

Διδακτορική Διατριβή



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, Ομάδα Μοριακής
Καρκινογένεσης

Διευθυντής Εργαστηρίου & επικεφαλής ερευνητικής ομάδας: καθ. Βασ. Γοργούλης

Επιβλέπων: καθ. Βασ. Γοργούλης

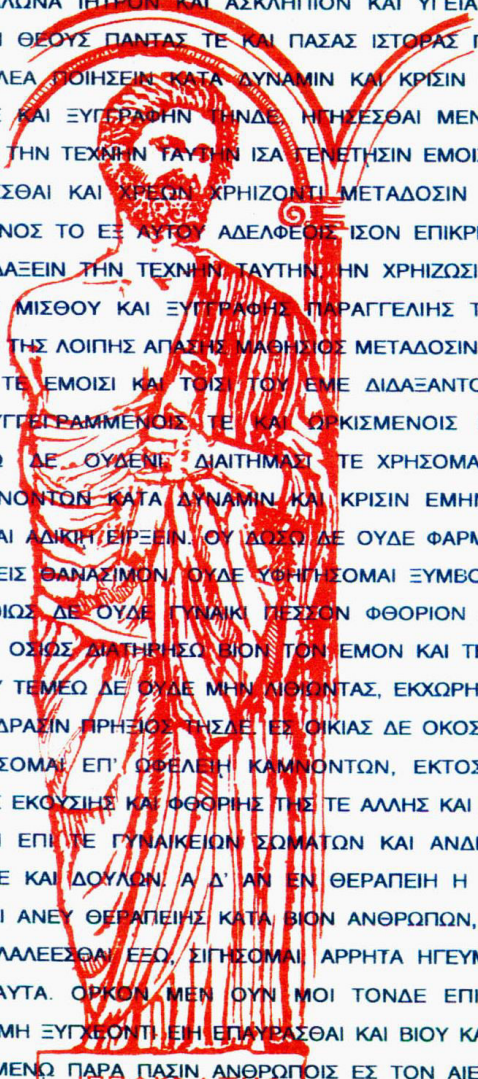
«Διερεύνηση του μηχανισμού δράσης των
ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών
 $p21^{WAF1/CIP1}$ και ARF»

Παναγιώτα Παπανάγνου

Βιοχημικός-Βιοτεχνολόγος

Αθήνα, Ιούνιος 2014

ΙΠΠΟΚΡΑΤΙΚΟΣ ΟΡΚΟΣ ΚΕΙΜΕΝΟ



ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ
ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥ-
ΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΕΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ, ΗΤΗΣΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ
ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΤΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ
ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗ-
ΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΕΩΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ
ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝ-
ΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΕΥΓΓΡΑΦΗΣ ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ
ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΤΗΣ ΜΑΘΗΣΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗ-
ΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ
ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΕΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣ ΤΕ ΚΑΙ ΟΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ
ΙΗΤΡΙΚΩ ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ'
ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ
ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ ΕΙΡΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ
ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΤΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΕΥΜΒΟΥΛΙΗΝ
ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ.
ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΩΣ ΔΙΑΤΗΤΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ
ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΠΟΝΟΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ
ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ ΕΞ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ
ΕΣΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΑ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ
ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟ-
ΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΙΩΝ,
ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ Η ΙΔΩ Η
ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ
ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΠΗΣΟΜΑΙ ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ
ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ
ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΕΥΓΓΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΕΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧ-
ΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟ-
ΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

«Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμών του συγγραφέα.»
(Οργανισμός του Πανεπιστημίου Αθηνών, άρθρ. 202, παρ. 2, Ν. 5343/32)

*Στη μνήμη της Αλεξανδρουπολίτισσας γιαγιάς μου
Αναστασίας Τζίμα,
του πνευματικού μου φάρου*

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου τον κ. Βασίλειο Γοργούλη τόσο για την παροχή της υλικοτεχνικής υποστήριξης όσο και για την διάθεση των εγκαταστάσεων του εργαστηρίου Ιστολογίας-Εμβρυολογίας το οποίο και διευθύνει. Πάνω απ' όλα όμως θέλω να τον ευχαριστήσω που με ενέταξε στην ερευνητική του ομάδα της Μοριακής Καρκινογένεσης και με κατεύθυνε τόσα χρόνια στο πεδίο της έρευνας του καρκίνου. Κοντά του είχα την ευκαιρία να δω την καρκινογένεση από μία εντελώς διαφορετική οπτική από αυτήν που είχα ως νέα βιοεπιστήμονας γιατί κατάφερε με μαεστρία να παντρέψει τη βασική επιστήμη με το κλινικό στοιχείο με το οποίο συχνά δεν είναι εξοικειωμένοι όσοι δεν αποφοιτήσαν από τμήματα Ιατρικής όπως εγώ. Θερμές ευχαριστίες για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της διατριβής εκφράζω και στα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής, τους καθηγητές κ. Παναγιώτη Παναγιωτίδη και κ. Χρήστο Κίττα. Επιπροσθέτως, τον καθηγητή κ. Χρήστο Κίττα τον ευχαριστώ για την παροχή της υλικοτεχνικής υποδομής κατά τα πρώτα χρόνια της εκπόνησης της διατριβής μου, πριν αφυπηρετήσει. Επίσης τον ευχαριστώ για την αρχική παρότρυνσή του να ασχοληθώ μετά την λήψη του πτυχίου με την μοριακή έρευνα του καρκίνου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω σε όλα τα μέλη της ομάδας Μοριακής Καρκινογένεσης για την αγαστή συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια και για την βοήθεια που απλόχερα μου παρείχαν όποτε την ζήτησα. Συγκεκριμένα θέλω να ευχαριστήσω τους Δρ. Μιχάλη Λιόντο και Μαρία Σιδερίδου που συνέδραμαν με την πολυετή εμπειρία τους στις κυτταροκαλλιέργειες και τις διαμολύνσεις καθώς και τον Δρ. Κωνσταντίνο Βουγά για την αμέριστη βοήθειά του κατά την βιοπληροφορική και στατιστική ανάλυση των πρωτεωμικών δεδομένων. Πολύτιμη υπήρξε και η συμβολή στην εφαρμογή των μοριακών τεχνικών του υποψήφιου διδάκτορα Παναγιώτη Γαλανού τον οποίο και ευχαριστώ δημόσια. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή κ. Αθανάσιο Κοτσίνα για την καθοδήγησή του στην ορθή διατύπωση του επιστημονικού λόγου σε μία σειρά εργασιών σχετικών με το αντικείμενο της διατριβής. Τέλος, ευχαριστώ τον Δρ. Ιωάννη Πατέρα που μου παρείχε σε ηλεκτρονική μορφή δημοσιεύσεις στις οποίες δεν είχα πρόσβαση και χρησίμευσαν ως βιβλιογραφικές αναφορές είτε στην διατριβή είτε στα άρθρα που σχετίζονται με αυτήν.

Στοιχεία διατριβής

Ημερομηνία αίτησης υποψηφίου: 20-3-2006

Ημερομηνία ορισμού 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 6-10-2006

Σύνθεση 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 1) Βασ. Γοργούλης (επιβλ.),
2) Χρήστος Κίττας, 3) Παναγιώτης Παναγιωτίδης

Ημερομηνία ορισμού θέματος διατριβής: 22-5-2007

Ημερομηνία κατάθεσης διατριβής στην Γραμματεία της Ι.Σ.Π.Α.: 25-6-2014

Πρόεδρος Ι.Σ.Π.Α.: Μελέτιος Αθανάσιος Δημόπουλος

Σύνθεση 7μελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

1) Βασ. Γοργούλης (Καθηγητής Ι.Σ.Π.Α.-επιβλ.), 2) Χρήστος Κίττας (Ομότιμος Καθηγητής Ι.Σ.Π.Α.), 3) Παναγιώτης Παναγιωτίδης (Καθηγητής Ι.Σ.Π.Α.), 4) Αθανάσιος Κοτσίνας (Επίκουρος Καθηγητής Ι.Σ.Π.Α.), 5) Σοφία Χαβάκη (Λέκτορας Ι.Σ.Π.Α.), 6) Θεόδωρος Τρουπής (Επίκουρος Καθηγητής Ι.Σ.Π.Α.) και 7) Δημήτριος Κλέτσας (Ερευνητής Α', Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος)

Βαθμός με τον οποίο η 7μελής Επιτροπή έκανε αποδεκτή την διατριβή : Άριστα

Βιογραφικό Σημείωμα

Προσωπικά Στοιχεία

Όνομα : Παναγιώτα

Επώνυμο : Παπανάγνου

Όνομα πατέρα : Κωνσταντίνος

Όνομα μητέρας : Χαρίκλεια

Το γένος : Τζίμα

Ημερομηνία γέννησης : 26/05/1983

Τόπος γέννησης : Λάρισα

Διεύθυνση Μόνιμης Κατοικίας : Γιαννιτσιώτη 7, ΤΚ 41222, Λάρισα

ΤΗΛ. : 2410-625430

E-mail : panagiota1983rr@yahoo.com

Σπουδές

2001: Απολυτήριο Λυκείου με βαθμό «άριστα»

