηχανισμό ελευθέρων ριζών μετά από προσθήκη υπερθευικού αμμωνίου και TEMED και δημιουργεί τρισδιάστατο δίκτυο. Ο σύνδεσμος των αλυσίδων του ακρυλαμιδίου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

Η ηλεκτροφόρηση έγινε με τη μέθοδο του Laemmli (1970) σε σύστημα κάθετων γυάλινων πλακών [Lane and Harlow, 1989; Sambrook et al., 1989]. Η πηκτή αποτελείται από δύο μέρη: Από την πηκτή επιστοιβαξης 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 επιστοιβαξης 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/ApoJ, 15% για το Bcl-2 και 8% για την πολυμεράση της πολύ-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 [Lane and Harlow, 1989; Sambrook et al., 1989].

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

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 δείκτης των μοριακών βαρών των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ένα πρότυπο έγχρωμο μίγμα



πρωτεϊνών (Kaleidoscope prestained standards; Bio-Rad Laboratories, USA) που περιείχε: μυσίνη 199 kDa (μπλε), β-γαλακτοσιδάση 133 kDa (πορφυρό), λευκωματίνη ορού μόσχου 87 kDa (πράσινο), ανθρακική ανυδράση 40.1 kDa (βιολετί), αναστλέας θρυψίνης από σόγια 31.6 kDa (πορτοκαλί), λυσοζύμη 18.5 kDa (κόκκινο) και απροτινίνη 7.1 kDa (μπλε).

Όγκοι πηκτής επιστίβαξης (για δύο πηκτές: 10 ml)

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

Όγκοι πηκτών διαχωρισμού (για δύο πηκτές: 20 ml)

Πηκτή	Διάλυμα	Όγκος (ml)	Τελική συγκέντρωση
10%	Αποστειρωμένο ddH ₂ O	7.9	
	30% μίγμα ακρυλαμιδίου (29.2% ακρυλαμίδιο, 0.8% Δις-ακρυλαμίδιο)	6.7	10% w/v
	1.5 M Tris pH8.8	5.0	0.375 M
	10% SDS	0.2	0.1%
	10% υπερθειϊκό αμμώνιο	0.2	0.1%
	TEMED	0.008	
	Τελικός όγκος (ml)	20	
12%	Αποστειρωμένο ddH ₂ O	6.6	
	30% μίγμα ακρυλαμιδίου (29.2% ακρυλαμίδιο, 0.8% Δις-ακρυλαμίδιο)	8.0	10% w/v
	1.5 M Tris pH8.8	5.0	0.375 M
	10% SDS	0.2	0.1%
	10% υπερθειϊκό αμμώνιο	0.2	0.1%
	TEMED	0.008	
	Τελικός όγκος (ml)	20	
15%	Αποστειρωμένο ddH ₂ O	4.6	
	30% μίγμα ακρυλαμιδίου (29.2% ακρυλαμίδιο, 0.8% Δις-ακρυλαμίδιο)	10	10% w/v
	1.0 M Tris pH 6.8	5.0	0.375 M
	10% SDS	0.2	0.1%



10% υπερθειϊκό αμμώνιο	0.2	0.1%
TEMED	0.008	
Τελικός όγκος (ml)	20	

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

2.4.2 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

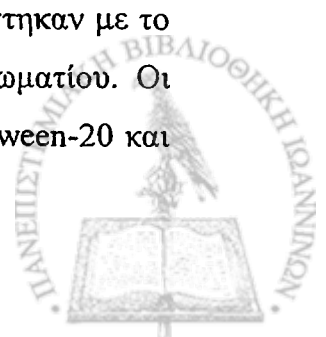
Διαλύματα αποχρωματισμού: Ανάμιξη 95% αιθανόλης και 5% οξικού οξέος σε αναλογία:
(α) 2:3 για 60-120 λεπτά
(β) 1.5:3.5 για 60-120 λεπτά
(γ) 1:4 για 120 λεπτά
(δ) 350 ml 5% οξικού οξέος και 150 ml αποστειρωμένου δις-απεσταγμένου νερού για 60 λεπτά – όλη τη νύχτα

2.4.3 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 ή western blot).

Μετά την ηλεκτροφόρηση σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα Tris-γλυκίνης που περιείχε SDS, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών για όλη τη νύχτα (>16 ώρες) στους 4°C και τάση 35V σύμφωνα με προηγούμενες μεθόδους που έχουν περιγραφεί (Sambrook 1989).

Μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών, οι μεμβράνες επώαστηκαν για 3 ώρες– όλη τη νύχτα σε 5% άπαχο γάλα σκόνη ελεύθερο λιπιδίων διαλυμένο σε PBS το οποίο περιείχε 0.05% Tween-20 (5% blocking solution). Στην συνέχεια οι μεμβράνες επώαστηκαν με το πρώτο αντίσωμα σε 5% blocking solution για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μεμβράνες εκπλύθηκαν 3 φορές από 10 λεπτά με PBS που περιείχε 0.05% Tween-20 και



εκτέθηκαν στο δεύτερο αντίσωμα για 1.5 – 2 ώρες. Οι μεμβράνες εκπλύθηκαν 3 φορές από 10 λεπτά με PBS που περιείχε 0.05% Tween-20 και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν σε σκοτεινό θάλαμο χρησιμοποιώντας το Pierce Super Signal West Pico Chemiluminescence kit (Pierce, USA) ή το ECL (Amersham Int.), σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών, και εκτέθηκαν σε φιλμ Kodak-XOMAT AR.

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

Αντίσωμα	Εταιρεία
Anti hTERT rabbit polyclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti β -actin mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti p53 (DO1) mouse monoclonal	Oncogene Science
Anti p21 ^{Ha-Ras} mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti Cyc-D1 mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti P16 ^{INK4a} rabbit polyclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti p21 ^{CIP/WAF1} mouse monoclonal	BD Transduction Laboratories, USA
Anti cdc-6 mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti γ -H2AX mouse monoclonal	Upstate
Anti H2A rabbit polyclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti Chk2-pT68	
Anti Chk-2 rabbit polyclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti p-p53 (ser20) rabbit polyclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti PARP-1 mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA
Anti Bax rabbit polyclonal	DAKO Co
Anti Bak rabbit polyclonal	DAKO Co
Anti Bcl-2 mouse monoclonal	SantaCruz Biotech, USA

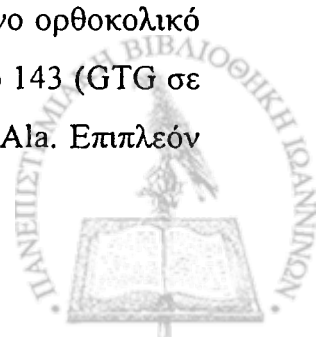


2.5 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

2.5.1 Ρετροϊικοί φορείς (Retroviral vectors)

Φυσιολογικές ανθρώπινες ινοβλάστες MRC-5 επιμολύνθηκαν με αμφοτροπικούς ρετροϊικούς φορείς έκφρασης που έφεραν είτε την καταλυτική υπομονάδα της ανθρώπινης τελομεράσης *hTERT* (Babe-Puro/*hTERT*; ευγενική προσφορά της J. Campisi, Lawrence Berkley National Laboratory, California) ή/και τη μεταλλαγμένη μορφή της ανθρώπινης *p53*, *p53^{143ala}* (ΔΗ-*p53^{143ala}* ή ΔΗ-SCX-3) (Baker et al., 1990; Kolettas et al., 2005), ή/και το ογκογονίδιο *Ha-RasV12* (LXSN-*RasV12*; ευγενική προσφορά του J. Downward, ICRF/CRC Laboratories, London, UK) προκειμένου να κατασκευασθούν ινοβλάστες MRC-5*Ras*, MRC-5*p53^{143ala}*, MRC-5*p53^{143ala}/Ras*, MRC-5*TERT*, MRC-5*TERT/p53^{143ala}*, MRC-5*TERT/Ras* και MRC-5*TERT/p53^{143ala}/Ras*. Μετά την επιμόλυνση και την επιλογή των επιμολυσμένων κυττάρων στα αντίστοιχα αντιβιοτικά, πουρομυκίνη (*TERT*), υγρομυκίνη (*p53^{143ala}*) και G418 (*Ha-RasV12*) και οι ανθεκτικοί κυτταρικοί πληθυσμοί αυξήθηκαν..

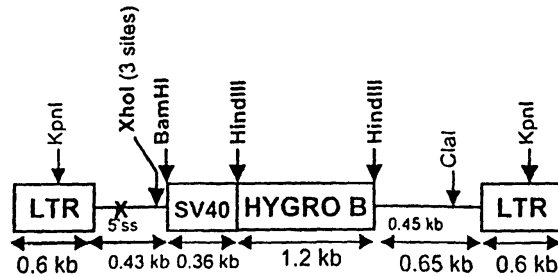
Ο ρετροϊικός φορέας ΔΗ-SCX3 φέρει επιπλέον του γονιδίου της φωσφομεταφοράσης της υγρομυκίνης (HygroB), ένα ανθρώπινο μεταλλαγμένο *p53^{143ala}* cDNA (Σχήμα 4.2). Ο ΔΗ-SCX3 ήταν ευγενής προσφορά του Δρ. Θεοδώρου Τζαβάρα, Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, και η κατασκευή και η χρήση του δεν έχουν δημοσιευθεί. Για την κατασκευή του *pΔΗ-SCX3*, το 1.8 kb BamHI μεταλλαγμένο ανθρώπινο cDNA της *p53* (*mtp53^{143ala}*) από τα νουκλεοτίδια -130 έως +1671 σε σχέση με τη θέση έναρξης της μετάφρασης (Baker et al., 1989) απομονώθηκε από το φορέα έκφρασης *pCp53-SCX3* (Baker et al., 1990) (ευγενής προσφορά του Dr. Burt Vogelstein, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, USA). Στη συνέχεια έγινε επεξεργασία του *mtp53^{143ala}* cDNA με τη πολυμεράση *klenow* για τη δημιουργία ισοτελών άκρων (blunt-ended), προστέθηκαν συνδέτες (linkers) BamHI και κλωνοποιήθηκε στη θέση BamHI του *pΔΗ* (Overell et al., 1988) (ευγενής προσφορά του Dr. Robert Overell, Immunex Corporation, USA) για να παραχθεί ο ρετροϊικός φορέας *pΔΗ-SCX3*. Το HygroB είναι κάτω από το μεταγραφικό έλεγχο του πρώιμου προαγωγέα του SV40 και επιφέρει ανθεκτικότητα στην υγρομυκίνη B. Το ανθρώπινο μεταλλαγμένο *p53^{143ala}* 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 T σε C μέσα στο κωδικόνιο 143 (GTG σε GCG) έτσι ώστε να μεταβάλλεται το αμινοξύ που κωδικοποιείται από Val σε Ala. Επιπλέον



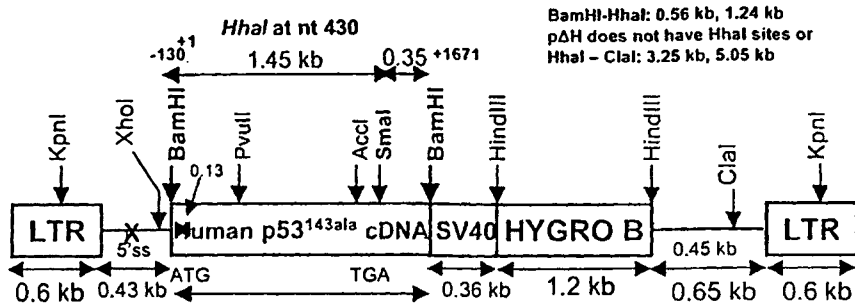
αυτή η μετάβαση έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας νέας θέσης περιορισμού, HhaI (GCGC, nt 427-430) που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό μεταξύ αγρίου-τύπου (wt) και μεταλλαγμένου (mutant; mt) ανθρώπινου p53 cDNA. Η κατεύθυνση του cDNA στο ρετροϊκό φορέα μπορεί να ελεγχθεί με SmaI και ClaI που κόβουν 350 bp ανάρρους του 3' άκρου του p53 και μέσα στο ρετροϊκό φορέα, αντίστοιχα.



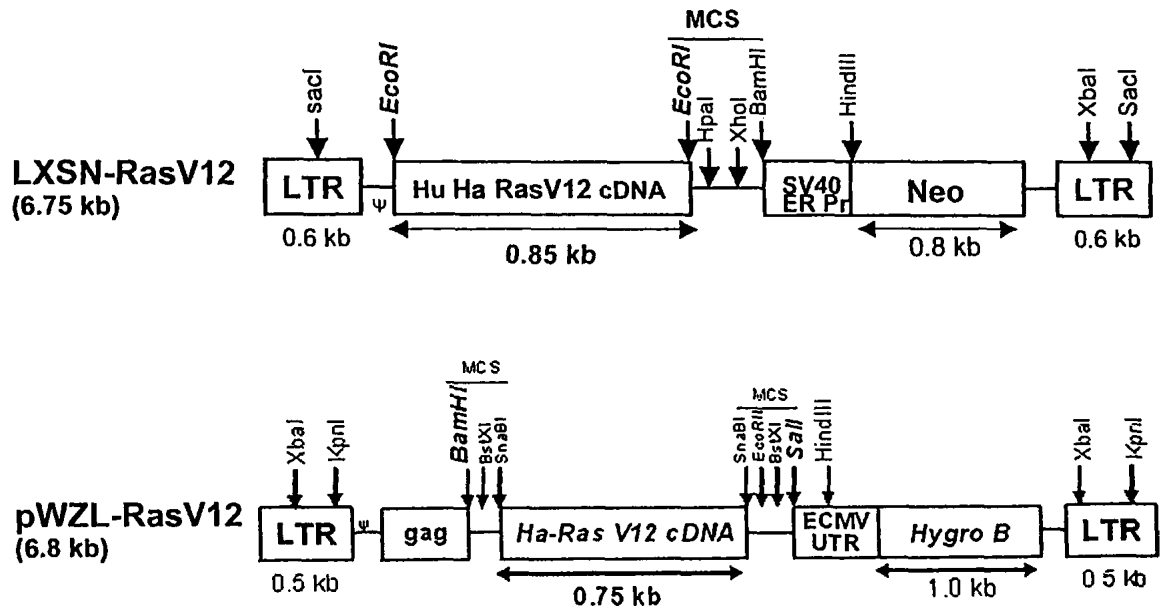
pΔH
(6.5 kb)



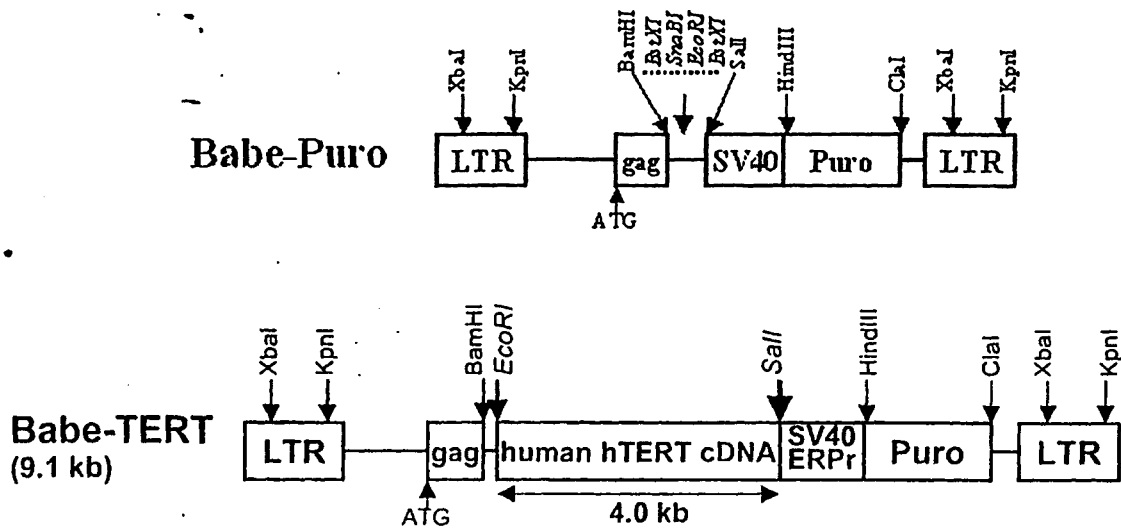
pΔH-SCX-3
(p53^{143ala}, 8.3kb)



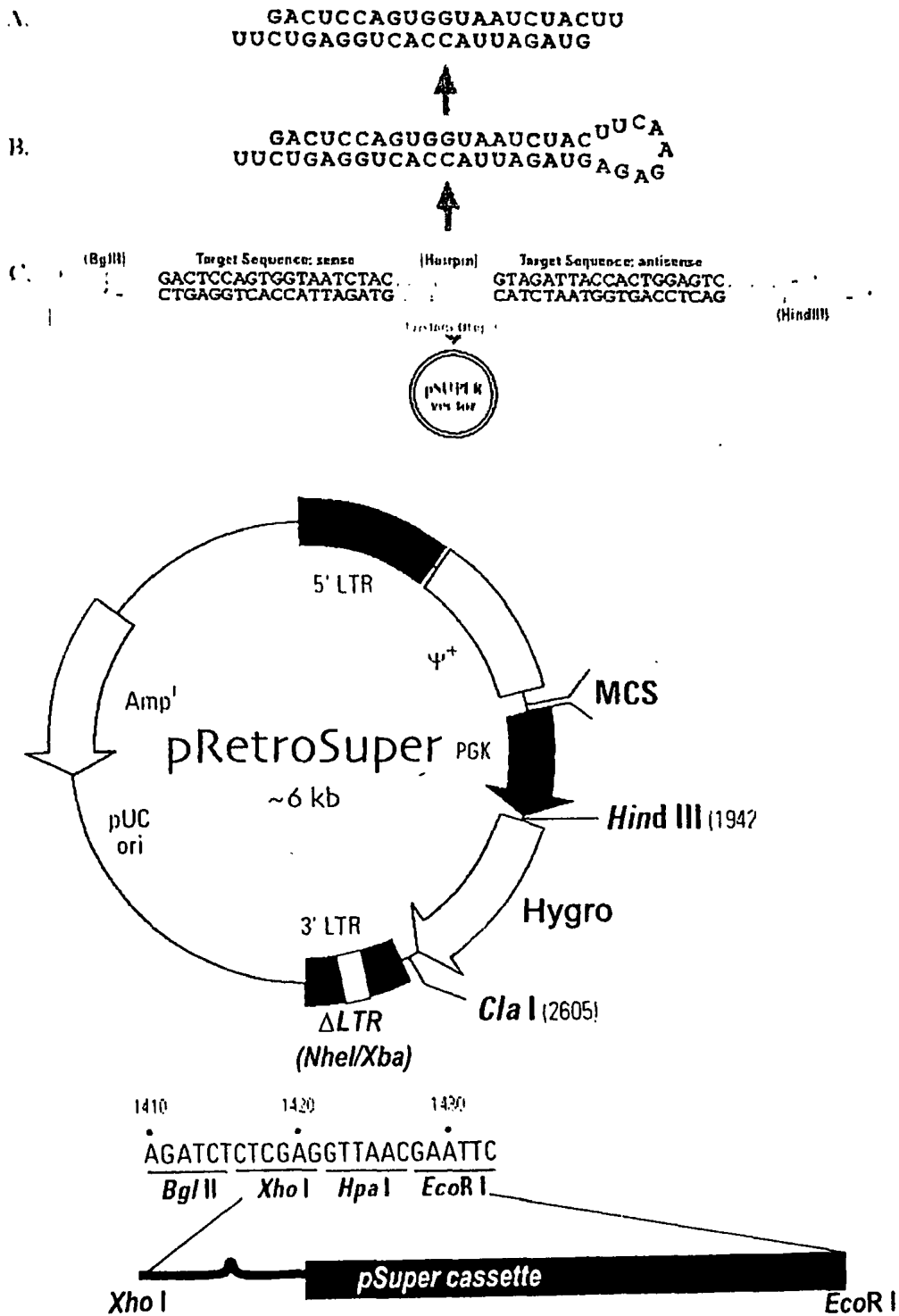
Σχήμα 7. Σχηματική παράσταση του ρετροϊκού φορέα ελέγχου ΔΗ και του ρετροϊκού φορέα έκφρασης της p53^{143ala}, ΔΗ-SCX3. Ο ΔΗ-SCX3 φέρει επιπλέον του γονιδίου της φωσφομεταφοράς της υγρομυκίνης (Hygro), ένα ανθρώπινο μεταλλαγμένο p53^{143ala} cDNA που απομονώθηκε από έναν ανθρώπινο ορθοκολικό καρκίνο (Baker et al., 1989; Baker et al., 1990) και κλωνοποιήθηκε στη θέση BamHI του pΔH (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.



Σχήμα 8. Σχηματική παράσταση των ρετροϊικών φορέων έκφρασης της RasV12, LXSN-RasV12 και pWZL-RasV12.



Σχήμα 9. Ρετροϊκοί φορείς έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης τελομεράσης. Στον ρετροϊό ελέγχου Babe-Puro κλωνοποιήθηκε στη θέση EcoRI το ανθρώπινο cDNA της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης για την κατασκευή του ρετροϊκού φορέα Babe-TEPT.



Σχήμα 10. Σχηματική παράσταση του ρετροϊκού φορέα έκφρασης του p53 RNAi.



2.5.2 Παραγωγή ρετροϊών με διαμόλυνση DNA

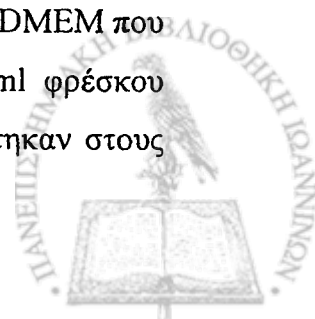
Για την παραγωγή ρετροϊών χρησιμοποιήθηκε η αμοτροπική κυτταρική σειρά πακεταρίσματος ρετροϊών Phoenix (ΦNX) η οποία διαμολύνθηκε με τους επιθυμητούς ρετροϊικούς φορείς με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου (Gorman, Padmanabhan et al. 1983). Τα ρετροϊικά σωματίδια που προέκυψαν μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων ΦNX χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση των κυττάρων MRC-5 και IMR-90 (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 ενδοκύττωσης, συμπλέγματα φωσφορικού ασβεστίου-DNA όταν αυτά προστίθενται εξωγενώς. Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την επιμόλυνση των κυττάρων παρασκευάζονται λίγο πριν τη χρήση τους και αποστειρώνονται σε φίλτρα 0.2 μm Sartorius. Η διαμόλυνση γίνεται με την μεγαλύτερη δυνατή ταχύτητα, ώστε το pH της καλλιέργειας να μην μεταβληθεί.

Περίληπτικά, έγινε σπορά 3×10^6 κύτταρα ΦNX ανά 6cm τριβλύο και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C , 5%CO₂. Μετά την επώαση, έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού με 3 ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM τουλάχιστον 2 ώρες πριν τη διαμόλυνση των κυττάρων με τους ρετροϊικούς φορείς. Στη συνέχεια αναμίχθηκαν με δίνη (vortex) 15 μg ρετροϊικού DNA σε 1XTE pH8.0 με 31 μl 2M CaCl₂ και αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 250 μl . Το μίγμα προστέθηκε στάγδην και υπό χαμηλή συνεχή ανάδευση, σε 250 μl αποστειρωμένου διαλύματος 2XHBS pH7.12. Το καθαρό (διαφώτιστο; translucent) ίζημα συμπλεγμάτων DNA-CaPO₄ που σχηματίστηκε (όγκος 500 μl) προστέθηκε αμέσως στάγδην στα κύτταρα που τοποθετήθηκαν αμέσως στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C , 5%CO₂, για να μην μεταβληθεί το pH της καλλιέργειας, και ακολούθησε επώαση για όλη τη νύχτα (>18 ώρες).

Μετά από τουλάχιστον 18 ώρες επώασης, το θρεπτικό υλικό που περιείχε το DNA αναρροφήθηκε και τα διαμολυσμένα κύτταρα εκπλύθηκαν δύο φορές με 5 ml DMEM που περιείχε αντιβιοτικά και L-γλουταμίνη χωρίς ορό. Μετά τη προσθήκη 4 ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM, τα διαμολυσμένα κύτταρα ΦNX επώαστηκαν στους



37°C, 5%CO₂ για 24 – 48 ώρες πριν τη συλλογή των ρετροϊκών σωματιδίων για την επιμόλυνση των κυττάρων MRC-5 και IMR-90.

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

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

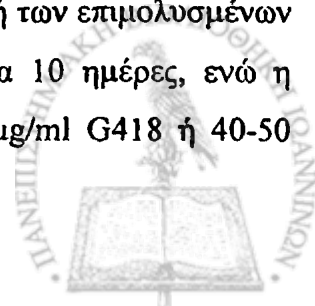
(β) *Επιμόλυνση των κυττάρων MRC-5 και IMR-90 με τους ρετροϊούς*

Οι ανασυνδυασμένοι ρετροϊοί ελαττωματικής αντιγραφής (replication-defective recombinant retroviruses) που παράχθηκαν με τη διαμόλυνση των κυττάρων ΦNX με τους ρετροϊικούς φορείς χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση των κυττάρων MRC-5 και IMR90 όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Kolettas and Rosenberger 1998).

Περίληπτικά η διαδικασία πραγματοποιείται σε δύο βασικά στάδια:

- (i) Το θρεπτικό υλικό των διαμολυσμένων κυττάρων ΦNX που περιείχε τα ρετροϊκά σωματίδια συλλέχθηκε μετά από 24 ώρες και φιλτραρίστηκε διαμέσου ενός μικροφίλτρου 0.45μm (Sartorius). Στα 4 ml του διηθήματος προστέθηκε πολυβρίνη σε τελική συγκέντρωση 8 μg/ml, τα οποία στη συνέχεια προστέθηκαν στα κύτταρα MRC-5 και MRC-5 (βλέπε ii).
- (ii) Έγινε σπορά 5x10⁵ κυττάρων MRC-5 και IMR-90 σε φλάσκες 25cm² και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C, 5%CO₂. Μετά την επώαση το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με το διήθημα (4 ml) από τα διαμολυσμένα κύτταρα ΦNX (βλέπε i) και η επώαση στους 37°C, 5%CO₂ συνεχίστηκε για 8 ώρες. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό με τους ρετροϊούς αντικαταστάθηκε και προστέθηκαν στα κύτταρα 5 ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM και η επώαση συνεχίστηκε στους 37°C, 5%CO₂ σγια 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 IMR-90 και η επώαση συνεχίστηκε στους 37°C, 5%CO₂ για 10-14 ημέρες για την επιλογή σταθερών κυτταρικών πλυθησμών. Η επιλογή των επιμολυσμένων κυττάρων MRC-5 και IMR-90 έγινε σε 1 μg/ml πουρομυκίνη για 10 ημέρες, ενώ η επιλογή των επιμολυσμένων κυττάρων MRC-5 έγινε σε 100-150 μg/ml G418 ή 40-50



μg/ml HygroB για 14 ημέρες. Το θρεπτικό υλικό με το αντιβιοτικό επιλογής ανανεώνονταν κάθε 3-4 ημέρες καθόλη τη διάρκεια της επιλογής των επιμολυσμένων κυττάρων.

2.6 Τεχνικές προσδιορισμού του μετασχηματισμού των κυττάρων

Οι τεχνικές προσδιορισμού του μετασχηματισμού των κυττάρων χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση της έκφρασης ή μη ενός μετασχηματισμένου ή/και ογκογόνου φαινότυπου σε έναν κυτταρικό τύπο.

2.6.1 *In vitro* τεχνικές προσδιορισμού του μετασχηματισμού

(A) Σχηματισμός εστιών

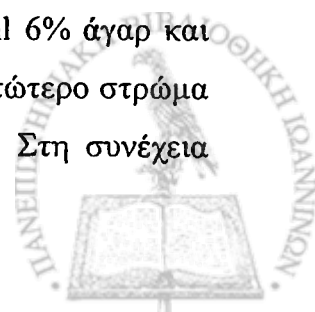
Τα φυσιολογικά κύτταρα διατηρούν την ιδιότητα της αναστολής εξ επαφής και σταματούν να διαιρούνται όταν αναπτυχθούν σε πλήρες ταπήτιο. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα, τα μετασχηματισμένα κύτταρα χάνουν την ικανότητα της αναστολής εξ επαφής και συνεχίζουν να διαιρούνται με συνέπεια την ανάπτυξη σε πολυστοιβάδες και το σχηματισμό εστιών. Οι κυτταρικές εστίες είναι εμφανείς με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου καθώς και με τη χρώση των κυττάρων με κρυσταλλικό ιώδες.

Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε μονοστοιβάδες, σε πλήρες θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% ορό από έμβρυο μόσχου, μέχρι να σχηματιστεί πλήρες ταπήτιο και στη συνέχεια διατηρούνται για 3-5 εβδομάδες με συχνές αλλαγές θρεπτικού υλικού. Στο τέλος αυτής της περιόδου γίνεται χρώση των κυττάρων με κρυσταλλικό ιώδες όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.13 και τα τριβλία εξετάζονται για την ύπαρξη εστιών.

(B) Κυτταρική ανάπτυξη ανεξάρτητη από προσφύσεις (ανάπτυξη σε μαλακό άγαρ)

Από όλες τις *in vitro* τεχνικές προσδιορισμού του μετασχηματισμού η ανάπτυξη των κυττάρων χωρίς στέρεες προσφύσεις παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συσχέτιση με την ογκογονικότητα των κυττάρων.

Προετοιμάστηκαν 20 ml 6% άγαρ και αφού αποστειρώθηκαν διατηρήθηκαν στους 42°C και DMEM/FCS το οποίο επωάστηκε στους 37°C. Αναμίχθηκαν 20 ml 6% άγαρ και 180 ml DMEM/FCS και διατηρήθηκαν στους 42°C για να σχηματίσουν το κατώτερο στρώμα από άγαρ με τελική συγκέντρωση 0.6% άγαρ, 0.8xDMEM and 10% FCS. Στη συνέχεια



τοποθετήθηκαν 5.0 ml άγαρ σε τριβλία 60 mm και αφέθηκαν να στερεοποιηθούν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 περίπου λεπτά. Στο ενδιάμεσο διάστημα τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν, μετρήθηκαν και αραιώθηκαν με πλήρες DMEM σε συγκεντρώσεις 3 - 5×10^5 κυττάρων ανά 0.5 ml. Αναμίχθηκαν 1 ml από 0.6% κατώτερο στρώμα άγαρ με 0.5 ml ($3-5 \times 10^5$ κύτταρα) κυτταρικού διαλύματος, προστέθηκαν πάνω από το στερεοποιημένο άγαρ και αφέθηκαν να στερεοποιηθούν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Έτσι δημιουργήθηκε το ανώτερο στρώμα άγαρ με τελική συγκέντρωση 0.4% άγαρ. Χρησιμοποιήθηκαν 3 τριβλία για κάθε κυτταρικό τύπο τα οποία επώαστηκαν στους 37°C, 5% CO₂ για 3-5 εβδομάδες ή μέχρι να σχηματιστούν αποικίες. Στο διάστημα αυτό προστίθεντο στα κύτταρα 1-1.5 ml πλήρους θρεπτικού υλικού εβδομαδιαίως. Οι αποικίες εντοπίζονται με την παρατήρηση ή με τη χρώση των καλλιέργειών με κρυσταλλικό ιώδες (Macpherson and Montagnier 1964; Neugut and Weinstein 1979; Rosenthal, Lindquist et al. 1986).

10% tryptose phosphate broth:

Διάλυση 20 gr σε 200 ml ddH₂O και αποστείρωση

20 ml 6% Άγαρ:

12 g Bacto-Agar ή Noble Agar σε 20 ml ddH₂O (ή σε 10% tryptose phosphate broth) σε μπουκάλια των 200 ml, αποστείρωση

80 ml DMEM/FCS:

158 ml θρεπτικό υλικό DMEM, 20 ml ορό από έμβρυο μόσχου, 1 ml Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη, 1 ml L-γλουταμίνη

Πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM

0.5 mg/ml iodonitrotetrazolium violet (Sigma Chemical Co.) σε ddH₂O

2.6.2 In vivo τεχνικές προσδιορισμού του μετασχηματισμού.

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με θρυψινοποίηση και προστέθηκαν 9 ml PBS ανά τρυβλίο και τα κύτταρα συλλέχθηκαν plate σε στείρους 15 ml falcon tube και φυγοκεντρήθηκαν για 5-10 λεπτά στις 1500 – 2000 rpm σε θερμοκρασίες δωματίου. Τα κύτταρα επαναεκπύθηκαν με 10 ml PBS και επαναδιαλύθηκαν σε PBS to give συγκέντρωση 5 - 10×10^6 κυττάρων ανά 0.5 ml PBS. Το κυτταρικό διάλυμα ενέθηκε intraperitoneally σε αθυμικά ποντίκια ηλικίας 4 - 8 εβδομάδων. Τα πειραματόζωα εξετάζονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα για μία περίοδο 12 - 16 εβδομάδων για την εμφάνιση όγκων (Giovanella and Fogh 1985).



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

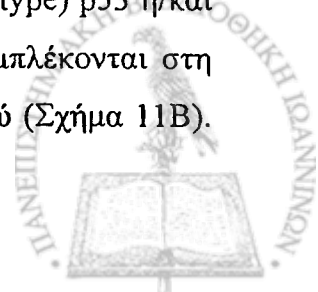
ΕΝΟΤΗΤΑ Ι

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ MRC-5 ΠΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΟΥΝ *hTERT*, *Ha-RasV12* ή/και *p53*^{143ala}

3.1. Σχεδιασμός πειραματικής μελέτης

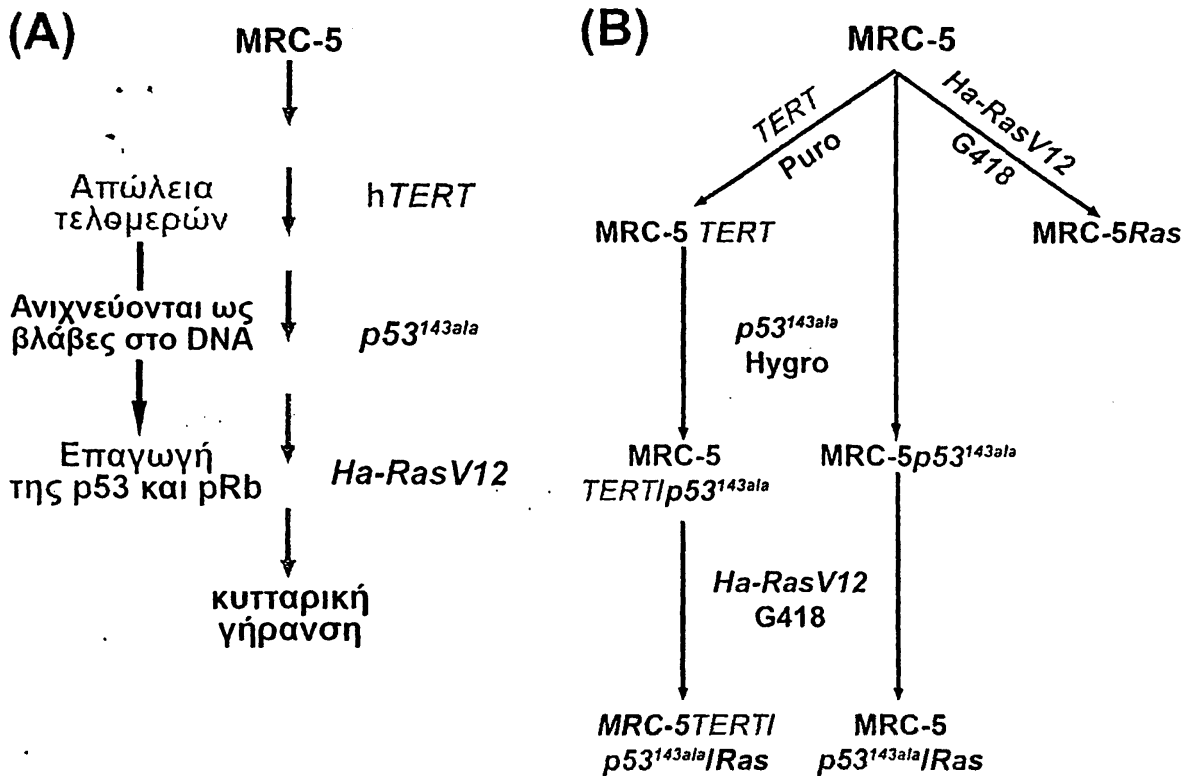
Φυσιολογικά κύτταρα θηλαστικών υφίστανται ένα συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων στην καλλιέργεια μετά από τις οποίες εισέρχονται σε περίοδο 'κρίσης' κατά την οποία παραμένουν μεταβολικά ενεργά αλλά δεν διαιρούνται. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται *κυτταρική γήρανση* (Goldstein, 1990; Campisi, 2001; Serrano and Blasco, 2001). Τα φυσιολογικά κύτταρα διαθέτουν επίσης αμυντικούς μηχανισμούς για να ελαχιστοποιήσουν τα καταστροφικά αποτελέσματα μεταλλάξεων που αδρανοποιούνται ή απαλείφονται κατά την πολυσταδιακή καρκινογένεση. Τέτοιους προστατευτικούς μηχανισμούς αποτελούν οι αντί-πολλαπλασιαστικές αποκρίσεις των κυττάρων - *διακοπή της αύξησης* ή *πρόωρη γήρανση* και *απόπτωση* - σε υπερβολικά μιτογόνα μηνύματα ή/και σε ογκογόνο στρες, όπως για παράδειγμα αυτό που επάγεται από το ογκογονίδιο *Ha-RasV12* (Serrano et al., 1997; Weinberg et al., 1997). Μελέτες έδειξαν ότι τόσο η γήρανση όσο και ο μετασχηματισμός των φυσιολογικών κυττάρων ρυθμίζονται από τα τελομερή και τις πορείες των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών p53 και Rb (Σχήμα 11A) (Campisi, 2001; Hahn and Weinberg, 2002).

Για να καθοριστεί αν απαιτούνται και οι τρεις αυτές πορείες για τη διάσωση φυσιολογικών ανθρωπίνων ινοβλαστών από την κυτταρική γήρανση ή για να επάγουν το νεοπλασματικό μετασχηματισμό τους, εισήχθησαν με ελαττωματικής αντιγραφής αμοφοτροπικούς ρετροϊικούς φορείς σε φυσιολογικές ανθρώπινες ινοβλάστες, MRC-5, η καταλυτική υπομονάδα της ανθρώπινης τελομεράσης *hTERT* προκειμένου να διατηρηθεί σταθερό το μήκος των τελομερών κατά τη συνεχή ανακαλλιέργεια τους, η μεταλλαγμένη μορφή της p53, *p53*^{143ala} η οποία θεωρείται κυρίαρχα-αρνητική (dominant-negative), προκειμένου να απενεργοποιηθεί/αδρανοποιηθεί η δράση της ενδογενούς αγρίου-τύπου (wild-type) p53 ή/και το ογκογόνο *Ha-RasV12* για να μελετηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη ρύθμιση της κυτταρικής γήρανσης και του νεοπλασματικού μετασχηματισμού (Σχήμα 11B).



Έμφαση δόθηκε επίσης στην πιθανή συνεργειακή δράση των ογκογονιδίων *Ha-RasV12* και *p53^{143ala}* στις φυσιολογικές (MRC-5) και στις τελομερισμένες (MRC-5 TERT) ινοβλάστες (Σχήμα 11B).





Σχήμα 11. Επικρατές μοντέλο των μηχανισμών της κυτταρικής γήρανσης και πειραματικός σχεδιασμός. (A) Απεικονίζονται οι πορείες που εμπλέκονται στην κυτταρική γήρανση φυσιολογικών ανθρωπίνων ινοβλαστών, όπως η απώλεια των τελομερών με τη συνεχή ανακαλλιέργεια των κυττάρων που ανιχνεύονται ως βλάβες του DNA και οδηγούν στην ενεργοποίηση των πορειών των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών p53 και pRb με αποτέλεσμα τη διακοπή της κυτταρικής αύξησης και την κυτταρική γήρανση. **(B)** Σχεδιασμός της πειραματικής μελέτης όπου απεικονίζεται η διαδοχική σειρά με την οποία εισήχθησαν τα γονίδια *TERT*, *p53^{143ala}* και *Ha-RasV12* στις φυσιολογικές ανθρώπινες ινοβλάστες MRC-5, προκειμένου να κατασκευασθούν κυτταρικοί πληθυσμοί MRC-5 και MRC-5 TERT που υπερεκφράζουν *Ha-RasV12* ή *p53^{143ala}*.

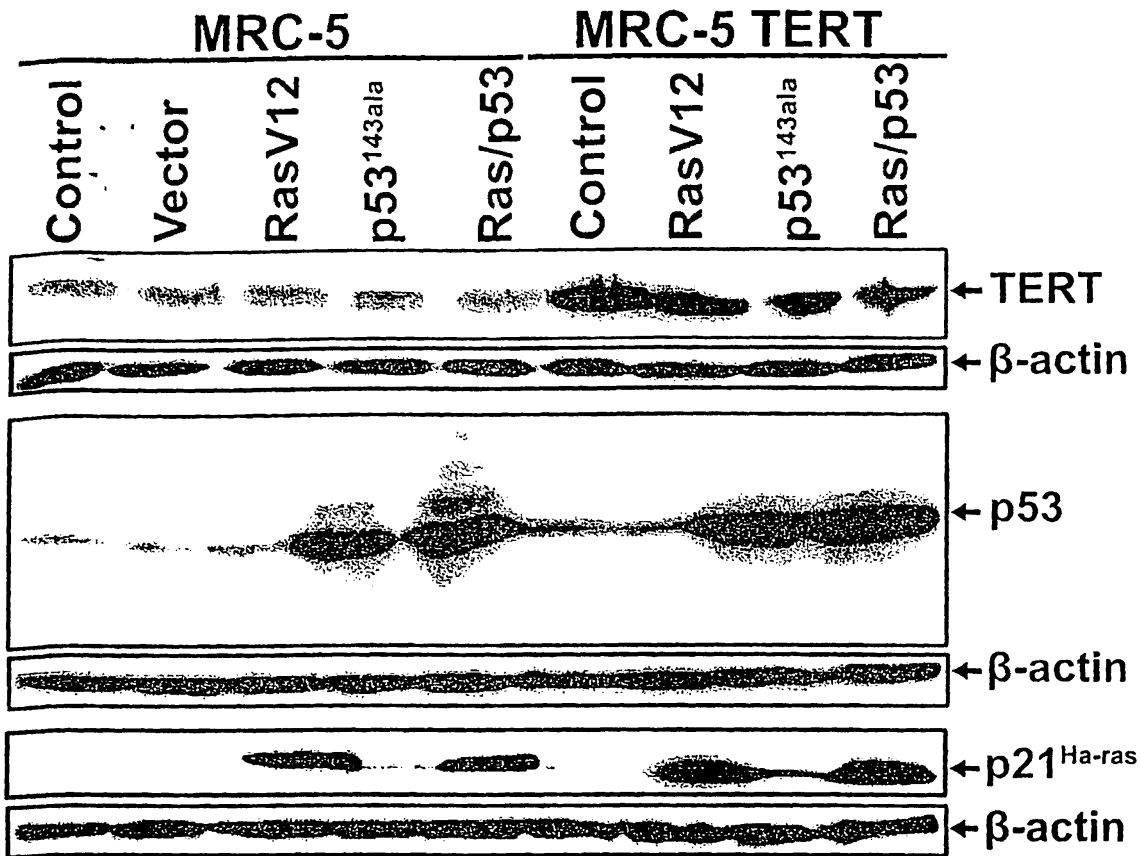
3.2. Κατασκευή κυττάρων που εκφράζουν *hTERT*, ογκογόνο *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}*

Φυσιολογικές ανθρώπινες ινοβλάστες MRC-5 επιμολύνθηκαν με ελαττωματικής αντιγραφής αμοτροπικούς ρετροϊκούς φορείς έκφρασης που έφεραν είτε την καταλυτική υπομονάδα της ανθρώπινης τελομεράσης *hTERT* (Babe-Puro/*hTERT*; ευγενική προσφορά της J. Campisi, Lawrence Berkley National Laboratory, California) ή/και τη μεταλλαγμένη μορφή της ανθρώπινης *p53*, *p53^{143ala}* (ΔH-*p53^{143ala}* ή ΔH-SCX-3) (Baker et al., 1990; Kolettas et al., 2005), ή/και το ογκογονίδιο *Ha-RasV12* (LXSN-*RasV12*; ευγενική προσφορά του J. Downward, ICRF/CRC Laboratories, London, UK) προκειμένου να κατασκευασθούν ινοβλάστες *MRC-5Ras*, *MRC-5p53^{143ala}*, *MRC-5p53^{143ala}/Ras*, *MRC-5TERT*, *MRC-5TERT/p53^{143ala}*, *MRC-5TERT/Ras* και *MRC-5TERT/p53^{143ala}/Ras*, σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό που απεικονίζεται στο Σχήμα 10B, και περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι. Μετά την επιμόλυνση και την επιλογή των επιμολυσμένων κυττάρων στα αντίστοιχα αντιβιοτικά, πουρομυκίνη (*TERT*), υγρομυκίνη (*p53^{143ala}*) και G418 (*Ha-RasV12*), ανθεκτικοί κυτταρικοί πληθυσμοί αυξήθηκαν και η έκφραση των εισαχθέντων γονιδίων μελετήθηκε με ανοσο-αποτύπωμα κατά western (Σχήμα 12).

Η ανάλυση των πρωτεϊνών έδειξε ότι τα επιμολυσμένα κύτταρα με το ρετροϊκό φορέα που έφερε το *TERT* cDNA εκφράζανε την *TERT* μοριακού βάρους 120 kDa σε πολύ υψηλότερα επίπεδα, από ότι τα επιμολυσμένα MRC-5 κύτταρα με τον πρότυπο φορέα ή με τους άλλους ρετροϊκούς φορείς ή από ότι τα μη-επιμολυσμένα ομόλογα τους (Σχήμα 12). Να σημειωθεί ότι αν και ανθρώπινες ινοβλάστες ενήλικα δεν εκφράζουν *TERT*, οι ινοβλάστες MRC-5 εκφράζανε *TERT* σε χαμηλότερα επίπεδα από ότι τα MRC-5 *TERT* λόγω της εμβρυϊκής τους προέλευσης.

Η ανάλυση της έκφρασης της *p53* έδειξε ότι όλα τα κύτταρα εκφράζανε την *p53*, αλλά σε διαφορετικά επίπεδα λόγω της εισαγωγής της εξωγενούς μεταλλαγμένης μορφής της στις επιμολυσμένες ινοβλάστες. Οι ινοβλάστες MRC-5 και MRC-5*TERT* επιμολυσμένες με το ρετροϊκό φορέα που έφερε το ανθρώπινο *p53^{143ala}* cDNA εκφράζανε την *p53* σε υψηλότερα επίπεδα από ότι τα αντίστοιχα πρότυπα ομόλογα τους. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ανίχνευσε την ενδογενή αγρίου-τύπου *p53* αλλά και την εξωγενή μεταλλαγμένη μορφή *p53^{143ala}*.





Σχήμα 12. Έκφραση των εισαχθέντων γονιδίων p53^{143ala}, TERT και Ha-RasV12 στις επιμολυσμένες ανθρώπινες ινοβλάστες, MRC-5. Ολικές πρωτεΐνες απομονώθηκαν από μη-επιμολυσμένες ινοβλάστες MRC-5 (Control) και από MRC-5 επιμολυσμένες με ένα πρότυπο ρετροϊικό φορέα (vector) ή τους ρετροϊούς που έφεραν TERT, p53^{143ala} και Ha-RasV12, διαχωρίστηκαν σε SDS-πηκτή πολυακρυλαμίδιου και αναλύθηκαν με ανοσο-αποτύπωμα κατά western χρησιμοποιώντας πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού αντί-TERT (H-231) και αντί-Ha-Ras (C-20) και ένα μονοκλωνικό αντίσωμα αντί-p53 (DO-1) που ανιχνεύει την αγρίου-τύπου ενδογενή p53 αλλά και τις μεταλλαγμένες μορφές της. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο (internal control) για την ισοφόρτωση των δειγμάτων.

Η έκφραση της p53 δεν φάνηκε να μεταβλήθηκε από την συν-έκφραση του ογκογόνου *Ha-RasV12* στις MRC-5 ή MRC-5 TERT ινοβλάστες. Να σημειωθεί ότι η ενδογενής έκφραση της p53 ήταν υψηλότερη στις MRC-5TERT από ότι στις φυσιολογικές ινοβλάστες MRC-5.

Ομοίως, μελετήθηκε με ανοσο-αποτύπωμα κατά western, η έκφραση της p21^{Ha-Ras} στις μη επιμολυσμένες αλλά και στις επιμολυσμένες ινοβλάστες με τους αντίστοιχους ρετροϊκούς φορείς. Ενώ στις φυσιολογικές ινοβλάστες MRC-5 ή σε εκείνες επιμολυσμένες με έναν πρότυπο φορέα (vector) δεν ανιχνεύθηκε η έκφραση της p21^{Ha-Ras}, οι ινοβλάστες MRC-5 ή MRC-5p53^{143ala} επιμολυσμένες με το ρετροϊκό φορέα LXS_N-*RasV12* εκφράζανε την ογκοπρωτεΐνη p21^{Ha-Ras} σε υψηλά επίπεδα. Αντίθετα με τις φυσιολογικές ινοβλάστες MRC-5, η ενδογενής έκφραση της p21^{Ha-Ras} ήταν ανιχνεύσιμη στις MRC-5 TERT. Η επιμόλυνση των MRC-5 TERT και MRC-5 TERT/p53^{143ala} με το ρετροϊκό φορέα LXS_N-*RasV12* οδήγησε στην υπερέκφραση της p21^{Ha-Ras} λόγω της εξωγενούς μεταλλαγμένης ογκομορφή της, p21^{Ha-Ras(T24)}. Να σημειωθεί ότι στα κύτταρα MRC-5p53^{143ala} αλλά και στα MRC-5 TERT/p53^{143ala} η ενδογενής έκφραση της p21^{Ha-Ras} ήταν υψηλότερη από την αντίστοιχη στα μη-επιμολυσμένα κύτταρα που πιθανά να οφείλεται στη σταθεροποίηση της ενδογενούς ογκοπρωτεΐνης Ras από την υπερέκφραση της p53^{143ala} (Σχήμα 12).

Συνολικά, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι φυσιολογικές ινοβλάστες MRC-5 εκφράζανε τα γονίδια που εισήχθησαν διαδοχικά σε υψηλά επίπεδα.

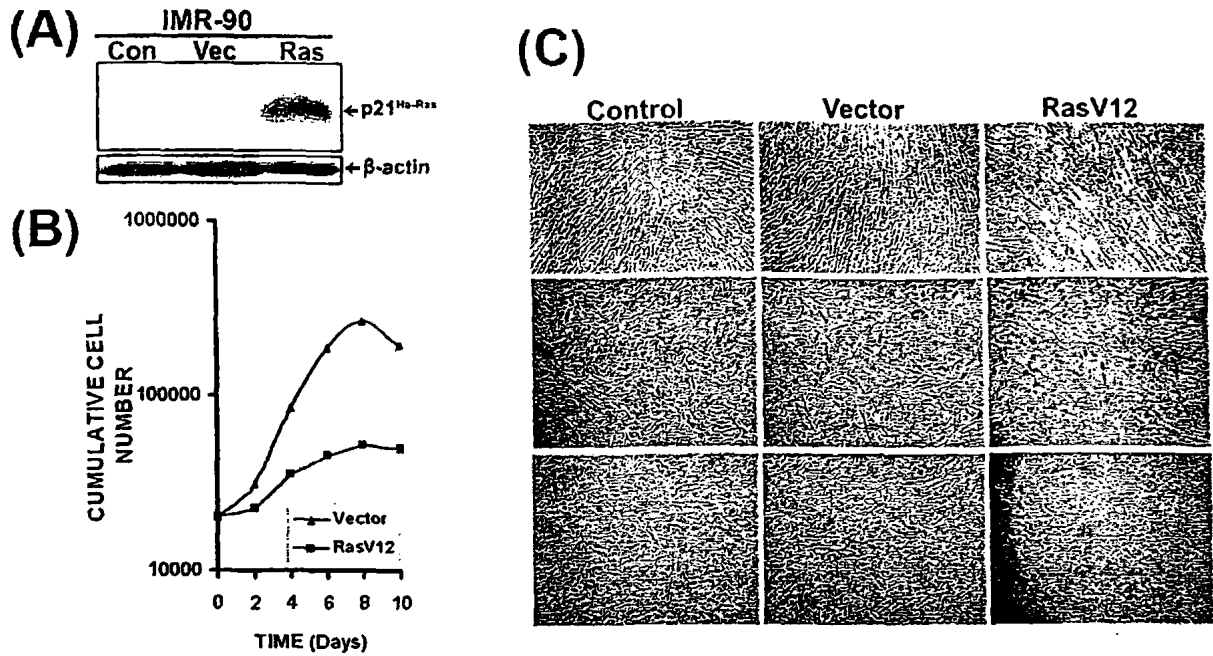


ΕΝΟΤΗΤΑ II:**ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ *Ha-RasV12* ή/και *p53*^{143ala} ΣΤΙΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ *MRC-5*****3.3. Το ογκογόνο *Ha-Ras* δεν προκάλεσε την πρόωρη κυτταρική γήρανση των ινοβλαστών *MRC-5***

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η υπερέκφραση του ογκογόνου *Ha-RasV12* προάγει την πρόωρη κυτταρική γήρανση ορισμένων στελεχών φυσιολογικών ινοβλαστών, όπως τα *IMR-90* (Serrano et al., 1997), ενώ δεν έχει τις ίδιες επιπτώσεις σε άλλα (Benanti and Galloway, 2004). Προκειμένου να διερευνηθούν οι επιδράσεις του ογκογόνου *Ha-RasV12* στην κυτταρική αύξηση φυσιολογικών ανθρωπίνων ινοβλαστών, αναλύθηκε και συγκρίθηκε ο φαινότυπος των ινοβλαστών *MRC-5Ras* με αυτόν των *IMR-90Ras*, καθώς το δεύτερο κυτταρικό στέλεχος αποτελεί ένα καλά χαρακτηρισμένο μοντέλο κυτταρικής γήρανσης επαγόμενης από το *Ha-RasV12* (Serrano et al., 1997). Για το σκοπό αυτό, κατασκευάστηκαν με επιμόλυνση ινοβλάστες *IMR-90* που υπερεκφράζανε το ογκογόνο *Ha-RasV12* ή τον πρότυπο ρετροϊκό φορέα (Σχήμα 13).

Ανάλυση των πρωτεϊνών με ανοσο-αποτύπωμα κατά western έδειξε ότι τα επιμολυσμένα κύτταρα *IMR-90* εκφράζανε την ογκοπρωτεΐνη *p21*^{Ha-Ras} σε υψηλά επίπεδα σε σχέση με τα μη επιμολυσμένα κύτταρα ή με τα επιμολυσμένα με τον πρότυπο ρετροϊκό φορέα (Σχήμα 13A). Η έκτοπη υπερέκφραση του *Ha-RasV12* στις *IMR-90* μείωσε το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους (Σχήμα 123B) και οδήγησε στην πρόωρη γήρανση τους, όπως ανιχνεύθηκε μορφολογικά αλλά και με τη χρώση των κυττάρων για την έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης, ενός μάρτυρα της γήρανσης των ινοβλαστών, αλλά και άλλων φυσιολογικών κυτταρικών τύπων (Σχήμα 13C). Οι ινοβλάστες *IMR-90RasV12* παρουσίασαν αυξημένη και έντονη έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης σε σύγκριση με τα κύτταρα επιμολυσμένα με τον πρότυπο ρετροϊκό φορέα ή με τις μη-επιμολυσμένες ινοβλάστες (Σχήμα 13C). Ενώ οι φυσιολογικές ινοβλάστες *IMR-90* επιμολυσμένες με τον πρότυπο φορέα έκφρασης (*Vec*) αυξήθηκαν για ~40 κυτταρικές διαιρέσεις, οι ινοβλάστες *IMR-90Ras* εμφάνισαν χαρακτηριστικά πρόωρης κυτταρικής γήρανσης μετά από ~23-25 κυτταρικές διαιρέσεις.





Σχήμα 13. Οι επιδράσεις της έκφραση του *Ha-RasV12* στις επιμολυσμένες ανθρώπινες ινοβλάστες, *IMR-90* και *MRC-5*. **(A)** Ολικές πρωτεΐνες απομονώθηκαν από μη-επιμολυσμένες ινοβλάστες *IMR-90* (Control) και από *IMR-90* επιμολυσμένες με ένα πρότυπο ρετροϊκό φορέα (vector) ή το ρετροϊκό φορέα που έφερε το ογκογόνο *Ha-RasV12*, διαχωρίστηκαν σε SDS-πηκτή πολυακρυλαμιδίου και αναλύθηκαν με ανοσο-αποτύπωμα κατά western χρησιμοποιώντας ένα πολυκλωνικό αντισώμα κουνελιού αντί-*Ha-Ras* (C-20). **(B)** Καμπύλες αύξησης των επιμολυσμένων και μη-επιμολυσμένων με τους ρετροϊκούς φορείς ινοβλάστες *IMR-90*. **(C)** Μορφολογία και χρώση των κυττάρων *IMR-90* και *MRC-5* για την ανίχνευση της έκφρασης της β-γαλακτοσιδάσης (sen-β-gal), ενός μάρτυρα της κυτταρικής γήρανσης: *Επάνω* – Μορφολογία *IMR-90*; *Μέση* – Χρώση των *IMR-90* για sen-β-gal; *Κάτω* - Χρώση των *MRC-5* για sen-β-gal.

Σε αντίθεση, οι ινοβλάστες MRC-5 που υπερέκφραζαν το ογκογονίδιο *Ha-RasV12* δεν εμφάνισαν πρόωρη γήρανση και η έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης δεν ήταν πιο έντονη ή αυξημένη σε σύγκριση με τις ινοβλάστες ελέγχου (Σχήμα 13C).

3.4. Οι επιδράσεις του ογκογόνου *Ha-RasV12* και της μεταλλαγμένης μορφής της *p53*, *p53^{143ala}*, στις ιδιότητες αύξησης των ινοβλαστών MRC-5

Μολονότι η έκτοπη υπερέκφραση του *Ha-RasV12* στις ινοβλάστες MRC-5 δεν προκάλεσε την πρόωρη γήρανση τους, μείωσε το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους κατά ~1.4 φορές (Σχήμα 14 και Πίνακας 4). Ενώ ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των επιμολυσμένων ινοβλαστών με το πρότυπο φορέα (Hygro; vector) ήταν 24.5 ώρες, ο ρυθμός αύξησης των ινοβλαστών MRC-5*RasV12* ήταν 34.8 ώρες (Πίνακας 4).

Ομοίως, η υπερέκφραση της *p53^{143ala}* μείωσε το ρυθμό πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών MRC-5 που ήταν 47.2 ώρες, κατά ~1.9 φορές σε σύγκριση με τα κύτταρα επιμολυσμένα με τον πρότυπο φορέα (Πίνακας 4).

Επιπλέον, η συν-έκφραση της *p53^{143ala}* μαζί με το ογκογόνο *Ha-RasV12* δεν είχε σαν αποτέλεσμα την ανάκτηση του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των MRC-5. Οι ινοβλάστες MRC-5*p53^{143ala}/RasV12* εμφάνισαν ρυθμό αναδιπλασιασμού του κυτταρικού πληθυσμού 41.4 ωρών, σαφώς μικρότερο από αυτόν των κυττάρων MRC-5*RasV12* και MRC-5*Hygro* κατά 1.7 φορές, αλλά περίπου όμοιο με αυτόν των κυττάρων MRC-5*p53^{143ala}* (Πίνακας 4).

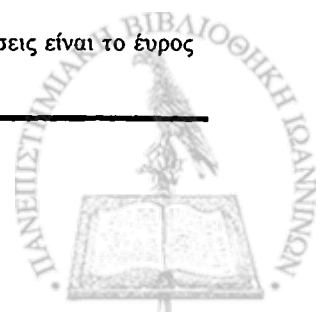
Πίνακας 4: Επιδράσεις των ογκογονιδίων στη μορφολογία και στις ιδιότητες αύξησης των φυσιολογικών ινοβλαστών MRC-5

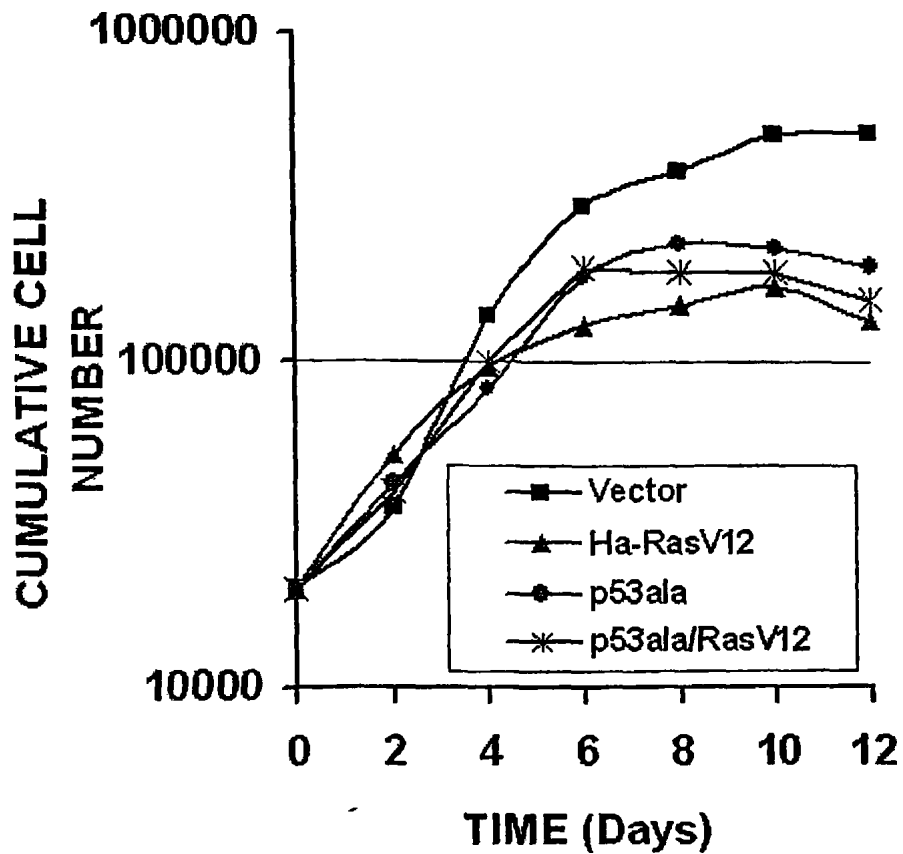
Κύτταρα ¹	Χρόνος ζωής κυτταρικού πληθυσμού ή PDL ²	Ρυθμός αύξησης (ώρες)	Κυτταρική πυκνότητα ³ (κύτταρα x 10 ⁴)	Ικανότητα Σποράς (%)	
MRC-5	63 (60-65)	24.1	2.65	-	10.1
MRC-5 <i>Hygro</i>	61 (60-63)	24.5	1.72	100.0%	9.8
<i>Ha-RasV12</i>	59 (57-59)	34.8	1.57	91.3%	10.5
<i>p53^{143ala}</i>	56 (55-57)	47.2	1.28	74.4%	8.6
<i>p53^{143ala}/RasV12</i>	53 (51-54)	41.2	1.45	84.3%	6.4

¹ Η ανάλυση των ιδιοτήτων των MRC-5 έγινε όταν τα κύτταρα ήταν P33.

² Ο χρόνος της ζωής των κυτταρικών πληθυσμών ή PDL μετά από συνεχείς ανακαλλιέργειες. Σε παρενθέσεις είναι το εύρος των pdls.

³ Το ποσοστό της κυτταρικής πυκνότητας υπολογίστηκε με βάση τα MRC-5*Hygro* (vector).





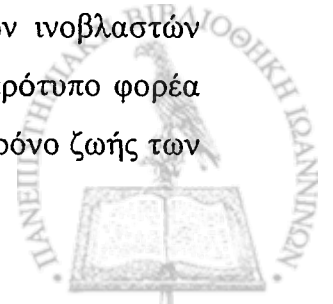
Σχήμα 14. Καμπύλες αύξησης των μη-επιμολυσμένων και επιμολυσμένων ινοβλαστών *MRC-5* με τους ρετροϊκούς φορείς που έφεραν *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}*. Έγινε σπορά 2.0×10^4 ινοβλαστών ανά πηγαδάκι σε πολυτριβλύο 24-πηγαδιών και η αύξηση των κυττάρων ακολουθήθηκε με τη καταμέτρηση τους σε πλάκα Neubauer κάθε 2 ημέρες για μια περίοδο 12 ημερών.

Δύο άλλες παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν η κυτταρική πυκνότητα και η ικανότητα σποράς των ινοβλαστών MRC-5 που έφεραν τα διαφορετικά ογκογονίδια (Πίνακας 4). Ενώ το ογκογόνο *Ha-RasV12* δεν μείωσε σημαντικά την κυτταρική πυκνότητα ή την ικανότητα σποράς των MRC-5, διαφορές εντοπίστηκαν μετά την υπερέκφραση της $p53^{143ala}$, η οποία μείωσε το ρυθμό αύξησης των φυσιολογικών ινοβλαστών MRC-5 σε σχέση με τα πρότυπα κύτταρα, και κατ' ακολουθία την κυτταρική πυκνότητα τους και την ικανότητα σποράς τους, δείχνοντας ότι συνολικά η $p53^{143ala}$ είχε αρνητικές επιδράσεις στην αύξηση των MRC-5 (Πίνακας 4). Οι ινοβλάστες MRC-5 $p53^{143ala}/Ras$ παρουσίασαν επίσης μειωμένη κυτταρική πυκνότητα και ικανότητα σποράς (Πίνακας 4 και Σχήμα 15A). Τέτοιες μεταβολές στις ιδιότητες αύξησης των ινοβλαστών MRC-5 συνηγορούν στην ενεργοποίηση ανασταλτικών μηχανισμών.

Προκειμένου να διερευνηθεί αν οι μεταβολές των αυξητικών ιδιοτήτων των ινοβλαστών MRC-5 που έκφραζαν τα ογκογονίδια ακολουθούνταν και από μεταβολές χαρακτηριστικές του φυσιολογικού φαινοτύπου των ινοβλαστών στην καλλιέργεια, μελετήθηκαν οι μορφολογικές μεταβολές των MRC-5 P33, η έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης που επάγεται κατά τη γήρανση φυσιολογικών ινοβλαστών (Sen-β-Gal) σ' αυτούς τους κυτταρικούς πληθυσμούς (Σχήμα 15) και ο χρόνος ζωής των κυτταρικών πληθυσμών στην καλλιέργεια μετά τη συνεχή ανακαλλιέργεια τους (Πίνακας 4).

Ανεξάρτητα από τις μεταβολές στην αύξηση των κυττάρων MRC-5 κανένα από τα ογκογονίδια, *Ha-RasV12* ή $p53^{143ala}$, δρώντας μόνα τους ή συνεργειακά δεν επέφεραν σημαντικές μεταβολές στη μορφολογία των νεαρών ινοβλαστών MRC-5. Όλες οι διαφορετικές καλλιέργειες των νεαρών ινοβλαστών MRC-5 P33 είχαν επιμήκη μορφή και εμφάνισαν τη χαρακτηριστική παράλληλη αύξηση τους στην κυτταροκαλλιέργεια (Σχήμα 15B).

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η υπερέκφραση της $p53^{143ala}$ σε φυσιολογικές ανθρώπινες ινοβλάστες επιμηκύνει το χρόνο ζωής τους ή καθυστερεί τη διακοπή της αύξησης τους στην κυτταροκαλλιέργεια (Bond et al., 1994, Bond et al., 1995, Wyllie et al., 2003). Προκειμένου να διερευνηθεί, αν η $p53^{143ala}$ επιμηκύνει το χρόνο ζωής των MRC-5 στην καλλιέργεια, όλα τα διαφορετικά κύτταρα ανακαλλιεργήθηκαν συνεχώς μέχρι που εισήλθαν στο στάδιο 'κρίσης'. Οι φυσιολογικοί ινοβλάστες MRC-5 γηράσκουν μετά από 60-65 pdl's. Ενώ το ογκογόνο *Ha-RasV12* δεν μείωσε το χρόνο ζωής των φυσιολογικών ινοβλαστών MRC-5, που ήταν ~59 pdl's, σε σχέση με τα κύτταρα επιμολυσμένα με τον πρότυπο φορέα που ήταν 61 pdl's (Πίνακας 4), η $p53^{143ala}$ μείωσε κατά περίπου ~4-5 pdls το χρόνο ζωής των

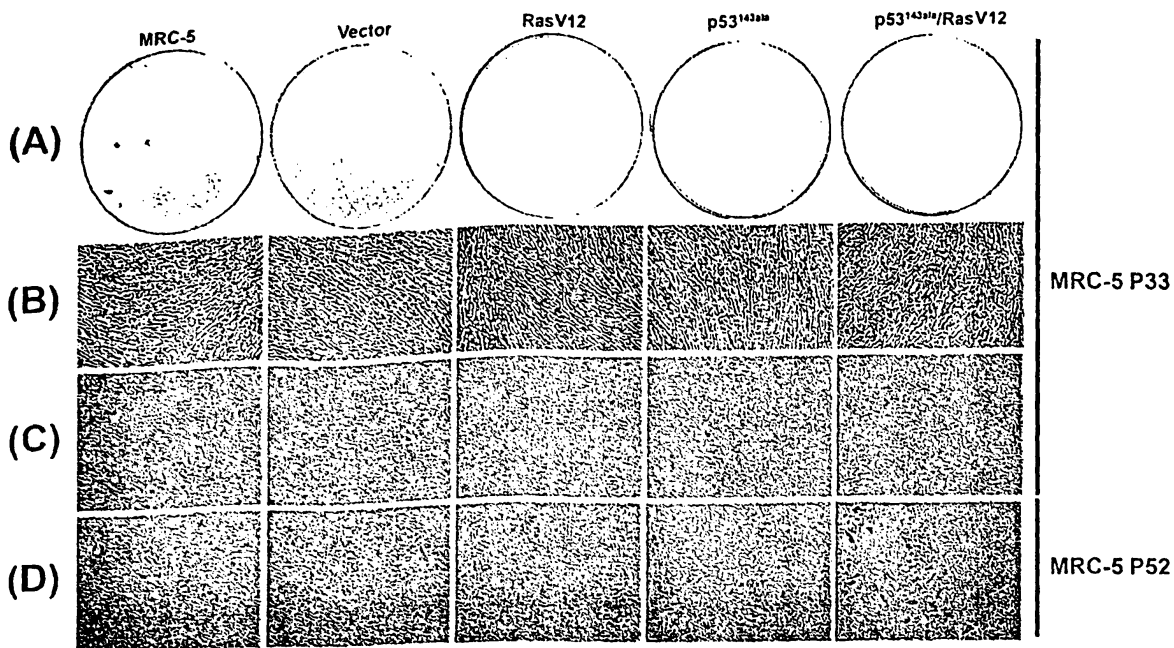


MRC-5, αλλά η συνεργειακή δράση των δύο ογκογονιδίων *RasV12/p53^{143ala}* είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου ζωής (life-span) των MRC-5 στην καλλιέργεια, κατά ~7-9 κυτταρικές διαιρέσεις (Πίνακας 4). Επομένως, ενώ η υπερέκφραση του *Ha-RasV12* δεν προήγαγε την πρόωρη γήρανση των ινοβλαστών MRC-5, η υπερέκφραση της *p53^{143ala}* δρώντας μόνη της δεν επιμήκυνε το χρόνο ζωής των ινοβλαστών MRC-5, αλλά αντίθετα τα κύτταρα *MRC-5p53^{143ala}* εμφάνισαν μείωση του χρόνου ζωής των κατά 10%, ποσοστό που αυξήθηκε στο 15%, δρώντας συνεργειακά με το ογκογόνο *Ha-RasV12* (Πίνακας 4).

Νεαρές ινοβλάστες MRC-5 που υπερεκφράζανε τα ογκογονίδια *Ha-RasV12* ή / και *p53^{143ala}* αναλύθηκαν για την έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης που επάγεται κατά τη γήρανση (Sen-β-Gal) προκειμένου να διερευνηθεί αν νεαρές ινοβλάστες *MRC-5p53^{143ala}* ή *MRC-5p53^{143ala}/Ras* εκφράζανε sen-β-gal (Σχήμα 15). Η χρώση όλων των νεαρών ινοβλαστών έδειξε ότι, ενώ στις ινοβλάστες *MRC-5Ras* παρατηρήθηκε μόνον η χρώση του υποβάθρου (background staining), όμοια σε ένταση με αυτή στις ινοβλάστες MRC-5 και MRC-5Hygro (vector), στις ινοβλάστες *MRC-5p53^{143ala}* και *MRC-5p53^{143ala}/Ras* παρατηρήθηκαν συναθροίσεις κυττάρων που εκφράζανε Sen-β-Gal (Σχήμα 15C). Σε αντίθεση, η έκφραση της Sen-β-Gal στις ινοβλάστες MRC-5 P52 ήταν πιο έντονη στις *MRC-5p53^{143ala}* και *MRC-5p53^{143ala}/Ras* από ότι στις μη-επιμολυσμένες ή στις επιμολυσμένες με τον πρότυπο φορέα (vector) ινοβλάστες MRC-5 (Σχήμα 15D). Να σημειωθεί ότι δεν μπορεί να γίνει άμεση σύγκριση της έντασης της Sen-β-Gal μεταξύ των νεαρών και των γηρασμένων ινοβλαστών καθώς ο χρόνος επώασης των κυττάρων με τη χρωστική ήταν διαφορετικός στις δύο περιπτώσεις, 18 και ~4 ώρες, αντίστοιχα.

Επομένως η υπερέκφραση της *p53^{143ala}* συνέργησε με το ογκογόνο *Ha-RasV12* επιφέροντας αρνητικές επιδράσεις στην αύξηση των ινοβλαστών MRC-5.





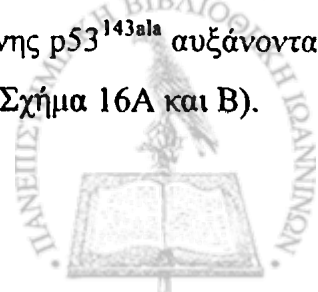
Σχήμα 15. Οι επιδράσεις των ογκογονιδίων *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* στην αύξηση, στην μορφολογία και στην έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης της κυτταρικής γήρανσης (Sen-β-Gal) στις φυσιολογικές ινοβλάστες MRC-5. (A) Αύξηση των διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών MRC-5, μη-επιμολυσμένων ή επιμολυσμένων είτε με τον πρότυπο φορέα (vector) ή MRC-5 P33 που υπερεκφράζανε το ογκογόνο *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* σε πλήρες ταπήτιο. (B) Μορφολογία των ινοβλαστών MRC-5: Μη-επιμολυσμένοι και επιμολυσμένοι ινοβλάστες MRC-5 P33 είτε με τον πρότυπο φορέα (vector) ή MRC-5 P33 που υπερεκφράζανε το ογκογόνο *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* σε πλήρες ταπήτιο φωτογραφήθηκαν κάτω από οπτικό μικροσκόπιο (Carl Zeiss, Axionvert S100). (C και D) Χρώση των μη-επιμολυσμένων και επιμολυσμένων κυττάρων MRC-5 P33 (C) και MRC-5 P52 (D) με τον πρότυπο φορέα (vector) ή MRC-5 P33 που υπερεκφράζανε το ογκογόνο *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* για την ανίχνευση της έκφρασης της β-γαλακτοσιδάσης, ενός μάρτυρα της κυτταρικής γήρανσης (Sen-β-Gal). Η χρώση Sen-β-Gal στο (C) διεξήχθη για ~18 ώρες, ενώ στο (D) για ~4 ώρες.

3.5. Οι επιδράσεις του ογκογόνου *Ha-RasV12* ή/και της *p53^{143ala}* στην έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου των MRC-5

Προκειμένου να διερευνηθούν οι λόγοι των διαφορετικών αποκρίσεων των MRC-5 στα ογκογονίδια *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}*, μελετήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Σχήμα 16).

Ενώ η *p53^{143ala}* δεν επήγαγε την έκφραση της κυκλίνης D1, η υπερέκφραση του ογκογόνου *Ha-RasV12* επήγαγε την έκφραση της κυκλίνης D1 στις MRC-5 κάτω από συνθήκες παρουσίας και απουσίας ορού (Σχήμα 16A και B), ακόμη και παρουσία της *p53^{143ala}* ιδιαίτερα μετά από 24 ώρες παρουσία ή απουσίας ορού. Η επαγωγή της έκφρασης της κυκλίνης D1 από το *Ha-RasV12* ήταν παρατεταμένη αφού ανιχνεύθηκε ακόμη και απουσίας ορού για 48 h (Σχήμα 16B).

Ομοίως η υπερέκφραση του *Ha-RasV12* επήγαγε την έκφραση της p53, στις φυσιολογικές ινοβλάστες MRC-5 κάτω από συνθήκες παρουσίας ορού, που ήταν ιδιαίτερα εμφανής μετά από τη διέγερση των κυττάρων με ορό για 24 ώρες. Η έκφραση της ενδογενούς αγρίου-τύπου p53 αυξήθηκε στις MRC-5 μετά από 48 και 72 ώρες παρουσίας ορού, σε επίπεδα όμοια με αυτά που ανιχνεύθηκαν στις ινοβλάστες MRC-5*Ras* (Σχήμα 17A). Στα κύτταρα MRC-5 *p53^{143ala}* και MRC-5*p53^{143ala}/Ras* η έκφραση της p53 ήταν σημαντικά αυξημένη λόγω της εξωγενούς μεταλλαγμένης μορφής της καθώς το μονοκλωνικό αντίσωμα DO-1 που χρησιμοποιήθηκε ανιχνεύει τόσο την αγρίου-τύπου όσο και τις μεταλλαγμένες μορφές της p53 (Σχήμα 16A). Η *p53^{143ala}* μετακινείται ταχύτερα αλλά συμβάλλει όμως και στη δημιουργία του τετραμερούς λειτουργικού συμπλόκου της p53. Επομένως, είναι φυσικό στις ινοβλάστες MRC-5 που φέρουν *p53^{143ala}* να σχηματίζονται τετραμερή που αποτελούνται από μόρια αγρίου-τύπου p53 και *p53^{143ala}*, και η αναλογία αυτών των μορίων στο τετραμερές να καθορίζει τη μεταγραφική ενεργότητα της p53 (Chan et al., 2004). Σε ινοβλάστες MRC-5 που καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24, 48 και 72 ώρες, η υπερέκφραση του *Ha-RasV12* επήγαγε επίσης την έκφραση της ενδογενούς αγρίου-τύπου (wild-type; wt) p53 (Σχήμα 16B). Μολονότι η επαγωγή της έκφρασης της wt p53 αυξάνονταν με το χρόνο στις επιμολυσμένες με τον πρότυπο φορέα (con) ινοβλάστες, τα επίπεδα έκφρασης της ήταν σημαντικά υψηλότερα στις ινοβλάστες MRC-5*Ras*, μετά από 24, 48 και 72 ώρες απουσίας ορού, (Σχήμα 16B). Να σημειωθεί ότι κάτω και από τις δύο συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων, δηλαδή παρουσίας και απουσίας ορού η έκφραση της ταχύτερα μετακινούμενης *p53^{143ala}* αυξάνονταν με το χρόνο πιθανά λόγω αυξανόμενης σταθερότητας της πρωτεΐνης (Σχήμα 16A και B).