2005: Πτυχίο Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας με βαθμό «Λίαν Καλώς» (8,11)

2005: Εκπόνηση Διπλωματικής Εργασίας στην Πνευμονολογική Κλινική του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας με θέμα «Το Οξειδωτικό Στρες στο Σύνδρομο της Άπνοιας κατά τον Ύπνο»

2006-2014 : Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Τμήμα Ιατρικής του Ε.Κ.Π.Α στο γνωστικό αντικείμενο της Μοριακής Καρκινογένεσης με θέμα: «Διερεύνηση του μηχανισμού δράσης των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών p21^{WAF1/CIP1} και ARF »

Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά: Κάτοχος του διπλώματος Proficiency του Michigan & Επάρκειας διδασκαλίας της Αγγλικής Γλώσσας

Γερμανικά : Κάτοχος του διπλώματος Mittelstufe του Goethe Institut

Γνώσεις Η/Υ

Χειρισμός προγραμμάτων-εφαρμογών του Office (Word, Excel, Powerpoint) και του προγράμματος ανάλυσης δεδομένων γονιδιωματικής/πρωτεωμικής Ariadne

Υποτροφίες

2007-2012: Υπότροφος του Ιδρύματος Μποδοσάκη για μεταπτυχιακές σπουδές στην Ελλάδα

Ανακοινώσεις σε Συνέδρια/Workshops

ATM-dependent E2F1 targets in osteosarcoma cells. A genome wide analysis. Michalis Liontos, Katerina Niforou, Panagiota Papanagnou, Georgia Velimezi, Ioannis Trougkos, Athanassios Kotsinas, Doron Ginsberg, Jiri Bartek, Vassilis G Gorgoulis. EMBO Workshop “The Interface Between the Ubiquitin Family and the DNA Damage Response”, Rovinj, Croatia, 1-5 September, 2010. Poster.

Ξενόγλωσσες Δημοσιεύσεις

1. **Zachariades M, Evangelou K, Kastrinakis NG, Papanagnou P, Gorgoulis VG.** Molecular Carcinogenesis. In Key topics in surgical research and methodology. (2010). Springer 1st ed, Chapter 74, pages 975 – 1004.
2. **Kotsinas A, Papanagnou P, Galanos P, Schramek D, Townsend P, Penninger JM, Bartek J, Gorgoulis VG.** MKK7 and ARF: New players in the DNA damage response scenery. *Cell Cycle*. 2014 Apr 15;13(8):1227-36.
3. **Kotsinas A, Papanagnou P, Evangelou K, Trigkas G.C., Kostourou V, Townsend P, Gorgoulis V.G.** (2014). ARF: a versatile DNA damage response ally at the crossroads of development and tumorigenesis. *Frontiers in Cancer Genetics* [doi: 10.3389/fgene.2014.00236].

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

σελ. 13 **Περίληψη**

σελ. 14-84 **A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

σελ. 15-18 A.1. Η p21: μία πολυ-λειτουργική πρωτεΐνη με πολλαπλούς στόχους

σελ. 19-41 A.2. Η p21 και ο κυτταρικός κύκλος

σελ. 19-32 A.2.1. Η p21 ως αρνητικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου και της κυτταρικής αύξησης

σελ. 19-23 A.2.1.1. Ο κρίσιμος ρόλος της αλληλεπίδρασης της p21 με τις CDKs και το PCNA

σελ. 23-25 A.2.1.2. Η p21 στο G1 σημείο ελέγχου

σελ. 26-32 A.2.1.3. Η p21 στο G2 σημείο ελέγχου: αρνητική ρύθμιση του συμπλόκου κυκλίνης B1/CDC2 σε πολλαπλά επίπεδα

σελ. 26-28 A.2.1.3.a. Η p21 αναστέλλει την CAK-μεσολαβούμενη ενεργοποιητική φωσφορυλίωση της CDC2 στην Thr161

σελ. 29-31 A.2.1.3.β. Η p21 προωθεί την πυρηνική παραμονή του συμπλόκου της κυκλίνης B1/CDC2 σε ανενεργό μορφή

σελ. 31-32 A.2.1.3.γ. Η p21 προωθεί την πρωτεασωμική αποικοδόμηση της κυκλίνης B1 και καταστέλλει την μεταγραφή των γονιδίων της κυκλίνης B1 και της CDC2

σελ. 32-41	A.2.2. Η p21 ως θετικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου
σελ. 32-37	A.2.2.1. Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης της p21 από τους E2Fs
σελ. 38-41	A.2.2.2. Η p21 ως παράγοντας συγκρότησης ενεργών συμπλόκων κυκλινών-CDKs
σελ. 38-39	A.2.2.2.a. Ρόλος στην συγκρότηση συμπλόκων της G1 και S φάσης
σελ. 40-41	A.2.2.2.β. Ρόλος στην συγκρότηση συμπλόκων της M φάσης
σελ. 42-47	A.3. Η p21 στην κυτταρική γήρανση
σελ. 42-44	A.3.1. Ο διαφορικός ρόλος της p21 και της p16 στην γήρανση
σελ. 44-47	A.3.2. Η Wig1 είναι κρίσιμος αρνητικός ρυθμιστής της p21-μεσολαβούμενης γήρανσης
σελ. 47-51	A.4. Η p21 στην επιδιόρθωση του DNA
σελ. 52-60	A.5. Ο ρόλος της p21 στην απόπτωση
σελ. 52-58	A.5.1. Η p21 ως αρνητικός ρυθμιστής της απόπτωσης
σελ. 52-54	A.5.1.1. Η p21 ως αρνητικός ρυθμιστής της p53-εξαρτώμενης απόπτωσης
σελ. 54-58	A.5.1.2. Η p21 ως αρνητικός ρυθμιστής της p53-ανεξάρτητης απόπτωσης
σελ. 58-60	A.5.2. Η p21 ως επαγωγέας της απόπτωσης

σελ. 60-65	A.6. Οι αντιφατικοί ρόλοι της p21 στην ογκογένεση
σελ. 60-61	A.6.1. Η έκφραση της p21 στα καρκινικά κύτταρα
σελ. 61-62	A.6.2. Οι ογκοκατασταλτικές ιδιότητες της p21
σελ. 62-65	A.6.3. Οι ογκογενετικές ιδιότητες της p21
σελ. 65-69	A.7. Η p21 στην κυτταρική διαφοροποίηση και στην εμβρυογένεση
σελ. 65-67	A.7.1. Η p21 στην κυτταρική διαφοροποίηση
σελ. 67-69	A.7.2. Η p21 σε οντογενετικές διαδικασίες
σελ. 70-84	A.8. Η πρωτεΐνη ARF και οι κυτταρικές της λειτουργίες
σελ. 70-76	A.8.1. Η ARF στην καταστολή της ογκογένεσης
σελ. 70-71	A.8.1.1. Η ARF συμμετέχει σε πολλαπλά ογκοκατασταλτικά δίκτυα
σελ. 71-76	A.8.1.2. Η ARF επιδεικνύει ογκοκατασταλτικές δράσεις σε αλληλεπίδραση με το μονοπάτι της απόκρισης στη βλάβη του DNA (DDR)
σελ. 71-74	A.8.1.2.α. Το μονοπάτι της απόκρισης στη βλάβη του DNA και η σημασία του για την καρκινογένεση
σελ. 74-76	A.8.1.2.β. Η αλληλεπίδραση της DDR με την ARF
σελ. 76-77	A.8.2. Η ARF στην προστασία κατά της αθηρογένεσης
σελ. 78-79	A.8.3. Η ανοσορυθμιστική δράση της ARF
σελ. 79-81	A.8.4. Η ARF ως αρνητικός ρυθμιστής της rRNA βιοσύνθεσης
σελ. 81-84	A.8.5. Ο ρόλος της ARF στην σπερματογένεση

σελ. 85-126 **B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

σελ. 86-94 B.1. Καλλιέργεια κυττάρων

σελ. 86-87 B.1.1. Κυτταρικές σειρές και χειρισμός των κυττάρων

σελ. 88-92 B.1.2. Διαδικασία κυτταροκαλλιέργειας

σελ. 92-94 B.1.3. Το σύστημα Tet-ON

σελ. 95-100 B.2. Πέψη πρωτεϊνών και σήμανση με τα αντιδραστήρια iTRAQ

σελ. 95-96 B.2.1. Πέψη και σήμανση

σελ. 96-100 B.2.2. Η πρωτεωμική μέθοδος iTRAQ

σελ. 101-102 B.3. Κλασμάτωση πεπτιδίων

σελ. 101 B.3.1. Κλασμάτωση πεπτιδίων μέσω χρωματογραφίας υψηλού-
pH ανάστροφης φάσης

σελ. 101-102 B.3.2. Κλασμάτωση πεπτιδίων μέσω χρωματογραφίας υδρόφιλης
αλληλεπίδρασης