Το πρότυπο έκφρασης της $p21^{Cip1/Waf1}$, ενός αναστολέα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών, γονιδίου-στόχου της $p53$ (Σχήμα 15), ήταν πιο πολύπλοκο καθώς η $p21^{Cip1/Waf1}$ δρα ως θετικός και αρνητικός ρυθμιστής της προόδου του κυτταρικού κύκλου: διεγείρεται από αυξητικούς παράγοντες του ορού και δρα ως παράγοντας συγκρότησης του συμπλόκου κυκλίνης D1-CDK4/6, αλλά και επάγεται από ερεθίσματα που διακόπτουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Sherr and Roberts, 1999, Sherr, 2000). Κάτω από συνθήκες παρουσίας ορού, η έκφραση της $p21^{Cip1/Waf1}$ ήταν υψηλότερη στις ινοβλάστες MRC-5*Ras*, MRC- $p53^{143ala}$ και MRC-5*p53^{143ala}/Ras* από ότι στις ινοβλάστες επιμολυσμένες με τον πρότυπο φορέα (con) (Σχήμα 16A). Η επαγωγή της έκφρασης της $p21^{Cip1/Waf1}$ στις ινοβλάστες MRC- $p53^{143ala}$ δείχνει ότι η μεταλλαγμένη μορφή της $p53$ διατηρεί τη μεταγραφική της ενεργότητα, αλλά και ότι το ογκογόνο *Ha-RasV12* επήγαγε την έκφραση της $p21^{Cip1/Waf1}$ μέσω της επαγωγής της έκφρασης της wt $p53$ (Σχήμα 16B). Κάτω από συνθήκες απουσίας ορού, η επαγωγή της έκφρασης της $p21^{Cip1/Waf1}$ από το ογκογόνο *Ha-RasV12* και την $p53^{143ala}$ ήταν πιο εμφανής μετά από 48 και 72 ώρες καλλιέργειας απουσίας ορού, σε σύγκριση με τα κύτταρα που έφεραν μόνο τον πρότυπο φορέα (con) (Σχήμα 16B).

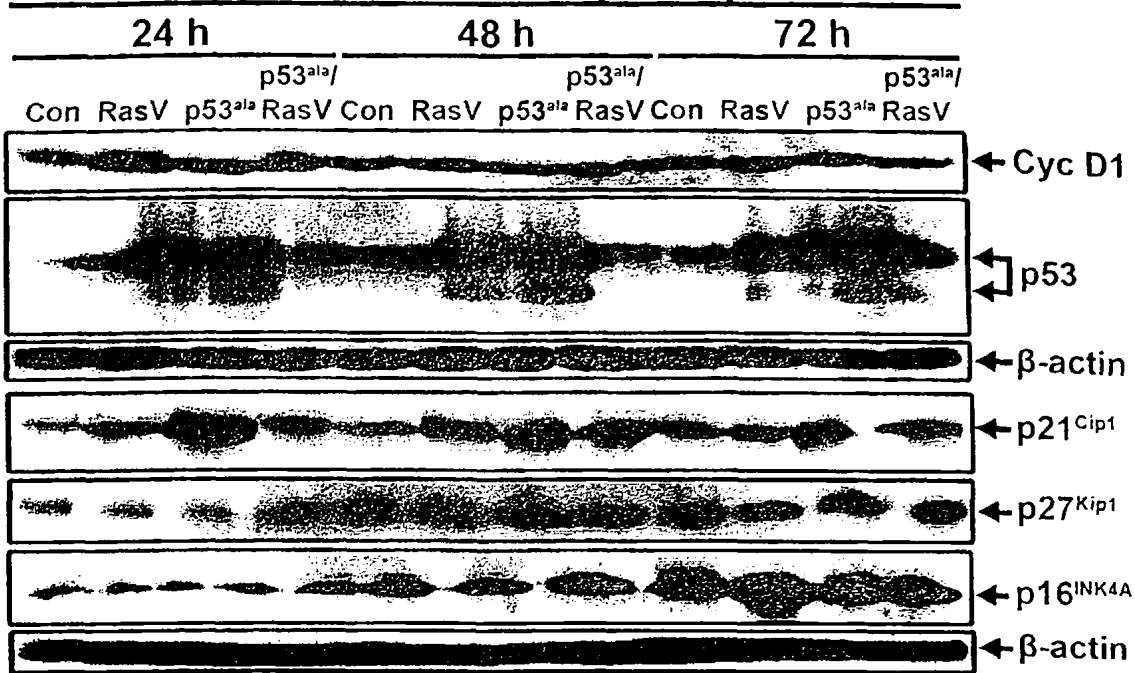
Αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ογκογόνο *Ha-RasV12* στις φυσιολογικές ινοβλάστες MRC-5 επήγαγε την έκφραση των $p53$ και κατ' ακολουθία της $p21^{Cip1/Waf1}$, όπως ανιχνεύθηκε επίσης και στις ινοβλάστες MRC-5*p53^{143ala}* MRC-5*p53^{143ala}/Ras*.

Η $p27^{Kip1}$ είναι ένας άλλος αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cyclin-dependent kinase inhibitor; CKI), που αναστέλλει ιδιαίτερα τη δράση του συμπλόκου κυκλίνης E-CDK2, στο σημείο περιορισμού (restriction point) του κυτταρικού κύκλου (Sherr and Roberts, 1999; Sherr, 2000). Μολονότι δεν παρατηρήθηκε καμιά μεταβολή των επιπέδων έκφρασης της $p27^{Kip1}$ ούτε από το *Ha-RasV12* ή/και $p53^{143ala}$ στις ινοβλάστες MRC-5, τα επίπεδα έκφρασης της $p27^{Kip1}$ αυξάνονταν με το χρόνο κάτω και από τις δύο συνθήκες καλλιέργειας, δηλαδή παρουσίας και απουσίας ορού, είτε λόγω της κατανάλωσης των αυξητικών παραγόντων του ορού ή λόγω της δημιουργίας πλήρους ταπητίου (Σχήμα 16A και B).



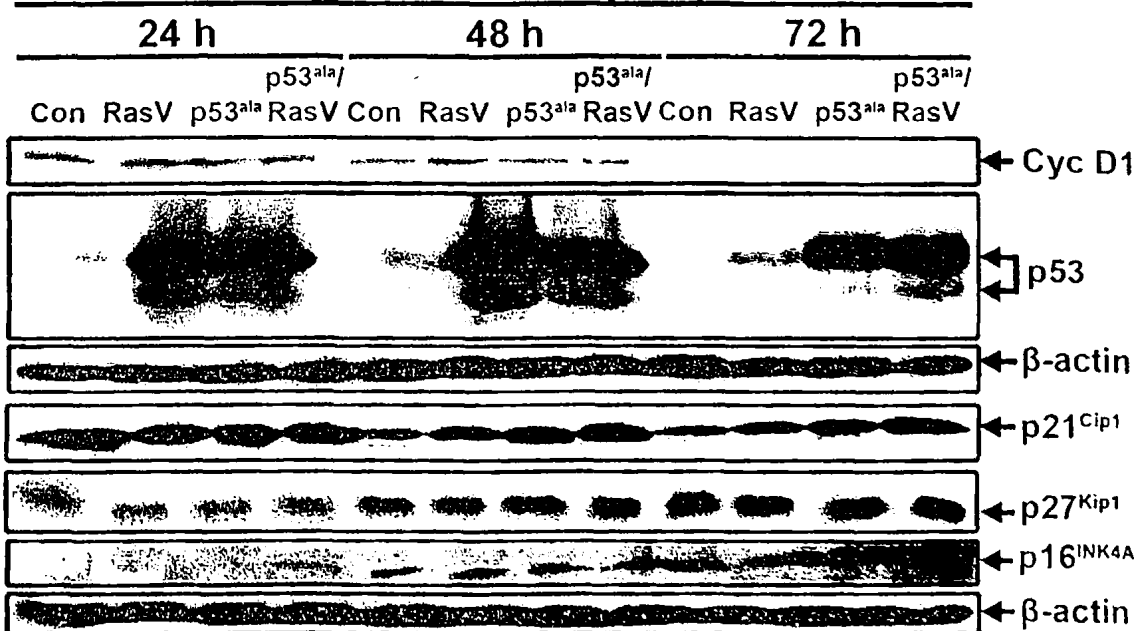
(A)

MRC-5 P33 (FCS)



(B)

MRC-5 P33 (SF)



Σχήμα 16. Έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στις ινοβλάστες MRC-5 που υπερέκφραζαν *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}*. Ινοβλάστες MRC-5 που υπερέκφραζανε *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* καλλιεργήθηκαν για 24, 48 και 72 ώρες παρουσία (A) ή απουσία (B) ορού και αναλύθηκε η έκφραση της κυκλίνης D1, p53, p21^{Cip1/waf1}, p27^{Kip1} και p16^{INK4A}.



Μελετήθηκε επίσης η έκφραση της $p16^{INK4A}$ η οποία δρα ως αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CKI) δεσμεύοντας την κυκλίνη D1, αλλά και ως επαγωγέας της απόπτωσης (Lagresle et al., 2002; Sachs et al., 2004). Όλες οι διαφορετικές κυτταρικές καλλιέργειες εκφράζαν $p16^{INK4A}$ κάτω από συνθήκες παρουσίας και απουσίας ορού (Σχήμα 16). Παράδοξα, κάτω από συνθήκες παρουσίας ορού, τα επίπεδα έκφρασης της $p16^{INK4A}$ ήταν υψηλότερα- (Σχήμα 16A) από ότι κάτω από συνθήκες απουσίας ορού (Σχήμα 16B) και αυξάνονταν με το χρόνο στη καλλιέργεια (Σχήμα 16B). Κάτω από συνθήκες απουσίας ορού η έκφραση της $p16^{INK4A}$ ήταν μόλις ανιχνεύσιμη με την εξαίρεση στις ινοβλάστες MRC-5 $p53^{143ala}/Ras$ (Σχήμα 16B). Όμως, η έκφραση της αυξάνονταν με το χρόνο στη καλλιέργεια.

- Τα επίπεδα έκφρασης της $p16^{INK4A}$ μολονότι αυξήθηκαν με το χρόνο στις MRC-5 (Σχήμα 16), δεν παρατηρήθηκε καμιά σημαντική μεταβολή των επιπέδων αυτής της CKI από κανένα από τα ογκογονίδια, *Ha-RasV12* ή $p53^{143ala}$, δρώντας μόνα τους ή συνεργειακά (Σχήμα 16). Η αύξηση των επιπέδων τα $p16^{INK4A}$ σε συνάρτηση με το χρόνο μολονότι μπορεί να οφείλονταν στην κατανάλωση των αυξητικών παραγόντων του ορού ή του σχηματισμού πλήρους ταπητίου, ή πιθανά και στους δύο παραγόντες, η αυξορρυθμισή της κάτω και από τις δύο συνθήκες υποδηλώνει είτε τη διακοπή της κυτταρικής αύξησης, αν και τα επίπεδα της θα ήταν υψηλότερα κάτω από συνθήκες απουσίας ορού ή την επαγωγή της απόπτωσης των ινοβλαστών (Σχήμα 16A).

Επομένως το ογκογόνο *Ha-RasV12* επήγαγε την έκφραση της κυκλίνης D1, της ενδογενούς αγρίου-τύπου μορφής της p53 και κατ' ακολουθία της CKI $p21^{Cip1/Waf1}$, μιας πρωτεΐνης που είναι μεταγραφικός στόχος της p53. Η επαγωγή της $p21^{Cip1/Waf1}$ διαμέσου της p53 επιβεβαιώθηκε επίσης στις ινοβλάστες MRC-5 που υπερεκφράζανε την $p53^{143ala}$. Η επαγωγή της wt p53 και της $p21^{Cip1/Waf1}$ από το *Ha-RasV12* αλλά και της δεύτερης από την $p53^{143ala}$, μαζί με τη συνάθροιση των CKI's $p27^{Kip1}$ και $p16^{INK4}$, με το χρόνο των κυττάρων στην καλλιέργεια συνηγορούν στη μείωση του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των MRC-5 που παρατηρήθηκε με την κατασκευή των καμπυλών αύξησης (Σχήμα 14) και της μελέτης των ιδιοτήτων αύξησης των κυττάρων (Πίνακας 4). Αυτός ο φαινότυπος καθυστέρησης της προόδου του κυτταρικού κύκλου πιθανά να οφείλεται στην επαγωγή βλαβών στο DNA που οδηγεί σε δύο αντι-πολλαπλασιαστικές αποκρίσεις: κυτταρικό θάνατο με απόπτωση ή μόνιμη διακοπή της κυτταρικής αύξησης λόγω κυτταρικής γήρανσης.



3.6. Ρύθμιση της έκφραση της *Cdc6* από το *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* και οι επιδράσεις της στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών MRC-5

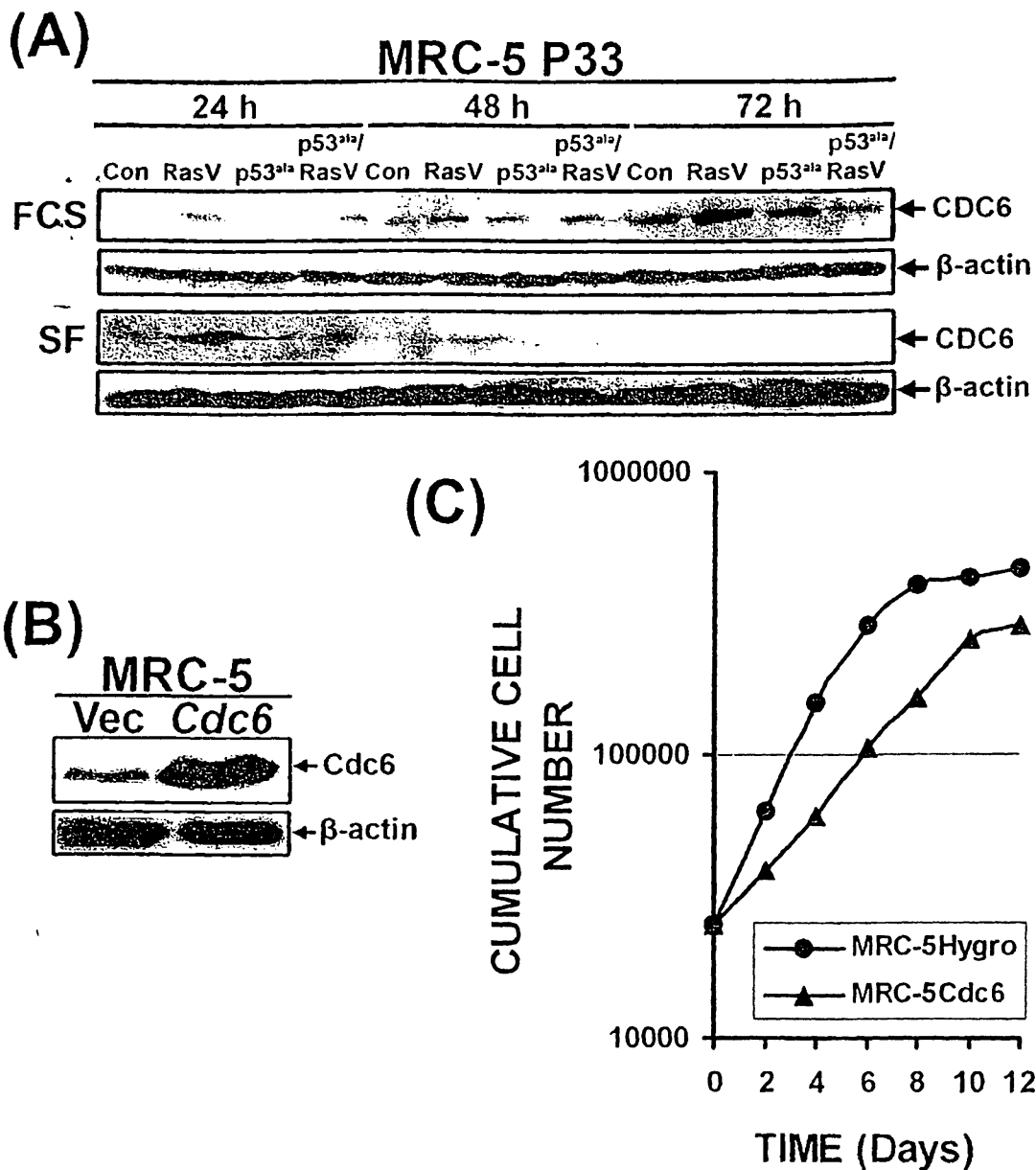
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η $p21^{Cip1/Waf1}$, εκτός από αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών δρα και ως παράγοντας συγκρότησης του συμπλόκου κυκλίνης D1-CDK4/6. Η επαγωγή της $p21^{Cip1/Waf1}$ αλλά και της κυκλίνης D1 και της wt $p53$ από το ογκογόνο *Ha-RasV12* μας προέτρεψε να μελετήσουμε την έκφραση της *Cdc6*, ενός παράγοντα αδειοδότησης (licensing factor) της έναρξης της αντιγραφής του DNA (Gladden and Diehl, 2003, Machida and Dutta, 2005, DePamphilis et al., 2006).

Η ανάλυση της έκφρασης της *Cdc6* με ανοσο-αποτύπωμα κατά western στις φυσιολογικές MRC-5 που υπερεκφράζανε το ογκογόνο *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* έδειξε ότι ενώ το *Ha-RasV12* επήγαγε την έκφραση της *Cdc6* κάτω από συνθήκες παρουσίας και απουσίας ορού, η συν-έκφραση της *p53^{143ala}* κατέστειλε δραματικά την *Ras*-επαγόμενη έκφραση της *Cdc6* (Σχήμα 17A), σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες οι οποίες έδειξαν ότι η $p53$ είναι αρνητικός ρυθμιστής της *Cdc6* (Duursma and Agami, 2005).

Η επαγωγή της κυκλίνης D1 και της *Cdc6* που συνηγορούν στη διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της αντιγραφής του DNA, αντίστοιχα, υποδήλωσε ότι το *Ha-RasV12* μετήγαγε υπερβολικά μιτογόνα μηνύματα οδηγώντας τα κύτταρα MRC-5 σε ένα στρες υπερ-πολλαπλασιασμού (hyperproliferative stress). Είναι πιθανό οι ινοβλάστες MRC-5 να αποκρίθηκαν σ' αυτό το στρες υπερ-πολλαπλασιασμού από το *Ha-RasV12*, μειώνοντας το ρυθμό αύξησης τους.

Η επαγωγή της *Cdc6* από το ογκογόνο *Ha-RasV12* μας προέτρεψε να μελετήσουμε τις επιδράσεις της στις ανθρώπινες ινοβλάστες. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν σταθεροί κυτταρικοί πληθυσμοί ινοβλαστών MRC-5 με ρετροϊκή επιμόλυνση χρησιμοποιώντας είτε το πρότυπο φορέα Babe-Hygro ή Babe-Hygro/*Cdc6* και επιλογή σε υδρομυκίνη Β. Ανοσο-αποτύπωμα κατά western έδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης της *Cdc6* ήταν πολύ υψηλότερα (5-8X) στα κύτταρα επιμολυσμένα με το ρετροϊκό φορέα Babe-Hygro/*Cdc6* από ότι στις ινοβλάστες MRC-5Hygro αντίστοιχα (Σχήμα 17B).





Σχήμα 17. Οι επιδράσεις της *Cdc6*, ενός παράγοντα αδειοδότησης της έναρξης της αντιγραφής του DNA, στις ινοβλάστες MRC-5. (A) Ινοβλάστες MRC-5 που υπερεκφράζανε *Ha-RasV12* ή/και *p53^{Δ12}* καλλιεργήθηκαν για 24, 48 και 72 ώρες παρουσία ή απουσία ορού και αναλύθηκε η έκφραση της *Cdc6* με ανοσο-αποτύπωμα κατά western. (B) Ινοβλάστες MRC-5 επιμολύνθηκαν με ένα ρετροϊκό φορέα, Babe-Hygro/*Cdc6* που έφερε το ανθρώπινο *Cdc6* cDNA, επιλέχθηκαν σε υγρομυκίνη B και η έκφραση της *Cdc6* ανιχνεύθηκε με ανοσο-αποτύπωμα κατά western. (C) Καμπύλες αύξησης φυσιολογικών ινοβλαστών MRC-5Hygro (πρότυπος φορέας) και MRC-5*Cdc6*.

Ανάλυση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των MRC-5Hygro και MRC-5*Cdc6* με καμπύλες αύξησης έδειξε ότι η υπερέκφραση της *Cdc6* επιβράδυνε την αύξηση των κυττάρων (Σχήμα 17C), σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι η *Cdc6* είναι υπεύθυνη για τη σύζευξη της αντιγραφής του DNA και της μίτωσης και ότι η υπερέκφραση της *Cdc6* παρεμποδίζει τη μίτωση (Clay-Farrace et al., 2003). Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών για τις MRC-5Hygro και MRC-5*Cdc6* υπολογίστηκε στις 29.7 h και 36.2 h, αντίστοιχα.

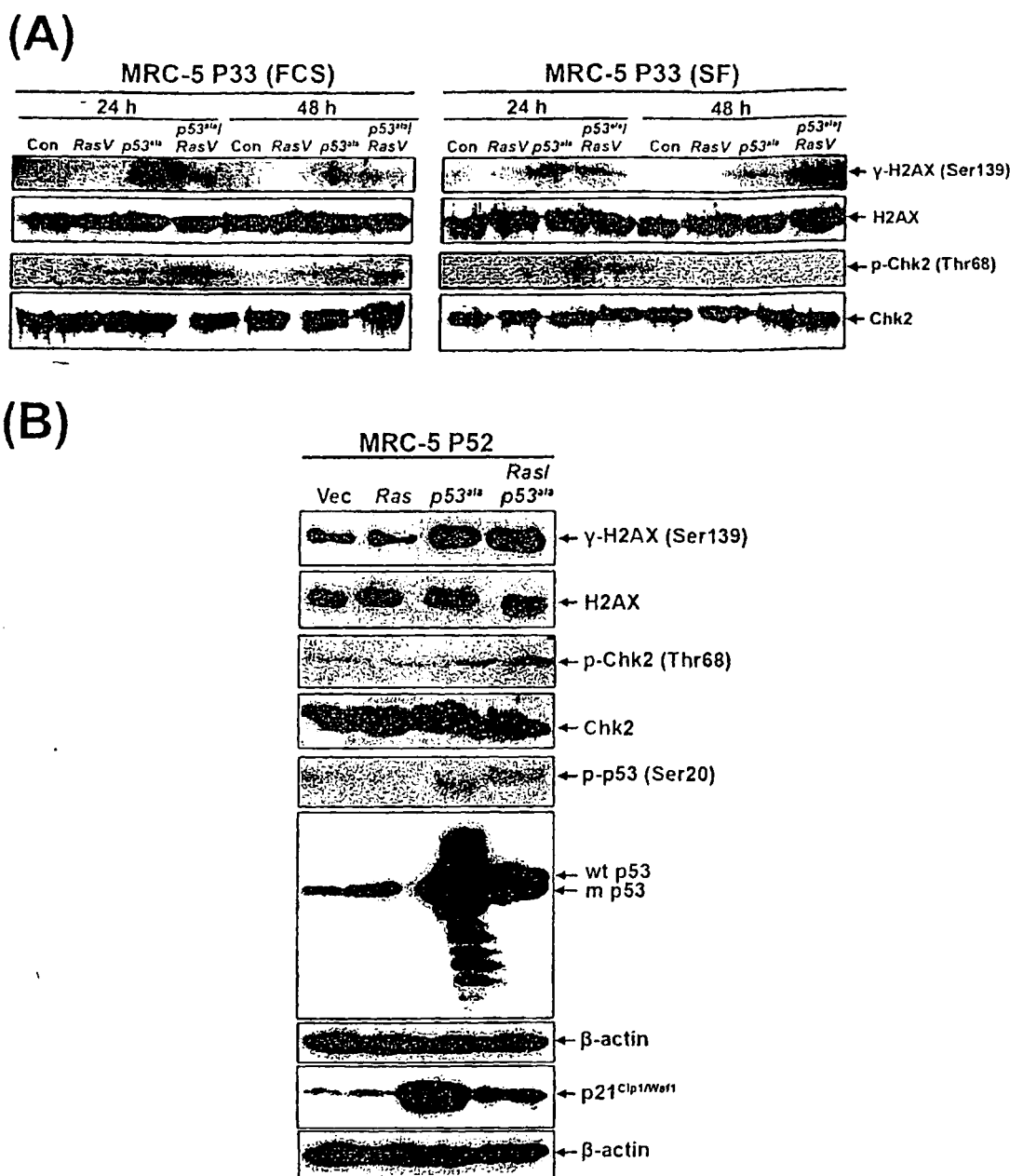
3.7. Οι επιδράσεις του ογκογόνου *Ha-RasV12* ή/και της *p53^{143ala}* στις αποκρίσεις των MRC-5 σε βλάβες στο DNA

Η υπερέκφραση της *Cdc6* σε κύτταρα θηλαστικών προάγει την επαναντιγραφή του DNA μέσα στον ίδιο κυτταρικό κύκλο, ιδιαίτερα σε p53-ανεπαρκή κύτταρα, δείχνοντας ότι η p53 παρεμποδίζει την επαναντιγραφή του DNA κυρίως διαμέσου της επαγωγής της p21 (Clay-Farrace et al., 2003, Vaziri et al., 2003, Machida and Dutta, 2005, Stillman et al., 2005). Επιπλέον, η *Cdc6* υπερεκφράζεται σε ορισμένους τύπους καρκίνου (Karakaidos et al., 2004) και έχει εμπλακεί στη απόκριση του κυττάρου σε βλάβες DNA διαμέσου μιας p53-εξαρτώμενης πορείας (Duursma and Agami, 2005).

Η επαγωγή της *Cdc6* από το ογκογόνο *Ha-RasV12* και η καταστολή του από την *p53^{143ala}*, αλλά και οι επιδράσεις της στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μας προέτρεψαν να μελετήσουμε την πορεία απόκρισης βλαβών DNA (DNA Damage Checkpoint Response ή DDR) (Ljungman, 2005). Τα κύτταρα θηλαστικών αποκρίνονται σε βλάβες στο DNA ενεργοποιώντας τα ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA και τις πορείες μεταγωγής σήματος βλαβών στο DNA (DNA Damage signaling pathways), ως ένα επιπλέον επίπεδο αντίστασης στην επαγωγή μεταλλάξεων (Artandi and Attardi, 2005, Ljungman, 2005, Herbig and Sedivy, 2006).

Το εναρκτήριο στάδιο της πορείας της DDR είναι η μεταβολή της τοπολογίας του DNA μετά τη πρόκληση βλαβών. Το αποτέλεσμα αυτής της μεταβολής είναι η έκθεση της δεσμευμένης στο DNA ιστόνης H2AX και η ενεργοποίηση των ATM/ATR κινασών που φωσφορυλιώνουν την H2AX στη σερίνη 139 σχηματίζοντας γ-H2AX και την κινάση Chk2 στο κατάλοιπο θρεονίνης 68 (Thr68).





Σχήμα 18. Έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πορεία απόκρισης σε βλάβες DNA (DDR) των ινοβλαστών MRC-5. **(A)** Πρωτεΐνες από νεαρούς ινοβλάστες MRC-5 P33 που υπερεκφράζανε *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* και καλλιεργήθηκαν για 24 και 48 ώρες κάτω από συνθήκες παρουσίας ή απουσίας ορού, αλλά και **(B)** πρωτεΐνες από ινοβλάστες MRC-5 P52 που υπερεκφράζανε τα ίδια ογκογονίδια, αναλύθηκαν με ανοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση της φωσφορυλιωμένης μορφής της ιστόνης H2AX [phospho-γ-H2AX (Ser139)], της ολικής H2AX, της φωσφορυλιωμένης μορφής της Chk2 [phospho-Chk2 (T68)], της ολικής Chk2, της φωσφορυλιωμένης μορφής της p53 [phospho-p53 (Ser20)], της ολικής p53 και της p21^{Cip1/Waf1}, χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα. Η ισοφόρτωση των πρωτεϊνών ανιχνεύθηκε με την έκφραση της β-ακτίνης.

Η φωσφορυλιωμένη μορφή της Chk2 φωσφορυλιώνει την p53 στη σερίνη 20 (P-p53 Ser20) και τη σταθεροποιεί με αποτέλεσμα να δρα ως παράγοντας μεταγραφής και επάγοντας ή καταστέλλοντας γονίδια-στόχους.

Αποτέλεσμα των δράσεων της p53 είναι η ενεργοποίηση πορειών που οδηγούν σε διακοπή της κυτταρικής αύξησης στη φάση G1 ή κυτταρική γήρανση και απόπτωση (Artandi and Attardi, 2005, Ljungman, 2005, Herbig and Sedivy, 2006), εκτός αν επιδιορθωθούν οι βλάβες στο DNA με αποτέλεσμα τη συνέχεια της προόδου του κυτταρικού κύκλου.

Προκειμένου να μελετηθούν οι επιδράσεις του ογκογόνου *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* στη DDR των κυτάρων, ινοβλάστες MRC-5 καλλιιεργήθηκαν για 24 και 48 h παρουσίας ή απουσίας ορού (Σχήμα 18Α).

Η ανάλυση των πρωτεϊνών που επάγονται κατά τη DDR έδειξε ότι ενώ το ογκογόνο *Ha-RasV12* δεν επήγαγε την έκφραση της γ -H2AX, ενός χαρακτηριστικού μοριακού μάρτυρα κυτάρων που υφίστανται αμφίκλωνες ρήξεις στις αλυσίδες του DNA (DNA double strand breaks; DNA DSBs), η υπερέκφραση της *p53^{143ala}* επήγαγε τη γ -H2AX, δρώντας μόνη της ή συνεργειακά με το *Ha-RasV12* (Σχήμα 18Α). Σε αντίθεση τα επίπεδα της ολικής H2AX δεν μεταβλήθηκαν από την υπερέκφραση των ογκογονιδίων (Σχήμα 18Α). Η συν-έκφραση των δύο ογκογονιδίων *Ha-RasV12* και *p53^{143ala}* στις ινοβλάστες MRC-5 είχε σαν αποτέλεσμα τη φαινομενικά ισχυρότερη επαγωγή της γ -H2AX στις φυσιολογικές ινοβλάστες, σε επίπεδα υψηλότερα από εκείνα που ανιχνεύθηκαν στα αντίστοιχα κύτταρα που εκφράζανε μόνον την *p53^{143ala}* (Σχήμα 18Α). Επειδή η επαγωγή της γ -H2AX μετά από πρόκληση βλαβών στο DNA εξαρτάται από τις κινάσες ATM και ATR (Shiloh, 2003), το παραπάνω αποτέλεσμα έδειξε ότι οι συγκεκριμένες κινάσες ήταν ενεργές στις ινοβλάστες που υπερεκφράζανε την *p53^{143ala}* αλλά όχι το *Ha-RasV12*.

Προκειμένου να χαρακτηριστεί επιπλέον η DDR μελετήθηκε επίσης η έκφραση και η φωσφορυλίωση της κινάσης Chk2. Η ανάλυση με ανοσο-αποτύπωμα κατά western έδειξε ότι ενώ το ογκογόνο *Ha-RasV12* δεν επήγαγε τη φωσφορυλίωση της Chk2 στο κατάλοιπο T68 στις ινοβλάστες MRC-5 μετά τη καλλιέργεια τους παρουσία ή απουσία ορού για 24 και 48 h, η επαγωγή της φωσφορυλιωμένης Chk2 (T68) ήταν εμφανής στις ινοβλάστες MRC-5 *p53^{143ala}* κάτω από συνθήκες παρουσίας ορού, αλλά και απουσίας ορού μόνο μετά από 24 h (Σχήμα 18Α). Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης της φωσφο-Chk2 (T68) ήταν σημαντικά πιο αυξημένα μετά τη συνέκφραση της *p53^{143ala}* και *Ha-RasV12* στις ινοβλάστες MRC-5, από ότι στις ινοβλάστες MRC-5 *p53^{143ala}* (Σχήμα 18Α). Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώνει την ενεργοποίηση των κινασών ATM και ATR και επιπλέον δείχνει ότι πιθανά οι φυσιολογικές

ινοβλάστες ήταν ευαίσθητες και επιδεκτικές στην πρόκληση βλαβών στο DNA από τη μεταλλαγμένη μορφή της $p53^{143ala}$, η οποία έδρασε συνεργειακά με το ογκογόνο *Ha-RasV12*. Σε αντίθεση, τα ολικά επίπεδα της Chk2 δεν μεταβλήθηκαν είτε από την υπερέκφραση του *Ha-RasV12* ή της $p53^{143ala}$ ή και των δύο μαζί, στις MRC-5 (Σχήμα 18A). Να σημειωθεί ότι η έκφραση της ολικής Chk2 χρησίμευσε και ως ενδογενής δείκτης της ισοφόρτωσης των πρωτεϊνών. Όμως για την πλήρη εκτέλεση της πορείας απόκρισης σε DNA βλάβες (ή DDR) απαιτείται και η φωσφορυλίωση της ενδογενούς αγρίου-τύπου p53 που διεξάγεται από την ATM ή τη φωσφο-Chk2 (T68), καθώς αυτή η μετα-μεταφραστική τροποποίηση σταθεροποιεί την αγρίου-τύπου p53. Η έκφραση της φωσφο-p53 (Ser20) δεν ήταν ανιχνεύσιμη στις ινοβλάστες MRC-5 P33.

Προκειμένου να διερευνηθεί αν η επαγωγή βλαβών στο DNA είναι παρατεταμένη ή επιδιορθώνεται κατά τη συνεχή ανακαλλιέργεια των κυττάρων, οι διαφορετικοί πληθυσμοί των ινοβλαστών MRC-5 ανακαλλιιεργήθηκαν, και πρωτεΐνες απομονώθηκαν από κύτταρα μετά από 52 κυτταρικές διαιρέσεις ή pdIs (P52) και αναλύθηκαν για την έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην επαγωγή της DDR [γ -H2AX (Ser139), φωσφο-Chk2 (Thr68) και φωσφο-p53 (Ser 20)] (Σχήμα 18B). Επιλέχθηκαν ινοβλάστες MRC-5 P52 γιατί παρατηρήθηκε επιβράδυνση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μετά από 52 pdIs. Η ανάλυση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην επαγωγή της DDR έδειξε ότι οι γηρασμένες ινοβλάστες MRC-5 εκφράζανε όλους τους μάρτυρες, γ -H2AX (Ser139), φωσφο-Chk2 (Thr68) και φωσφο-p53 (Ser 20), της απόκρισης σε βλάβες στο DNA (Σχήμα 18B). Όμως, η υπερέκφραση των *Ha-RasV12* και $p53^{143ala}$ επέφερε διαφορετικές επιδράσεις στις αποκρίσεις των κυττάρων. Μολονότι το ογκογόνο *Ha-RasV12* επήγαγε την έκφραση της wt p53 και της $p21^{Cip1/Waf1}$ στις γηρασμένες ινοβλάστες MRC-5 (Σχήμα 18B), δεν επήγαγε την έκφραση των γ -H2AX (Ser139), φωσφο-Chk2 (Thr68) και φωσφο-p53 (Ser 20) σε επίπεδα υψηλότερα από εκείνα που ανιχνεύθηκαν στα πρότυπα κύτταρα (con) επιμολυσμένα με τον πρότυπο φορέα (Σχήμα 18B). Αντίθετα, η υπερέκφραση της $p53^{143ala}$ είχε σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης των γ -H2AX (Ser139), φωσφο-Chk2 (Thr68) και φωσφο-p53 (Ser 20) σε επίπεδα σημαντικά υψηλότερα από ότι στις ινοβλάστες MRC-5Hygro MRC-5*Ras* (Σχήμα 18B), υποδηλώνοντας την ισχυρότερη επαγωγή βλαβών στο DNA. Η επαγωγή της φωσφο-p53 (Ser20) υποδήλωσε τη σταθεροποίηση της wt p53 και επομένως την πλήρη ενεργοποίηση των επιδιορθωτικών μηχανισμών των ινοβλαστών MRC-5 που υπερεκφράζανε $p53^{143ala}$ ή $p53^{143ala}/Ras$.



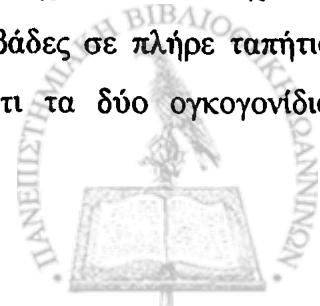
Καθώς αυτές οι φωσφορυλιώσεις της H2AX, της κινάσης Chk2 και της p53 κυρίως από την κινάση ATM απαιτούνται για την πλήρη εκτέλεση της πορείας της DDR ως απόκριση σε βλάβες του DNA, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ογκογόνο *Ha-RasV12* δεν επήγαγε βλάβες στο DNA των φυσιολογικών MRC-5. Σε αντίθεση η *p53^{143ala}* επήγαγε βλάβες στο DNA με αποτέλεσμα στην ενεργοποίηση της πορείας της DDR και τη σταθεροποίηση της ενδογενούς αγρίου-τύπου p53, η οποία μπορεί να οδηγήσει τα κύτταρα είτε σε διακοπή της κυτταρικής αύξησης στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου ή σε πρόωρη γήρανση ή σε απόπτωση.

3.8. Το *Ha-RasV12* και η *p53^{143ala}* δρουν συνεργειακά και επάγουν έναν αποπτωτικό φαινότυπο υπεύθυνο για τον περιορισμό των κυτταρικών διαιρέσεων των ινοβλαστών MRC-5

Αναφέρθηκε παραπάνω ότι ενεργοποίηση της DDR από την *p53^{143ala}* δρώντας μόνη της ή συνεργειακά με το *Ha-RasV12* μπορεί να οδηγήσει τις ινοβλάστες MRC-5 είτε σε διακοπή της κυτταρικής αύξησης ή σε πρόωρη γήρανση ή σε απόπτωση διαμέσου της φωσφορυλίωσης και σταθεροποίησης της p53. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν οι επιδράσεις των *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* στην απόπτωση των κυττάρων MRC-5.

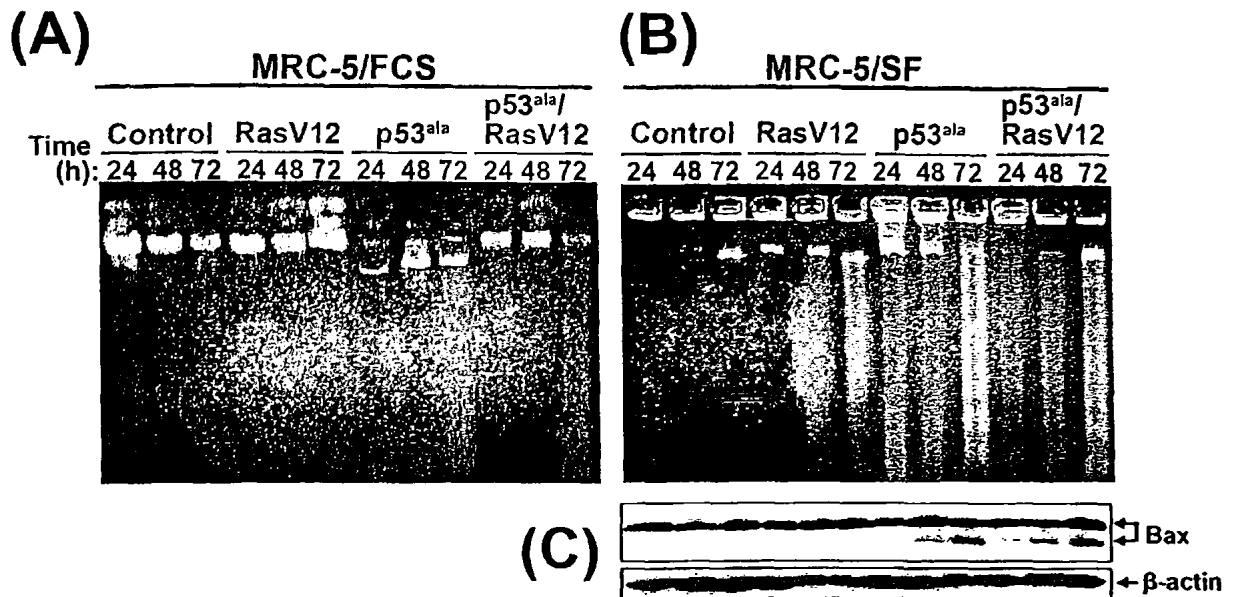
Ινοβλάστες MRC-5 ή οι ίδιες ινοβλάστες που υπερέκφραζαν τον πρότυπο φορέα ή το *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* καλλιεργήθηκαν κάτω από συνθήκες παρουσίας και απουσίας ορού για 24h, 48 h και 72 h και ο αποπτωτικός φαινότυπος τους μελετήθηκε με ανάλυση του DNA και των πρωτεϊνών που εμπλέκονται κυρίως στη μιτοχονδριακή πορεία της απόπτωσης με ανοσο-αποτύπωμα κατά western.