σελ. 102-103 B.4. Φασματομετρική ανάλυση

σελ. 102-103 B.4.1. Ανάλυση LC-MS

σελ. 103-105 B.5. Ανάλυση δεδομένων

σελ. 103-105 B.5.1. Αναζήτηση βάσης δεδομένων για την πρωτεωμική
ανάλυση

σελ. 104-105 B.5.2. Βιοστατιστική και βιοπληροφορική ανάλυση

σελ. 86-99 B.6. Ανάλυση Western blotting (ανοσοστυπώματος)

σελ. 105-108	B.6.1. Βασικές αρχές
σελ. 108-117	B.6.2. Πρωτόκολλο πειραματικής διαδικασίας για χειροποίητα gels
σελ. 117-118	B.6.3. Αντιδραστήρια για το Western blotting
σελ. 119-122	B.7. Ανάλυση ανοσοϊστοχημείας
σελ. 119	B.7.1. Βασικές αρχές
σελ. 120-122	B.7.2. Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας
σελ. 123-124	B.8. Ανάλυση έμμεσου ανοσοφθορισμού
σελ. 123	B.8.1. Βασικές αρχές
σελ. 123-124	B.8.2. Πρωτόκολλο έμμεσου ανοσοφθορισμού
σελ. 124	B.8.3. Αντιδραστήρια ανάλυσης έμμεσου ανοσοφθορισμού
σελ. 125	B.9. Ξενομοσχεύματα και μεταχείριση ζώων
σελ. 125-126	B.10. Παραγωγή λεντιϊών/τιτλοποίηση και μεταγωγή των ξενομοσχευμάτων-όγκων
σελ. 127-159	Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
σελ. 128-145	Γ.1. Αποτελέσματα για την p21 WAF1/CIP1
σελ. 146-159	Γ.2. Αποτελέσματα για την ARF
σελ. 160-182	Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

σελ. 161-176	Δ.1. Συζήτηση επί των αποτελεσμάτων σχετικά με την p21 WAF1/CIP1
σελ. 161-165	Δ.1.1. Η εμπλοκή της p21 Waf1/CIP1 σε μεταβολικά μονοπάτια
σελ. 165	Δ.1.2. Οι επιπτώσεις της έκτοπης έκφρασης της p21 σε επιδιορθωτικούς παράγοντες
σελ. 166-167	Δ.1.3. Η p21 επηρεάζει κινητήριες πρωτεΐνες και υπομονάδες του συμπλόκου της κοντενσίνης
σελ. 167-168	Δ.1.4. Η p21 ασκεί μια αντίστροφη ρύθμιση στην μηχανή αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA και την μιτωτική μηχανή
σελ. 168-173	Δ.1.5. Η εξήγηση της «διπλοπροσωπίας» της p21 στον καρκίνο: πιθανά σενάρια
σελ. 173-176	Δ.1.6. Σύγκριση των πρωτεωμικών δεδομένων με τα ευρήματα προηγούμενων αναλύσεων μεγάλης κλίμακας: ομοιότητες και στοιχεία νεωτερισμού
σελ. 177-182	Δ.2. Συζήτηση επί των αποτελεσμάτων σχετικά με την ARF
σελ. 183-207	Βιβλιογραφία

Περίληψη

Η $p21^{WAF1/CIP1}$ είναι ένας «καθολικός» αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών και παίζει κρίσιμο ρόλο στο μονοπάτι της απόκρισης στην βλάβη του DNA (DDR). Η $p21^{WAF1/CIP1}$ είναι ένα πολυλειτουργικό μόριο ενώ στην καρκινογένεση ο αρχικός της χαρακτηρισμός της ως ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης να αμφισβητείται. Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε ένα επαγωγίμο κυτταρικό σύστημα, το Saos2- $p21^{WAF1/CIP1}$ Tet ON, και διενεργήθηκε ελεύθερη-γέλης πρωτεωμική ανάλυση iTRAQ σε 3 διαφορετικά χρονικά σημεία μετά την επαγωγή της $p21^{WAF1/CIP1}$, δηλ. στις 12, 48 και 96 ώρες, με σκοπό να αποσαφηνιστούν οι ογκογενετικές ιδιότητες της $p21^{WAF1/CIP1}$ που πιθανό να σκιαγραφούνται καλύτερα όταν η έκφραση της $p21^{WAF1/CIP1}$ είναι παρατεταμένη και απουσιάζει η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Η πρωτεωμική ανάλυση ακολουθούμενη από αναλύσεις δεδομένων με την βοήθεια βιοπληροφορικής έδειξε πως ανάμεσα στις περισσότερο επηρεαζόμενες πρωτεΐνες που υφίστανται αυξορρύθμιση και μειορρύθμιση από την $p21^{WAF1/CIP1}$ είναι εκείνες που συμμετέχουν στην αντιγραφή του DNA και την μίτωση, αντίστοιχα. Δεδομένου ότι η απορρύθμιση της αντιγραφικής αλλά και της μιτωτικής μηχανής έχουν συνδεθεί με την πυροδότηση της γενωμικής αστάθειας, τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας προσφέρουν νέα στοιχεία για την ογκογενετική συμπεριφορά της $p21^{WAF1/CIP1}$.

Η ARF (alternative reading frame) από την άλλη, είναι και αυτή όπως η p21 Waf1 μία ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη με πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες. Πρόσφατα βρέθηκε πως υπάρχει μία αλληλεπίδραση του μονοπατιού της ARF με την DDR, συγκεκριμένα την DDR κινάση ATM. Στην παρούσα μελέτη, εφαρμόζοντας μία σειρά μοριακών και *in situ* τεχνικών, αλλά και βιοπληροφορικής διερευνήθηκε η σχέση της ARF με την ATM-σχετιζόμενη κινάση ATR και την MKK7 που είχε δειχθεί πως σταθεροποιεί την p53 σε απόκριση σε ογκογονικά ερεθίσματα. Επιπλέον αναλύθηκαν ξενομοσχεύματα σε ποντίκια για να χαρακτηριστεί η αντι-αγγειογενετική δράση της ARF όταν καταστέλλεται η ATM. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ARF συμμετέχει σε ένα πολυπλοκότερο δίκτυο σχέσεων στην DDR απ' ό,τι ήταν τώρα γνωστό και ότι η καταστολή της ATM μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμα και σε όγκους που δεν εκφράζουν την p53 ως θεραπευτική αντι-αγγειογενετική προσέγγιση μέσω της αυξορρύθμισης της ARF.

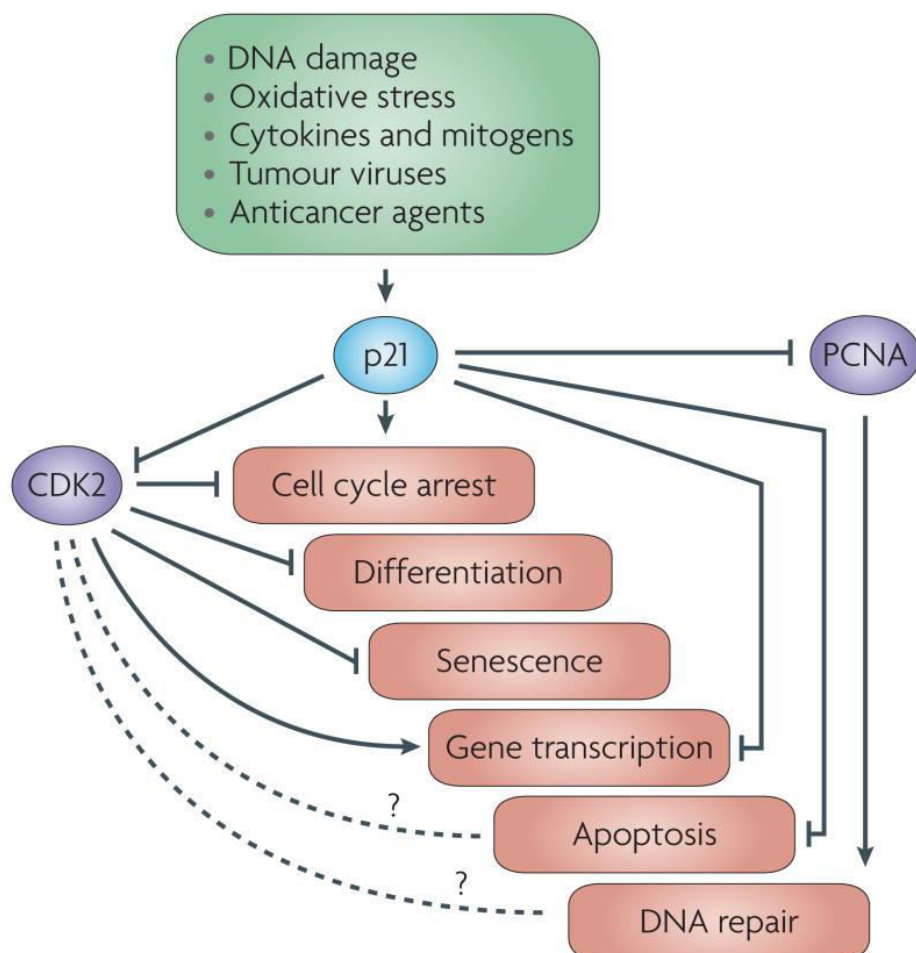
Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1. Η p21: μία πολυ-λειτουργική πρωτεΐνη με πολλαπλούς στόχους