Ανάλυση του DNA των ινοβλαστών που καλλιεργήθηκαν κάτω από συνθήκες παρουσίας ορού έδειξε ότι ενώ στα κύτταρα ελέγχου MRC-5 (Control) και στις MRC-5 που υπερεκφράζανε το *Ha-RasV12* δεν παρατηρήθηκε τμηματοποίηση του DNA, η *p53^{143ala}* δρώντας μόνη της ευαισθητοποίησε τις MRC-5 μετά από την καλλιέργεια των πληθυσμών σε πλήρες ταπήτιο για 72 h, όπως φαίνεται από το επίχρισμα που παρατηρήθηκε στην πηκτή αγαρόζης (Σχήμα 19Α). Όμως, η τμηματοποίηση του DNA των MRC-5 ήταν πιο εμφανής και χαρακτηριστική στις ινοβλάστες MRC-5*p53^{143ala}/Ras* μετά από 72 h παρουσία ορού, δείχνοντας ότι η *p53^{143ala}* συνέργησε με το ογκογόνο *Ha-RasV12* στην επαγωγή της απόπτωσης των φυσιολογικών ινοβλαστών MRC-5, πιθανά λόγω της κατανάλωσης των αυξητικών παραγόντων του ορού αφού παρατηρήθηκε σε μονοστιβάδες σε πλήρη ταπήτιο μετά από 72 ώρες καλλιέργειας (Σχήμα 19Α). Είναι φανερό ότι τα δύο ογκογονίδια



συνέργησαν στην επαγωγή της απόπτωσης των MRC-5 μετά από παρατεταμένη καλλιέργεια, όπως αυτή μετά από 72 h σε πλήρες ταπήτιο παρουσία ορού (Σχήμα 19Α).

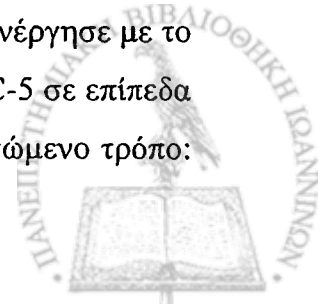




Σχήμα 19. Ανάλυση της απόπτωσης των ινοβλαστών MRC-5. Ινοβλάστες MRC-5 που φέρανε είτε έναν πρότυπο φορέα (control) ή MRC-5 που υπερεκφράζανε *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* καλλιεργήθηκαν για 24, 48 και 72 ώρες κάτω από συνθήκες παρουσίας ή απουσίας ορού. Χαμηλού μοριακού βάρους DNA απομονώθηκε από όλες τις καλλιέργειες **(A)** κάτω από συνθήκες παρουσίας ορού, και **(B)** κάτω από συνθήκες απουσίας ορού, και αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης. **(C)** Ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν από ινοβλάστες MRC-5 διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου και αναλύθηκαν με ανοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση της Bax ή β-ακτίνης. Να σημειωθεί ότι η επάνω ζώνη της Bax δεν μεταβάλλεται και πιθανά να είναι μη-εξειδικευμένο σήμα.

Σε αντίθεση, η καλλιέργεια των MRC-5 απουσία ορού έδωσε ένα διαφορετικό φαινότυπο. Ενώ η $p53^{143ala}$ ευσητοποίησε τις MRC-5 μετά από 24 ώρες καλλιέργειας, οι αρνητικές επιδράσεις του ογκογόνου *Ha-RasV12* ήταν εμφανείς μετά από 48 ώρες, όπως φαίνεται από το σχηματισμό του επιχρίσματος στην πηκτή αγαρόζης (Σχήμα 18B). Όμως και τα δύο ογκογονίδια *Ha-RasV12* και $p53^{143ala}$ δρώντας μόνα τους επήγαγαν τη θραυσματοποίηση του DNA μετά από 72 ώρες καλλιέργειας απουσία ορού, αν και ήταν πιο έντονη στις ινοβλάστες MRC-5 $p53^{143ala}$ (Σχήμα 18B). Η συνεργειακή δράση των δύο ογκογονιδίων *Ha-RasV12* και $p53^{143ala}$ μαζί παρήγαγε μια πιο εμφανής και χαρακτηριστική τμηματοποίηση (θραυσματοποίηση) του DNA στις 24 ώρες, η οποία έγινε εντονότερη με την διατήρηση των κυττάρων για 48 ώρες και ιδιαίτερα για 72 ώρες καλλιέργειας απουσίας ορού (Σχήμα 18B). Η επώαση των ινοβλαστών MRC-5*RasV12/p53^{143ala}* σε πλήρες ταπήτιο για 72 h παρουσία ορού είχε σαν αποτέλεσμα την πιο εμβριθή τμηματοποίηση του DNA των κυττάρων από εκείνα που υπερεκφράζανε είτε *Ha-RasV12* ή $p53^{143ala}$, χαρακτηριστική ενός αποπτωτικού φαινότυπου. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την παραπάνω παρατήρηση ότι η απουσία αυξητικών παραγόντων του ορού τα ογκογονίδια *Ha-RasV12* και $p53^{143ala}$ δρώντας μόνα τους ή συνεργειακά οδηγούν την απώλεια κυτταρικού πληθυσμού μέσω απόπτωσης. Επομένως, ανεξάρτητα από τις διαφορές που εντοπίστηκαν κάτω από τις δύο συνθήκες καλλιέργειας, είναι βέβαιο ότι η συνεργειακή δράση των ογκογονιδίων *Ha-RasV12* και $p53^{143ala}$ επήγαγε την απόπτωση των φυσιολογικών ινοβλαστών MRC-5 με χρονο-εξαρτώμενο τρόπο.

Προκειμένου να διερευνηθεί επιπλέον η αποπτωτική δράση της ογκογόνου $p53^{143ala}$ δρώντας μόνη της ή συνεργειακά με το ογκογόνο *Ha-RasV12* στις φυσιολογικές ινοβλάστες MRC-5 αναλύθηκε, κάτω από συνθήκες απουσίας ορού, με ανοσο-αποτύπωμα κατά western η έκφραση της Bax, η οποία αποτελεί μεταγραφικό στόχο της p53 (Miyashita and Reed, 1995) και εμπλέκεται στη μιτοχονδριακή πορεία της απόπτωσης διεγείροντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια (Antonsson et al., 2000, Gao et al., 2001) (Σχήμα 19C). Ανάλυση κατά western ανίχνευσε μια ασθενή έκφραση της Bax στις MRC-5 μετά από 72 ώρες στην καλλιέργεια και στις MRC-5*Ras* μετά από 48 και 72 ώρες (Σχήμα 18C). Σε αντίθεση, η έκφραση ή υπερέκφραση της $p53^{143ala}$ αυξορρύθμισε την έκφραση της Bax στις MRC-5 μετά από 48 ώρες και επήγαγε την ισχυρή έκφραση της μετά από 72 ώρες καλλιέργειας απουσίας ορού (Σχήμα 18C). Επιπλέον η $p53^{143ala}$ συνέργησε με το ογκογόνο *Ha-RasV12* επάγοντας έντονη και ισχυρή έκφραση της Bax στις MRC-5 σε επίπεδα υψηλότερα από αυτά που ανιχνεύθηκαν στις MRC-5 $p53^{143ala}$ κατά χρονο-εξαρτώμενο τρόπο:



η έκφραση της *Bax* ήταν ανιχνεύσιμη μετά από 24 h καλλιέργειας και τα επίπεδα της αυξάνονταν προοδευτικά μετά από 48 και 72 h καλλιέργειας (Σχήμα 18C).

Είναι φανερό ότι η επαγωγή της απόπτωσης όπως ανιχνεύθηκε με την θραυσματοποίηση του DNA συσχετίζονταν απόλυτα με την επαγωγή της έκφρασης της *Bax*, ενός προ-αποπτωτικού μέλους της οικογένειας της *Bcl-2*, και γονίδιο-στόχος της *p53*. Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι τα επίπεδα της απόπτωσης είναι χαμηλά και χρονο-εξαρτώμενα και ανιχνεύονται μόνον σε καλλιέργειες που βρίσκονται σε πλήρες ταπήτιο και όχι σε διάσπαρτες (subconfluent) καλλιέργειες. Η υπόθεση που προκύπτει είναι ότι η απώλεια των κυττάρων, και ιδιαίτερα των ινοβλαστών *MRC-5p53^{143ala}* και *MRC-5p53^{143ala}/Ras* κατά τη συνεχή ανακαλλιέργεια τους πρέπει να είναι ο υπεύθυνος παράγοντας για το μικρότερο χρόνο ζωής αυτών των κυττάρων στην κυτταροκαλλιέργεια (Πίνακας 4 και Σχήμα 14D). Η απώλεια ενός αριθμού ινοβλαστών λόγω απόπτωσης μετά από κάθε ανακαλλιέργεια οδήγησε στη μείωση του αριθμού των κυτταρικών διαιρέσεων κυρίως των *MRC-5Ras/p53^{143aal}*. Η *p53^{143ala}* δεν ήταν *per se* υπεύθυνη για την πρόωρη γήρανση των *MRC-5*. Το ογκογόνο στρες, όπως αυτό που προκαλείται από την *p53^{143ala}* και τη συνεργειακή της δράση με το ογκογόνο *Ha-RasV12*, επάγει τον κυτταρικό θάνατο των φυσιολογικών ινοβλαστών στην καλλιέργεια σε χαμηλά επίπεδα ο οποίος οδηγεί στην πρόωρη κυτταρική γήρανση τους.

3.9. Ιδιότητες μετασχηματισμού των ινοβλαστών *MRC-5* που υπερεκφράζανε *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}*

Τα κριτήρια του μετασχηματισμού κυττάρων *in vitro* είναι, πρώτον, ο σχηματισμός εστιών (focus formation) και δεύτερον, η αύξηση τους ανεξάρτητη προσκόλλησης (anchorage-independent growth). Ενώ η αύξηση των φυσιολογικών κυττάρων σταματά όταν δημιουργούν πλήρες ταπήτιο λόγω της στενής επαφής των κυττάρων, ένα φαινόμενο που ονομάζεται αναστολής επαφής (contact inhibition), τα μετασχηματισμένα ή καρκινικά κύτταρα συνεχίζουν να αυξάνονται το ένα πάνω από το άλλο και επομένως πάνω από τη καλλιέργεια μονοστιβάδας (monolayer) σχηματίζοντας εστίες (foci). Το δεύτερο κριτήριο του μετασχηματισμού των κυττάρων *in vitro* βασίζεται στο ότι τα μετασχηματισμένα ή καρκινικά κύτταρα δεν απαιτούν ένα στερεό υπόστρωμα για να αυξηθούν αλλά μπορούν να σχηματίσουν αποικίες σε ημι-στερεό υλικό επιδεικνύοντας αύξηση ανεξάρτητη προσκόλλησης.



Το τελευταίο και σημαντικότερο κριτήριο του μετασχηματισμού κυττάρων είναι αυτό του μετασχηματισμού τους *in vivo* όπου τα μετασχηματισμένα ή καρκινικά κύτταρα μπορούν να σχηματίσουν όγκους σε ανοσο-κατεσταλμένα ζωικά μοντέλα όπως αυτά των αθυμικών ή γυμνών ποντικών.

Με βάση αυτά τα κριτήρια μετασχηματισμού κυττάρων *in vitro* και *in vivo* μελετήθηκε η συμπεριφορά των ινοβλαστών MRC-5 που υπερεκφράζανε *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}*.

Ινοβλάστες MRC-5 P30 που υπερέκφραζαν *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* αυξήθηκαν προκειμένου να σχηματίσουν μονοστιβάδες σε πλήρες ταπήτιο και η αύξηση τους παρατηρήθηκε για περίπου ακόμη 2-3 εβδομάδες, χρονικό διάστημα που απαιτείται για το σχηματισμό αποικιών (Σχήμα 20). Κανένα από τα ογκογονίδια, είτε το *Ha-RasV12* ή *p53^{143ala}* ή και τα δύο μαζί δρώντας συνεργειακά δεν επέφερε το σχηματισμό εστιών (Πίνακας 5 και Σχήμα 20).

Πίνακας 5: Επιδράσεις των ογκογονιδίων *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* στις ιδιότητες μετασχηματισμού των φυσιολογικών ινοβλαστών MRC-5

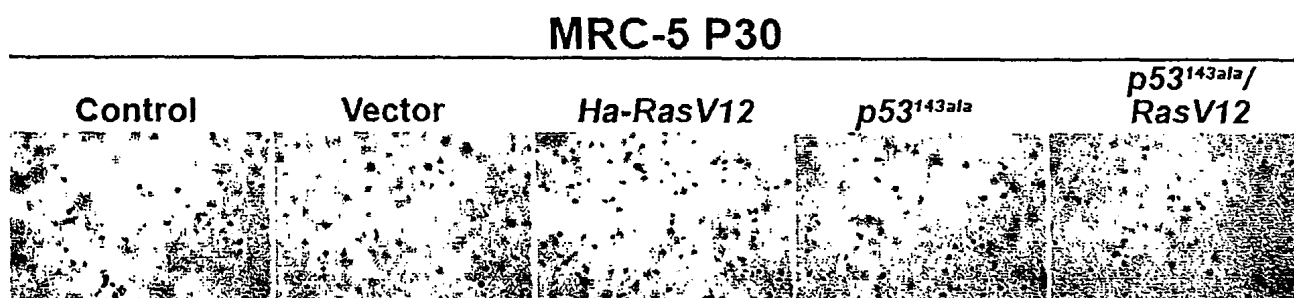
Κύτταρα	Αθανατοποίηση	Σχηματισμός εστιών <i>in vitro</i> (Foci)	Σχηματισμός αποικιών <i>in vitro</i> (AI Growth) ¹	Δημιουργία όγκων σε αθυμικά ποντίκια ²
MRC-5 P30	OXI	OXI	0/3	0/3
Neo P30	OXI	OXI	0/3	0/3
<i>Ha-RasV12</i> P30	OXI	OXI	0/3	0/3
<i>p53^{143ala}</i> P30	OXI	OXI	0/3	0/3
<i>p53^{143ala}/RasV12</i> P30	OXI	OXI	0/3	0/3

-, Συμβολίζει ένα αρνητικό αποτέλεσμα; +, Συμβολίζει ένα θετικό αποτέλεσμα; AI, Anchorage-independent

¹Αριθμός τριβλύων 6 cm ανά κυτταρικό πληθυσμό.

²Αριθμός ποντικών ανά κυτταρικό πληθυσμό. Τα κύτταρα ενοφθαλμίστηκαν και στις δύο πλευρές κάθε ζώου.





Σχήμα 20. Ανάλυση του σχηματισμού αποικιών των ινοβλαστών που υπερεκφράζανε *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}*. 3×10^6 ινοβλάστες MRC-5 εναιωρήθηκαν σε 0.4% καθαρό άγαρ (Noble agar) σε πλήρες θρεπτικό υλικό προκειμένου να ανιχνευθεί ο σχηματισμός αποικιών. Η αύξηση των κυττάρων στο ημι-στερεό υλικό ακολουθήθηκε για 3-4 εβδομάδες.

Προκειμένου να διερευνηθεί αν ικανοποιήθηκε το δεύτερο κριτήριο του μετασχηματισμού των κυττάρων *in vitro*, δηλαδή η αύξηση τους ανεξάρτητης προσκόλλησης, οι ινοβλάστες MRC-5 που υπερεκφράζανε *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* εναιωρήθηκαν σε ημι-στερεό υλικό όπως αυτό της μαλακής καθαρής άγαρ και επώαστηκαν για 3-4 εβδομάδες για το σχηματισμό αποικιών. MRC-5 P30 που υπερεκφράζανε *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* δεν σχημάτισαν αποικίες σε ημι-στερεό υλικό (Σχήμα 20).

Προκειμένου να διερευνηθεί ο μετασχηματισμός των ινοβλαστών *in vivo*, οι διαφορετικοί τύποι ινοβλαστών ενέθηκαν στα πλευρά αθυμικών (γυμνών) ποντικών. Τα ποντίκια παρακολουθήθηκαν για 6 μήνες προκειμένου να διαπιστωθεί εάν αναπτύχθηκαν όγκοι (Πίνακας 5). Καμιά κυτταρική σειρά δεν ήταν ικανή δημιουργίας όγκων σε αθυμικά ποντίκια. Τα παραπάνω αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ογκογονίδια *p53^{143ala}* ή/και *Ha-RasV12* δρώντας μόνα τους ή συνεργειακά δεν ήταν ικανά να μετασχηματίσουν φυσιολογικές ινοβλάστες *in vitro* και *in vivo*.

ΕΝΟΤΗΤΑ ΙΙΙ:

ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* ΣΤΙΣ ΤΕΛΟΜΕΡΙΣΜΕΝΕΣ ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ MRC-5TERT

3.10. Οι επιδράσεις του ογκογόνου *Ha-RasV12* και της μεταλλαγμένης μορφής της *p53*, *p53^{143ala}*, στις ιδιότητες αύξησης των ινοβλαστών MRC-5TERT

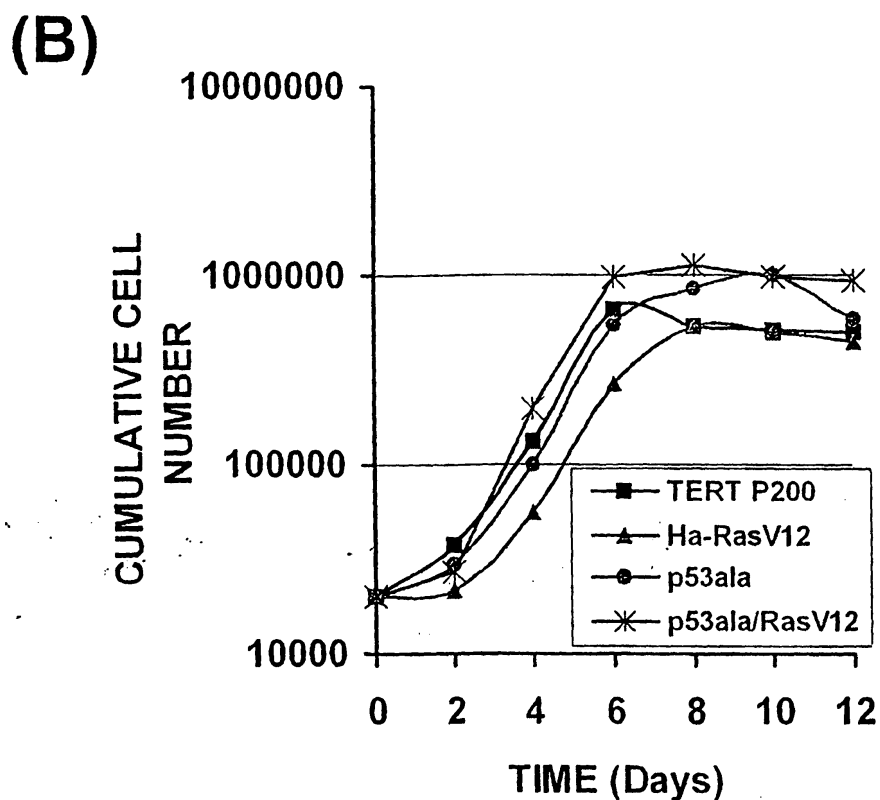
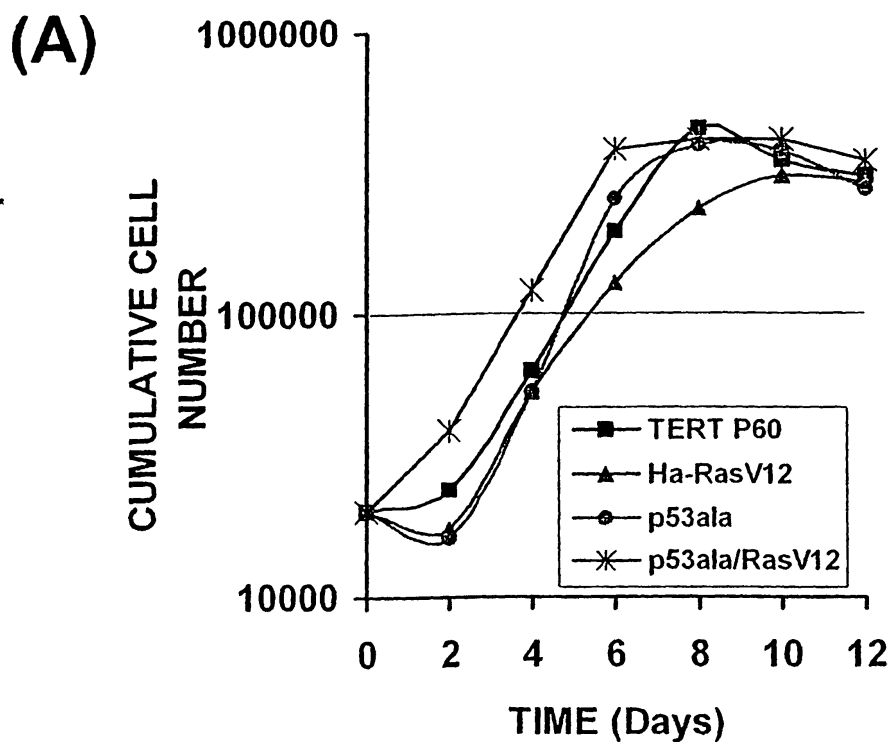
Κατασκευάστηκαν καμπύλες αύξησης των κυττάρων MRC-5TERT P60 καθώς και των MRC-5TERT P200 επιμολυσμένων με τα ογκογονίδια *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* (Σχήμα 21). Ενώ ο ρυθμός αύξησης των κυττάρων MRC-5TERT P60 ήταν βραδύτερος των ινοβλαστών MRC-5 ή MRC-5 που έφεραν τον πρότυπο φορέα (30.7 h vs 24.5 h) (Πίνακες 4 και 6), ο ρυθμός αύξησης των MRC-5TERT/*RasV12* ήταν ταχύτερος των MRC-5/*RasV12* (30.2 h vs 34.8 h), αλλά ίδιος με αυτόν των MRC-5TERT (Πίνακες 4 και 6), δείχνοντας ότι το *Ha-RasV12* δεν επιβράδυνε την αύξηση των ινοβλαστών MRC-5TERT. Σε αντίθεση, ο ρυθμός αύξησης των MRC-5TERT/*p53^{143ala}* ήταν ταχύτερος των MRC-5TERT (Πίνακας 6) αλλά και των φυσιολογικών ινοβλαστών MRC-5/*p53^{143ala}* (23.1 h vs 47.2 h) (Πίνακας 4). Η συν-έκφραση των *Ha-RasV12* και *p53^{143ala}* στις MRC-5TERT είχε σαν αποτέλεσμα ένα ρυθμό αύξησης μεταξύ αυτού που παρατηρήθηκε στις MRC-5TERT/*RasV12* και στις MRC-



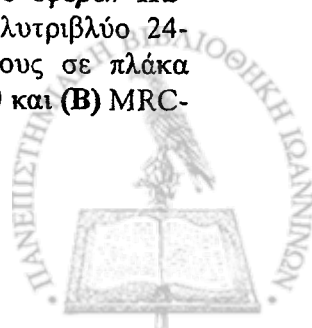
5TERT/*p53*^{143ala} (Πίνακας 6), που ήταν 27.2 h, κατά περίπου 1.5 φορές ταχύτερος του ρυθμού αύξησης των ινοβλαστών MRC-5*RasV12/p53*^{143ala} (Πίνακας 4).

Σε αντίθεση οι ινοβλάστες MRC-5TERT P200 που καλλιιεργήθηκαν για 200 κυτταρικές διαιρέσεις είχαν σαφώς ταχύτερους ρυθμούς αύξησης από εκείνους που παρατηρήθηκαν για τις φυσιολογικές MRC-5 (Πίνακας 4) ή τις τελομερισμένες ινοβλάστες MRC-5TERT P60 που έφεραν τα αντίστοιχα ογκογονίδια *Ha-RasV12* ή/και *p53*^{143ala}, και ιδιαίτερα των ινοβλαστών MRC-5TERT P200 που συν-έκφραζαν τα δύο ογκογονίδια μαζί (Πίνακας 6). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι φυσιολογικές ινοβλάστες MRC-5 αποκρίθηκαν διαφορετικά στα ογκογονίδια *Ha-RasV12* και *p53*^{143ala} από ότι οι ινοβλάστες MRC-5TERT, σε σχέση με το ρυθμό αύξησης τους.





Σχήμα 21. Καμπύλες αύξησης των τελομερισμένων ινοβλαστών MRC-5TERT που έφεραν Ha-RasV12 ή/και p53^{143ala}. Έγινε σπορά 2.0×10^4 ινοβλαστών ανά πηγαδάκι σε πολυτριβλύο 24-πηγαδιών και η αύξηση των κυττάρων παρακολούθηθηκε με τη καταμέτρηση τους σε πλάκα Neubauer κάθε 2 ημέρες για μια περίοδο 12 ημερών. (A) Ινοβλάστες MRC-5TERT P60 και (B) MRC-5TERT P200.



Συγκεκριμένα, ενώ τα ογκογονίδια *Ha-RasV12* και *p53^{143ala}* δρώντας μόνα τους ή συνεργειακά μειορρύθμισαν το ρυθμό αύξησης των φυσιολογικών ινοβλαστών MRC-5 (Πίνακας 4), το *Ha-RasV12* δεν επέφερε σχεδόν καμία σημαντική μεταβολή στον ρυθμό αύξησης των MRC-5TERT, ενώ η *p53^{143ala}* διέγειρε τον πολλαπλασιασμό τους.

Πίνακας 6: Επιδράσεις των ογκογονιδίων *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* στη μορφολογία και στις ιδιότητες αύξησης των τελομερισμένων ινοβλαστών MRC-5TERT

Κύτταρα ¹	Χρόνος ζωής κυτταρικού πληθυσμού ή PDL ²	Ρυθμός αύξησης (ώρες)	Κυτταρική πυκνότητα ³ (κύτταρα x 10 ⁴)	Ικανότητα Σποράς (%)	
P60					
MRC-5 TERT	>250	30.7	10.0	100.0%	12.5
TERT/RasV12	>250	30.2	7.4	74.0%	8.70
TERT/p53 ^{143ala}	>250	23.1	9.6	96.0%	11.7
TERT/p53 ^{143ala} /RasV12	>250	27.2	9.1	91.0%	10.9
P200					
MRC-5 TERT	>250	22.2	15.2	100.0%	14.50
TERT/RasV12	>250	24.1	14.4	94.7%	13.40
TERT/p53 ^{143ala}	>250	21.5	21.6	142.1%	15.70
TERT/p53 ^{143ala} /RasV12	>250	19.6	25.1	165.1%	15.50
A549 (ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα πνεύμονα)					18.6%

¹Η ανάλυση των ιδιοτήτων των MRC-5TERT έγινε όταν τα κύτταρα ήταν P60 και P200, αντίστοιχα.

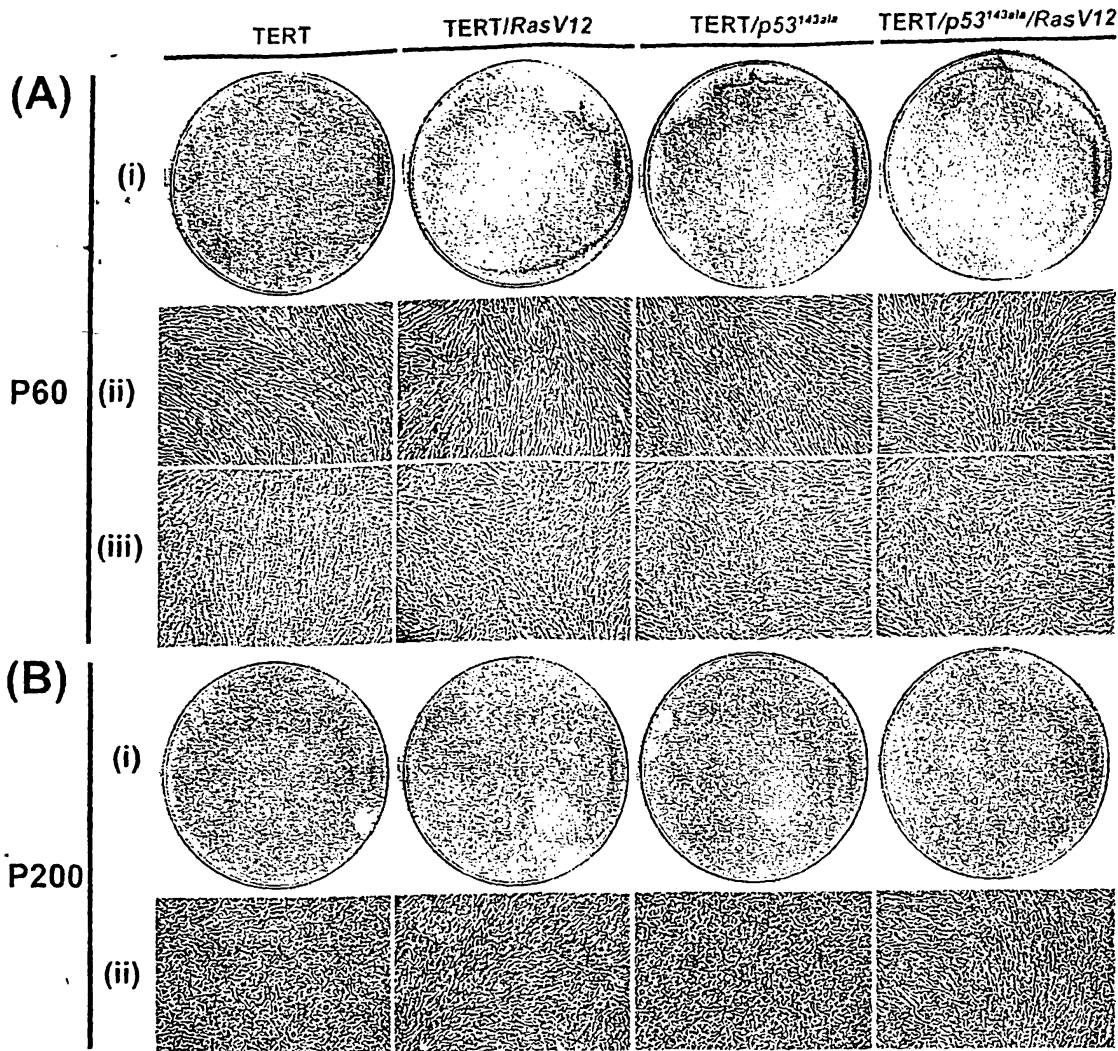
²Ο χρόνος της ζωής των κυτταρικών πληθυσμών ή PDL μετά από συνεχείς ανακαλλιέργειες.

³Το ποσοστό της κυτταρικής πυκνότητας υπολογίστηκε με βάση τα TERT.

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν οι μεταβολές στο ρυθμό αύξησης των ινοβλαστών MRC-5TERT που έκφραζαν τα ογκογονίδια ακολουθούνταν και από μεταβολές σε άλλες ιδιότητες αύξησης, μελετήθηκε ο χρόνος ζωής των κυτταρικών πληθυσμών, η μορφολογία τους, η έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης που επάγεται κατά τη γήρανση φυσιολογικών ινοβλαστών (Sen-β-Gal) (Σχήμα 21), η κυτταρική τους πυκνότητα και η ικανότητα σποράς τους (Πίνακας 6).

Μολονότι το ογκογόνο *Ha-RasV12* δεν μετέβαλλε το ρυθμό πολλαπλασιασμού, μείωσε την κυτταρική πυκνότητα και την ικανότητα σποράς των ινοβλαστών MRC-5TERT P60, και είχε σημαντικά μικρότερες αρνητικές επιδράσεις στις MRC-5TERT P200 (Πίνακας 6 και Σχήμα 22 Αi). Σε αντίθεση η υπερέκφραση της *p53^{143ala}* στις MRC-5TERT P60 δεν μετέβαλλε σημαντικά αυτές τις δύο παραμέτρους, ενώ αύξησε την κυτταρική πυκνότητα και την ικανότητα σποράς των MRC-5TERT P200 (Πίνακας 6).





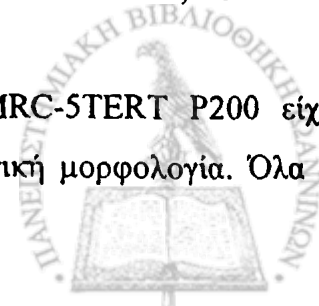
Σχήμα 22. Οι επιδράσεις των ογκογονιδίων *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* στην αύξηση, στη μορφολογία και στην έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης της κυτταρικής γήρανσης (Sen-β-Gal) στις ινοβλάστες MRC-5TERT. (Ai και Bi) Αύξηση των διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών MRC-5TERT P60 και P200, αντίστοιχα, που υπερέκφραζαν το ογκογόνο *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* σε πλήρες ταπήτιο. (Aii) Μορφολογία των ινοβλαστών MRC-5TERT P60 και P200, αντίστοιχα, που υπερέκφραζαν το ογκογόνο *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* σε πλήρες ταπήτιο φωτογραφήθηκαν κάτω από οπτικό μικροσκόπιο (Carl Zeiss, Axionvert S100). (Aiii) Χρώση των MRC-5TERT P60 που υπερέκφραζαν το ογκογόνο *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* για την ανίχνευση της έκφρασης της β-γαλακτοσιδάσης, ενός μάρτυρα της κυτταρικής γήρανσης (Sen-β-Gal). Η χρώση Sen-β-Gal στο διεξήχθηκε για ~18 ώρες.

Σε αντίθεση, η συν-έκφραση των *Ha-RasV12* και *p53^{143ala}* στις MRC-5TERT P60 αλλά και στις MRC-5TERT P200 αύξησε σημαντικά την κυτταρική πυκνότητα και την ικανότητα σποράς των ινοβλαστών (Πίνακας 6). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπερέκφραση της *p53^{143ala}* στις ινοβλάστες MRC-5TERT ανταγωνίστηκε τις αρνητικές επιδράσεις του ογκογόνου *Ha-RasV12*, αλλά συνέργησε με το ογκογόνο *Ha-RasV12* αυξάνοντας την κυτταρική πυκνότητα και την ικανότητα σποράς των ινοβλαστών MRC-5TERT, όπως έγινε περισσότερο εμφανές μετά τη συνεχή ανακαλλιέργεια τους (Πίνακας 6).

Επιπλέον, η υπερέκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης, TERT, επιμήκυνε το χρόνο ζωής (life-span) των MRC-5 και μέχρι σήμερα έχουν ανακαλλιεργηθεί για παραπάνω από 250 κυτταρικές διαιρέσεις. Μολονότι δεν παρατηρήθηκε το στάδιο 'κρίσης', θα μπορούσαν τα κύτταρα MRC-5TERT να θεωρούνται ως αθανатоποιημένες ινοβλάστες.

Ανεξάρτητα από τις μεταβολές στο ρυθμό πολλαπλασιασμού και στην πυκνότητα των κυττάρων MRC-5TERT P60, κανένα από τα ογκογονίδια δεν επέφερε σημαντικές μεταβολές στη μορφολογία των κυττάρων (Σχήμα 22 Aii), τα οποία είχαν επιμήκη μορφή και εμφάνισαν τη χαρακτηριστική παράλληλη αύξηση των MRC-5 (Σχήμα 15) στην κυτταροκαλλιέργεια (Σχήμα 22Aii). Επομένως, η υπερέκφραση της TERT δε μετέβαλε τη μορφολογία ή το προφίλ (πρότυπο) της αύξησης των κυττάρων MRC-5TERT P60. Να σημειωθεί ότι οι ινοβλάστες MRC-5TERT P60 θεωρούνται ως προ-γηρασμένα (pre-senescent), ένας όρος που εμφανίζεται στη διεθνή βιβλιογραφία για να περιγράψει ινοβλάστες που βρίσκονται κοντά ή στο τέλος του χρόνου ζωής τους στην κυτταροκαλλιέργεια. Για το λόγο αυτό καθώς επίσης και για το γεγονός ότι οι ινοβλάστες MRC-5TERT P60 δεν είχαν εισέλθει σε περίοδο 'κρίσης', ανιχνεύθηκε η έκφραση της Sen-β-Gal (Σχήμα 22 Aiii). Μολονότι δεν παρατηρήθηκε έντονη χρώση της Sen-β-Gal στις ινοβλάστες MRC-5TERT P60 που έφεραν ή όχι το *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}*, ανάλογη της έντασης των αντίστοιχων φυσιολογικών MRC-5 (Σχήμα 15), τα κύτταρα MRC-5TERT P60 που έφεραν *Ha-RasV12* είχαν εντονότερη έκφραση Sen-β-Gal από ότι τα MRC-5TERT ή MRC-5TERT/*p53^{143ala}* P60 (Σχήμα 22 Aiii). Να σημειωθεί, όμως ότι οι ινοβλάστες MRC-5TERT/*RasV12* P60 συνέχισαν να διαιρούνται και δεν επέδειξαν ένα γηρασμένο φαινότυπο. Η εντονότερη χρώση Sen-β-Gal στα κύτταρα MRC-5TERT/*RasV12* P60 πιθανά να οφείλονταν σε κυτταρικό θάνατο, ο οποίος παρεμποδίστηκε παρουσία της *p53^{143ala}* (Σχήμα 22 Aiii).

Σε αντίθεση με τις ινοβλάστες MRC-5TERT P60, οι MRC-5TERT P200 είχαν υψηλότερη πυκνότητα (Πίνακας 6 και Σχήμα 22Bi) και διαφορετική μορφολογία. Όλα τα



κύτταρα ανεξάρτητα αν έφεραν τα ογκογονίδια ή όχι, ήταν μικρότερα, στρογγυλά και πιο συμπκνωμένα, χαρακτηριστικό των μετασχηματισμένων ινοβλαστών (Σχήμα 22Bii).

3.11. Οι επιδράσεις του ογκογόνου *Ha-RasV12* και της *p53^{143ala}* στην έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου των ινοβλαστών MRC-5TERT

Προκειμένου να διερευνηθούν οι επιδράσεις των ογκογονιδίων *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}*, μελετήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Σχήμα 23).

Η υπερέκφραση του ογκογόνου *Ha-RasV12* επήγαγε την έκφραση της κυκλίνης D1 στις MRC-5TERT P60 κάτω από συνθήκες παρουσίας και απουσίας ορού (Σχήμα 23A και B), ακριβώς όπως και στις φυσιολογικές ινοβλάστες (Σχήμα 16). Η επαγωγή της έκφρασης της κυκλίνης D1 από το *Ha-RasV12* ήταν παρατεταμένη αφού ανιχνεύθηκε ακόμη και απουσία ορού για 72 h (Σχήμα 23B). Οι επιδράσεις του *Ha-RasV12* στην επαγωγή της έκφρασης της κυκλίνης D1 τόσο στις φυσιολογικές MRC-5 όσο και στις τελομερισμένες MRC-5TERT P60 ινοβλάστες συνηγορούν σε ένα μιτογόνο ρόλο του ογκογόνου *Ha-RasV12*.

Το ογκογόνο *Ha-RasV12* επήγαγε επίσης την έκφραση της ενδογενούς αγρίου-τύπου (wt), καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας (24 - 72 h), κάτω από συνθήκες παρουσίας (Σχήμα 23A) και απουσίας (Σχήμα 23B) ορού. Συχνά η παρουσία ορού καλύπτει τις επιδράσεις ογκογονιδίων στην έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, επομένως ήταν απαραίτητη η διερεύνηση των επιδράσεων του *Ha-RasV12* κάτω από συνθήκες απουσίας ορού. Η απουσία ορού έδειξε ότι η επαγωγή της έκφρασης της wt *p53* από το *Ha-RasV12* ήταν προφανής και ισχυρή. Για τον παραπάνω λόγο, μελετήθηκε η έκφραση της *p21^{Cip1/Waf1}*, ενός αναστολέα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών και γονιδίου-στόχου της *p53* κάτω από συνθήκες παρουσίας και απουσίας ορού (Σχήμα 23). Το ογκογόνο *Ha-RasV12* επήγαγε την έκφραση της *p21^{Cip1/Waf1}* κάτω και από τις δύο συνθήκες καλλιέργειας, και η επαγωγή της *p21^{Cip1/Waf1}* συσχετιζόταν με την επαγωγή της wt *p53* από το *Ha-RasV12* (Σχήμα 23). Επειδή η έκφραση της *p21^{Cip1/Waf1}* διεγείρεται επίσης από τον ορό καθώς δρα ως θετικός ρυθμιστής της προόδου του κυτταρικού κύκλου, η επαγωγή της από το *Ha-RasV12* επιβεβαιώθηκε και σε καλλιέργειες απουσίας ορού (Σχήμα 23B). Όμως, η έκφραση της *p21^{Cip1/Waf1}* επάχθηκε επίσης και από την *p53^{143ala}*, φαινόμενο που ήταν πιο προφανές κάτω από συνθήκες απουσίας ορού (Σχήμα 23B).



Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι η $p53^{143ala}$ (Friedlander et al., 1996, Aurelio et al., 2000), αλλά και άλλες μεταλλαγμένες μορφές της $p53$ (Ludwig et al., 1996, Ryan and Vousden, 1998) επηρεάζουν επιλεκτικά την έκφραση γονιδίων-στόχων, επάγοντας την έκφραση της $p21^{Cip1/Waf1}$ και καταστέλλοντας την έκφραση της Bax , μιας πρωτεΐνης που εμπλέκεται στην απόπτωση.

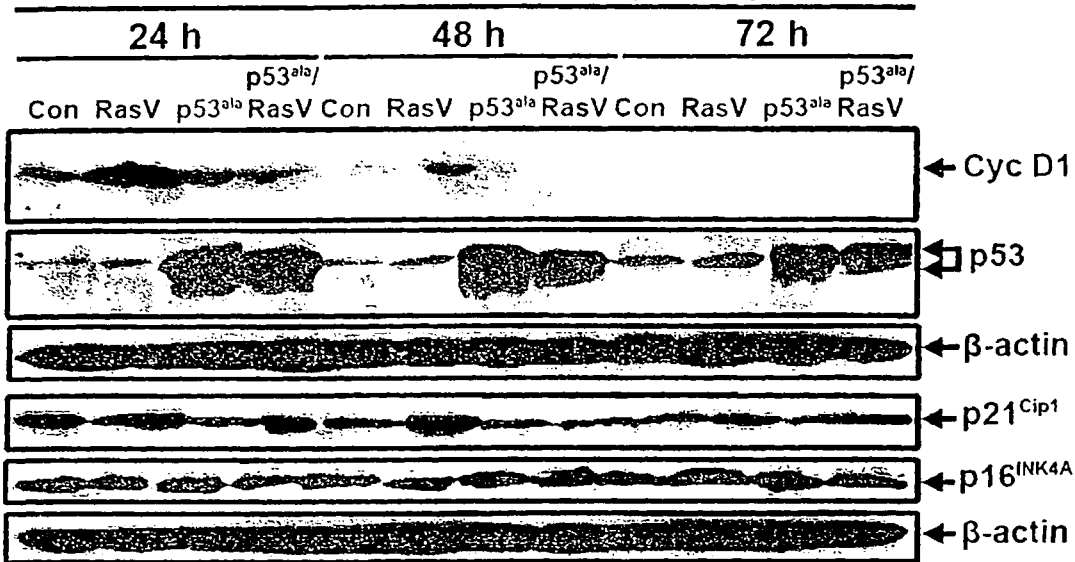
Η συν-έκφραση των $Ha-RasV12$ και $p53^{143ala}$ MRC-5TERT P60 δεν οδήγησε σε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της $p21^{Cip1/Waf1}$ από εκείνα που ανιχνεύθηκαν στις ινοβλάστες που έφεραν μόνον το ένα από τα δύο ογκογονίδια (Σχήμα 23B).

Μελετήθηκε επίσης η έκφραση της $p16^{INK4A}$ η οποία δρα ως αναστολέας των κυκλινών (CKI) δεσμεύοντας την κυκλίνη D1 (Sherr and Roberts, 1999, Sherr, 2000, Voorhoeve and Agami, 2004, Satyanarayana and Rudolph, 2004), αλλά και ως επαγωγέας της απόπτωσης (Lagresle et al., 2002, Sachs et al., 2004). Όπως και στις φυσιολογικές ινοβλάστες MRC-5 (Σχήμα 16), τα επίπεδα έκφρασης της $p16^{INK4A}$ ήταν υψηλότερα στις MRC-5TERT P60 που καλλιιεργήθηκαν παρουσία (Σχήμα 22A) από ότι απουσία (Σχήμα 23B) ορού και κανένα από τα ογκογονίδια $Ha-RasV12$ ή/και $p53^{143ala}$ δρώντας μόνα τους ή συνεργειακά δεν επηρέασαν την έκφραση της, τουλάχιστον κάτω από συνθήκες παρουσίας ορού (Σχήμα 23A). Όμως, ενώ κάτω από συνθήκες απουσίας ορού η έκφραση της $p16^{INK4A}$ ήταν μη-ανιχνεύσιμη μετά από 24 και 48 ώρες καλλιέργειας, εκφράζονταν σε υψηλότερα επίπεδα μετά από 72 ώρες καλλιέργειας απουσίας ορού (Σχήμα 23B). Επιπλέον, ενώ το ογκογόνο $Ha-RasV12$ επήγαγε την έκφραση της, η $p53^{143ala}$ κατέστειλε την έκφραση της $p16^{INK4A}$ δρώντας μόνη της ή παρουσία του $Ha-RasV12$ (Σχήμα 23B).



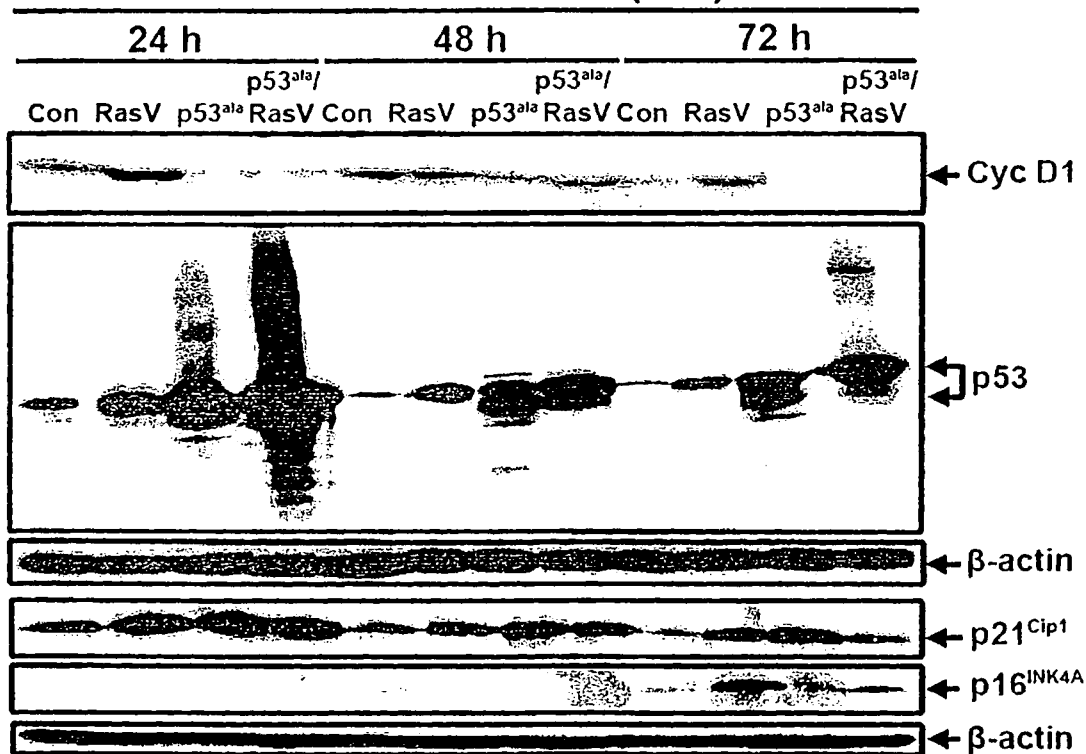
(A)

MRC-5TERT P60 (FCS)



(B)

MRC-5TERT P60 (SF)



Σχήμα 23. Έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στις ινοβλάστες MRC-5TERT P60 που υπερέκφραζαν *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}*. Ινοβλάστες MRC-5TERT P60 που υπερέκφραζαν *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* καλλιεργήθηκαν για 24, 48 και 72 ώρες παρουσία (A) ή απουσία (B) ορού και αναλύθηκε η έκφραση της κυκλίνης D1, p53, p21^{Cip1/Waf1} και p16^{INK4A}.

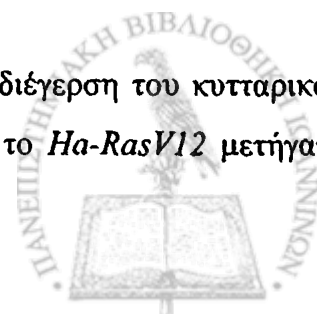
Η επαγωγή της κυκλίνης D1 από το *Ha-RasV12* υποδηλώνει μιτογόνο δράση στις MRC-5TERT, παρά το γεγονός αυτό οι ινοβλάστες MRC-5TERT/*RasV12* P60 δεν επέδειξαν υψηλότερους ρυθμούς αύξησης από τις MRC-5TERT P60 (Πίνακας 6), πιθανά λόγω της υψηλότερης έκφρασης της wt p53 και του γονιδίου-στόχου της p21^{Cip1/Waf1} (Σχήμα 23). Παραμένει επομένως το ερώτημα του φαινοτύπου των κυττάρων MRC-5TERT P60 που υπερέκφραζαν το *Ha-RasV12* ή/και p53^{I43ala}.

3.12. Έκφραση της *Cdc6* και οι επιδράσεις της στις ινοβλάστες MRC-5TERT

Η p21^{Cip1/Waf1}, εκτός από αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών δρα και ως παράγοντας συγκρότησης του συμπλόκου κυκλίνης D1-CDK4/6. Η επαγωγή της p21^{Cip1/Waf1} αλλά και της κυκλίνης D1 από το ογκογόνο *Ha-RasV12* μας προέτρεψε να μελετήσουμε την έκφραση της CDC6, ενός παράγοντα αδειοδότησης (licensing factor) της έναρξης της αντιγραφής του DNA (Gladden and Diehl, 2003, Machida and Dutta, 2005, Takeda et al., 2005, DePamphilis et al., 2006, Lau et al., 2006), η έκφραση του οποίου μειορρυθμίζεται από την p53 (Chen et al., 2004; Duursma and Agami, 2005).

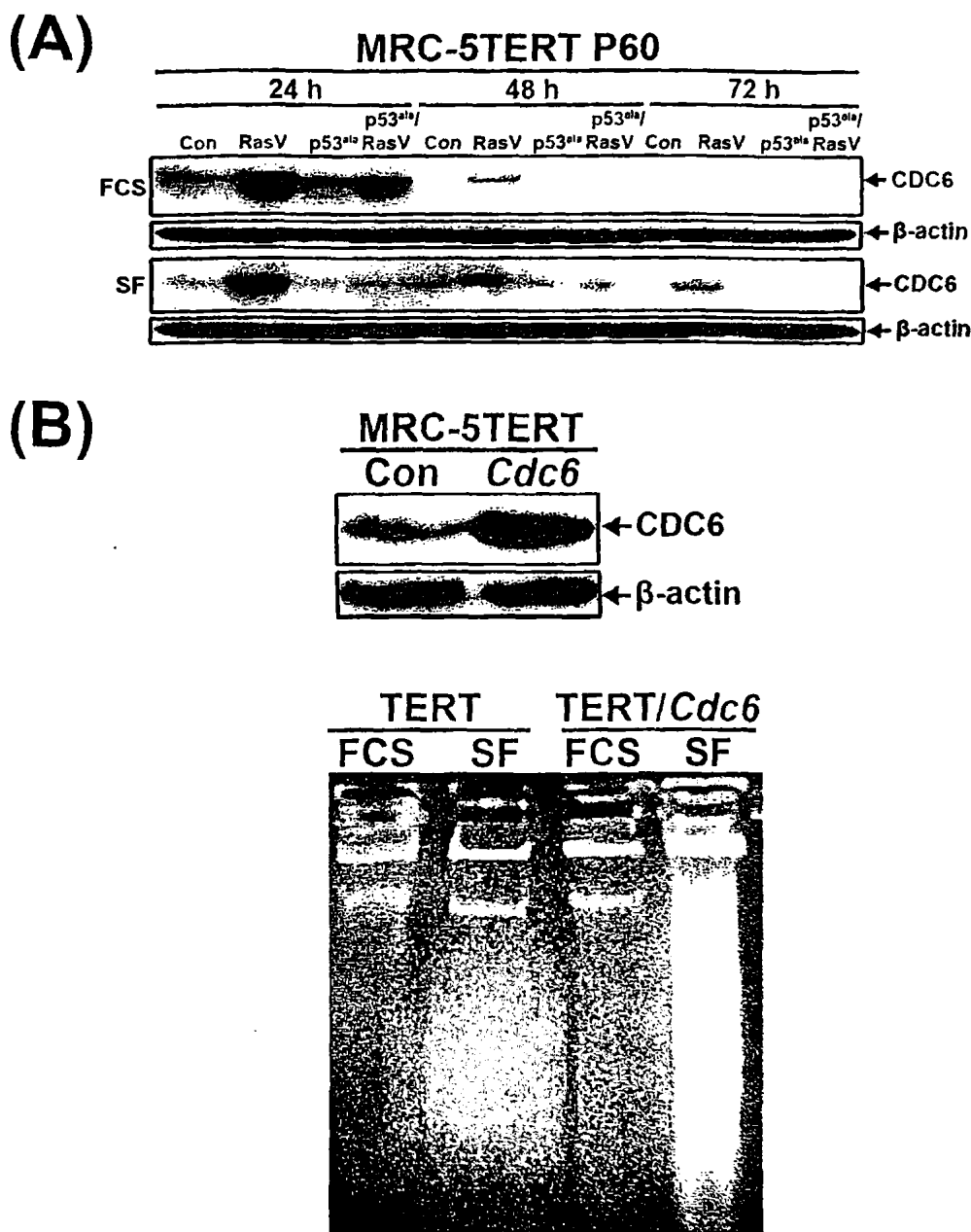
Η ανάλυση της έκφρασης της CDC6 με ανοσο-αποτύπωμα κατά western στις τελομερισμένες ινοβλάστες MRC-5TERT P60 που υπερέκφραζαν το ογκογόνο *Ha-RasV12* ή/και p53^{I43ala} έδειξε ότι ενώ το *Ha-RasV12* επίγαγε την έκφραση της CDC6 κάτω από συνθήκες παρουσίας και απουσίας ορού, η συν-έκφραση της p53^{I43ala} κατέστειλε δραματικά την *RasV12*-επαγόμενη έκφραση της CDC6 (Σχήμα 23A), σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι η p53 δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της CDC6 (Chen et al., 2004, Duursma and Agami, 2005). Η επαγωγή της CDC6 μαζί με την επαγωγή της κυκλίνης D1 από το ογκογόνο *Ha-RasV12* στις MRC-5TERT P60 επιβεβαιώνει τη μιτογόνο δράση του *Ha-RasV12*, καθώς μελέτες έδειξαν ότι η στρατολόγηση της CDC6 στο DNA είναι επαρκής για τη διέγερση της αντιγραφής του (Takeda et al., 2005), αλλά και ότι η μειορρύθμιση της CDC6 με χρήση RNAi παρεμποδίζει τη μετάβαση G1-S του κυτταρικού κύκλου (Lau et al., 2006). Είναι φανερό ότι η διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τη CDC6 είναι μια ιδιότητα με βάση την οποία έχει προφανώς αποδοθεί ογκογόνος δράση στη CDC6, τουλάχιστον σε ινοβλάστες τρωκτικών (Gonzalez et al., 2006).

Η επαγωγή της κυκλίνης D1 και της CDC6 που συνηγορούν στη διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της αντιγραφής του DNA, υποδήλωσε ότι το *Ha-RasV12* μετήγαγε



υπερβολικά μιτογόνα μηνύματα οδηγώντας τις ινοβλάστες MRC-5TERT πιθανά σε ένα στρες υπερ-πολλαπλασιασμού (hyperproliferative stress). Ποια ήταν όμως η πιθανή απόκριση των ινοβλαστών MRC-5TERT σε αυτό το στρες υπερ-πολλαπλασιασμού; Προκειμένου να μελετηθεί κατά πόσο η CDC6 που επάγεται από το *Ha-RasV12* διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών MRC-5TERT P60, κατασκευάστηκαν MRC-5TERT που υπερέκφραζαν τη CDC6 (Σχήμα 24B). Όμως, η υπερέκφραση της CDC6 στις MRC-5TERT οδήγησε τα κύτταρα σε απόπτωση κάτω από συνθήκες απουσίας ορού (Σχήμα 24B), παρά σε ογκογόνο μετασχηματισμό (Gonzalez et al., 2006), καθώς οι ινοβλάστες MRC-5TERT/Cdc6 δεν επέδειξαν αύξηση σε ημι-στερεό υλικό (δεν απεικονίζεται). Το αποτέλεσμα συνηγορεί στο ότι το *Ha-RasV12* επήγαγε ένα στρες υπερ-πολλαπλασιασμού οδηγώντας τις ινοβλάστες MRC-5TERT P60 σε απόπτωση. Η επαγωγή της απόπτωσης των MRC-5TERT/Cdc6 δεν ήταν αναμενόμενη, αν και έχει αναφερθεί ότι η υπερέκφραση της CDC6 σε ανθρώπινα κύτταρα παρεμποδίζει την έναρξη της μίτωσης μέσω του Chk1 μηχανισμού ελέγχου βλαβών στο DNA (Clay-Farrace et al., 2003). Το ερώτημα που τίθεται από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι κατά πόσο το ογκογόνο *Ha-RasV12* επάγει βλάβες στο DNA που καταστέλλονται από την υπερέκφραση της *p53^{143ala}*.





Σχήμα 24. Έκφραση και επιδράσεις της CDC6 στις ινοβλάστες MRC-5TERT P60 που υπερέκφραζαν *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}*. (A) Ινοβλάστες MRC-5TERT P60 που υπερέκφραζαν *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* καλλιεργήθηκαν για 24, 48 και 72 ώρες παρουσία ή απουσία ορού και αναλύθηκε η έκφραση της Cdc6, ενός παράγοντα αδειοδότησης (licensing factor) της έναρξης της αντιγραφής του DNA. (B) Ινοβλάστες MRC-5TERT επιμολύνθηκαν με το ρετροϊό Babe-Hygro/Cdc6 που έφερε το ανθρώπινο Cdc6 cDNA, επιλέχθηκαν σε υγρομυκίνη B και ανιχνεύθηκε η έκφραση της CDC6 με ανοσο-αποτύπωμα κατά western. Ινοβλάστες MRC-5TERT και MRC-5TERT/Cdc6 καλλιεργήθηκαν κάτω από συνθήκες παρουσίας ή απουσίας ορού για 24 ώρες και χαμηλού μοριακού βάρους DNA απομονώθηκε και αναλύθηκε σε πηκτική αγαρόζης.

3.13. Το ογκογόνο *Ha-RasV12* επήγαγε την πορεία απόκρισης βλαβών DNA, η οποία κατεστάλη από την *p53^{143ala}* στις ινοβλάστες MRC-5TERT

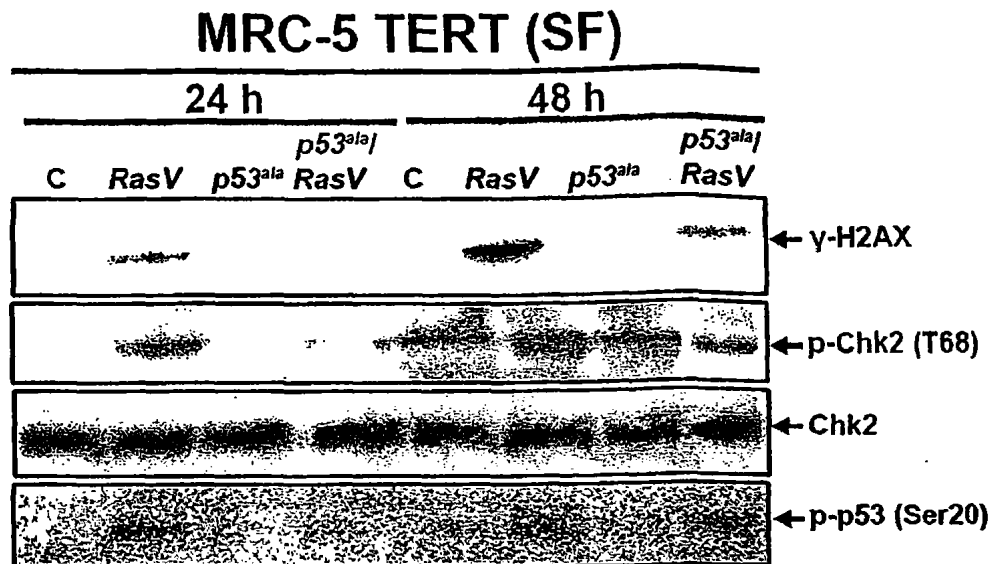
Η υπερέκφραση της *Cdc6* σε κύτταρα θηλαστικών προάγει την επαναντιγραφή του DNA μέσα στον ίδιο κυτταρικό κύκλο, ιδιαίτερα σε *p53*-ανεπαρκή κύτταρα, δείχνοντας ότι η *p53* παρεμποδίζει την επαναντιγραφή του DNA κυρίως διαμέσου της επαγωγής της *p21^{Cip1/Waf1}* (Clay-Farrace et al., 2003, Vaziri et al., 2003, Machida and Dutta, 2005, Stillman et al., 2005). Επιπλέον, η *Cdc6* υπερεκφράζεται σε ορισμένους τύπους καρκίνου (Karakaidos et al., 2004) και έχει εμπλακεί στη απόκριση του κυττάρου σε βλάβες DNA (Clay-Farrace et al., 2003; Duursma and Agami, 2005).

Η επαγωγή της *Cdc6* από το ογκογόνο *Ha-RasV12* και η καταστολή του από την *p53^{143ala}* στις ινοβλάστες MRC-5TERT, η επαγωγή της *p21^{Cip1/Waf1}* από την *p53^{143ala}*, αλλά και η επαγωγή της απόπτωσης αυτών των κυττάρων από την υπερέκφραση της *CDC6* μας προέτρεψαν να μελετήσουμε την πορεία απόκρισης βλαβών DNA (DNA Damage Response ή DDR) (Clay-Farrace et al., 2003; Artandi and Attardi, 2005; Ljungman, 2005; Herbig and Sedivy, 2006).

Τα κύτταρα θηλαστικών αποκρίνονται σε βλάβες στο DNA ενεργοποιώντας τα ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA και τις πορείες μεταγωγής σήματος βλαβών στο DNA (DNA Damage signaling pathways), ως ένα επιπλέον επίπεδο αντίστασης στην επαγωγή μεταλλάξεων (Artandi and Attardi, 2005, Ljungman, 2005).

Το εναρκτήριο στάδιο της πορείας της DDR είναι η μεταβολή της τοπολογίας του DNA μετά τη πρόκληση βλαβών. Το αποτέλεσμα αυτής της μεταβολής είναι η έκθεση της δεσμευμένης στο DNA ιστόνης H2AX και η ενεργοποίηση των ATM/ATR κινάσων που φωσφορυλιώνουν την H2AX σε γ -H2AX και την κινάση Chk2. Η φωσφορυλιωμένη μορφή της Chk2 φωσφορυλιώνει την *p53* στη σερίνη 20 (P-*p53* Ser20) και τη σταθεροποιεί με αποτέλεσμα να δρα ως παράγοντας μεταγραφής επάγοντας ή καταστέλλοντας γονίδια-στόχους. Αποτέλεσμα των δράσεων της *p53* είναι η ενεργοποίηση πορειών που οδηγούν σε διακοπή της κυτταρικής αύξησης στη φάση G1 ή κυτταρική γήρανση και απόπτωση (Artandi and Attardi, 2005, Ljungman, 2005).





Σχήμα 25. Έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πορεία απόκρισης σε βλάβες DNA (DDR) των ινοβλαστών MRC-5TERT P60. Ινοβλάστες MRC-5TERT που υπερέκφραζαν *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* καλλιιεργήθηκαν για 24 και 48 ώρες κάτω από συνθήκες απουσίας ορού και αναλύθηκε με ανοσο-αποτύπωμα κατά western η έκφραση της φωσφορυλιωμένης μορφής της ιστόνης H2AX (γ -H2AX), της ολικής Chk2 και της φωσφορυλιωμένης μορφής της Chk2, p-Chk2 (T68) και της φωσφορυλιωμένης μορφής της p53, p-p53 (Ser20) χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα.

Προκειμένου να διερευνηθεί η φωσφορυλίωση της p53 που διεξάγεται κυρίως στις σερίνες 15 και 20, αναλύθηκε η έκφραση της φωσφορυλιωμένης μορφής της p53 στη σερίνη 20 (p-p53 Ser20) με ανοσο-αποτύπωμα κατά western (Σχήμα 25). Η ανάλυση έδειξε ότι ενώ το ογκογόνο *Ha-RasV12* επήγαγε τη φωσφορυλίωση της p53 στη σερίνη 20 στις ινοβλάστες MRC-5TERT, η συν-έκφραση της *p53^{143ala}* μαζί με το *Ha-RasV12* μείωσε τα επίπεδα έκφρασης της p-p53 Ser20 στις MRC-5TERT P60 (Σχήμα 25). Η φωσφορυλίωση της p53 στη σερίνη 20 (p-p53 Ser20) διεξάγεται είτε από την ενεργό κινάση Chk2 T68 ή από την ενεργό κινάση ATM. Ανεξάρτητα αν η φωσφορυλίωση της p53 είναι έμμεση ή άμεση, είναι βέβαιο ότι οδηγεί στη σταθεροποίηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 και τη παρεμπόδιση της από την αποικοδόμηση.

Καθώς αυτές οι φωσφορυλιώσεις της H2AX, της κινάσης Chk2 και της p53 κυρίως από την κινάση ATM απαιτούνται για την πλήρη εκτέλεση της πορείας της DDR ως απόκριση σε βλάβες του DNA, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ογκογόνο *Ha-RasV12* επήγαγε βλάβες στο DNA των τελομερισμένων ινοβλαστών MRC-5TERT P60 οδηγώντας στην ενεργοποίηση της πορείας της DDR και στη σταθεροποίηση της ενδογενούς αγρίου-τύπου p53, η οποία μπορεί να οδηγήσει τα κύτταρα είτε σε διακοπή της κυτταρικής αύξησης στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου είτε σε απόπτωση.

Η εμπλοκή της p53 αλλά και η κυριαρχία αυτής της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης στην απόκριση των ινοβλαστών σε βλάβες στο DNA που προκλήθηκαν από την υπερέκφραση του ογκογόνου *Ha-RasV12* προέρχεται από τα παραπάνω αποτελέσματα, όπου η χρήση μιας αρνητικά κυρίαρχης μεταλλαγμένης μορφής της p53 (dominant-negative mutant form, *p53^{143ala}*) κατέστειλε την έκφραση των ενεργοποιημένων από το *Ha-RasV12* μορφών των πρωτεϊνών (γ-H2AX, Chk2 T68, P-p53 Ser20) που εμπλέκονται στην εκτέλεση της DDR.

Να σημειωθεί ότι στις ινοβλάστες MRC-5TERT P200 δεν ανιχνεύθηκε η έκφραση των γ-H2AX, Chk2 T68 και p-p53 Ser20, ακόμη και μετά από 96 ώρες καλλιέργειας απουσία ορού.



Προκειμένου να μελετηθούν οι επιδράσεις του ογκογόνου *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* στη DDR των κυττάρων, ινοβλάστες MRC-5TERT p60 καλλιεργήθηκαν για 24 και 48 h απουσίας ορού, καθώς κάτω απ' αυτές τις συνθήκες ήταν πιο ισχυρή και προφανής η επαγωγή της ενδογενούς αγρίου-τύπου p53 και του μεταγραφικού της στόχου p21^{Cip1/Waf1} (Σχήμα 23).

Η ανάλυση των πρωτεϊνών που επάγονται κατά τη DDR έδειξε ότι το ογκογόνο *Ha-RasV12* επήγαγε την έκφραση της φωσφορυλιωμένης μορφής της H2AX, γ-H2AX, ενός χαρακτηριστικού μοριακού μάρτυρα κυττάρων που υφίστανται αμφίκλωνες ρήξεις στις αλυσίδες του DNA (DNA double strand breaks; DNA DSBs) στις MRC-5TERT P60 μετά από 24 ώρες καλλιέργειας αλλά ιδιαίτερα μετά τη καλλιέργεια των κυττάρων για 48 h απουσίας ορού (Σχήμα 25). Σε αντίθεση, τα επίπεδα έκφρασης της γ-H2AX ήταν χαμηλά ως μη-ανιχνεύσιμα στα κύτταρα MRC-5TERT/*p53^{143ala}* (Σχήμα 25). Η συν-έκφραση των δύο ογκογονιδίων *Ha-RasV12* και *p53^{143ala}* στις ινοβλάστες MRC-5TERT P60 οδήγησε στη μείωση των επιπέδων της γ-H2AX, δείχνοντας ότι η *p53^{143ala}* κατέστειλε την επαγωγή της γ-H2AX από το *Ha-RasV12* (Σχήμα 25). Επειδή η επαγωγή της γ-H2AX μετά από πρόκληση βλαβών στο DNA εξαρτάται από τις κινάσες ATM και ATR (Shiloh, 2003), το παραπάνω αποτέλεσμα έδειξε ότι οι συγκεκριμένες κινάσες ήταν ενεργές στις ινοβλάστες που υπερέκφραζαν το ογκογόνο *Ha-RasV12*.

Προκειμένου να χαρακτηριστεί επιπλέον η DDR μελετήθηκε επίσης η έκφραση και η φωσφορυλίωση της κινάσης Chk2. Η ανάλυση με ανοσο-αποτύπωμα κατά western έδειξε ότι ενώ το ογκογόνο *Ha-RasV12* επήγαγε τη φωσφορυλίωση της Chk2 στο κατάλοιπο T68 στις ινοβλάστες MRC-5TERT μετά τη καλλιέργεια τους απουσία ορού για 24 και 48 h, η *p53^{143ala}* κατέστειλε την επαγωγή της φωσφορυλίωσης της Chk2 που ήταν πιο εμφανής στις ινοβλάστες MRC-5TERT που συν-έκφραζαν *Ha-RasV12* και *p53^{143ala}* (Σχήμα 25). Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώνει την ενεργοποίηση των κινασών ATM και ATR και επιπλέον δείχνει ότι οι τελομερισμένες ινοβλάστες ήταν ευαίσθητες και επιδεκτικές στην πρόκληση βλαβών στο DNA από το ογκογόνο *Ha-RasV12*. Σε αντίθεση, τα ολικά επίπεδα της Chk2 δεν μεταβλήθηκαν είτε από την υπερέκφραση του *Ha-RasV12* ή της *p53^{143ala}* ή και των δύο μαζί, στις ινοβλάστες MRC-5TERT P60 (Σχήμα 25). Επιπλέον, η έκφραση της ολικής Chk2 χρησίμευσε και ως ενδογενής δείκτης της ισοφόρτωσης των πρωτεϊνών. Όμως για την πλήρη εκτέλεση της πορείας απόκρισης σε DNA βλάβες (ή DDR) απαιτείται και η φωσφορυλίωση της ενδογενούς αγρίου-τύπου p53.



3.14. Η υπερέκφραση της $p53^{143ala}$ κατέστειλε την απόπτωση των ινοβλαστών MRC-5TERT που επάχθηκε από το ογκογόνο *Ha-RasV12*

Αναφέρθηκε παραπάνω ότι ενεργοποίηση της DDR από το ογκογόνο *Ha-RasV12* μπορεί να οδηγήσει τις ινοβλάστες είτε σε διακοπή της κυτταρικής αύξησης ή σε απόπτωση διαμέσου της φωσφορλίωσης και σταθεροποίησης της p53.

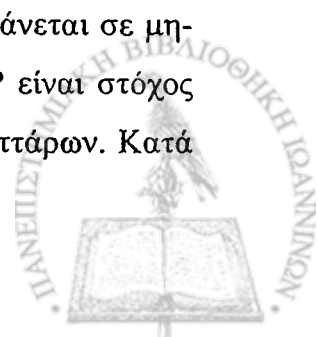
Επειδή το ογκογόνο *Ha-RasV12* δεν επήγαγε τη διακοπή της αύξησης των ινοβλαστών MRC-5TERT P60, μολονότι ανιχνεύθηκαν χαμηλά επίπεδα Sen-β-Gal (τα οποία ενδέχεται να προέρχονται από κυτταρικό θάνατο) (Σχήμα 22), μελετήθηκαν οι επιδράσεις των *Ha-RasV12* ή/και $p53^{143ala}$ στην απόπτωση των ινοβλαστών MRC-5TERT P60.

Ινοβλάστες MRC-5TERT P60 ή MRC-5TERT P60 που υπερέκφραζαν *Ha-RasV12* ή/και $p53^{143ala}$ καλλιεργήθηκαν κάτω από συνθήκες απουσίας ορού για 24 και 48 h και ο αποπτωτικός φαινότυπος τους μελετήθηκε με ανάλυση του DNA και πρωτεϊνών που εμπλέκονται κυρίως στη μιτοχονδριακή πορεία της απόπτωσης με ανοσο-αποτύπωμα κατά western (Σχήμα 26).

Ανάλυση του DNA των ινοβλαστών που καλλιεργήθηκαν κάτω από συνθήκες απουσίας ορού έδειξε ότι ενώ στα κύτταρα ελέγχου (Con) δεν παρατηρήθηκε τμηματοποίηση του DNA, το *Ha-RasV12* ευαισθητοποίησε τις MRC-5TERT P60 και επήγαγε την απόπτωση τους, η οποία ήταν πιο έντονη και χαρακτηριστική μετά τη καλλιέργεια τους για 48 ώρες (Σχήμα 26A). Σε αντίθεση δεν παρατηρήθηκε απόπτωση στις ινοβλάστες MRC-5TERT p60 που υπερέκφραζαν $p53^{143ala}$ ή $p53^{143ala}/RasV12$ (Σχήμα 26A).

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η αποπτωτική δράση του ογκογόνου *Ha-RasV12* στις ινοβλάστες MRC-5TERT p60 αναλύθηκε με ανοσο-αποτύπωμα κατά western η έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση, ιδιαίτερα της μιτοχονδριακής πορείας της απόπτωσης (Σχήμα 26B).

Η πρωτεολυτική διάσπαση της πολυ-ADP ριβόσυλο-πολυμεράσης (PARP) αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό κυττάρων, που υφίστανται απόπτωση από ποικίλα αποπτωτικά ερεθίσματα, αλλά και έναν αξιόπιστο δείκτη της κυτταρικής απόπτωσης. Η PARP είναι ένα πυρηνικό ένζυμο 115 kDa που βρίσκεται στη χρωματίνη και καταλύει την μεταφορά των μονάδων ADP-ριβόζης από το NAD^+ σε διάφορες πυρηνικές πρωτεΐνες όπως ιστόνες, τοποϊσομεράσες και στον εαυτό της. Η καταλυτική ενεργότητα της PARP αυξάνεται σε μη-αποπτωτικά κύτταρα μετά από επαγωγή βλάβης στο DNA. Επιπλέον η PARP είναι στόχος της δράσης των κασπασών, ενζύμων που εμπλέκονται στην απόπτωση των κυττάρων. Κατά

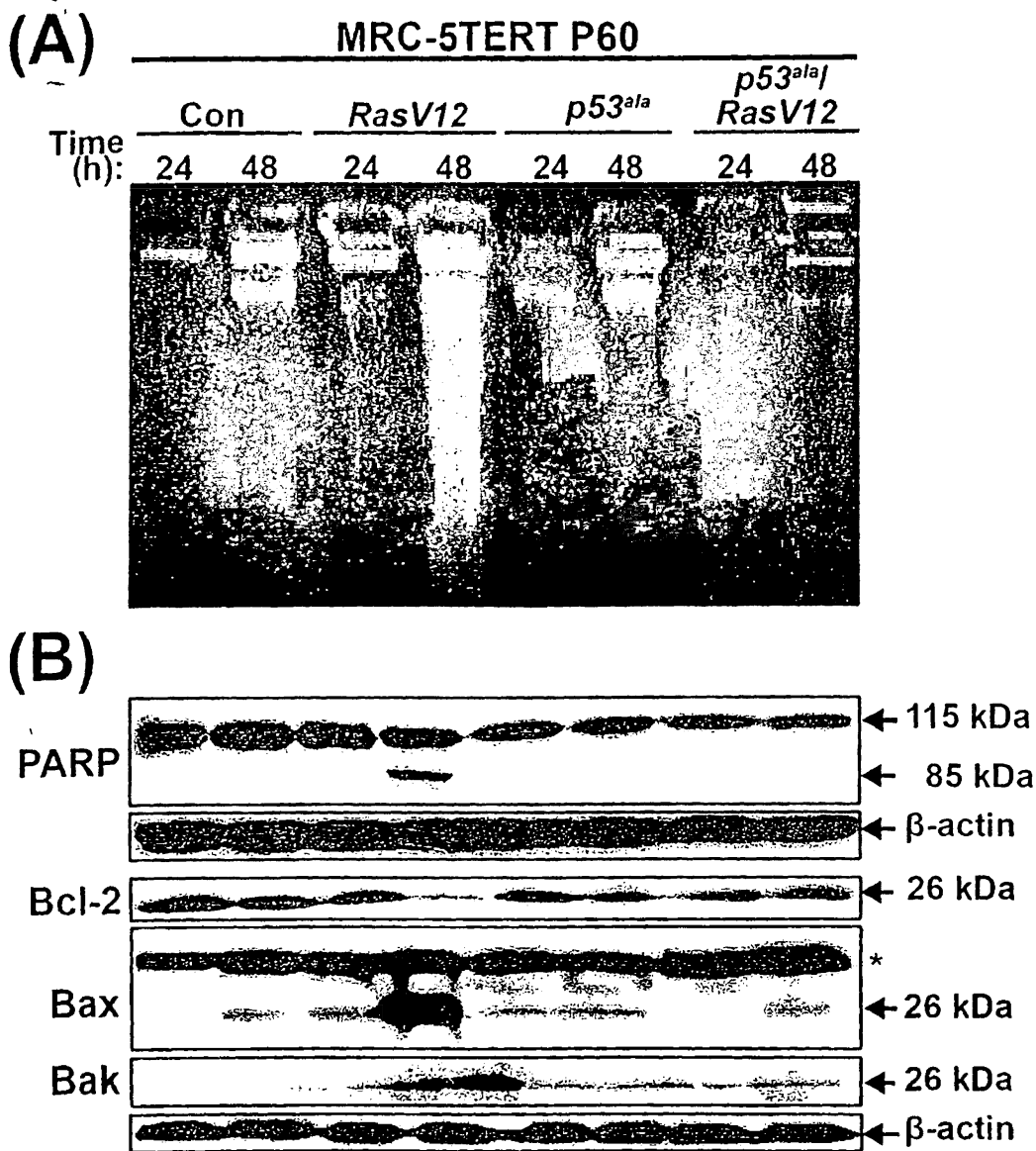


την απόπτωση, η 115 kDa PARP διασπάται σε δύο τμήματα ~85 kDa και 25 kDa, διαχωρίζοντας έτσι το αμινο-τελικό τμήμα του ενζύμου που προσδένει στο DNA από το καρβοξυ-τελικό τμήμα με αποτέλεσμα την απώλεια της δράσης του. Έτσι η διάσπαση της PARP θεωρείται ως ένας αξιόπιστος δείκτης της απόπτωσης των κυττάρων.