Η p21^{Waf1/Cip1} είναι μία μικρή ρυθμιστική πρωτεΐνη, που παρ' όλο που όπως θα αναλυθεί αναλυτικά στις επόμενες παραγράφους έχει κατά κόρον χαρακτηριστεί βάσει της ιδιότητάς της να προκαλεί παύση του κυτταρικού κύκλου σε απόκριση στην p53 μετά από βλάβη του DNA, είναι πλέον καλά τεκμηριωμένο ότι διαθέτει πολυ-λειτουργικό χαρακτήρα αποκρινόμενη σε πλήθος στρεσογόνων ερεθισμάτων (**Εικόνα A1**). Συνεπώς, είναι πιο σωστό να θεωρείται ως μία πρωτεΐνη απόκρισης στο κυτταρικό στρες χωρίς αυτό όμως να σημαίνει ότι δεν λαμβάνει μέρος σε κυτταρικές λειτουργίες απουσία στρεσογόνων μηνυμάτων όπως π.χ. η συγκρότηση συμπλόκων κυκλινών με τις αντίστοιχες κυκλο-εξαρτώμενες κινάσες (cyclin-dependent kinases, CDKs). Ας σημειωθεί, ότι η p21 είναι μία πρωτεΐνη της οποίας η κυτταρική εντόπιση είναι είτε πυρηνική είτε κυτοσολική κατά έναν τρόπο που ελέγχεται από την κινάση AKT (**Zhou et al. 2001**) ενώ τα επίπεδα της ρυθμίζονται σε επίπεδο πρωτεασωμικής αποικοδόμησης από διαφορετικές E3 λιγάσες ουβικουΐτινης ανάλογα την φάση του κυτταρικού κύκλου δηλ. την SCF^{SKP2} (SKP1–CUL1–SKP2) κατά την φάση G1/S και S, την CRL4^{CDT2} κατά την φάση S όταν η p21 είναι προσδεσμένη με το PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ή σε μικρότερη έκταση μετά από ακτινοβολήση πάλι κατά έναν PCNA-εξαρτώμενο τρόπο καθώς και από το σύμπλοκο APC/C^{CDC20} κατά την G2/M μετάβαση (**Abbas and Dutta, 2009**).

Επιπλέον, η p21 είναι γνωστή για την δράση της στην επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης (senescence) καθώς και για την εμπλοκή της σε παθογενετικές διαδικασίες που σχετίζονται με το γήρας όπως η άνοια Alzheimer, η ρευματοειδής αρθρίτιδα (rheumatoid arthritis, RA), η αμυλοείδωση και η αθηροσκλήρωση ή ακόμα με την διαβητική νεφροπάθεια και την ίδια την καρκινογένεση· κάτι το οποίο έρχεται σε αντίθεση με τον επί χρόνια εδραιωμένο ρόλο της p21 σαν ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη. Η p21 έχει συνδεθεί μηχανιστικά με τις παραπάνω παθογένειες είτε μέσω της κυτταροστατικής της δράσης που σχετίζεται με την υπερτροφία των μεσαγγειακών κυττάρων (**Griffin and Shankland, 2004**) είτε κυρίως μέσω της ικανότητάς της να επάγει την έκφραση πρωτεϊνών που λαμβάνουν ενεργό μέρος στην γένεσή τους, όπως η γαλεκτίνη-3 στην αθηροσκλήρωση, η APP (amyloid precursor

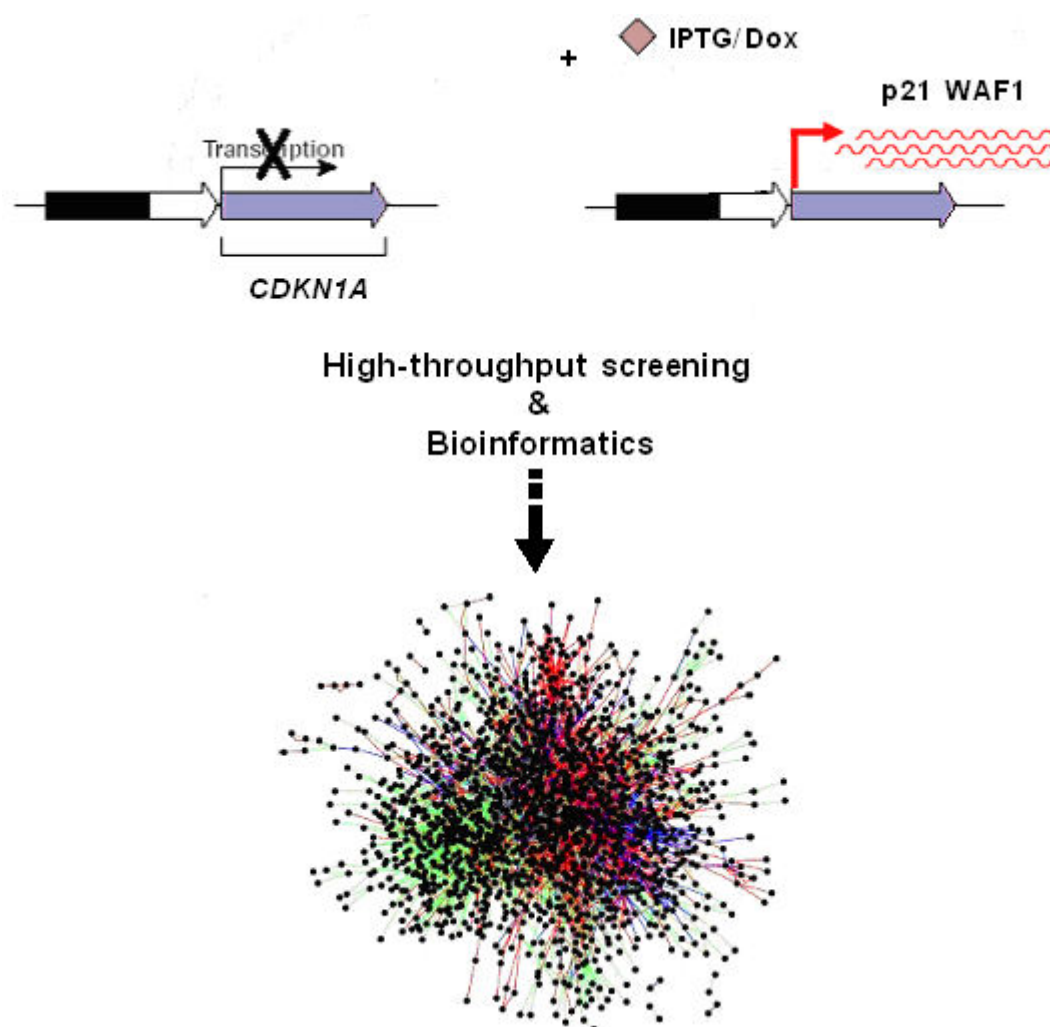
protein) στη νόσο Alzheimer, η καθεψίνη B στην RA, και η tTGάση (tissue transglutaminase) σε νόσους που εμπλέκουν αμυλοείδωση (Chang et al. 2000).



Εικόνα Α1. Η p21 αποκρίνεται σε διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα για να επηρεάσει πλήθος φυσιολογικών κυτταρικών διεργασιών, κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασής της και της ανασταλτικής της δράσης επί της CDK2 και του PCNA (Abbas and Dutta, 2009).

Στην παρούσα μελέτη, θεωρήθηκε ιδιαίτερα ενδιαφέρον να διερευνηθεί το p21-επαγόμενο πρωτέωμα σε μία κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος (Saos-2) που δεν εκφράζει την p53, δεδομένου ότι η p21 α) έχει δειχθεί ότι σε πολλές περιπτώσεις δρα κατά έναν p53-ανεξάρτητο τρόπο, β) η πλειοτροπική δράση της όπως προαναφέρθηκε είναι στενά συνδεδεμένη με τα μόρια-στόχους της και γ) μέχρι τώρα η μόνη μεγάλης

κλίμακας (high-throughput) ανάλυση (**Εικόνα A2**) που έχει πραγματοποιηθεί σε απόκριση στην p21 είναι σε επίπεδο τρανσκριτώματος (**Chang et al. 2000**) με μόνο μία προκαταρκτική μελέτη του p21-επαγόμενου πρωτεώματος που απέδωσε λίγα δεδομένα (**Kraljevic et al. 2006**) και μία άλλη που αφορούσε αποκλειστικά τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες που επάγονται σε απόκριση στην p21 ή αλλιώς το p21-επαγόμενο «σεκρίτωμα» (secretome) από την ίδια ομάδα που διενήργησε και την τρανσκριπτομική ανάλυση (**Currid et al. 2006**).



Εικόνα A2. Σχηματική επισκόπηση του πειραματικού σχεδιασμού που μπορεί να ακολουθηθεί για την διερεύνηση των p21-μεσολαβούμενων ποσοτικών αλλαγών σε μεγάλη κλίμακα (πρωτεωμική ή τρανσκριπτομική) και την κατασκευή των σηματοδοτικών δικτύων των πρωτεϊνών που ταυτοποιούνται ως στόχοι της p21. (Τροποποιημένο από www.clontech.com και <http://www.heribert-hirt.info/publications.htm>).

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ένα επαγωγίμο σύστημα τετρακυκλίνης στα p53^{-/-} κύτταρα Saos-2, το Saos-2 p21 Tet ON, στο οποίο παρουσία του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη εκφράζεται εκτοπικά η p21 και εφαρμόστηκε για πρώτη φορά ανάλυση του p21-επαγόμενου πρωτεώματος με την ελεύθερη γέλης (gel-free) πρωτεωμικής τεχνικής iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation) σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά την επαγωγή. Τα αποτελέσματα, όπως θα παρουσιαστούν και θα σχολιαστούν παρακάτω, επιβεβαίωσαν τον πολυ-λειτουργικό χαρακτήρα της p21 πέραν της δράσης της ως αναστολέα των CDKs και μάλιστα, προσέφεραν νέα πειραματικά τεκμήρια για την ογκογενετική δράση αυτής της «ογκοκατασταλτικής» πρωτεΐνης.

Είναι αναγκαίο όμως αρχικά να παρουσιαστούν τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα για την p21 σε σχέση με τις διάφορες λειτουργίες στις οποίες λαμβάνει μέρος όπως ο κυτταρικός κύκλος, η επιδιόρθωση, η γήρανση, η απόπτωση, η κυτταρική διαφοροποίηση και η οντογένεση αλλά και η καρκινογένεση· κάτι το οποίο γίνεται αναλυτικά στις παραγράφους που ακολουθούν.

A.2. Η p21 και ο κυτταρικός κύκλος

A.2.1. Η p21 ως αρνητικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου και της κυτταρικής αύξησης

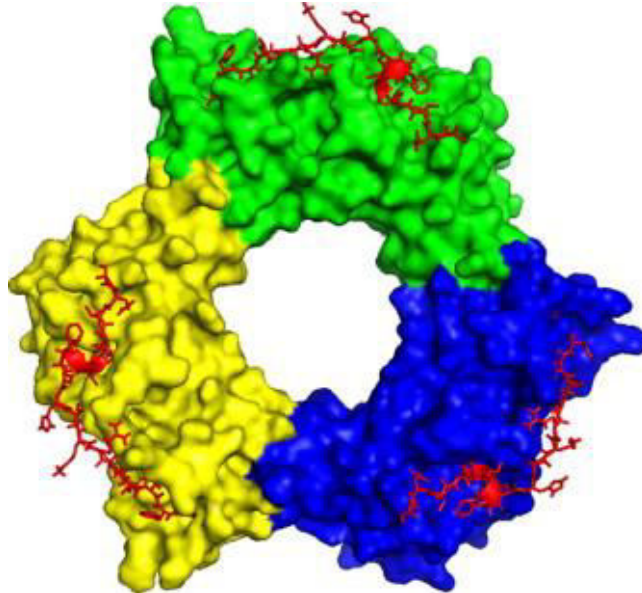
A. 2. 1. 1. Ο κρίσιμος ρόλος της αλληλεπίδρασης της p21 με τις CDKs και το PCNA

Η p21 ή όπως αλλιώς αναφέρεται p21^{Cip1/WAF1/Sdi1} είναι ένας αναστολέας όλων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (universal CDKI) η οποία ανήκει στην οικογένεια των αναστολέων Cip/Kip και προκαλεί την παύση του κυτταρικού κύκλου αναστέλλοντας με μη ειδικό τρόπο την δραστηριότητα των CDKs που είναι ειδικές για την G1 και S φάση. Ανακαλύφθηκε στις αρχές του '90 σαν i) μία p53-επαγόμενη πρωτεΐνη (wild-type p53-activated factor 1, WAF1, **el-Deiry et al. 1993**) που αναστέλλει την κυτταρική αύξηση, η οποία ii) αλληλεπιδρά με την Cdk2 όπως έδειξαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης (Cdk-interacting protein, Cip1, **Harper et al. 1993**) και iii) της οποίας η έκφραση αυξάνεται κατά την υιοθέτηση του φαινοτύπου της γήρανσης και σχετίζεται με την απώλεια της ικανότητας των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται (senescent cell-derived inhibitor, Sdi1, **Noda et al. 1994**).

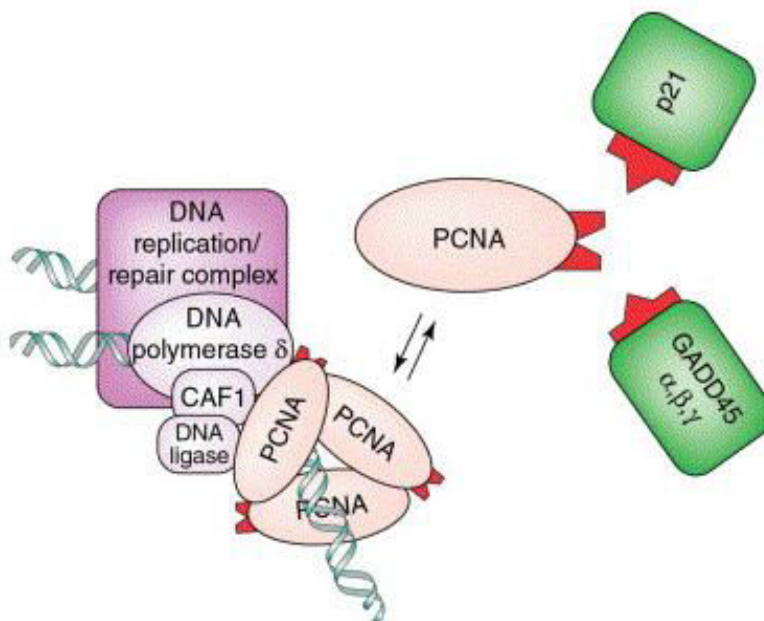
Δομικά, η p21 πρωτεΐνη διαθέτει δύο διακριτές δομές· μία αμινο-τελική περιοχή που είναι κρίσιμη για την ικανότητά της να αναστέλλει τις CDKs και μία ξεχωριστή PCNA (proliferating-cell nuclear antigen)-προσδένουσα περιοχή που βρίσκεται στο καρβοξυ-τελικό της άκρο. Η πρόσδεση του PCNA από αυτήν την C-τελική περιοχή μεσολαβείται από 20 κατάλοιπα αμινοξέων που επαρκούν για να την αναστολή της αντιγραφής του DNA του SV40 *in vitro* (**Warbrick et al. 1995**), με τα αμινοξέα QTSMTDFY που βρίσκονται στις θέσεις 144-151 της πρωτοταγούς ακολουθίας της p21 να είναι κρίσιμα (**Εικόνα A3.A**). Το PCNA διαθέτει μία τρισδιάστατη πτύχωση «δακτυλιδιού» και χρησιμεύει για την DNA πολυμεράση δ ως «συνδετήρας» με την βοήθεια του οποίου γλιστράει πάνω στο DNA, καθώς το PCNA περιβάλλει το DNA-υπόστρωμα, προσδένοντας την πολυμεράση επάνω του (**Εικόνα A3.B**), με παρόμοιο τρόπο με την ομόλογη πρωτεΐνη του *E. coli* γνωστή ως β συνδετήρας (beta clamp).

Έτσι, το PCNA είναι αναγκαίο για την ενίσχυση της κατάλυσης της DNA πολυμεράσης δ και για την αντιγραφή του γενόματος κατά την φάση S του κυτταρικού κύκλου.