Η διάσπαση της PARP εξετάστηκε στις ινοβλάστες ελέγχου MRC-5TERT και στις ίδιες ινοβλάστες που υπερέκφραζαν *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* με ανοσοαποτύπωμα κατά western (Σχήμα 26B). Τα αποτελέσματα έδειξαν ενώ τα κύτταρα ελέγχου (Con) εκφράζαν μόνο τη μη-διασπασμένη μορφή του ενζύμου, μεγέθους 115 kDa, στις ινοβλάστες MRC-5TERT που υπερέκφραζαν *Ha-RasV12* ανιχνεύθηκαν και οι δύο μορφές του ενζύμου μετά την καλλιέργεια των κυττάρων για 48 ώρες απουσία ορού. Η μια αντιστοιχούσε στην 115 kDa μορφή, ενώ η δεύτερη μορφή του ενζύμου αντιστοιχούσε στην υδρολυμένη ~85 kDa μορφή της PARP, που είχε υποστεί πρωτεολυτική διάσπαση (Σχήμα 26B). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε πρωτεολυτική διάσπαση της PARP στις ινοβλάστες MRC-5TERT που υπερέκφραζαν *p53^{143ala}* ή *p53^{143ala}/RasV12*, στις οποίες ανιχνεύθηκε μόνο η φυσιολογική μορφή του ενζύμου μεγέθους 115 kDa (Σχήμα 26B).

Όπως είναι γνωστό, η απόπτωση κυττάρων διεξάγεται διαμέσου δύο πορειών, της εξωτερικής πορείας απόπτωσης στην οποία συμμετέχουν οι υποδοχείς θανάτου, και της εσωτερικής ή μιτοχονδριακής πορείας στην οποία εμπλέκονται τα μέλη της υπεροικογένειας της Bcl-2. Προκειμένου να διερευνηθεί αν το ογκογόνο *Ha-RasV12* επήγαγε την απόπτωση των ινοβλαστών MRC-5TERT διαμέσου της ενεργοποίησης της μιτοχονδριακής πορείας της απόπτωσης, μελετήθηκε με ανοσο-αποτύπωμα κατά western, η έκφραση της Bcl-2, Bax και Bak (Σχήμα 26B). Ενώ η Bcl-2 ανήκει στα αντι-αποπτωτικά μέλη, η Bax και Bak ανήκουν στα προ-αποπτωτικά μέλη της υπεροικογένειας της Bcl-2, και ο λόγος των προ-:αντι-αποπτωτικά μέλη καθορίζει την έκβαση της απόκρισης σ' έναν αποπτωτικό παράγοντα.





Σχήμα 26. Ανάλυση της απόπτωσης των ινοβλαστών MRC-5TERT. Ινοβλάστες MRC-5TERT P60 που υπερέκφραζαν *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* καλλιεργήθηκαν για 24 και 48 ώρες κάτω από συνθήκες απουσίας ορού. **(A)** Χαμηλού μοριακού βάρους DNA απομονώθηκε απ' όλες τις καλλιέργειες και αναλύθηκε σε πηκτική αгарόζης. **(B)** Ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική SDS-πολυακρυλαμιδίου και αναλύθηκαν με ανοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση της πολυ-ADP-ριβοσυλ μεταφοράσης (PARP), Bcl-2, Bax και Bak ή β-ακτίνης χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα.



Η ανάλυση κατά western έδειξε ότι το ογκογόνο *Ha-RasV12* μειορρύθμισε την έκφραση της Bcl-2 και επήγαγε την έκφραση των Bax και Bak στις ινοβλάστες MRC-5TERT P60 (Σχήμα 26B). Σε αντίθεση, η υπερέκφραση της $p53^{143ala}$ δεν μετέβαλλε την έκφραση των Bcl-2, Bax και Bak στις MRC-5TERT P60 (Σχήμα 26B). Η συν-έκφραση της $p53^{143ala}$ είχε σαν αποτέλεσμα τη διατήρηση των επιπέδων της Bcl-2 και την καταστολή της επαγωγής των Bax και Bak από το *Ha-RasV12* (Σχήμα 26B). Επειδή το *Ha-RasV12* κάτω από συνθήκες απουσίας ορού επήγαγε την έκφραση της ενδογενούς αγρίου-τύπου p53 (Σχήμα 23), η οποία δρα σαν μεταγραφικός επαγωγέας της έκφρασης της Bax (Chiruk et al., 2004, Yamaguchi et al., 2004, Wei et al., 2005), η καταστολή της Bax από την $p53^{143ala}$ έδειξε ότι αυτή η κυρίαρχα αρνητική μορφή της p53 ήταν επαρκής να ανταγωνισθεί τη δράση της ενδογενούς, αγρίου-τύπου p53. Αυτό επιβεβαιώθηκε επίσης από το εύρημα ότι η $p53^{143ala}$ κατέστειλε την έκφραση της Bax ακόμη και παρουσία του ογκογόνου *Ha-RasV12* (Σχήμα 26B). Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν προηγούμενες μελέτες σε σχέση με την επιλεκτική μεταγραφική δράση της $p53^{143ala}$ σε προαγωγείς γονιδίων-στόχων της p53, που έδειξαν ότι ενώ δρα μεταξύ άλλων ως θετικός ρυθμιστής της $p21^{Cip1/Waf1}$, καταστέλλει την έκφραση γονιδίων-στόχων της που εμπλέκονται στην κυτταρική απόπτωση όπως η Bax (Friedlander et al., 1996, Aurelio et al., 2000).

Συνολικά, τα παραπάνω αποτελέσματα έδειξαν ότι το ογκογόνο *Ha-RasV12* επήγαγε την απόπτωση των ινοβλαστών MRC-5TERT διαμέσου της ενεργοποίησης της μιτοχονδριακής πορείας της απόπτωσης και η $p53^{143ala}$ ήταν επαρκής να καταστείλει την απόπτωση που προκλήθηκε από το ογκογόνο *Ha-RasV12* μεταβάλλοντας το λόγο των προ-αντι-αποπτωτικών μελών της υπεροικογένειας της Bcl-2 προς τα αντι-αποπτωτικά μέλη, καθιστώντας έτσι τα κύτταρα πιο ανθεκτικά στην αποπτωτική δράση του ογκογόνου *Ha-RasV12*.

Να σημειωθεί ότι οι ινοβλάστες MRC-5TERT P200 δεν υφίστανται απόπτωση από την υπερέκφραση του ογκογόνου *Ha-RasV12*, αλλά αντίθετα η παρατεταμένη ανακαλλιέργεια των ινοβλαστών MRC-5TERT οδηγεί σε μεταβολές στη μορφολογία τους (Σχήμα 22) χαρακτηριστικές ενός μετασχηματισμένου φαινοτύπου *in vitro*. Αυτό το εύρημα συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες όπου η υπερέκφραση της TERT στις φυσιολογικές ινοβλάστες WI-38, ανάλογες των MRC-5, οδηγεί σε έναν προ-καρκινικό φαινότυπο μετά τη συνεχή ανακαλλιέργεια τους (Milyavsky et al., 2003).

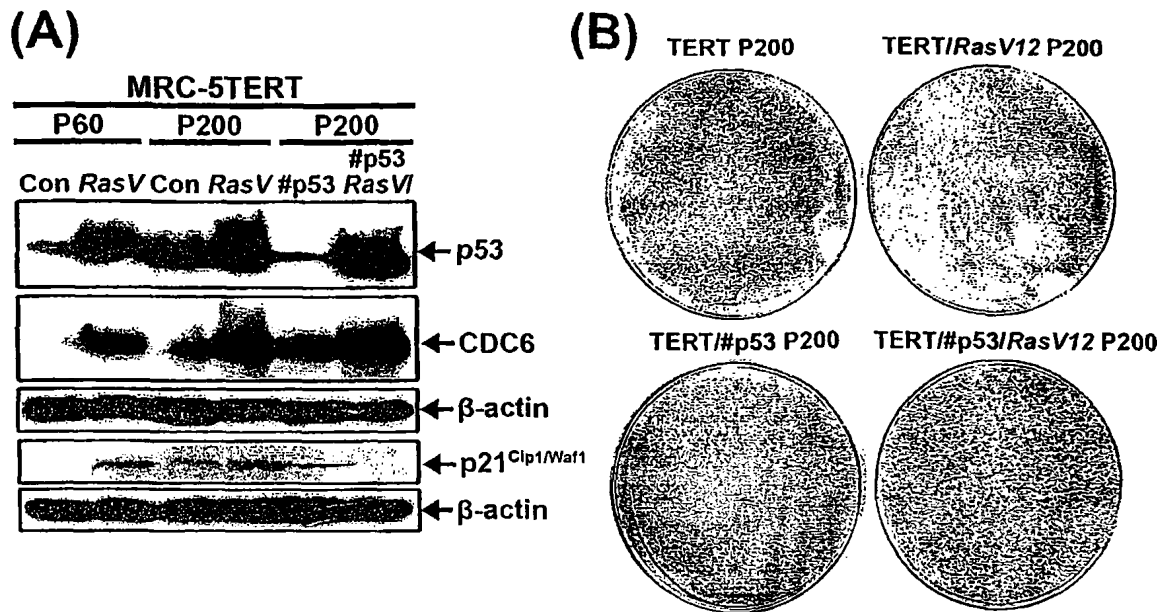


3.15. Χαρακτηρισμός ινοβλαστών MRC-5TERT στις οποίες μειορρυθμίστηκε η ενδογενής αγρίου-τύπου p53

Κατασκευάσθηκαν ινοβλάστες MRC-5TERT P200 και MRC-5TERT/*RasV12* P200 στις οποίες μειορρυθμίστηκε η έκφραση της ενδογενούς αγρίου-τύπου p53, με χρήση RNAi, για τρεις λόγους: (α) Οι ινοβλάστες MRC-5TERT αποκτούν ένα *in vitro* μετασχηματισμένο φαινότυπο μετά από συνεχή ανακαλιέργεια, (β) η ενεργοποίηση της πορείας της p53 αποτελεί ένα μηχανισμό με τον οποίο φυσιολογικά κύτταρα εισέρχονται σε κυτταρική γήρανση, και (3) η δυσλειτουργία της πορείας της p53 συμβάλλει στη μετατροπή φυσιολογικών ανθρωπίνων ινοβλαστών σε καρκινικά κύτταρα μετά τη διάδοχη υπερέκφραση της TERT, του μεγάλου T-αντιγόνου του DNA ιού του SV40 και του ογκογόνου *Ha-RasV12* (Hahn et al., 1999).

Ανάλυση των ινοβλαστών MRC-5TERT/#p53 P200 και MRC-5TERT/*RasV12*/#p53 P200 και σύγκριση μεταξύ τους ή με τις ινοβλάστες MRC-TERT P60, MRC-5TERT/*RasV12* P60, MRC-5TERT P200 και MRC-5TERT/*RasV12* P200 έδειξε ότι οι MRC-5TERT/#p53 P200 εκφράζαν ενδογενή wt p53 σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα από ότι οι ινοβλάστες MRC-5TERT P200 (con), οι οποίοι είχαν υψηλότερα επίπεδα wt p53 από τις ινοβλάστες MRC-5TERT P60 (con) (Σχήμα 27A). Επιπλέον, το ογκογόνο *Ha-RasV12* επήγαγε την έκφραση της wt p53 στις ινοβλάστες MRC-5TERT P60 και P200, ακόμη και στις ινοβλάστες MRC-5TERT/#p53 P200, μολονότι σε ελαφρώς χαμηλότερα επίπεδα από τις MRC-5TERT/*RasV12* P200 (Σχήμα 27A).





Σχήμα 27. Κατασκευή και χαρακτηρισμός των ινοβλαστών MRC-5TERT/#p53 P200.
(A) Ινοβλάστες MRC-5TERT P200 ή MRC-5TERT/RasV12 P200 επιμολύνθηκαν με ένα ρετροϊό που έφερε shRNAi για τη μείωσή της ανθρώπινης p53. Ινοβλάστες MRC-5TERT P60 ή P200 με ή χωρίς το ογκογόνο *Ha-RasV12*, καθώς επίσης και MRC-5TERT/#p53 P200 και MRC-5TERT/RasV12/#p53 P200 αναλύθηκαν με ανοσο-αποτύπωμα κατά western για την έκφραση της ενδογενούς αγρίου-τύπου p53, CDC6 και p21^{Cip1/Waf1} ή β-ακτίνης. **(B)** Αύξηση και ανάλυση του σχηματισμού εστιών των MRC-5TERT ή MRC-5TERT/RasV12 P200 και MRC-5TERT/#p53 ή MRC-5TERT/RasV12/#p53 P200 σε πλήρες ταπήτιο μετά από χρώση με κρυσταλλικό ιώδες προκειμένου να ανιχνευθεί ο σχηματισμός εστιών.

Προκειμένου να διερευνηθεί, εάν οι μεταβολές στην έκφραση της wt p53 ακολουθούνταν από μεταβολές στην έκφραση της CDC6 ή της p21^{Cip1/Waf1}, μελετήθηκε η έκφραση τους με ανοσο-αποτύπωμα κατά western (Σχήμα 22A). Το ογκογόνο *Ha-RasV12* επήγαγε την έκφραση της CDC6 στις ινοβλάστες MRC-5TERT P60 και P200, αλλά και στις ινοβλάστες MRC-5TERT/#p53. Επιπλέον, η μειορρύθμιση της wt p53 στις ινοβλάστες MRC-5TERT/#p53 P200 είχε ως αποτέλεσμα την έκφραση της CDC6 σε υψηλότερα επίπεδα από αυτά που ανιχνεύθηκαν στις ινοβλάστες MRC-5TERT P200 (con), επιβεβαιώνοντας τη δράση της p53 ως αρνητικό ρυθμιστή της CDC6 (Σχήμα 27A). Ανάλυση της έκφρασης της p21^{Cip1/Waf1} έδειξε ότι το ογκογόνο *Ha-RasV12* επήγαγε την έκφραση της πρωτεΐνης σε υψηλότερα επίπεδα από τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου (con) στις MRC-5TERT P60 και P200. Η μειορρύθμιση της wt p53 στις ινοβλάστες MRC-5TERT/#p53 P200 έδειξε ότι η p21^{Cip1/Waf1} εκφράζονταν στα ίδια, αν όχι υψηλότερα, επίπεδα με τις ινοβλάστες MRC-5TERT P200 (con). Όμως, η υπερέκφραση του *Ha-RasV12* στις MRC-5TERT/#p53 δεν οδήγησε στην επαγωγή της έκφρασης της p21^{Cip1/Waf1} (Σχήμα 27A), πιθανά διότι η p21^{Cip1/Waf1} επάγεται από p53-εξαρτώμενους και p53-ανεξάρτητους μηχανισμούς.

Προκειμένου να χαρακτηριστεί επιπλέον ο φαινότυπος των ινοβλαστών MRC-5TERT/#p53 P200 και MRC-5TERT/*RasV12*/#p53 P200, κύτταρα σε πλήρες ταπήτιο καλλιεργήθηκαν για 15 ημέρες και έγινε χρώση με κρυσταλλικό ιώδες. Η αύξηση τους συγκρίθηκε με αυτή των ινοβλαστών MRC-5TERT P200 και MRC-5TERT/*RasV12* P200 (Σχήμα 27B). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 27B, ενώ οι ινοβλάστες MRC-5TERT/#p53 P200 δεν σχημάτισαν πλήρες ταπήτιο όπως οι αντίστοιχοι ινοβλάστες MRC-5TERT P200, οι ινοβλάστες MRC-5TERT/*RasV12*/#p53 P200 αυξήθηκαν σε υψηλότερη πυκνότητα από τις αντίστοιχες ινοβλάστες MRC-5TERT/*RasV12* P200 και σχημάτισαν εστίες (Σχήμα 27B), χαρακτηριστικό ενός μετασχηματισμένου φαινοτύπου *in vitro*.

3.16. Ιδιότητες μετασχηματισμού των ινοβλαστών MRC-5TERT που υπερέκφραζαν *Ha-RasV12* ή/και p53^{143ala}

Η ανταγωνιστική δράση της p53^{143ala} στις επιδράσεις του ογκογόνου *Ha-RasV12* στις ινοβλάστες MRC-5TERT μας προέτρεψε να μελετήσουμε τις ιδιότητες μετασχηματισμού των κυττάρων που υπερέκφραζαν *Ha-RasV12* ή/και p53^{143ala} *in vitro* και *in vivo*.

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα II, τα κριτήρια του μετασχηματισμού κυττάρων *in vitro* είναι, πρώτον, ο σχηματισμός εστιών (focus formation) και δεύτερον, η αύξηση τους



ανεξάρτητη προσκόλλησης (anchorage-independent growth). Το κριτήριο του μετασχηματισμού κυττάρων *in vivo* είναι ο σχηματισμός όγκων σε ανοσο-κατασταλμένα ζωικά μοντέλα όπως αυτά των αθυμικών ή γυμνών ποντικών.

Με βάση αυτά τα κριτήρια μετασχηματισμού κυττάρων *in vitro* και *in vivo* μελετήθηκε η συμπεριφορά των ινοβλαστών MRC-5TERT P60 και P200 που υπερέκφραζαν *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}*, αλλά και των ινοβλαστών MRC-5TERT/#*p53* P200 και MRC-5TERT/*RasV12*/#*p53* P200 στα οποία είχε μειορρυθμιστεί η ενδογενής αγρίου-τύπου *p53*.

Όλοι οι διαφορετικοί τύποι ινοβλαστών MRC-5TERT P60 και P200 αυξήθηκαν προκειμένου να σχηματίσουν μονοστιβάδες σε πλήρες ταπήτιο και η αύξηση τους παρατηρήθηκε για περίπου ακόμη 2-3 εβδομάδες, χρονικό διάστημα που απαιτείται για το σχηματισμό εστιών (Σχήματα 22 και 27). Κανένα από τα ογκογονίδια, είτε το *Ha-RasV12* ή *p53^{143ala}* ή και τα δύο μαζί δρώντας συνεργειακά δεν επέφερε το σχηματισμό εστιών (Σχήμα 22). Σε αντίθεση, οι ινοβλάστες MRC-5TERT/*RasV12*/#*p53* P200 σχημάτισαν ένα σημαντικό αριθμό εστιών (foci) (Σχήμα 27B και Πίνακας 7).

Προκειμένου να διερευνηθεί αν ικανοποιήθηκε το δεύτερο κριτήριο του μετασχηματισμού των κυττάρων *in vitro*, δηλαδή η αύξηση τους ανεξάρτητης προσκόλλησης (anchorage-independent ή soft agar growth), οι διαφορετικοί τύποι ινοβλαστών MRC-5TERT P60 και P200 εναιωρήθηκαν σε ημι-στερεό υλικό όπως αυτό της μαλακής καθαρής άγαρ και επώαστηκαν για 3-4 εβδομάδες για το σχηματισμό αποικιών. Ινοβλάστες MRC-5TERT P60 ή P200 που υπερέκφραζαν *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* δεν σχημάτισαν αποικίες σε ημι-στερεό υλικό (Σχήμα 28). Επομένως, μολονότι οι ινοβλάστες MRC-5TERT P200 που υπερεκφράζανε τα ογκογονίδια *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* εμφάνισαν μορφολογικές μεταβολές δεν απέκτησαν την ικανότητα σχηματισμού εστιών ή αποικιών σε ημι-στερεό υλικό (Σχήμα 28 και Πίνακας 7), που έδειξε ότι η τα ογκογονίδια *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* δρώντας μόνα τους ή συνεργειακά, σε συνάρτηση με τη δράση της τελομεράσης δεν ήταν ικανά να μετασχηματίσουν φυσιολογικές ανθρώπινες ινοβλάστες *in vitro*.

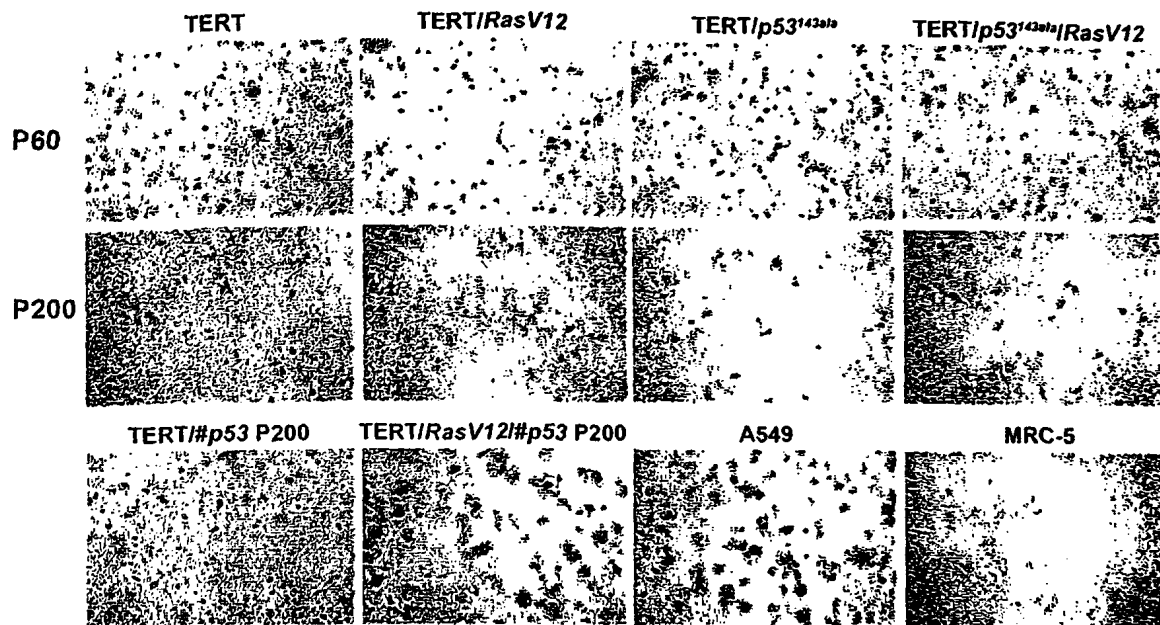
Ενώ οι ινοβλάστες, MRC-5TERT/#*p53* δεν επέδειξαν αύξηση ανεξάρτητη προσκόλλησης, οι ινοβλάστες MRC-5TERT/*RasV12*/#*p53* είχαν την ικανότητα σχηματισμού αποικιών σε ημι-στερεό υλικό με μια συχνότητα ίδια με αυτή που παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες των ανθρωπίνων επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549 (Σχήμα 28). Ο σχηματισμός εστιών και αποικιών σε ημι-στερεό υλικό των κυττάρων MRC-5TERT/*RasV12*/#*p53* έδειξε ότι η δράση της TERT και *Ha-RasV12* και η μειορρύθμιση της



έκφρασης της wt p53 ήταν επαρκή στοιχεία για το μετασχηματισμό φυσιολογικών ανθρωπίνων ινοβλαστών MRC-5 *in vitro*.

Προκειμένου να διερευνηθεί αν ο μετασχηματισμός των ινοβλαστών *in vitro* συσχετιζόταν με το μετασχηματισμό τους *in vivo*, οι διαφορετικοί τύποι ινοβλαστών ενέθηκαν στα πλευρά αθυμικών (γυμνών) ποντικών. Η δημιουργία όγκων ακολουθήθηκε για περίπου 6 μήνες (Πίνακας 7). Καμιά κυτταρική σειρά δεν ήταν ικανή δημιουργίας όγκων σε αθυμικά ποντίκια. Ακόμη και η χρήση RNAi προκειμένου να μειορρυθμιστούν τα επίπεδα της ενδογενούς αγρίου-τύπου ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53, δεν ήταν ικανή για τη δημιουργία όγκων σε αθυμικά ποντίκια, συνεργειακά με το ογκογόνο *Ha-RasV12* και την TERT, παρόλο που οι ινοβλάστες MRC-5/*RasV12/#p53* P200 επέδειξαν ένα μετασχηματισμένο φαινότυπο *in vitro* (Πίνακας 7).





Σχήμα 28. Ανάλυση του σχηματισμού αποικιών σε ημι-στερεό υλικό ή αύξηση ανεξάρτητης προσκόλλησης των ινοβλαστών MRC-5TERT P60 και P200 που υπερέκφραζαν *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* και των MRC-5TERT/#*p53* MRC-5TERT/*RasV12*/#*p53*. 3×10^6 διαφορετικές καλλιέργειες ινοβλαστών MRC-5TERT εναιωρήθηκαν σε 0.4% καθαρό άγαρ (Noble agar) σε πλήρες θρεπτικό υλικό προκειμένου να ανιχνευθεί ο σχηματισμός αποικιών ανεξάρτητου προσκόλλησης.

Πίνακας 7: Επιδράσεις των ογκογονιδίων *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}* στις ιδιότητες μετασχηματισμού των φυσιολογικών και τελομερισμένων ινοβλαστών MRC-5

Κύτταρα	Αθανатоποίηση	Σχηματισμός εστιών <i>in vitro</i>	Σχηματισμός αποικιών <i>in vitro</i>	Δημιουργία όγκων σε αθυμικά ποντίκια
P60				
MRC-5 <i>TERT</i>	-	OXI	OXI	0/3
<i>TERT/RasV12</i>	-	OXI	OXI	0/3
<i>TERT/p53^{143ala}</i>	-	OXI	OXI	0/3
<i>TERT/p53^{143ala}/RasV12</i>	-	OXI	OXI	0/3
P200				
MRC-5 <i>TERT</i>	+	OXI	OXI	0/3
<i>TERT/RasV12</i>	+	OXI	OXI	0/3
<i>TERT/p53^{143ala}</i>	+	OXI	OXI	0/3
<i>TERT/p53^{143ala}/RasV12</i>	+	OXI	OXI	0/3
<i>TERT/#p53</i>	+	OXI		0/3
<i>TERT/ RasV12/#p53 KO/</i>	+	NAI	+	0/3
A549		N/A	+	N/A

-, Συμβολίζει ότι δεν είναι εφαρμόσιμο; +, Συμβολίζει ένα θετικό αποτέλεσμα; N/A, δεν αναλύθηκε
(Knock-down), συμβολίζει τη χρήση RNAi προκειμένου να μειορρυθμιστεί ή έκφραση της ενδογενούς αγρίου-τύπου p53

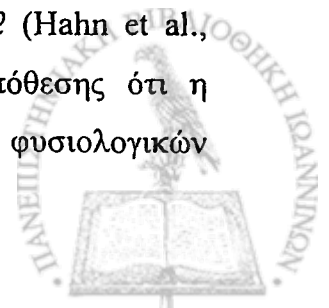
Τα παραπάνω αποτελέσματα έδειξαν ότι η δράση των *TERT*, *p53^{143ala}* και *Ha-RasV12* δεν ήταν επαρκής να μετασχηματίσει φυσιολογικές ινοβλάστες *in vitro* και *in vivo*, αλλά αντίθετα, για τον *in vitro* μετασχηματισμό των MRC-5 απαιτήθηκε η μειορρύθμιση της ενδογενούς wt p53, η επιμήκυνση του χρόνου ζωής των με τη δράση της τελομεράσης και η ογκογόνος δράση του *Ha-RasV12*.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν γενετικές μεταλλάξεις που υπερβαίνουν ή εξαλείφουν τους μηχανισμούς που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη γήρανση. Σε αντίθεση με τα κύτταρα τρωκτικών, τα ανθρώπινα κύτταρα είναι ανθεκτικά στον ογκογόνο μετασχηματισμό, δείχνοντας ότι υπάρχουν θεμελιώδεις διαφορές μεταξύ τους. Αυτές εντοπίζονται στη βιολογία των τελομερών: σε αντίθεση με τα κύτταρα τρωκτικών, τα ανθρώπινα κύτταρα δεν έχουν ενεργό τελομεράση και χάνουν DNA τελομερών μετά από κάθε κυτταρικό κύκλο με αποτέλεσμα να γηράσκουν, καθώς επίσης και στις πορείες των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών p53 και Rb, που ρυθμίζονται θετικά από τις ARF και p16^{INK4a} του γενετικού τόπου CDKN2A. Επαγωγή της p53 ή υποφωσφορυλίωση της Rb οδηγεί σε παύση του κυτταρικού κύκλου. Ενδείξεις για την εμπλοκή αυτών των πορειών στη ρύθμιση της γήρανσης και του μετασχηματισμού προέρχονται από μελέτες όπου η υπερέκφραση του SV40 LT σε συνδυασμό με την *hTERT* και το ογκογονίδιο *Ha-RasV12* οδήγησε στη μετατροπή φυσιολογικών ανθρωπίνων κυττάρων σε καρκινικά. Ενώ η *hTERT* διατηρεί το μήκος των τελομερών κατά την ανακαλλιέργεια των κυττάρων, το SV40 LT δεσμεύει και εξουδετερώνει τη δράση των p53 και Rb. Το ογκογονίδιο *Ha-RasV12*, ενώ επιφέρει ιδιότητες μετασχηματισμού όταν δρα συνεργειακά με την *hTERT* ή/και το SV40 LT, επάγει την πρόωρη γήρανση ή την απόπτωση όταν υπερεκφραστεί σε μερικά στελέχη φυσιολογικών ινοβλαστών που εκφράζουν υψηλά ενδογενή επίπεδα της p16^{INK4a}, όπως οι φυσιολογικές εμβρυϊκές ινοβλάστες WI-38 και IMR-90 (Serrano et al., 1997; Beausajour et al., 2002).

Με σκοπό το διαχωρισμό των δράσεων του SV40 LT και τον καθορισμό του εάν όντως απαιτούνται και οι τρεις πορείες ρύθμισης της γήρανσης και του νεοπλασματικού μετασχηματισμού – διατήρηση των τελομερών και απενεργοποίηση των p53 και Rb – εισαγάγαμε με ρετροϊούς σε φυσιολογικές εμβρυϊκές ανθρώπινες ινοβλάστες MRC-5, μία μεταλλαγμένη μορφή της p53 (*p53^{143ala}*), η οποία βρέθηκε ότι επιμηκύνει το χρόνο ζωής μερικών στελεχών ανθρωπίνων ινοβλαστών (Wyllie et al., 1993, Bond et al., 1994, Bond et al., 1995), την ανθρώπινη καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης (*hTERT*), η οποία επιμηκύνει το αναπαραγωγικό δυναμικό φυσιολογικών ανθρωπίνων ινοβλαστών (Counter et al., 1998; Hahn et al., 1999) και το μεταλλαγμένο ογκογονίδιο *Ha-RasV12* (Hahn et al., 1999). Στόχοι της παρούσας διατριβής αποτελούν η διερεύνηση της υπόθεσης ότι η απενεργοποίηση της πορείας της p53 είναι επαρκής για τη μετατροπή φυσιολογικών



ανθρωπίνων ινοβλαστών σε μετασηματισμένα ή καρκινικά κύτταρα καθώς και η ευρύτερη μελέτη για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της κυτταρικής γήρανσης και του νεοπλασματικού μετασηματισμού.

Τα φυσιολογικά κύτταρα έχουν πεπερασμένο διάστημα αναπαραγωγής στο τέλος του οποίου οδηγούνται σε μία κατάσταση μόνιμης παύσης του κυτταρικού κύκλου που αποκαλείται κυτταρική γήρανση (*replicative senescence*) και ενεργοποιείται από την παρουσία δυσλειτουργικών τελομερών (Goldstein, 1990, Campisi, 2001, Serrano and Blasco, 2001, Masutomi et al., 2005, Wright and Shay, 2001). Τα ανθρώπινα σωματικά κύτταρα δεν εκφράζουν ενεργό τελομεράση με αποτέλεσμα οι επαναλαμβανόμενες κυτταρικές διαιρέσεις να οδηγούν στη βράχυνση των τελομερών. Η μείωση του μήκους των τελομερών (~14-16 kb) κάτω από ένα όριο – το οποίο δεν είναι με ακρίβεια γνωστό, αλλά κυμαίνεται ~4-6 kb – οδηγεί στην κινητοποίηση μιας πορείας απόκρισης σε βλάβες του DNA (DDR) η οποία συνήθως προκαλείται από αμφίκλωνες θραύσεις του DNA (DSBs) (d'Adda di Fagagna et al., 2003, d'Adda di Fagagna et al., 2004). Η επαγωγή DSBs ανιχνεύεται από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου μέσω των σημείων/μηχανισμών ελέγχου βλαβών του DNA (*DNA damage checkpoint mechanisms*) που είναι υπεύθυνοι για την παύση του κυτταρικού κύκλου και για τη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων της DDR (Artandi and Attardi, 2005; Ljungman, 2005; Longhese et al., 2006; Herbig and Sedivy, 2006).

Η έναρξη των πορειών μεταγωγής σήματος με στόχο την αναστολή του κυτταρικού κύκλου επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση των κινάσων ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) και ATR (*AMT and Rad3-related*) και τη φωσφορυλίωση της ιστόνης H2A (γ -H2A.X). Οι ενεργές κινάσες ATM και ATR φωσφορυλιώνουν τις κινάσες Chk1 και Chk2 και τις ενεργοποιούν. Η φωσφορυλιωμένη ενεργός μορφή της Chk2 φωσφορυλιώνει την p53 στη σερίνη 20 (P-p53 Ser20) και τη σταθεροποιεί με αποτέλεσμα να δρα ως παράγοντας μεταγραφής επάγοντας ή καταστέλλοντας γονίδια-στόχους. Η φωσφορυλίωση της p53 μπορεί να διεξαχθεί επίσης άμεσα από την ενεργό κινάση ATM. Αποτέλεσμα των δράσεων της p53 είναι η ενεργοποίηση πορειών που οδηγούν σε διακοπή της κυτταρικής αύξησης στη φάση G1 ή κυτταρική γήρανση, στην απόπτωση ή στην επιδιόρθωση του DNA (Bakkenist and Kastan, 2003; Kastan and Bartek, 2004; Artandi and Attardi, 2005; Ljungman, 2005).

Εκτός από τη φυσιολογική κυτταρική γήρανση (*replicative senescence*) το κύτταρο μπορεί να εισέλθει σε κατάσταση μόνιμης κυτταρικής παύσης όχι λόγω της βράχυνσης των τελομερών αλλά εξαιτίας της υπερέκφραση ογκογονιδίων (Serrano, 1997; Campisi, 2005; Collado et al., 2005). Η επαγομένη από ογκογονίδια γήρανση (*oncogene-induced senescence*,

OIS) παρατηρήθηκε αρχικά σε καλλιεργούμενα κύτταρα πλέον όμως γνωρίζουμε πως συμβαίνει *in vivo* και αποτελεί προστατευτικό μηχανισμό ενάντια στην καρκινογένεση (Collado et al., 2005, Sharpless and DePihno, 2005, Braig et al., 2005, Chen et al., 2005, Michaloglou et al., 2005, Campisi, 2005).

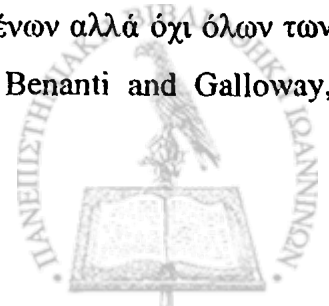
Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το κυτταρικό στέλεχος MRC-5 που έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως μοντέλο κυτταρικής γήρανσης, πρώτον για να μελετηθεί η δράση της καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης τελομεράσης hTERT, στο αναπαραγωγικό τους δυναμικό στην καλλιέργεια, δεύτερον για να μελετηθεί εκτενέστερα η επίδραση του *RasV12* ή/και *p53^{143ala}* στον συγκεκριμένο στέλεχος ινοβλαστών και τρίτον, να εξετασθεί εάν η διατήρηση των τελομερών και η απενεργοποίηση της ενδογενούς αγρίου-τύπου p53 από μία αρνητικά κυρίαρχη μεταλλαγμένη μορφή της ήταν επαρκής για το μετασχηματισμό των κυττάρων *in vitro* ή/και *in vivo*. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν φυσιολογικές ινοβλάστες MRC-5 καθώς επίσης και τελομερισμένες ινοβλάστες (MRC-5TERT) μετά την έκτοπη έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης τελομεράσης (hTERT), που υπερέκφραζαν *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}*, όπως ανιχνεύθηκε με ανοσο-αποτύμωμα κατά western (Σχήμα 13).

Ένας από τους στόχους της παρούσας διατριβής ήταν η επιμήκυνση του χρόνου ζωής ή αθανатоποίηση των ινοβλαστών MRC-5. Η συνεχής ανακαλλιέργεια των ινοβλαστών MRC-5TERT οδήγησε στην επιμήκυνση του χρόνου ζωής τους, σε σχέση με τις φυσιολογικές ινοβλάστες MRC-5 (Πίνακας 4) των οποίων το αναπαραγωγικό δυναμικό ήταν ~60 κυτταρικές διαιρέσεις. Οι ινοβλάστες MRC-5TERT έχουν καλλιεργηθεί για παραπάνω από 250 κυτταρικές διαιρέσεις, και μολονότι δεν έχουν εισέλθει σε περίοδο 'κρίσης', μπορούν να θεωρηθούν αθανатоποιημένοι (Πίνακας 6). Η αθανатоποίηση των ινοβλαστών MRC-5 από τη δράση της hTERT πιθανά οφείλονταν στη διατήρηση του μήκους των τελομερών μετά τη συνεχή ανακαλλιέργεια των κυττάρων. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες οι οποίες έδειξαν ότι η έκτοπη υπερέκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) οδήγησε στη παραγωγή κλώνων MRC-5 με απεριόριστο δυναμικό αναπαραγωγής (MacKenzie et al., 2000, Franco et al., 2001, McSharry et al., 2001). Επιπλέον, η συνεχής ανακαλλιέργεια των ινοβλαστών MRC-5TERT οδήγησε σε μορφολογικές μεταβολές χαρακτηριστικές ενός μετασχηματισμένου φαινοτύπου (Σχήμα 22), ευρήματα που συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες (Milyavsky et al., 2003). Είναι προφανές ότι ο πρώτος στόχος της παρούσας διατριβής που ήταν η αθανатоποίηση των φυσιολογικών



ινοβλαστών MRC-5 από την *hTERT*, επιτεύχθηκε και κατασκευάστηκαν ινοβλάστες MRC-5TERT με απεριόριστο δυναμικό αύξησης.