A



B



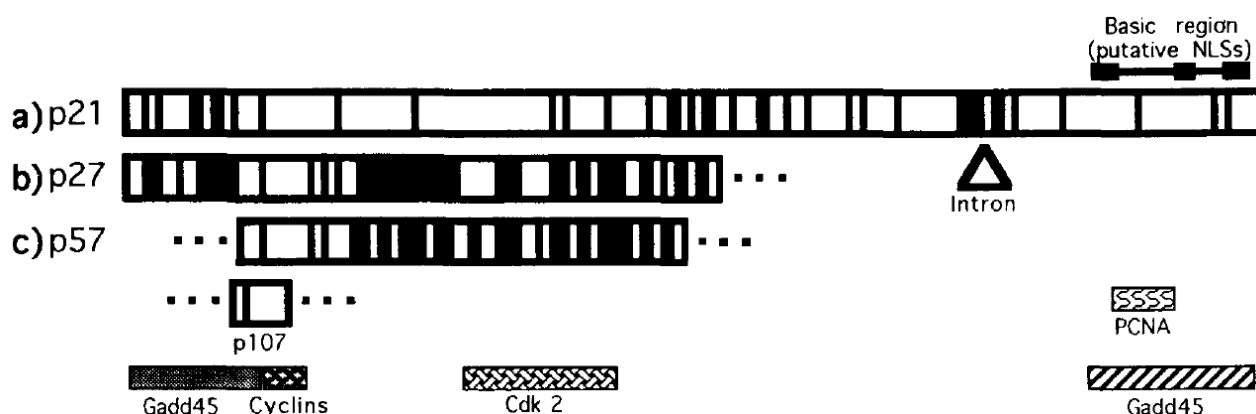
Εικόνα A3. (A) Κρυσταλλογραφία ακτίνων X της δομής του ανθρώπινου PCNA σε σύμπλοκο με ένα πεπτίδιο που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 139-160 της ανθρώπινης p21. Κάθε μονομερές του PCNA (πράσινο, κίτρινο και μπλε) προσδένει

ένα πεπτίδιο p21 (κόκκινο). Στην αλληλεπίδραση με την p21 εμπλέκεται μία κεντρική θηλιά διασύνδεσης των δύο λοβών του κάθε PCNA μονομερούς. Αυτή η κεντρική θηλιά του PCNA επίσης προσδένεται από την C-τελική δομή της 3^{ης} υπομονάδας της DNA πολυμεράσης δ, την p66, η οποία ανταγωνίζεται με την p21 για πρόσδεση στην ίδια περιοχή του PCNA. Αυτό το 3-D μοντέλο έγινε με το πρόγραμμα PyMol. Ο προκαρυωτικός β συνδετήρας έχει παρόμοια στερεοδιαμόρφωση μόνο που σε αυτήν την περίπτωση πρόκειται για δύο υπομονάδες με τρεις λοβούς η κάθε μία. **(B)** Αναπαράσταση της «περικύκλωσης» του DNA από το δακτυλίδι του PCNA για την διεκπεραίωση είτε της αντιγραφής είτε της επιδιόρθωσης και της ανταγωνιστικής αλληλεπίδρασης του PCNA στην μονομερή ή τριμερή δακτυλιοειδή μορφή του από την p21 ή τις ισομορφές GADD45. Ας αναφερθεί πως στα σημεία αντιγραφής ή βλάβης του DNA, το PCNA αλληλεπιδρά με την υπομονάδα p150 της σιαπερόνης ιστονών CAF1 (chromatin assembly factor 1) κι αυτή η αλληλεπίδραση έχει συσχετισθεί με την διατήρηση των επιγενετικών αλλαγών του νεοσυντιθέμενου DNA και με την επεξεργασία της χρωματίνης που έχει υποστεί βλάβη (**Bozza et al. 2012; Feng et al. 2002**).

Οι προαναφερθέντες δομές της p21 είναι ικανές να αναστείλουν την αντιγραφή του DNA ανεξάρτητα η μία από την άλλη, με αποτέλεσμα η p21 να επιδεικνύει έναν διττό τρόπο δράσης στην παρεμπόδιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (**Luo et al. 1995**). Συνολικά, το N-τελικό άκρο της p21 που αλληλεπιδρά με τις κυκλίνες (κυκλίνη A1, E και D1) και τις CDKs (CDK2, CDK4, CDK6 και CDK3) μαζί με το C-τελικό άκρο που αλληλεπιδρά με το PCNA επιδεικνύουν ανασταλτική δράση για την κυτταρική αύξηση μέσω της αρνητικής ρύθμισης της G1-S μετάβασης και της αντιγραφής του DNA (**Harper et al. 1995; Waga et al. 1994; Li et al. 1994; Flores-Rozas et al. 1994; Lin et al. 1996; Luo et al. 1995**).

Είναι ενδιαφέρον πως τα N-τελικά κατάλοιπα αμινοξέων 21-26 της p21 που εμπλέκονται στην πρόσδεση των κυκλινών D1 και E είναι εξελικτικά συντηρημένα και στις πρωτεΐνες CDKIs με παρόμοια με αυτήν της p21 λειτουργία, τις p27^{Kip1} and p57^{Kip2} (**Lin et al. 1996**), οι οποίες συγκαταλέγονται με την p21 στην ίδια ομάδα CDKIs αυτήν της οικογένειας CIP (**Εικόνα A4**). Θα πρέπει να σημειωθεί πως μία άλλη επαγόμενη από την βλάβη του DNA και την p53 πρωτεΐνη, η GADD45 (growth arrest and DNA damage), επίσης προσδένεται στο PCNA αλλά και στην p21 και

ανταγωνίζεται την αλληλεπίδραση μεταξύ της p21 και του PCNA (**Εικόνα A3.B**). Σε αντίθεση όμως με την GADD45, οι πρωτεΐνες p27^{Kip1} και p57^{Kip2} δεν αλληλεπιδρούν με το PCNA, καθώς στερούνται μίας PCNA-προσδένουσας δομής.

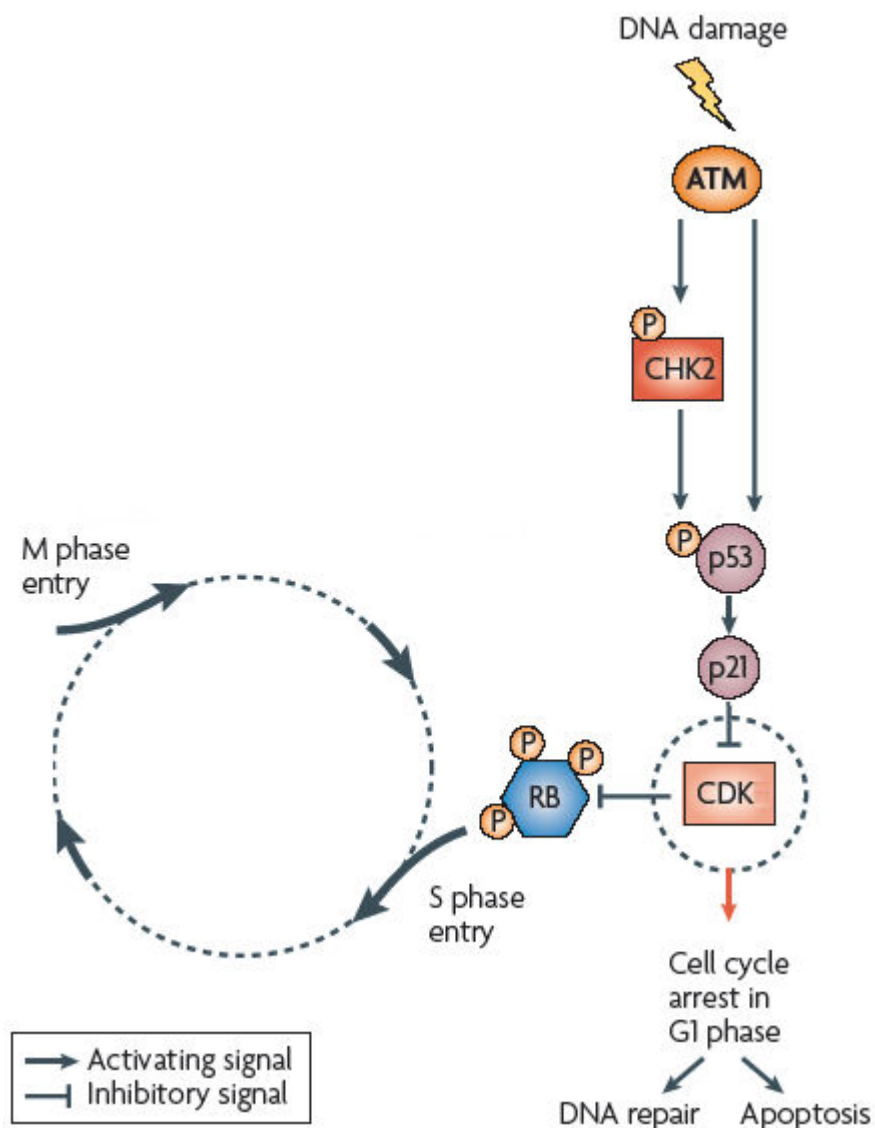


Εικόνα A4. Αρχιτεκτονική οργάνωση της p21 και σχηματική ομοπαράθεση της ανθρώπινης p21 με την p21 ποντικού (a), και τα άλλα ανθρώπινα μέλη της οικογένειας *CIP*, την p27 (b), και την p57 (c). Τα διαφορετικά αμινοξέα υποδεικνύονται από μαύρο και οι λευκές ενώ η ομοιότητα στο κατάλοιπο αμινοξέος αναπαρίστανται με λευκό. Με μπάρες υποδεικνύονται οι περιοχές αλληλεπίδρασης της p21 με τα μόρια PCNA, Gadd45, Cdk2, και τις κυκλίνες, καθώς και η C-τελική περιοχή. Τα πιθανά σήματα πυρηνικού εντοπισμού που περιέχουν βασικά αμινοξέα υποδεικνύονται από μικρά κουτάκια ενώ ένα τρίγωνο χρησιμοποιείται για να οριοθετήσει το 2^ο από το 3^ο εξόνιο. Επιπλέον, στην πολλαπλή ομοπαράθεση περιλαμβάνεται και το μέλος της Rb οικογένειας p107 που όπως φαίνεται διαθέτει μία περιοχή ομολογίας με την p21, μέσω της οποίας αλληλεπιδρά με τα σύμπλοκα των κυκλινών A/Cdk2 ή E/Cdk2. Συνεπώς η αλληλεπίδραση αυτών των συμπλόκων με την p21 και με την p107 είναι αμοιβαία αποκλειόμενα γεγονότα (**Gartel et al. 1996b**).

Πιο πρόσφατα, δείχθηκε πως η p21 όχι μόνο επάγει την G1 παύση σε απόκριση σε γενωτοξικό ερέθισμα αλλά είναι επιπλέον αναγκαία για την διατήρηση στην παύση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2, προωθώντας την πρωτεασωμική αποικοδόμηση της κυκλίνης B1 (Gillis et al. 2009) και αναστέλλοντας την CDK1 (Bunz et al. 1998) ενώ υπό συνθήκες απώλειας της δραστηριότητας της CDK2 και παρουσία της p53, η p21-μεσολαβούμενη αναστολή της CDK1 φαίνεται να έχει αναπληρωματικό ρόλο στην επιβολή του G1/S σημείου ελέγχου (Satyanarayana et al. 2008). Επιπλέον, η έκφραση και του γονιδίου που κωδικοποιεί την CDC2 (CDK1) και εκείνου που κωδικοποιεί την κυκλίνη B1 καταστέλλεται από την p21 (Chang et al. 2000) και έως εκ τούτου, η κατιούσα ρύθμιση της έκφρασης των συμπλόκων κυκλινών-CDKs είναι ένας επιπρόσθετος ανεξάρτητος των άλλων μηχανισμός μέσω του οποίου η p21 επιτυγχάνει την κυτταρόσταση.

A.2.1.2. Η p21 στο G1 σημείο ελέγχου

Η p21, ως συνιστώσα του p53-p21 μονοπατιού απόκρισης στην βλάβη του DNA (Εικόνα A5), επάγεται μετά από γενωτοξικό ερέθισμα για να προκαλέσει G1 παύση τόσο **α)** μέσω της δράσης της ως αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cyclin-dependent kinase inhibitor, CDKI) CDK2 και CDK4/CDK6 που συμπλοκοποιούνται με τις G1 κυκλίνες· την κυκλίνη E και τις κυκλίνες τύπου D (D1, D2 και D3), αντίστοιχα (Dulić et al. 1994; Xiong et al. 1993), αλλά και **β)** μέσω της ανασταλτικής του αλληλεπίδρασης με το PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (Cayrol et al. 1998). Μηχανιστικά, η p21 παρεμβαίνει στην αλληλεπίδραση κυκλινών:CDKs μέσω δύο μοτίβων Cy₁ και Cy₂ (cyclin-binding motif 1/2) στο N-τελικό και C-τελικό της άκρο, αντίστοιχα, καθώς και μέσω μίας θέσης πρόσδεσης στις CDKs στο N-τελικό άκρο (Chen et al. 1996). Καθώς τα υποστρώματα των CDKs, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών της οικογένειας Rb χρησιμοποιούν παρόμοια Cy μοτίβα για την πρόσδεσή τους στα σύμπλοκα κυκλινών/CDKs, η αλληλεπίδραση CDKs:υποστρωμάτων αναστέλλεται (Zhu et al. 1995; Shivanov et al. 1996; Saha et al. 1997).



Εικόνα Α5. Το ATM-p53-p21 μονοπάτι στο G1 σημείο ελέγχου. Σε απόκριση σε γενωτοξικούς παράγοντες (γ-ακτινοβολία, χημειοθεραπευτικά) η ATM κινάση ενεργοποιείται και είτε άμεσα, είτε έμμεσα μέσω της κινάσης Chk2 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την πρωτεΐνη p53. Αυτή είναι ένας τετραμερής μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιεί μεταγραφικά το γονίδιο *CDKN1A* (ή *CIP1*) που κωδικοποιεί την p21. Η p21 με την σειρά της, ως αναστολέας των κυκλοεξαρτώμενων κινασών της G1 φάσης (CDK2 και CDK4/CDK6) συντελεί στην παύση του κυτταρικού κύκλου στην G1 ώστε το κύτταρο να μπορέσει να επιδιορθώσει τις βλάβες του γενώματός του. Η αποτροπή της εισόδου στην φάση S σχετίζεται μηχανιστικά με την αναστολή της CDK-μεσολαβούμενης υπερφωσφορυλίωσης της pRb που είναι αναγκαία για την αποδέσμευσή της από τον παράγοντα E2F και την

πυροδότηση της μεταγραφής γονιδίων τα οποία προωθούν την G1/S μετάβαση. Εάν ωστόσο οι βλάβες είναι εκτεταμένες και μη επιδιορθώσιμες, το τελικό αποτέλεσμα μπορεί να είναι η απόπτωση. Η παύση στην G1 από την p21 σχετίζεται και με την ανασταλτική της δράση στο PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ενώ η p21 παίζει σημαντικό ρόλο και στο G2 σημείο ελέγχου κι επιπλέον οι p21 και p53 μπορούν να λειτουργήσουν και ανεξάρτητα η μία από την άλλη, αλλά για λόγους ευκρίνειας οι μηχανισμοί αυτοί δεν απεικονίζονται εδώ **(τροποποιημένο από Lapenna and Giordano, 2009)**.

Κατά συνέπεια, έχει δειχθεί πως απουσία της p21 το G1 σημείο ελέγχου καταρρέει είτε είναι απλά δυσλειτουργικό, ανάλογα με την κυτταρική σειρά. Χαρακτηριστικά, στα HCT116 κύτταρα που προέρχονται από ανθρώπινο καρκίνωμα του παχέος εντέρου και διαθέτουν ακέραιη την p53, η ομόζυγη απαλοιφή της p21 συντελεί στην πλήρη κατάρρευση του G1 σημείο ελέγχου μετά από έκθεση των κυττάρων σε γ-ακτινοβολία. Έτσι, στις 24 ώρες μετά από ακτινοβολήση με 6 Gy, τα μεν p21^{+/+} HCT116 κύτταρα διαθέτουν έναν πληθυσμό στην S φάση που δεν ξεπερνάει το 18%, τα δε p21^{-/-} HCT116 κύτταρα διαθέτουν ένα κλάσμα στην φάση S που φτάνει έως και το 52% του πληθυσμού τους **(Waldman et al. 1995)**. Αντίθετα, το p21^{-/-} γενετικό υπόβαθρο στους ποντικίσιους εμβρυϊκούς ινοβλάστες (mouse embryonic fibroblasts, MEFs) έχει σαν αποτέλεσμα τα κύτταρα να διατηρήσουν σε κάποιο βαθμό την ικανότητά τους για παύση στο G1 σημείο **(Deng et al. 1995; Brugarolas al. 1995)**.

Ο κρίσιμος ρόλος της p21 στο G1 σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου είναι μία σημαντική πτυχή της ογκοκατασταλτικής της δράσης, δεδομένου ότι το G1 σημείο στην πλειοψηφία των ανθρώπινων καρκίνων είναι δυσλειτουργικό είτε λόγω απενεργοποιητικών μεταλλάξεων στο γονίδιο *TP53* που είναι ανώτερος τελεστής της p21 είτε λόγω μεταλλάξεων στον γενετικό τόπο *RB1* ο οποίος κωδικοποιεί την pRb (πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος) που είναι κατώτερος τελεστής της p21 και ελέγχει την G1/S μετάβαση **(Sherr and McCormick, 2002)**.

A.2.1.3. Η p21 στο G2 σημείο ελέγχου: αρνητική ρύθμιση του συμπλόκου κυκλίνης B1/CDC2 σε πολλαπλά επίπεδα

A.2.1.3.a. Η p21 αναστέλλει την CAK-μεσολαβούμενη ενεργοποιητική φωσφορυλίωση της CDC2 στην Thr161

Κατά την μεσόφαση, η καταλυτική υπομονάδα του ‘MPF’ (mitosis-promoting factor), δηλ. του συμπλόκου κυκλίνης B1/CDC2 (CDK1) που χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά στον Xenopus – η CDC2 – διατηρείται στην ανενεργό της μορφή μέσω των ανασταλτικών φωσφορυλίωσών της στα κατάλοιπα Tyr14 και Tyr15 (**Berry and Gould, 1996**) που καταλύονται από τις κινάσες Wee1 και Myt1. Όταν κατά την πρόφαση η φωσφατάση CDC25C μετατοπίζεται στον πυρήνα, αποφωσφορυλιώνει τα κατάλοιπα αυτά ενώ η κινάση CAK (CDK-activating kinase) μεσολαβεί την ενεργοποιητική φωσφορυλίωση της CDC2 στην Thr161 σε μία περιοχή του μορίου γνωστή ως ‘T-θηλειά’ (T-loop) πριν ακόμα η CDC2 σχηματίσει διμερές σύμπλοκο με την κυκλίνη B1 (**Morgan D, 1995; De Smedt et al. 2002**) ώστε να καταστεί καταλυτικά ενεργός. Η πυρηνική μετατόπιση της CDC25C κατά την πρόφαση πυροδοτείται από την Plk1-εξαρτώμενη φωσφορυλίωσή της στην Ser198 εντός ενός σινιάλου πυρηνικής εξόδου (nuclear export signal, NES) (**Toyoshima-Morimoto et al. 2002**). Συνολικά, αυτά τα συμβάντα αποφωσφορυλίωσεων και φωσφορυλίωσης της CDC2 συντελούν στην συγκρότηση του ενεργού διμερούς συμπλόκου κυκλίνης B1/CDC2 στον πυρήνα κατά την πρόφαση και πυροδοτούν την G2/M μετάβαση.