Προκειμένου να διερευνηθούν οι επιδράσεις του ογκογόνου *Ha-RasV12* στην κυτταρική αύξηση φυσιολογικών ανθρωπίνων ινοβλαστών, αναλύθηκε και συγκρίθηκε ο φαινότυπος των ινοβλαστών MRC-5*Ras* με αυτόν των IMR90*Ras* (Σχήμα 13), καθώς το δεύτερο κυτταρικό στέλεχος αποτελεί ένα καλά χαρακτηρισμένο μοντέλο κυτταρικής γήρανσης επαγόμενης από το *Ha-RasV12* (Serrano et al., 1997). Η έκτοπη υπερέκφραση του *Ha-RasV12* στις IMR-90 μείωσε το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους και οδήγησε στην πρόωρη γήρανση τους, ενώ οι ινοβλάστες MRC-5 που υπερέκφραζαν το ογκογονίδιο *Ha-RasV12* δεν εμφάνισαν πρόωρη γήρανση (Σχήμα 13). Μολονότι η έκτοπη υπερέκφραση του *Ha-RasV12* στις ινοβλάστες MRC-5 δεν προκάλεσε την πρόωρη γήρανση τους, μείωσε το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους κατά ~1.5 περίπου φορές. Οι Serrano et al. (1997) χρησιμοποίησαν τις πρωτογενείς ανθρώπινες εμβρυϊκές ινοβλάστες IMR90 και WI38 για να εξετάσουν τις επιδράσεις του ογκογόνου *Ha-RasV12* και έδειξαν πως το ογκογόνο *Ha-RasV12* οδήγησε τα κύτταρα σε μόνιμη παύση της κυτταρικής φάσης G1 (Serrano, 1997). Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η επαγόμενη από το *RasV12* κυτταρική γήρανση οφείλονταν στην επαγωγή της p53 και της πρωτεΐνης-στόχου της, p21^{Cip1/Waf1} καθώς και στην επαγωγή της p16^{INK4A}, μιας πρωτεΐνης αναστολέα του συμπλόκου κυκλίνης D-CDK4/6, απουσία απώλειας τελομερών. Παρατηρήθηκε επίσης μία αύξηση των επιπέδων έκφρασης της κυκλίνης D1, δείχνοντας ότι το *RasV12* αρχικά έχει μιτογόνο δράση (Serrano, 1997, Lin et al., 1998, Sherr and DePihno, 2000). Συνολικά αυτά τα ευρήματα έδειξαν ότι η πρόκληση της πρόωρης κυτταρικής γήρανσης των φυσιολογικών ανθρωπίνων ινοβλαστών από το ογκογόνο *Ha-RasV12* πιθανά οφείλονταν σε υπερβολικά μιτογόνα μηνύματα. Σε αντίθεση με τις παραπάνω μελέτες το *RasV12* δεν επήγαγε την πρόωρη κυτταρική γήρανση πρωτογενών καλλιιεργειών ανθρωπίνων ινοβλαστών που απομονώθηκαν από επιφανειακές στοιβάδες δέρματος οι οποίες εκφράζαν πολύ χαμηλά επίπεδα της p16^{INK4A} (Benanti and Galloway, 2004). Η αιτιολογία των διαφορών αυτών, παρότι έχουν αποδοθεί σε μια σειρά από παράγοντες (επίπεδα έκφρασης της p16^{INK4A}, κυτταρική προέλευση, στρες επαγόμενο από τις συνθήκες κυταροκαλλιέργειας) δεν έχει διευκρινιστεί επαρκώς (Benanti and Galloway, 2004, Galloway, 2004). Τα αποτελέσματα μας επιβεβαίωσαν, σε συμφωνία με τις προαναφερθείσες μελέτες, ότι το ογκογόνο *Ha-RasV12* επάγει την πρόωρη κυτταρική γήρανση ορισμένων αλλά όχι όλων των στελεχών φυσιολογικών ανθρωπίνων ινοβλαστών (Serrano, 1997, Benanti and Galloway, 2004).



Σε αντίθεση το ογκογόνο *Ha-RasV12* δεν επιβράδυνε σημαντικά το ρυθμό πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών MRC-5TERT, αλλά μείωσε την κυτταρική πυκνότητα και την ικανότητα σποράς τους (Πίνακας 6). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ένας παράγοντας που συμβάλλει στην αθανατοποίηση των τελομερισμένων ινοβλαστών είναι η απώλεια της $p16^{INK4A}$ (Taylor et al., 2004). Η έκτοπη έκφραση ενός ογκογόνου N-Ras σε $p16$ -θετικές, αλλά όχι σε $p16$ -αρνητικές, ινοβλάστες MRC-TERT είχε σαν αποτέλεσμα ένα φαινότυπο όμοιο μ' αυτόν της κυτταρικής γήρανσης (Taylor et al., 2004). Η παρούσα διατριβή δεν επιβεβαιώνει αυτά τα αποτελέσματα καθώς οι ινοβλάστες MRC-5TERT που χρησιμοποιήθηκαν εκφράζαν $p16^{INK4A}$, τα επίπεδα της οποίας δεν μεταβλήθηκαν από το ογκογόνο *Ha-RasV12* (Σχήμα 23). Επιπλέον, η υπερέκφραση της $p53^{143ala}$ ή συν-έκφραση της μαζί με το ογκογόνο *Ha-RasV12* είχε σαν αποτέλεσμα την επιπλέον επιβράδυνση του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των MRC-5 κατά ~1.9 και ~1.7 περίπου φορές (Πίνακας 4), αντίστοιχα, καθώς επίσης και τις άλλες παραμέτρους αύξησης όπως η κυτταρική πυκνότητα και η ικανότητα σποράς τους (Πίνακας 4). Η συνεργειακή δράση των *Ha-RasV12* και $p53^{143ala}$ μείωσε το αναπαραγωγικό δυναμικό των φυσιολογικών ινοβλαστών MRC-5 κατά περίπου 25% (Πίνακας 4) οι οποίοι ανέπτυξαν μάρτυρες της κυτταρικής γήρανσης όπως η Sen-β-Gal (Σχήμα 14). Αντίθετα, η $p53^{143ala}$ δρώντας μόνη της ή συνεργειακά με το *Ha-RasV12* δεν μετάβαλε το ρυθμό πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών MRC-5TERT, αλλά αύξησε την κυτταρική πυκνότητα και την ικανότητα σποράς τους (Πίνακας 6). Τα παραπάνω ευρήματα έδειξαν ότι τα ογκογονίδια *Ha-RasV12* και $p53^{143ala}$ δρώντας μόνα τους ή συνεργειακά είχαν αρνητικές επιδράσεις στην αύξηση των φυσιολογικών ινοβλαστών MRC-5. Αντίθετα, στις ινοβλάστες MRC-5TERT, ενώ το *Ha-RasV12* είχε αρνητικές επιδράσεις στην αύξηση των κυττάρων, η $p53^{143ala}$ δρώντας μόνη της ή παρουσία του *RasV12* διέγειρε την αύξηση τους, δείχνοντας ότι ανταγωνίστηκε τις αρνητικές επιδράσεις του ογκογόνου *RasV12*, τουλάχιστον στις τελομερισμένες ινοβλάστες. Μελέτες έδειξαν ότι η καλλιέργεια ινοβλαστών τρωκτικών MEF που έφεραν ογκογόνο *RasV12* κάτω από συνθήκες παρουσίας ορού επήγαγε την πρόωρη γήρανση τους λόγω χρωμοσωμικών μεταβολών, ενώ κάτω από συνθήκες απουσίας ορού οι ινοβλάστες MEF*RasV12* ήταν χρωμοσωμικά σταθεροί και επέδειξαν ένα απεριόριστο δυναμικό αύξησης (Woo and Roop, 2004). Προκειμένου να διερευνηθεί αν οι ινοβλάστες MRC-5*RasV12* ή/και $p53^{143ala}$ αποκρίνονταν κατά τον ίδιο τρόπο, καλλιεργήθηκαν κάτω από συνθήκες απουσίας ορού. Καμία από τις καλλιέργειες των ανθρωπίνων ινοβλαστών δεν ήταν ικανή αύξησης απουσίας ορού.



Ανάλυση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου κάτω από συνθήκες ορού έδειξε ότι το *Ha-Ras* διέγειρε την έκφραση της κυκλίνης D1 και των p53 και p21^{Cip1/Waf1}, χωρίς να μεταβάλλει την έκφραση των p27^{Kip1} και p16^{INK4A}, κάτω από συνθήκες παρουσίας ή απουσίας ορού και στους δύο κυτταρικούς τύπους ινοβλαστών, MRC-5 και MRC-5TERT (Σχήματα 16 και 23). Η διέγερση της κυκλίνης D1 από το ογκογόνο *Ha-RasV12* συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες σε σχέση με την αρχική μιτογόνο δράση του ογκογονιδίου (Settano et al., 1997). Η επαγωγή των επιπέδων έκφρασης της p53 και της p21^{Cip1/Waf1} από το ογκογόνο *Ha-RasV12* αλλά και από την p53^{143ala}, μολονότι συμβάλλει στην επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης, μελέτες έδειξαν ότι αυτά τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης δεν επαρκούν για να εξηγήσουν την επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης ή της διακοπής της προόδου του κυτταρικού κύκλου (Ferbeyere et al., 2002). Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής. Ενώ η επαγωγή των p53 και του γονιδίου-στόχου της p21^{Cip1/Waf1} από το ογκογόνο *Ha-RasV12* θα μπορούσε να εξηγήσει την επιβράδυνση του ρυθμού πολλαπλασιασμού και τις αρνητικές επιδράσεις του *Ha-RasV12* στην αύξηση των φυσιολογικών ινοβλαστών MRC-5, δεν μπορεί να εξηγήσει επαρκώς τις ελάχιστες αρνητικές επιδράσεις του *Ha-RasV12* στα MRC-5TERT ή τη συνεργειακή και διαφορική δράση των *Ha-RasV12* και p53^{143ala} και στους δύο κυτταρικούς τύπους.

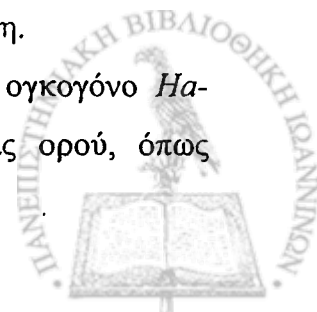
Προκειμένου να μελετηθούν εκτενέστερα οι επιδράσεις των ογκογονιδίων δρώντας μόνα τους ή συνεργειακά στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, αλλά και στη φαινομενικά αρχική μιτογόνο δράση του *Ha-RasV12*, όπως προκύπτει από την επαγωγή της έκφρασης της κυκλίνης D1, αναλύθηκε η έκφραση της CDC6, μιας πρωτεΐνης που εμπλέκεται στην έναρξη της αντιγραφής του DNA και στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Takeda et al., 2005, Duursma and Agami, 2005, Mainland and Diffley, 2005, Lau et al., 2006), με ανοσο-αποτύπωμα κατά western στις φυσιολογικές MRC-5 και στις τελομερισμένες ινοβλάστες MRC-5TERT που υπερέκφραζαν το ογκογόνο *Ha-RasV12* ή/και p53^{143ala}. Η ανάλυση έδειξε ότι ενώ το *Ha-RasV12* επήγαγε την έκφραση της CDC6 κάτω από συνθήκες παρουσίας και απουσίας ορού, η συν-έκφραση της p53^{143ala} κατέστειλε δραματικά την *RasV12*-επαγόμενη έκφραση της CDC6 (παράγοντας άδειοδότησης της έναρξης της αντιγραφής του DNA ή licensing factor) και στους δύο κυτταρικούς τύπους (Σχήματα 16 και 23), σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, που έδειξαν ότι η p53 είναι αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης της CDC6 (Duursma and Agami, 2005). Αφού το *Ha-RasV12* επήγαγε υπερβολικά μιτογόνα μηνύματα, όπως προκύπτει από την επαγωγή της έκφρασης της κυκλίνης D1 και της CDC6,

γιατί είχε αρνητικές επιδράσεις στην αύξηση των ινοβλαστών; Προκειμένου να διερευνηθεί αν η υπερέκφραση της CDC6 μπορεί να μιμηθεί τις αρνητικές επιδράσεις του *Ha-RasV12* στην αύξηση των ινοβλαστών, κατασκευάστηκαν ινοβλάστες MRC-5 και MRC-5TERT που υπερεκφράζανε τη CDC6 (Σχήματα 17 και 24). Η έκτοπη υπερέκφραση της CDC6 στις MRC-5 οδήγησε στη μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους (Σχήμα 17), ενώ τις MRC-5TERT στην επαγωγή της απόπτωσης τους (Σχήμα 24). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι η υπερέκφραση της CDC6 σε ανθρώπινα κύτταρα παρεμποδίζει τη μίτωση μέσω της ενεργοποίησης ενός μηχανισμού ελέγχου βλαβών στο DNA που εμπλέκεται η κινάση Chk1 (Clay-Farrace et al., 2003), και είναι αντίθετα με την ογκογόνο δράση της CDC6 σε κύτταρα τρωκτικών (Gonzalez et al., 2006).

Τα παραπάνω αποτελέσματα οδήγησαν σε δύο ερωτήματα: πρώτον, γιατί η μεταλλαγμένη μορφή της p53, $p53^{143ala}$, επήγαγε την έκφραση της $p21^{Cip1/Waf1}$ και στους δύο κυτταρικούς τύπους, αφού υποτίθεται ότι δρα ως κυρίαρχα-αρνητική, και επιβράδυνε την αύξηση των φυσιολογικών ινοβλαστών MRC-5 δρώντας μόνη της ή συνεργειακά με το ογκογόνο *Ha-RasV12* επάγωντας την κυτταρική γήρανση; Δεύτερον, γιατί η δράση της $p53^{143ala}$ ήταν διαφορετική στις ινοβλάστες MRC-5TERT από ότι στις MRC-5; και τρίτον, μήπως η επαγωγή της CDC6 από το ογκογόνο *Ha-RasV12* συσχετιζονταν με την επαγωγή βλαβών στο DNA από το ένα ή το άλλο ογκογονίδιο ή και τα δύο μαζί;

Προκειμένου να εξετασθούν αυτά τα ερωτήματα, αναλύθηκαν οι επιδράσεις των ογκογονιδίων *Ha-RasV12* και $p53^{143ala}$ δρώντας μόνα τους ή συνεργειακά στην επαγωγή βλαβών στο DNA αναλύοντας την έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη DDR και στους δύο κυτταρικούς τύπους (Σχήματα 18 και 22). Η ανάλυση έδειξε ότι η υπερέκφραση της $p53^{143ala}$ στις φυσιολογικές ινοβλάστες MRC-5 επήγαγε την έκφραση όλων των μαρτύρων της DDR, όπως γ -H2AX, p-Chk2 (T68) και p-p53 (Ser20), η έκφραση των οποίων ήταν εντονότερη κάτω από συνθήκες απουσίας ορού και παρουσίας του ογκογόνου *Ha-RasV12* (Σχήμα 18). Η επαγωγή βλαβών στο DNA από την συνεργειακή δράση των *Ha-RasV12* και $p53^{143ala}$ στις MRC-5 οδήγησε στην απόπτωση των κυττάρων, ιδιαίτερα κάτω από συνθήκες απουσίας ορού (Σχήμα 19). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συνεργειακή δράση των *Ha-RasV12* και $p53^{143ala}$ στις φυσιολογικές ινοβλάστες MRC-5 οδήγησε στην επαγωγή βλαβών στο DNA, στην χαμηλή απώλεια κυττάρων μέσω απόπτωσης κατά την ανακαλλιέργεια τους και κατ' ακολουθία στην πρόωρη κυτταρική τους γήρανση.

Σε αντίθεση με τα ευρήματα στις φυσιολογικές ινοβλάστες, ενώ το ογκογόνο *Ha-RasV12* επήγαγε βλάβες στο DNA ιδιαίτερα στις καλλιέργειες απουσίας ορού, όπως

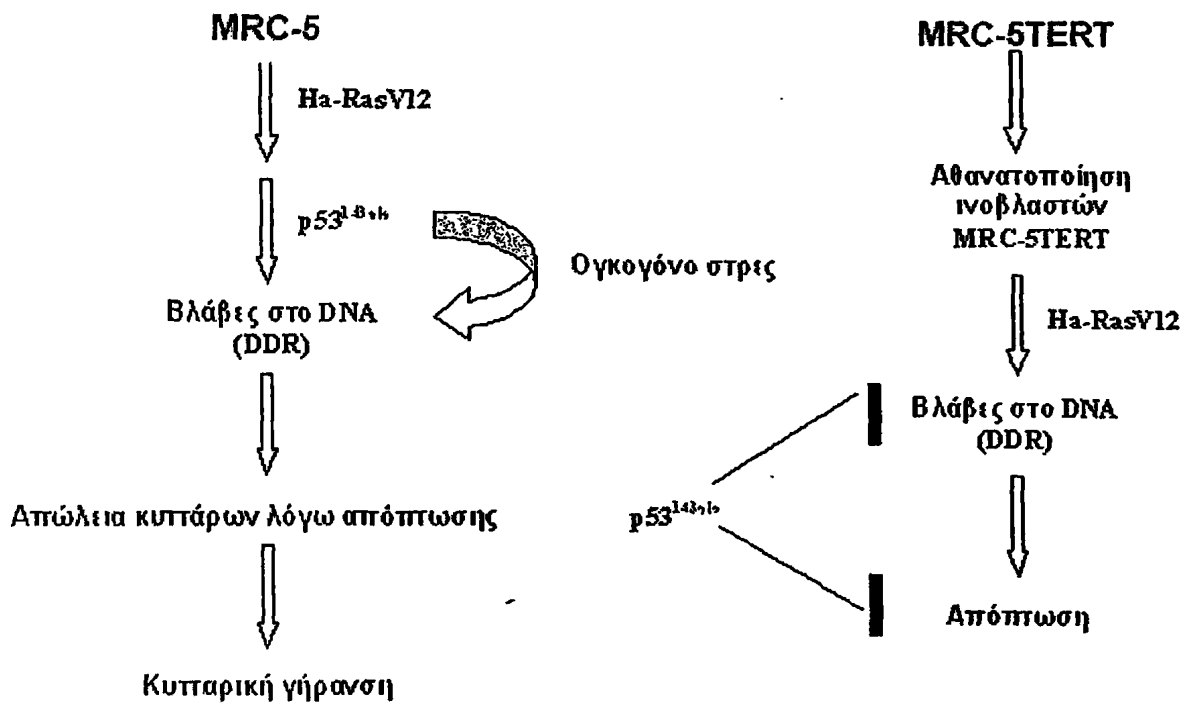


προκύπτει από την επαγωγή των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη DDR, η έκτοπη υπερέκφραση της $p53^{143ala}$ κατέστειλε την έκφραση αυτών των πρωτεϊνών (Σχήμα 25). Ανάλυση της απόπτωσης των MRC-5TERT που υπερέκφραζαν *Ha-RasV12* ή/και $p53^{143ala}$ έδειξε ότι το ογκογόνο *Ha-RasV12* επήγαγε την απόπτωση τους κάτω από συνθήκες απουσίας ορού, ενώ η $p53^{143ala}$ κατέστειλε την *RasV12*-επαγόμενη απόπτωση των MRC-5TERT (Σχήμα 26). Η διαφορετική δράση της $p53^{143ala}$ στους δύο κυτταρικούς τύπους έγκειται στο ότι $p53^{143ala}$ επιδεικνύει επιλεκτική μεταγραφική ενεργότητα στους προαγωγείς γονιδίων-στόχους της. Ενώ δρα μεταξύ άλλων ως θετικός ρυθμιστής της $p21^{Cip1/Waf1}$, καταστέλλει την έκφραση γονιδίων-στόχων της που εμπλέκονται στην κυτταρική απόπτωση όπως η *Bax* (Friedlander et al., 1996; Aurelio et al., 2000). Για παράδειγμα, η *Bax* αποτελεί μεταγραφικό στόχο της αγρίου-τύπου $p53$ (Miyashita and Reed, 1995) και εμπλέκεται στη μιτοχονδριακή πορεία της απόπτωσης διεγείροντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος *c* από τα μιτοχόνδρια (Antonsson et al., 2000, Gao et al., 2001). Επειδή το *Ha-RasV12* κάτω από συνθήκες απουσίας ορού επήγαγε την έκφραση της ενδογενούς αγρίου-τύπου $p53$ (Σχήμα 22), η οποία δρα σαν μεταγραφικός επαγωγέας της έκφρασης της *Bax* (Chiruk et al., 2004; Yamaguchi et al., 2004; Wei et al., 2005), η καταστολή της *Bax* από την $p53^{143ala}$ έδειξε ότι αυτή η κυρίαρχα αρνητική μορφή της $p53$ ήταν επαρκής να ανταγωνισθεί τη δράση της ενδογενούς, αγρίου-τύπου $p53$ στις MRC-5TERT, αλλά όχι στις φυσιολογικές ινοβλάστες. Είναι φανερό ότι η δράση των ογκογονιδίων *Ha-RasV12* και $p53^{143ala}$ δρώντας μόνα τους ή συνεργειακά ήταν διαφορετική στις φυσιολογικές MRC-5 και στις αθανατοποιημένες MRC-5TERT ινοβλάστες.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής συνηγορούν στη διαμόρφωση ενός μοντέλου που απεικονίζεται στο Σχήμα 29. Στις φυσιολογικές ινοβλάστες, η συνεργειακή δράση των ογκογονιδίων μέσω της πρόκλησης ογκογόνου στρες επάγει βλάβες στο DNA που οδηγούν σε απώλεια κυτταρικού πληθυσμού μέσω χαμηλού επιπέδου απόπτωσης με τη συνεχή ανακαλλιέργεια τους, και κατ' ακολουθία στην πρόωρη γήρανση τους. Αυτό επιβεβαιώνει την παρουσία προστατευτικών μηχανισμών στα φυσιολογικά κύτταρα οι οποίοι ενεργοποιούνται προκειμένου να υπερβούν τα καταστροφικά αποτελέσματα των μεταλλάξεων, και να απομακρύνουν τα μεταλλαγμένα κύτταρα (Hahn and Weinberg, 2002). Σε αντίθεση, σε ένα αθανατοποιημένο υπόβαθρο, η δράση ενός δεύτερου ογκογονιδίου φαίνεται ότι είναι απαραίτητη προκειμένου να υπερβεί τις αρνητικές επιδράσεις του πρώτου ογκογονιδίου καταστέλλοντας τους προστετυπικούς μηχανισμούς του κυττάρου που επάχθηκαν από τη δράση του πρώτου ογκογονιδίου (Weinberg, 1997; Hahn and

Weinberg, 2002) και επιπλέον εξηγεί τις επιδράσεις πολλαπλών μεταλλάξεων προκειμένου να μεταλλαχθεί ένα φυσιολογικό, σε προ- ή καρκινικό κύτταρο, σύμφωνα με το μοντέλο της πολυσταδιακής καρκινογένεσης (Hahn and Weinberg, 2002).





Σχήμα 29. Συνοπτική περιγραφή της συνεργειακής δράσης των ογκογονιδίων $p53^{143ala}$ και $Ha-RasV12$ σε φυσιολογικές και τελομερισμένες ινοβλάστες MRC-5.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η υπερέκφραση του ογκογόνου *Ha-RasV12* οδήγησε τις ανθρώπινες εμβρυικές ινοβλάστες IMR90 σε πρόωρη γήρανση.

Η υπερέκφραση του ογκογόνου *Ha-RasV12* δεν προκάλεσε την πρόωρη γήρανση των ινοβλαστών MRC-5.

Η $p53^{143ala}$ δρώντας μόνη της ή συνεργειακά με το ογκογόνο *Ha-RasV12* επήγαγε βλάβες στο DNA που οδήγησαν στην απόπτωση των φυσιολογικών ινοβλαστών, ιδιαίτερα μετά την καλλιέργεια τους κάτω από συνθήκες απουσίας ορού. Σαν αποτέλεσμα απώλειας των κυττάρων μετά από κάθε ανακαλλιέργεια, οι ινοβλάστες MRC-5*RasV12/p53^{143ala}* εμφάνισαν ένα φαινότυπο χαρακτηριστικό της πρόωρης κυτταρική γήρανσης των ινοβλαστών.

Η έκφραση της *hTERT* αθανατοποίησε τις φυσιολογικές ινοβλάστες MRC-5.

Σε αντίθεση με τις φυσιολογικές ινοβλάστες, το ογκογόνο *Ha-RasV12*, επήγαγε την πορεία απόκρισης σε βλάβες του DNA που οδήγησαν σε απόπτωση των τελομερισμένων ινοβλαστών MRC-5*TERT*, ενώ η $p53^{143ala}$ την κατέστειλε.

Η δράση των *TERT*, $p53^{143ala}$ και *Ha-RasV12* δεν ήταν επαρκής για να μετασχηματίσει φυσιολογικές ινοβλάστες *in vitro* και *in vivo*.

Η μειορύθμιση της ενδογενούς αγρίου-τύπου p53 με χρήση RNAi, μαζί με τη δράση της *TERT* και του ογκογόνου *Ha-RasV12* ήταν επαρκής να μετασχηματίσει τις ινοβλάστες *in vitro* αλλά όχι *in vivo*.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Φυσιολογικά κύτταρα θηλαστικών υφίστανται ένα συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων στην καλλιέργεια και εισέρχονται σε περίοδο 'κρίσης' κατά την οποία παραμένουν μεταβολικά ενεργά αλλά δεν διαιρούνται. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται *κυτταρική γήρανση*. Μελέτες έδειξαν ότι τόσο η γήρανση όσο και ο μετασχηματισμός των φυσιολογικών κυττάρων ρυθμίζονται από τα τελομερή και τις πορείες των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών p53 και pRb.

Η επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης λόγω της απώλειας των τελομερών, που ανιχνεύεται ως βλάβες στο DNA, ενεργοποιεί μια πορεία απόκρισης σε βλάβες στο DNA (DNA Damage Checkpoint Response ή DDR) κατά την οποία ενεργοποιούνται οι κινάσες ATM και Chk2 καθώς επίσης και ο τελεστής τους p53 κατάρρους. Η αναστολή της ενεργοποίησης των ATM και Chk2 επιβραδύνει την επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης, επιβεβαιώνοντας τον κρίσιμο ρόλο της DDR στην κυτταρική γήρανση.

Όμως η διάβρωση των τελομερών δεν είναι ο μοναδικός επαγωγέας της κυτταρικής γήρανσης. Τα φυσιολογικά κύτταρα διαθέτουν αμυντικούς μηχανισμούς για να ελαχιστοποιήσουν τα καταστροφικά αποτελέσματα μεταλλάξεων που αδρανοποιούνται ή απαλείφονται κατά την πολυσταδιακή καρκινογένεση. Τέτοιους προστατευτικούς μηχανισμούς αποτελούν οι αντί-πολλαπλασιαστικές αποκρίσεις των κυττάρων - *διακοπή της αύξησης ή πρόωρη γήρανση και απόπτωση* - σε υπερβολικά μιτογόνα μηνύματα ή/και σε ογκογόνο στρες. Το ογκογονίδιο *Ha-RasV12* συνήθως διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αλλά όταν υπερεκφρασθεί σε πρωτογενείς καλλιέργειες ορισμένων στελεχών ανθρωπίνων ινοβλαστών, όπως οι IMR-90 και WI-38, προκαλεί τη διακοπή της προόδου του κυτταρικού τους κύκλου με χαρακτηριστικά του γηρασμένου φαινοτύπου. Αυτή η πρόωρη κυτταρική γήρανση συσχετίζεται με την επαγωγή της έκφρασης της p53 και των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών, p21^{Cip1/Waf1} και p16^{NK4A}, απουσία απώλειας τελομερών. Αυτές οι αντι-πολλαπλασιαστικές αποκρίσεις των φυσιολογικών κυττάρων σε ενεργοποιημένα ογκογονίδια μπορούν επίσης να εξηγήσουν γιατί ο σχηματισμός ενός μετασχηματισμένου κυττάρου συχνά εξαρτάται από την εισαγωγή ενός δεύτερου ή περισσότερων ογκογονιδίων, η λειτουργία των οποίων είναι η εξουδετέρωση των αντι-πολλαπλασιαστικών μηχανισμών του κυττάρου που ενεργοποιήθηκαν από την υπερέκφραση του πρώτου ογκογονιδίου.



Οι στόχοι της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν: (α) η επιμήκυνση του χρόνου ζωής ή η αθανατοποίηση φυσιολογικών ανθρωπίνων ινοβλαστών MRC-5, (β) η διερεύνηση των επιδράσεων των ογκογονιδίων *Ha-RasV12* και *p53^{143ala}* δρώντας μόνα τους ή συνεργειακά σε φυσιολογικές και αθανατοποιημένες ινοβλάστες και (γ) ο μηχανισμός δράσης των *Ha-RasV12* και *p53^{143ala}* δρώντας μόνα τους ή συνεργειακά στους δύο κυτταρικούς τύπους. Ο σκοπός της συγκεκριμένης διατριβής ήταν να διερευνηθεί εάν απαιτούνται και οι τρεις πορείες ρύθμισης της κυτταρικής γήρανσης και του νεοπλασματικού μετασχηματισμού – διατήρηση των τελομερών και απενεργοποίηση των p53 και Rb. Για το σκοπό αυτό, εισήχθησαν διαδοχικά με ρετροϊούς σε φυσιολογικές εμβρυικές ανθρώπινες ινοβλάστες MRC-5, 1) μία μεταλλαγμένη μορφή της p53 (*Ha-RasV12* και *p53^{143ala}*), η οποία βρέθηκε ότι επιμηκύνει το χρόνο ζωής μερικών στελεχών ανθρωπίνων ινοβλαστών, 2) η ανθρώπινη καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης (*hTERT*), η οποία επιμηκύνει το αναπαραγωγικό δυναμικό φυσιολογικών ανθρωπίνων ινοβλαστών και 3) το μεταλλαγμένο ογκογονίδιο *Ha-RasV12*, προκειμένου να κατασκευασθούν κυτταρικοί πληθυσμοί MRC-5 και MRC-5TERT που υπερέκφραζαν *Ha-RasV12* ή/και *p53^{143ala}*. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στη διερεύνηση της υπόθεσης ότι η απενεργοποίηση μόνον της πορείας της p53 ήταν επαρκής για τη μετατροπή φυσιολογικών ανθρωπίνων ινοβλαστών σε μετασχηματισμένα ή καρκινικά κύτταρα.

Χρησιμοποιήθηκε το κυτταρικό στέλεχος MRC-5, πρώτον γιατί έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως μοντέλο κυτταρικής γήρανσης και δεύτερον, γιατί προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι το ογκογόνο *Ha-RasV12*, σε αντίθεση με τις αρνητικές επιδράσεις του στις φυσιολογικές ινοβλάστες IMR-90, δεν προκάλεσε την πρόωρη γήρανση του.

Η έκτοπη υπερέκφραση της *hTERT* στις φυσιολογικές ινοβλάστες MRC-5 επιμήκυνε το χρόνο ζωής τους στην καλλιέργεια. Τα κύτταρα MRC-5TERT έχουν καλλιεργηθεί για >250 κυτταρικές διαιρέσεις και μπορούν να θεωρηθούν αθανατοποιημένα.

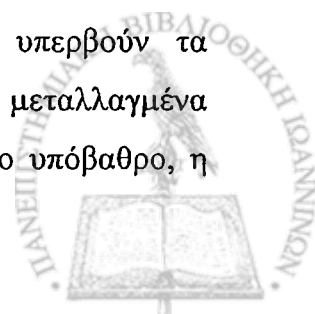
Ενώ το ογκογόνο *Ha-RasV12* ή *p53^{143ala}* δρώντας μόνα τους δεν προκάλεσαν την πρόωρη γήρανση των ινοβλαστών MRC-5, η συνεργειακή τους δράση οδήγησε στη μείωση του χρόνου ζωής των MRC-5 κάτω από φυσιολογικές συνθήκες καλλιέργειας. Εκτενέστερη ανάλυση έδειξε ότι η *p53^{143ala}* δρώντας μόνη της ή συνεργειακά με το *Ha-RasV12* επήγαγε βλάβες στο DNA κατά χρονο-εξαρτώμενο τρόπο, όπως διαπιστώθηκε από την επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη DDR, γ-H2AX, φωσφο-Chk2 (T68) και φωσφο-p53 (Ser20), πιθανά λόγω της κατανάλωσης των αυξητικών παραγόντων του ορού, οδηγώντας σε χαμηλού επιπέδου απόπτωση. Όμως κάτω από συνθήκες απουσίας ορού, τα ογκογονίδια *Ha-RasV12* και *p53^{143ala}* δρώντας μόνα τους επήγαγαν ισχυρότερες βλάβες στο

DNA, επάγοντας την απόπτωση των MRC-5, μολονότι με διαφορετική κινητική, η οποία ήταν εντονότερη στις ινοβλάστες που υπερέκφραζαν και τα δύο ογκογονίδια μαζί. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συνεργειακή δράση των *Ha-RasV12* και *p53^{43ala}* οδήγησε στην ελλάτωση του αριθμού των κυτταρικών διαιρέσεων λόγω απώλειας κυττάρων μέσω απόπτωσης μετά από κάθε ανακαλλιέργεια των κυττάρων.

Σε αντίθεση με τις φυσιολογικές ινοβλάστες MRC-5, ενώ το ογκογόνο *Ha-RasV12* επήγαγε βλάβες στο DNA οδηγώντας στην απόπτωση των κυττάρων MRC-5TERT, μέσω της επαγωγής της έκφρασης της ενδογενούς αγρίου-τύπου p53 και των μεταγραφικών της στόχων *p21^{Cip1/Waf1}* και *Bax*, η *p53^{43ala}* κατέστειλε την επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη DDR και κατ' ακολουθία την *RasV12*-επαγομένης απόπτωσης των MRC-5TERT, καταστέλλοντας την επαγωγή της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης *Bax*, αλλά όχι της *p21^{Cip1/Waf1}*. Αυτή η επιλεκτική μεταγραφική ενεργότητα της *p53^{43ala}* σε προαγωγείς γονιδίων-στόχων της συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες.

Η συνεργειακή δράση των *TERT*, *Ha-RasV12* και *p53^{43ala}* στις MRC-5TERT οδήγησαν σε μορφολογικές μεταβολές χαρακτηριστικές ενός μετασχηματισμένου φαινοτύπου. Όμως, εκτενέστερη ανάλυση του φαινοτύπου τους, χρησιμοποιώντας διάφορους προσδιορισμούς όπως ο σχηματισμός εστιών και η αύξηση ανεξάρτητης προσκόλλησης αλλά και σε αθυμικά ποντίκια έδειξε ότι η συνεργειακή δράση των *TERT*, *Ha-RasV12* και *p53^{43ala}* δεν ήταν επαρκής για να μετασχηματίσει τις ινοβλάστες MRC-5TERT *in vitro* ή *in vivo*. Αντίθετα, η μειορρύθμιση της ενδογενούς αγρίου-τύπου p53 με χρήση RNAi, μαζί με τη δράση της *TERT* και του ογκογόνου *Ha-RasV12* ήταν επαρκής για να μετασχηματίσει τις ινοβλάστες MRC-5TERT *in vitro* αλλά όχι *in vivo*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η απενεργοποίηση της πορείας της p53, η διατήρηση του μήκους των τελομερών με τη δράση της *TERT* και το ογκογόνο *Ha-RasV12* συνέργησαν για το μετασχηματισμό των φυσιολογικών ανθρωπίνων ινοβλαστών MRC-5 *in-vitro*. Πιθανά, ο νεοπλασματικός μετασχηματισμός αυτών των κυττάρων να απαιτεί και την απενεργοποίηση της πορείας της pRb.

Στις φυσιολογικές ινοβλάστες, η συνεργειακή δράση των ογκογονιδίων μέσω της πρόκλησης ογκογόνου στρες επάγει βλάβες στο DNA που οδηγούν σε απώλεια κυτταρικού πληθυσμού μέσω χαμηλού επιπέδου απόπτωσης με τη συνεχή ανακαλλιέργεια τους, και κατ' ακολουθία στην πρόωρη γήρανση τους. Αυτό επιβεβαιώνει την παρουσία προστατευτικών μηχανισμών στα φυσιολογικά κύτταρα οι οποίοι ενεργοποιούνται προκειμένου να υπερβούν τα καταστροφικά αποτελέσματα των μεταλλάξεων, και να απομακρύνουν τα μεταλλαγμένα κύτταρα (Hahn and Weinberg, 2002). Σε αντίθεση, σε ένα αθανατοποιημένο υπόβαθρο, η



δράση ενός δεύτερου ογκογονιδίου φαίνεται ότι είναι απαραίτητη προκειμένου να υπερβεί τις αρνητικές επιδράσεις του πρώτου ογκογονιδίου καταστέλλοντας τους προστετευτικούς μηχανισμούς του κυττάρου που επάχθησαν από τη δράση του πρώτου ογκογονιδίου (Weinberg, 1997; Hahn and Weinberg, 2002) και επιπλέον εξηγεί τις επιδράσεις πολλαπλών μεταλλάξεων προκειμένου να μεταλλαχθεί ένα φυσιολογικό, σε προ- ή καρκινικό κύτταρο, σύμφωνα με το μοντέλο της πολυσταδιακής καρκινογένεσης (Hahn and Weinberg, 2002).



ONCOGENIC STRESS IN HUMAN CELLS: THE ROLE OF ONCOGENIC STRESS IN THE CONTROL OF SENESCENCE, APOPTOSIS AND NEOPLASTIC TRANSFORMATION.

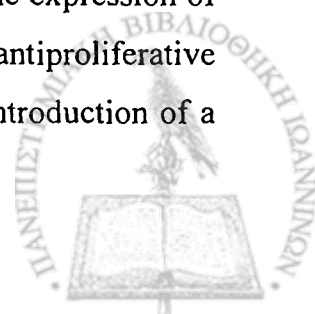
Soultana Markopoulou

SUMMARY

Normal mammalian cells undergo a limited number of cell divisions in cell culture before they enter a period of "crisis" during which they remain metabolically active but they don't divide. This phenomenon is termed cellular senescence. All normal cells possess protective mechanisms -in order to minimize the deleterious effects of mutations- which are eliminated during the multistep process of carcinogenesis. Such defence mechanisms are the anti-proliferative cell responses -growth arrest or premature senescence and apoptosis- in response to excessive mitogenic messages and/or oncogenic stress, e.g. *Ha-RasV12*-induced oncogenic stress. A number of studies have demonstrated that both senescence and normal cell transformation are controlled by telomere status and the pathways of tumor suppressor proteins p53 and Rb.

Induction of senescence due to telomere shortening is sensed by the cell as DNA damage and therefore causes the activation of a DNA Damage Response (DDR) pathway in which ATM and ATR kinases are activated. Inhibition of ATM and ATR activation delays the induction of senescence, confirming the critical role of DDR in cellular senescence.

However telomere erosion is not the only inducer of cellular senescence. Normal cells possess defence mechanisms that reduce or eliminate the catastrophic effects of mutations. Such mechanisms are the antiproliferative cell responses -growth arrest or premature senescence and apoptosis- against excessive mitogenic messages and/or oncogenic stress. The *Ha-RasV12* oncogene usually induces cell proliferation but when it is overexpressed in primary cultures of certain human fibroblast strains eg IMR-90 and WI-38, it halts cell cycle progress accompanied by a senescence phenotype. This premature senescence, in the absence of telomere shortening, correlates with the induction p53 expression and with the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p21^{Cip1/Waf1} and p16^{INK4A}. These antiproliferative responses of normal cells against activated oncogenes can explain why the introduction of a



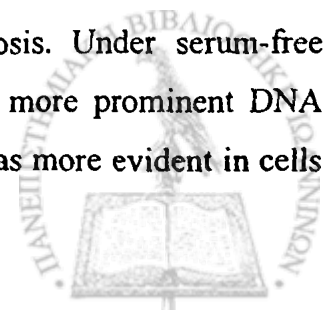
second oncogene that will cancel these defence mechanisms is required for a cell to become transformed.

The objectives of the present thesis were: (a) the extension of cell life span or the immortalization of normal human fibroblasts MRC-5, (b) to study the effects of HaRasV12 and p53^{143ala} when acting either separately or in cooperation on normal and immortalized fibroblasts and (c) the elucidation of the mechanism of action HaRasV12 and p53^{143ala} when acting separately or in cooperation on these two cell types. The aim of the thesis was to determine whether all three regulatory pathways of senescence and neoplastic transformation –telomere preservation and deactivation of p53 and Rb. In order to answer the above questions, normal embryonic human fibroblasts were infected with retroviruses containing, 1) a mutated form of p53 which was found to prolong the lifespan of certain human fibroblasts strains, 2) a the human catalytic subunit of telomerase which was found to prolong the reproductive potential of normal human fibroblasts and 3) the mutated oncogene HaRasV12. The above manipulations resulted in the construction of MRC-5 and MRC-5TERT cell populations overexpressing HaRasV12 and/or p53^{143ala}. Particular attention was paid on the hypothesis that deactivation of the p53 pathway alone was sufficient for the immortalization or neoplastic transformation of normal human fibroblasts.

The cell strain MRC-5 was used, firstly because it has been extensively used as a model of cellular senescence and secondly because pilot experiments have shown that the oncogenic HaRasV12, did not induce premature senescence in MRC-5, an effect that was evident in IMR-90.

Ectopic overexpression of hTERT in normal MRC-5 prolonged their lifespan in culture. MRC-5TERT cells have been cultured for more than 250 cell divisions and thus can be considered immortalized.

While oncogenic HaRasV12 or p53^{143ala} acting separately did not induce premature senescence of MRC-5 fibroblasts, their cooperative action reduced the life span of MRC-5 under normal culture conditions. Extended analysis showed that p53^{143ala} acting alone or cooperatively with HaRas V12 induced DNA damage in a time-dependent manner as it was showed by the induction in the expression of DDR related proteins, γ -H2AX, phospho-Chk2 (T68) and phospho-p53 (Ser20). DDR induction was probably due to the exhaust of serum growth factors and the subsequent induction of low level apoptosis. Under serum-free conditions HaRasV12 and p53^{143ala} acting separately contributed to more prominent DNA damage and leading to the induction of apoptosis in MRC-5 which was more evident in cells



overexpressing both oncogenes. The experimental results showed that the cooperative action of HaRasV12 and p53^{143ala} led to the reduction of cell divisions due to the apoptotic loss of cells after each cell passaging.

HaRasV12 and p53^{143ala} had different effects on MRC-5TERT fibroblasts. HaRasV12 induced DNA damage leading to apoptosis of MRC-5TERT through the expression induction of endogenous wild-type p53 and its transcriptional targets, p21^{Cip1/Waf1} and Bax. p53^{143ala} suppressed DDR induction and the HaRasV12-induced apoptosis by suppressing the induction of the pro-apoptotic protein Bax and not affecting p21^{Cip1/Waf1}. This selective transcriptional activation of p53 on the promoters of target genes is in agreement with previous studies.

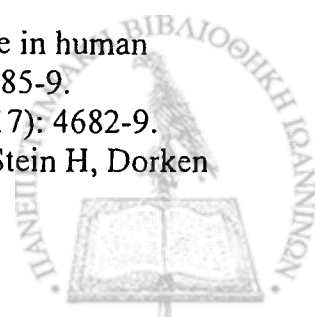
The cooperative actions of *TERT*, *Ha-RasV12* και *p53^{143ala}* on MRC-5TERT led to morphological changes characteristic of a transformed phenotype. Despite this more detailed analysis with the use of *in-vivo* and *in-vitro* transformation assays revealed that the cooperative actions of *TERT*, *Ha-RasV12* και *p53^{143ala}* was not sufficient to transform MRC-5TERT fibroblasts. In contrast downregulation of the endogenous wild-type p53 with the use of RNAi coupled with the actions of hTERT and HaRasV12 was sufficient to transform MRC-5TERT fibroblasts *in-vivo* but not *in-vitro*. In total the above results showed that the combined effects of the deactivation of the p53 pathway, the preservation of telomere length through the expression of hTERT and the actions oncogenic HaRasV12 were capable of transforming MRC-5 fibroblasts *in-vitro* but not *in-vivo*. It is quite possible that the *in-vivo* transformation of MRC-5 also requires the deactivation of the Rb pathway.

In normal fibroblasts the cooperative action of oncogenes provokes oncogenic stress and induces DNA damage thus leading low level apoptosis, cell loss with passaging and consequently to premature senescence. This verifies the presence of protective mechanisms in normal cells which are activated in order to circumvent the deleterious effects of mutations. In the case immortalized cells it seems that the action of a second oncogene is required in order to suppress the protective cell mechanisms which were enabled as a response to the first oncogene. Moreover this offers an explanation for the effects of multiple mutations in order to transform a normal cell which is in agreement with the multistep model of carcinogenesis.

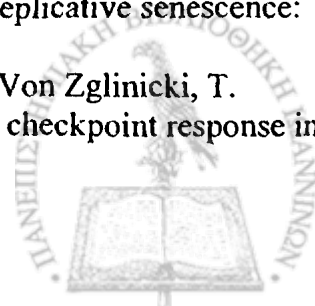


ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

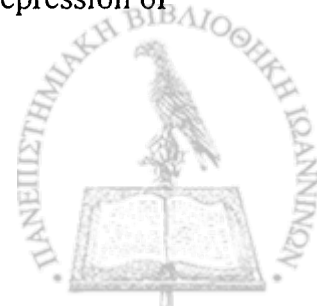
- Antonsson, B. and J. C. Martinou (2000). "The Bcl-2 protein family." Exp Cell Res **256**(1): 50-7.
- Artandi, S. E. and L. D. Attardi (2005). "Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer." Biochem Biophys Res Commun **331**(3): 881-90.
- Artandi, S. E., Chang, S., Lee, S., L. Alson, S., Gottlieb, G., J. Chin, L., DePinho, R. A. (2000). "Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice." Nature **406**(6796): 641-5.
- Aurelio ON, Kong XT, Gupta S, Stanbridge EJ. (2000) "p53 mutants have selective dominant-negative effects on apoptosis but not growth arrest in human cancer cell lines." Mol Cell Biol. **20**(3):770-8.
- Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, Korsmeyer SJ. (1985). "Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18." Cell **41**(3): 899-906.
- Bakkenist, C. J. and M. B. Kastan (2004). "Initiating cellular stress responses." Cell **118**(1): 9-17.
- Barbacid, M. (1987). "ras genes" Annu Rev Biochem **56**: 779-827.
- Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Kramer A, Tort F, Zieger K, Guldborg P, Sehested M, Nesland JM, Lukas C, Orntoft T, Lukas J, Bartek J. (2005). "DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis." Nature **434**(7035): 864-70.
- Benanti, J. A. and D. A. Galloway (2004). "Normal human fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence." Mol Cell Biol **24**(7): 2842-52.
- Benanti, J. A. and D. A. Galloway (2004). "The normal response to RAS: senescence or transformation?" Cell Cycle **3**(6): 715-7.
- Benedict, W.F. Murphee, A.L. Banerjee, A. Spina, C.A. Sparkers, R.S (1983). "Patient with 13 chromosome deletion: evidence that the retinoblastoma gene is a recessive cancer gene." Science **219**: 973-975.
- Benedict, W. F. Srivatsan, E. S. Mark, C. Banerjee, A. Sparkes, R. S. Murphee, A. L. (1987). "Complete or partial homozygosity of chromosome 13 in primary retinoblastoma." Cancer Res **47**(15): 4189-91.
- Blackburn, E. H. (2005). "Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions." FEBS Lett **579**: 859-862.
- Bodmer, W. F., Bailey, C. J., Bodmer, J., Bussey, H. J., Ellis, A., Gorman, P., Lucibello, F. C., Murday, V., A. Rider, S. H., Scambler, P. et al. (1987). "Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5." Nature **328**(6131): 614-6.
- Bond, J., Houghton, M., Blaydes, J., Gire, V., Wynford-Thomas, D., Wyllie, F. (1996). "Evidence that transcriptional activation by p53 plays a direct role in the induction of cellular senescence." Oncogene **13**(10): 2097-104.
- Bond, J., A. Blaydes, J. P. Rowson, J. Houghton, M. F. Smith, J. R. Wynford-Thomas, D. Wyllie, F. S. (1995). "Mutant p53 rescues human diploid cells from senescence without inhibiting the induction of SD11/WAF1." Cancer Res **55**(11): 2404-9.
- Bond, J. A., Wyllie, F. S., Wynford-Thomas, D. (1994). "Escape from senescence in human diploid fibroblasts induced directly by mutant p53." Oncogene **9**(7): 1885-9.
- Bos, J. L. (1989). "ras oncogenes in human cancer: a review." Cancer Res **49**(17): 4682-9.
- Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AH, Schlegelberger B, Stein H, Dorken



- B, Jenuwein T, Schmitt CA(2005). "Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development." *Nature* **436**(7051): 660-5.
- Caldeira, S.Zehbe, I.Accardi, R.Malanchi, I.Dong, W.Giarre, M.de Villiers, E. M.Filotico, R. Boukamp, P.Tommasino, M. (2003). "The E6 and E7 proteins of the cutaneous human papillomavirus type 38 display transforming properties." *J Virol* **77**(3): 2195-206.
- Campisi, J. (2000). "Cancer, aging and cellular senescence." *In Vivo* **14**(1): 183-8.
- Campisi, J. (2001). "Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism." *Trends Cell Biol* **11**(11): S27-31.
- Campisi, J. (2005). "Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors." *Cell* **120**(4): 513-22.
- Carnero, A. and D. H. Beach (2004). "Absence of p21 WAF1 cooperates with c-myc in bypassing Ras-induced senescence and enhances oncogenic cooperation." *Oncogene* **23**(35): 6006-11.
- Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL. (1983). "Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma." *Nature* **305**(5937): 779-84.
- Chan WM, Siu WY, Lau A, Poon RY. (2004) "How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer?" *Mol Cell Biol*. **24**(8):3536-51.
- Chen, Q. M.Bartholomew, J. C.Campisi, J.Acosta, M.Reagan, J. D.Ames, B. N. (1998). "Molecular analysis of H2O2-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication." *Biochem J* **332** (Pt 1): 43-50.
- Chen, Z.Trotman, L. C.Shaffer, D.Lin, H. K.Dotan, Z. A.Niki, M.Koutcher, J. A.Scher, H. I. Ludwig, T.Gerald, W.Cordon-Cardo, C.Pandolfi, P. P. (2005). "Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis." *Nature* **436**(7051): 725-30.
- Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. (2004). "Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis." *Science* **303**(5660): 1010-4.
- Clay-Farrace L, Pelizon C, Santamaria D, Pines J, Laskey RA. (2003). "Human replication protein Cdc6 prevents mitosis through a checkpoint mechanism that implicates Chk1." *Embo J* **22**(3): 704-12.
- Cleary, M. L. and J. Sklar (1985). "Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(21): 7439-43.
- Collado, M.Gil, J.Efeyan, A.Guerra, C.Schuhmacher, A. J.Barradas, M.Benguria, A. Zaballos, A.Flores, J. M.Barbacid, M.Beach, D.Serrano, M (2005). "Tumour biology: senescence in premalignant tumours." *Nature* **436**(7051): 642.
- Coursen, J.D.Bennett, W.P.Khan, M.A.Forrester, K.Pietenpol, J.A.Harris, C. C. (1997). "Differential effects of p53 mutants on the growth of human bronchial epithelial cells." *Molecular Carcinogenesis* **19**: 191-203.
- Cox, A. D. and C. J. Der (2003). "The dark side of Ras: regulation of apoptosis." *Oncogene* **22**(56): 8999-9006.
- Cristofalo VJ, Lorenzini A, Allen RG, Torres C, Tresini M. (2004). "Replicative senescence: a critical review." *Mech Ageing Dev* **125**(10-11): 827-48.
- d'Adda di Fagagna, F.Reaper, P. M.Clay-Farrace, L.Fiegler, H.Carr, P.Von Zglinicki, T. Saretzki, G.Carter, N. P.Jackson, S. P (2003). "A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence." *Nature* **426**(6963): 194-8.



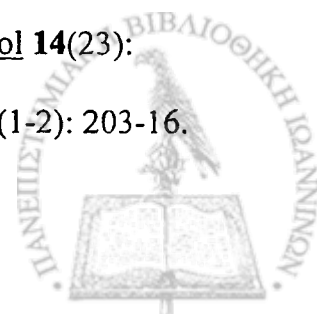
- d'Adda di Fagagna, F., S. H. Teo, S.P. Jackson (2004). "Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response." Genes Dev **18**(15): 1781-99.
- Denko, N. C., A. J. Giaccia, Stringer JR, Stambrook PJ.(1994). "The human Ha-ras oncogene induces genomic instability in murine fibroblasts within one cell cycle." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 5124-8.
- DePamphilis ML, Blow JJ, Ghosh S, Saha T, Noguchi K, Vassilev A. (2006). "Regulating the licensing of DNA replication origins in metazoa." Curr Opin Cell Biol **18**(3): 231-9.
- Diaz, R.Lue, J.Mathews, J.Yoon, A.Ahn, D.Garcia-Espana, A.Leonardi, P. Vargas, M.P.Pellicer, A (2005). "Inhibition of Ras oncogenic activity by Ras protooncogenes." Int J Cancer **113**: 241-248.
- Dimri, G. P. (2002). "The bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells." Cancer Res **62**: 4736-4745.
- Dimri, G. P. and J. Campisi (1994). "Molecular and cell biology of replicative senescence." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **59**: 67-73.
- Dimri, G. P., E. Hara, Campisi J.(1994). "Regulation of two E2F-related genes in presenescent and senescent human fibroblasts." J Biol Chem **269**(23): 16180-6.
- Duursma, A. M. and R. Agami (2005). "CDK-dependent stabilization of Cdc6: linking growth and stress signals to activation of DNA replication." Cell Cycle **4**(12): 1725-8.
- Elmore, L. W. and S. E. Holt (2000). "Telomerase and telomere stability: a new class of tumor suppressor?" Molecular Carcinogenesis **28**: 1-4.
- Ferbeyre, G., E. De Stanchina, A.W. Lin, et al. (2002) "Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence." Molecular and Cellular Biology **22**: 3497-3508
- Field, J. K. and D. A. Spandidos (1990). "The role of ras and myc oncogenes in human solid tumours and their relevance in diagnosis and prognosis (review)." Anticancer Res **10**(1): 1-22.
- Friedlander P., Haupt Y., Prives C. and M.Owen (1996) "A mutant p53 that discriminates between p53-responsive genes cannot induce apoptosis." Molecular and Cellular Biology **16**: 4961-4971
- Gao CF, Ren S, Zhang L, Nakajima T, Ichinose S, Hara T, Koike K, Tsuchida N. (2001) "Caspase-dependent cytosolic release of cytochrome c and membrane translocation of Bax in p53-induced apoptosis." Exp Cell Res. **15**:145-51.
- Garrett, M. D. and S. Mittnacht (2005). "Oncogenes and cell proliferation. The genetics and biology of cancer - revealing avenues for therapy." Current opinion in genetics & development **15**: 1-4.
- Giovanella, B. C. and J. Fogh (1985). "The nude mouse in cancer research." Adv Cancer Res **44**: 69-120.
- Gladden, A. B. and J. A. Diehl (2003). "The cyclin D1-dependent kinase associates with the pre-replication complex and modulates RB.MCM7 binding." J Biol Chem **278**(11): 9754-60.
- Goldstein, S. (1990). "Molecular genetic approaches to mechanisms of senescence." Annu Rev Gerontol Geriatr **10**: 97-116.
- Gollahon, L. S. and J. W. Shay (1996). "Immortalization of human mammary epithelial cells transfected with mutant p53 (273his)." Oncogene **12**: 715-725.
- Gonzalez S, Klatt P, Delgado S, Conde E, Lopez-Rios F, Sanchez-Céspedes M, Mendez J, Antequera F, Serrano M. (2006) "Oncogenic activity of Cdc6 through repression of the INK4/ARF locus." Nature. **440**(7084):702-6.



- Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Venere M, Ditullio RA Jr, Kastriakis NG, Levy B, Kletsas D, Yoneta A, Herlyn M, Kittas C, Halazonetis TD. (2005). "Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions." *Nature* **434**(7035): 907-13.
- Gorman, C., R. Padmanabhan, B.H. Howard (1983). "High efficiency DNA-mediated transformation of primate cells." *Science* **221**(4610): 551-3.
- Gross A, Pilcher K, Blachly-Dyson E, Basso E, Jockel J, Bassik MC, Korsmeyer SJ, Forte M. (2000). "Biochemical and genetic analysis of the mitochondrial response of yeast to BAX and BCL-X(L)." *Mol Cell Biol* **20**(9): 3125-36.
- Hahn, W. C. (2002). "Senescence, telomere shortening and telomere maintenance." *Cancer Biol Ther* **1**(4): 398-400.
- Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA. (1999). "Creation of human tumour cells with defined genetic elements." *Nature* **400**(6743): 464-8.
- Hahn, W. C. and R. A. Weinberg (2002). "Modelling the molecular circuitry of cancer." *Nat Rev Cancer* **2**(5): 331-41.
- Hahn, W. C. and R. A. Weinberg (2002). "Rules for making human tumor cells." *N Engl J Med* **347**(20): 1593-603.
- Halvorsen, T. L., G. Leibowitz, F. Levine (1999). "Telomerase activity is sufficient to allow transformed cells to escape from crisis." *Mol Cell Biol* **19**(3): 1864-70.
- Harris H, Sidebottom E, Grace DM, Bramwell ME (1969). "The expression of genetic information: a study with hybrid animal cells." *J Cell Sci* **4**(2): 499-525.
- Hayflick, L. (1965). "The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains." *Exp Cell Res* **37**: 614-36.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." *Nature* **407**(6805): 770-6.
- Herbig U, Sedivy JM. (2006) "Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story." *Mech Ageing Dev.* **127**(1):16-24
- Hipfner, D. R. and S. M. Cohen (2004). "Connecting proliferation and apoptosis in development and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(10): 805-15.
- Hupp, T. D. and D. Lane (2000). "Strategies for manipulating the p53 pathway in the treatment of human cancer." *Biochem Journal* **352**: 1-17.
- Itahana, K., G. Dimri, Campisi J.(2001). "Regulation of cellular senescence by p53." *Eur J Biochem* **268**(10): 2784-91.
- Jacobs, J. J.Kieboom, K.Marino, S.De Pinho, R.A.Van Lohuizen, M. (1999). "The oncogene and Polycomb gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus." *Nature* **397**: 164-168.
- Jacobs, J. P., C. M. Jones, J.P. Baille (1970). "Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5." *Nature* **227**(5254): 168-70.
- Jansen-Durr, P. (1996). "How viral oncogenes make the cell cycle." *Trends in Genetics* **12**: 270-275.
- Johnstone, R. W., A. A. Ruefli, S.W. Lowe (2002). "Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy." *Cell* **108**(2): 153-64.
- Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias J.M., Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D. (1997). "Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers." *Cell* **90**(4): 809-19.

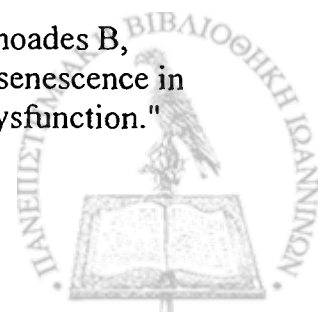


- Kakumoto K, Sasai K, Sukezane T, Oneyama C, Ishimaru S, Shibutani K, Mizushima H, Mekada E, Hanafusa H, Akagi T. (2006). "FRA1 is a determinant for the difference in RAS-induced transformation between human and rat fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(14): 5490-5.
- Karakaidos P, Taraviras S, Vassiliou LV, Zacharatos P, Kastrinakis NG, Kougiou D, Kouloukoussa M, Nishitani H, Papavassiliou AG, Lygerou Z, Gorgoulis VG (2004). "Overexpression of the replication licensing regulators hCdt1 and hCdc6 characterizes a subset of non-small-cell lung carcinomas: synergistic effect with mutant p53 on tumor growth and chromosomal instability--evidence of E2F-1 transcriptional control over hCdt1." Am J Pathol **165**(4): 1351-65.
- Kastan, M. B. and J. Bartek (2004). "Cell-cycle checkpoints and cancer." Nature **432**(7015): 316-23.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, A.R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-57.
- Knudson, A. G. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**: 820-823.
- Knudson, A.G.Meadows, A.T.Nichols, W.W.Hill, R (1976). "Chromosomal deletion and retinoblastoma." N. Engl. J. Med. **295**: 1120-1123.
- Ko, Y. G. and C. Prives (1996). "p53: puzzle and paradigm." Genes Dev **10**: 1054-1072.
- Kolettas, E. and R. F. Rosenberger (1998). "Suppression of decorin expression and partial induction of anchorage-independent growth by the v-src oncogene in human fibroblasts." Eur J Biochem **254**(2): 266-74.
- Land H, Chen AC, Morgenstern JP, Parada LF, Weinberg RA. (2002). "Transgenic expression of the p16(INK4a) cyclin-dependent kinase inhibitor leads to enhanced apoptosis and differentiation arrest of CD4-CD8- immature thymocytes." J Immunol **168**(5): 2325-31.
- Land, H., A. C. Chen, et al. (1986). "Behavior of myc and ras oncogenes in transformation of rat embryo fibroblasts." Mol Cell Biol **6**(6): 1917-25.
- Land, H., L. F. Parada, R.A. Weinberg (1983). "Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis." Science **222**(4625): 771-8.
- Lane, D. P. and L. V. Crawford (1979). "T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells." Nature **278**: 261-263.
- Lau E, Zhu C, Abraham RT, Jiang W (2006) "The functional role of Cdc6 in S-G2/M in mammalian cells." EMBO Rep. **7**(4): 425-30
- Leppert, M.Dobbs, M.Scambler, P.O'Connell, P.Nakamura, Y.Stauffer, D.Woodward, S.Burt, R.Hughes, J.Gardner, E.et al. (1987). "The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5." Science **238**(4832): 1411-3.
- Levine, A.J.Finlay, C.A.Hinds, P.W. (2004). "p53 is a tumor suppressor gene." Cell **S116**: S67-S69.
- Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW. (1998) "Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling." Genes Dev. **12**(19):3008-19.
- Linzer, D. I. and A. J. Levine (1979). "Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells." Cell **17**: 43-52.
- Lisby, M. and R. Rothstein (2004). "DNA repair: keeping it together." Curr Biol **14**(23): R994-6.
- Ljungman, M. (2005). "Activation of DNA damage signaling." Mutat Res **577**(1-2): 203-16.

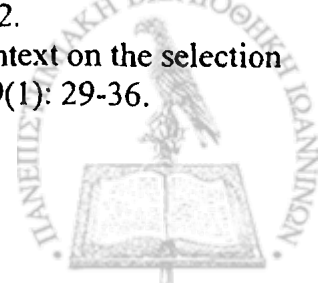


- Longhese, M. P., D. Mantiero, et al. (2006). "The cellular response to chromosome breakage." *Mol Microbiol* **60**(5): 1099-108.
- Lu, X. (2005). "p53: a heavily dictated dictator of life and death." *Current opinion in genetics & development* **15**: 27-33.
- Ludwig R.L., S. Bates, K.H. Vousden (1996). "Differential activation of target cellular promoters by p53 mutants with impaired apoptotic function." *Mol Cell Biol* **16**: 4952-60
- Machida, Y. J. and A. Dutta (2005). "Cellular checkpoint mechanisms monitoring proper initiation of DNA replication." *J Biol Chem* **280**(8): 6253-6.
- MacKenzie KL, Franco S, May C, Sadelain M, Moore MA. (2000) "Mass cultured human fibroblasts overexpressing hTERT encounter a growth crisis following an extended period of proliferation." *Exp Cell Res.* **259**(2):336-50.
- Macpherson, I. and L. Montagnier (1964). "Agar Suspension Culture for the Selective Assay of Cells Transformed by Polyoma Virus." *Virology* **23**: 291-4.
- Mailand N, Diffley JF. (2005) "CDKs promote DNA replication origin licensing in human cells by protecting Cdc6 from APC/C-dependent proteolysis." *Cell.* **122**(6):915-26.
- Masutomi K, Possemato R, Wong JM, Currier JL, Tothova Z, Manola JB, Ganesan S, Lansdorp PM, Collins K, Hahn WC.(2005). "The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(23): 8222-7.
- Masutomi K, Yu EY, Khurts S, Ben-Porath I, Currier JL, Metz GB, Brooks MW, Kaneko S, Murakami S, DeCaprio JA, Weinberg RA, Stewart SA, Hahn WC.(2003)."Telomerase maintains telomere structure in normal human cells." *Cell* **114**(2): 241-53.
- McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP, Korsmeyer SJ. (1989). "bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation." *Cell* **57**(1): 79-88.
- McSharry, B. P.Jones, C. J.Skinner, J. W.Kipling, D.Wilkinson, G. W. (2001). "Human telomerase reverse transcriptase-immortalized MRC-5 and HCA2 human fibroblasts are fully permissive for human cytomegalovirus." *J Gen Virol* **82**(Pt 4): 855-63.
- Michaloglou, C.Vredevel, L. C.Soengas, M. S.Denoyelle, C.Kuilman, T.van der Horst, C. M.Majoor, D. M.Shay, J. W.Mooi, W. J.Peeper, D. S. (2005). "BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi." *Nature* **436**(7051): 720-4.
- Milyavsky M, Shats I, Erez N, Tang X, Senderovich S, Meerson A, Tabach Y, Goldfinger N, Ginsberg D, Harris CC, Rotter V. (2003) "Prolonged culture of telomerase-immortalized human fibroblasts leads to a premalignant phenotype." *Cancer Res.* **63**(21):7147-57.
- Miyashita T, Reed JC.(1995) "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene." *Cell.* **80**(2):293-9.
- Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW; Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW. (2003). "Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence." *Cell* **113**(6): 703-16.
- Neugut, A. I. and I. B. Weinstein (1979). "The use of agarose in the determination of anchorage-independent growth." *In Vitro* **15**(5): 351-5.
- Newbold, R. F. and R. W. Overell (1983). "Fibroblast immortality is a prerequisite for transformation by EJ c-Ha-ras oncogene." *Nature* **304**(5927): 648-51.
- Nichols WW, Murphy DG, Cristofalo VJ, Toji LH, Greene AE, Dwight SA. (1977). "Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90." *Science* **196**(4285): 60-3.
- Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P.(2002). "The IARC TP53

- database: new online mutation analysis and recommendations to users." Hum Mutat **19**(6): 607-14.
- Palmero, I.Murga, M.Zubiaga, A.Serrano, M. (2002). "Activation of ARF by oncogenic stress in mouse fibroblasts is independent of E2F1 and E2F2." Oncogene **21**(19): 2939-47.
- Pelengaris, S., M. Khan, G. Ewan (2002). "c-MYC: more than just a matter of life and death." Nat Rev Cancer **2**(10): 764-76.
- Rich, T., R. L. Allen, A.H. Wyllie (2000). "Defying death after DNA damage." Nature **407**(6805): 777-83.
- Rosenthal A, Lindquist PB, Bringman TS, Goeddel DV, Derynck R..(1986). "Expression in rat fibroblasts of a human transforming growth factor-alpha cDNA results in transformation." Cell **46**(2): 301-9.
- Ryan KM, Vousden KH. (1998) "Characterization of structural p53 mutants which show selective defects in apoptosis but not cell cycle arrest." Mol Cell Biol. **18**(7):3692-8.
- Sachs Z, Sharpless NE, DePinho RA, Rosenberg N. (2004). "p16(Ink4a) interferes with Abelson virus transformation by enhancing apoptosis." J Virol **78**(7): 3304-11.
- Sambrook, J. (1989). "Protein structure. Chaperones, paperones." Nature **342**(6247): 224-225.
- Satyanarayana A, Rudolph KL (2004) ."p16 and ARF: activation of teenage proteins in old age." J Clin Invest. **114**(9):1237-40.
- Serrano, M. and M. A. Blasco (2001). "Putting the stress on senescence." Curr Opin Cell Biol **13**(6): 748-53.
- Serrano, M.Lin, A. W.McCurrach, M. E.Beach, D.Lowe, S. W (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." Cell **88**(5): 593-602.
- Sharpless, N. E. and R. A. DePinho (2002). "p53: good cop/bad cop." Cell **110**(1): 9-12.
- Sharpless, N. E. and R. A. DePinho (2005). "Cancer: crime and punishment." Nature **436**(7051): 636-7.
- Sherr, C. J. (2004). "Principles of tumor suppression." Cell **116**: 235-246.
- Sherr, C. J. and R. A. DePinho (2000). "Cellular senescence: mitotic clock or culture shock?" Cell **102**(4): 407-10.
- Sherr CJ, Roberts JM. (1999) "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." Genes Dev. **13**(12):1501-12.
- Shields, J.M.Pruit, K.McFall, A.Shaub, A.Der, C.J (2000). "Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'." Trends Cell Biol **10**: 147-154.
- Shiloh, Y. (2003). "ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity." Nat Rev Cancer **3**(3): 155-68.
- Stanbridge, E. J. (1976). "Cell fusion, genetic cartography, and malignancy." Lancet **1**(7984): 525.
- Stillman, B. (2005). "Origin recognition and the chromosome cycle." FEBS Lett **579**(4): 877-84.
- Strasser A, Harris AW, Vaux DL, Webb E, Bath ML, Adams JM, Cory S. (1990) "Abnormalities of the immune system induced by dysregulated bcl-2 expression in transgenic mice." Curr Top Microbiol Immunol **166**: 175-81.
- Sugiki H, Hozumi Y, Maeshima H, Katagata Y, Mitsuhashi Y, Kondo S.(2000). "C2-ceramide induces apoptosis in a human squamous cell carcinoma cell line." Br J Dermatol **143**(6): 1154-63.
- Takaoka M, Harada H, Deramaudt TB, Oyama K, Andl CD, Johnstone CN, Rhoades B, Enders GH, Opitz OG, Nakagawa H. (2004). "Ha-Ras(G12V) induces senescence in primary and immortalized human esophageal keratinocytes with p53 dysfunction." Oncogene **23**(40): 6760-8.



- Takeda DY, Shibata Y, Parvin JD, Dutta A (2005) "Recruitment of ORC or CDC6 to DNA is sufficient to create an artificial origin of replication in mammalian cells." Genes. Dev. **7(4)**:2827-36
- Tang, D. G.Tokumoto, Y. M.Apperly, J. A.Lloyd, A. C.Raff, M. C. (2001). "Lack of replicative senescence in cultured rat oligodendrocyte precursor cells." Science **291(5505)**: 868-71.
- Taylor LM, James A, Schuller CE, Brce J, Lock RB, Mackenzie KL. (2004) "Inactivation of p16INK4a, with retention of pRB and p53/p21cip1 function, in human MRC5 fibroblasts that overcome a telomere-independent crisis during immortalization." J Biol Chem. **279(42)**:43634-45.
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. (1985). "Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma." Science **228(4706)**: 1440-3.
- Vafa O, Wade M, Kern S, Beeche M, Pandita TK, Hampton GM, Wahl GM. (2002). "c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability." Mol Cell **9(5)**: 1031-44.
- Vaziri C, Saxena S, Jeon Y, Lee C, Murata K, Machida Y, Wagle N, Hwang DS, Dutta A. (2003). "A p53-dependent checkpoint pathway prevents rereplication." Mol Cell **11(4)**: 997-1008.
- Vermeulen, K.Berneman, Z.N.Van Bockstaele, D.R. (2003). "Cell cycle and apoptosis." Cell Prolif. **36**: 165-175.
- Vogelstein, B.Lane, D.Levine, A.J. (2000). "Surfing the p53 network." Nature **408**: 307-310.
- Vonlanthen, S. (2001). "The bmi-1 oncoprotein is differentially expressed in non-small cell lung cancer and correlates with INK4A-ARF locus expression." Br J Cancer **84**: 1372-1376.
- Voorhoeve PM, Agami R.(2004) " Unraveling human tumor suppressor pathways: a tale of the INK4A locus." Cell Cycle. **3(5)**:616-20.
- Vousden, K. H. and B. X. Lu (2002). "Live or let die: the cell's response to p53." Nat Rev Cancer **2**: 594-604.
- Wei, X., H. Xu, D. Kufe. (2005). "Human MUC1 oncoprotein regulates p53-responsive gene transcription in the genotoxic stress response." Cancer Cell **7(2)**: 167-78.
- Weinberg, R. A. (1985). "The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus." Science **230(4727)**: 770-6.
- Weinberg, R. A. (1989). "Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis." Cancer Res **49(14)**: 3713-21.
- Weinberg, R. A. (1989). "Positive and negative controls on cell growth." Biochemistry **28(21)**: 8263-9.
- Weinberg, R. A. (1997). "The cat and mouse games that genes, viruses, and cells play." Cell **88(5)**: 573-5.
- Weitzman, J. B. and M. Yaniv (1999). "Rebuilding the road to cancer." Nature **400**: 401-402.
- Woo, R. A. and R. Y. Poon (2004). "Activated oncogenes promote and cooperate with chromosomal instability for neoplastic transformation." Genes Dev **18(11)**: 1317-30.
- Wright, W. E. and J. W. Shay (2001). "Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting." Curr Opin Genet Dev **11(1)**: 98-103.
- Wyllie, F.Haughton, M.Bartek, J.Rowson, J.Wynford-Thomas, D. (2003). "Mutant p53 can delay growth arrest and loss of CDK2 activity in senescing human fibroblasts without reducing p21(WAF1) expression." Exp Cell Res **285(2)**: 236-42.
- Wynford-Thomas, D. and J. Blaydes (1998). "The influence of cell context on the selection pressure for p53 mutation in human cancer." Carcinogenesis **19(1)**: 29-36.



- Yamaguchi H, Chen J, Bhalla K, Wang HG. (2004). "Regulation of Bax activation and apoptotic response to microtubule-damaging agents by p53 transcription-dependent and -independent pathways." J Biol Chem **279**(38): 39431-7.
- Yan P, Benhattar J, Seelentag W, Stehle JC, Bosman FT(2004). "Immunohistochemical localization of hTERT protein in human tissues." Histochem Cell Biol **121**(5): 391-7.
- Yang, A. and F. McKeon (2000). "P63 and P73: P53 mimics, menaces and more." Nat Rev Mol-Cell Biol **1**(3): 199-207.
- Yeager, T. R. and R. R. Reddel (1999). "Constructing immortalized human cell lines." Curr Opin Biotechnol **10**(5): 465-9.
- Yu, J. and L. Zhang (2003). "No PUMA, no death: implications for p53-dependent apoptosis." Cancer Cell **4**(4): 248-9.



ΣΧΗΜΑΤΑ

Σχήμα 1.	Τρόποι μετατροπής ενός ογκογονιδίου σε ενεργό ογκογονίδιο.
Σχήμα 2.	Σύνοψη των κυριότερων πορειών που οδηγούν στη γήρανση.
Σχήμα 3.	Οι πορείες ελέγχου του κυτταρικού κύκλου που ενεργοποιούνται ως απόκριση σε βλάβες του DNA.
Σχήμα 4.	Συνοπτικό μοντέλο της εξωγενούς και ενδογενούς πορείας της απόπτωσης.
Σχήμα 5.	Πορείες ενεργοποίησης της p53.
Σχήμα 6.	Αντι-αποπτωτικές και προ-αποπτωτικές λειτουργίες του ογκογόνου Ras.
Σχήμα 7.	Σχηματική παράσταση του ρετροϊκού φορέα ελέγχου ΔΗ και του ρετροϊκού φορέα έκφρασης της p53 ^{143ala} , ΔΗ-SCX3.
Σχήμα 8.	Σχηματική παράσταση των ρετροϊκών φορέων έκφρασης της RasV12, LXSΝ-RasV12 και pWZL-RasV12.
Σχήμα 9.	Ρετροϊκοί φορείς έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης τελομεράσης.
Σχήμα 10.	Σχηματική παράσταση του ρετροϊκού φορέα έκφρασης του p53 RNAi.
Σχήμα 11.	Επικρατές μοντέλο των μηχανισμών της κυτταρικής γήρανσης και πειραματικός σχεδιασμός.
Σχήμα 12.	Έκφραση των εισαχθέντων γονιδίων p53 ^{143ala} , TERT και Ha-RasV12 στις επιμολυσμένες ανθρώπινες ινοβλάστες, MRC-5.
Σχήμα 13.	Οι επιδράσεις της έκφρασης του Ha-RasV12 στις επιμολυσμένες ανθρώπινες ινοβλάστες, IMR-90 και MRC-5.
Σχήμα 14.	Καμπύλες αύξησης των μη-επιμολυσμένων και επιμολυσμένων ινοβλαστών (Α) MRC-5 και (Β) MRC-5TERT με τους ρετροϊκούς φορείς που έφεραν Ha-RasV12, p53 ^{143ala} ή p53 ^{143ala} /RasV12.
Σχήμα 15.	Οι επιδράσεις των ογκογονιδίων Ha-RasV12 ή/και p53 ^{143ala} στην έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης στις φυσιολογικές ινοβλάστες MRC-5.



Σχήμα 16.	Έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στις ινοβλάστες MRC-5 και MRC-5TERT που υπερεκφράζανε Ha-RasV12 ή/και p53 ^{143ala} /RasV12.
Σχήμα 17.	Έκφραση και επιδράσεις της Cdc6 στις ινοβλάστες MRC-5 και MRC-5TERT.
Σχήμα 18.	Έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πορεία απόκρισης σε βλάβες DNA (DDR) των ινοβλαστών MRC-5 και MRC-5TERT.
Σχήμα 19.	Ανάλυση της απόπτωσης των ινοβλαστών MRC-5 και MRC-5TERT.
Σχήμα 20.	Ανάλυση του σχηματισμού εστιών των ινοβλαστών που υπερεκφράζανε Ha-RasV12 ή/και p53 ^{143ala} .
Σχήμα 21.	Καμπύλες αύξησης των τελομερισμένων ινοβλαστών MRC-5TERT που έφεραν Ha-RasV12 ή/και p53 ^{143ala} .
Σχήμα 22.	Οι επιδράσεις των ογκογονιδίων Ha-RasV12 ή/και p53 ^{143ala} στην αύξηση, στη μορφολογία και στην έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης της κυτταρικής γήρανσης (Sen-β-Gal) στις ινοβλάστες MRC-5TERT.
Σχήμα 23.	Έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στις ινοβλάστες MRC-5TERT P60 που υπερέκφραζαν Ha-RasV12 ή/και p53 ^{143ala} .
Σχήμα 24.	Έκφραση και επιδράσεις της CDC6 στις ινοβλάστες MRC-5TERT P60 που υπερέκφραζαν Ha-RasV12 ή/και p53 ^{143ala} .
Σχήμα 25.	Έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πορεία απόκρισης σε βλάβες DNA (DDR) των ινοβλαστών MRC-5TERT P60.
Σχήμα 26.	Ανάλυση της απόπτωσης των ινοβλαστών MRC-5TERT.
Σχήμα 27.	Κατασκευή και χαρακτηρισμός των ινοβλαστών MRC-5TERT/#p53 P200.
Σχήμα 28.	Ανάλυση του σχηματισμού αποικιών σε ημι-στερεό υλικό ή αύξηση ανεξάρτητης προσκόλλησης των ινοβλαστών MRC-5TERT P60 και P200 που υπερέκφραζαν Ha-RasV12 ή/και p53 ^{143ala} και των MRC-5TERT/#p53 MRC-5TERT/RasV12/#p53.
Σχήμα 29.	Συνοπτική περιγραφή της συνεργειακής δράσης των ογκογονιδίων p53 ^{143ala} και Ha-RasV12 σε φυσιολογικές και τελομερισμένες ινοβλάστες MRC-5.



ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1.	Κυτταρικά ογκογονίδια
Πίνακας 2.	Ογκοκατασταλτικά γονίδια.
Πίνακας 3.	Υλικά.
Πίνακας 4:	Επιδράσεις των ογκογονιδίων στη μορφολογία και στις ιδιότητες αύξησης των φυσιολογικών ινοβλαστών MRC-5.
Πίνακας 5:	Επιδράσεις των ογκογονιδίων Ha-RasV12 ή/και p53 ^{143ala} στις ιδιότητες μετασχηματισμού των φυσιολογικών MRC-5.
Πίνακας 6:	Επιδράσεις των ογκογονιδίων Ha-RasV12 ή/και p53 ^{143ala} στη μορφολογία και στις ιδιότητες αύξησης των τελομερισμένων ινοβλαστών MRC-5TERT
Πίνακας 7:	Επιδράσεις των ογκογονιδίων Ha-RasV12 ή/και p53 ^{143ala} στις ιδιότητες μετασχηματισμού των φυσιολογικών και τελομερισμένων ινοβλαστών MRC-5