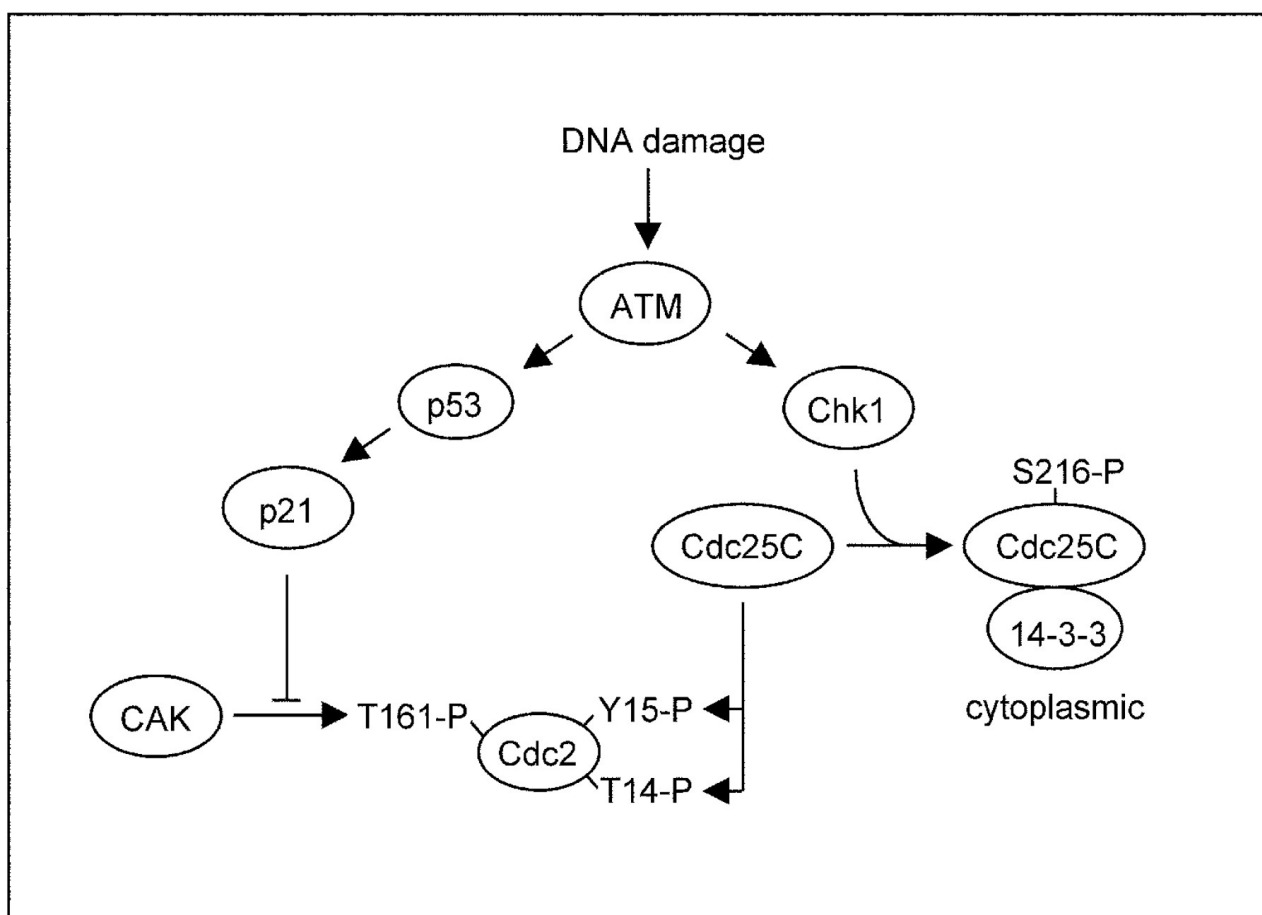
Το μονοπάτι που χρονολογικά ενεργοποιείται πρώτο ως απόκριση στην βλάβη του DNA είναι ο σηματοδοτικός άξονας ATM/R-Chk1-CDC25C ο οποίος καταλήγει στην φωσφορυλίωση της φωσφατάσης CDC25C στο κατάλοιπο Ser216. Με αυτήν την φωσφορυλίωση, δημιουργείται μία θέση ‘ελιμενισμού’ (docking site) επί της CDC25C για τις πρωτεΐνες 14-3-3 οι οποίες και παρεμποδίζουν την πυρηνική μετατόπιση της CDC25C (**Peng et al. 1997**) και επιπλέον, αναστέλλεται και η ενζυμική δραστηριότητα της CDC25C (**Blasina et al. 1999**). Έτσι, αναστέλλεται η CDC25C-εξαρτώμενη αποφωσφορυλίωση και επακόλουθη ενεργοποίηση της CDC2 και μπλοκάρεται η είσοδος στην μίτωση για να αποτραπούν πιθανά λάθη από μία μιτωτική κυτταρική διαίρεση υπό συνθήκες γενωτοξικού στρες.

Η p21 πρωτεΐνη όπως έχουν δείξει πειράματα ανοσοκατακρήμνισης αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο κυκλίνης B1/CDC2 και πιθανόν να το αναστέλλει *in vivo*. Ωστόσο, συγκριτικά με την αγκιστεία που παρουσιάζει η p21 ως προς τα σύμπλοκα κυκλινών/CDKs της φάσης G1 και S, δηλ. τα σύμπλοκα κυκλίνης A/CDK2, κυκλίνης E/CDK2 και κυκλινών D/CDK4-6, η αγκιστεία της p21 ως προς το σύμπλοκο της κυκλίνης B1/CDC2 είναι μικρή (**Harper et al. 1995**) και η άμεση p21-μεσολαβούμενη αναστολή της δραστηριότητας του συμπλόκου της κυκλίνης B1/CDC2 δεν συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στον μηχανισμό με τον οποίο η p21 εμπλέκεται στο G2 σημείο ελέγχου.

Παρ' όλα αυτά, ενώ η p21 έχει κατά κύριο λόγο μελετηθεί για τον ρόλο της στο G1 σημείο ελέγχου, ήδη από τα τέλη της δεκαετίας του '90 ο Bunz με τους συναδέλφους του ανέδειξε τον σημαντικό ρόλο της p21 και στο G2 σημείο ελέγχου. Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε πειραματικά πως για την παρατεταμένη παύση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2 (G2 arrest maintenance) όταν το DNA υποστεί βλάβη, είναι απαραίτητη και η ακεραιότητα της p21 και η ακεραιότητα της p53 που είναι ανώτερος τελεστής της p21 και επάγει την μεταγραφή της υπό συνθήκες γενωτοξικού στρες. Εάν έστω μία από τις δύο αυτές πρωτεΐνες δεν είναι λειτουργική, τότε τα κύτταρα που εκτίθενται σε ιονίζουσα ακτινοβολία (IR) τελικά εισέρχονται στην μίτωση με αποτέλεσμα η αποτυχημένη κυτοκίνηση και ανευπλοειδογένεση να είναι κοινά γεγονότα (**Bunz et al. 1998**).

Με δεδομένο λοιπόν τον σημαντικό ρόλο της p21 στο G2 σημείο ελέγχου, αποδείχθηκε ότι μηχανιστικά η p21 αλληλεπιδρώντας με το σύμπλοκο της κυκλίνης B1/CDC2 συμμετέχει σε αυτό το σημείο ελέγχου με διττό τρόπο: **α)** είτε άμεσα ως αναστολέας της ενζυμικής δραστηριότητας του συμπλόκου είτε **β)** αναστέλλοντας έμμεσα το σύμπλοκο της κυκλίνης B1/CDC2 ερχόμενη σε φυσική επαφή με την CDC2 και παρεμποδίζοντας την CAK-μεσολαβούμενη φωσφορυλίωσή της στην Thr161 που είναι και προϋπόθεση και για την ενεργοποίηση της CDC2 (**Smits et al. 2000a**). Έτσι, συνολικά, προτάθηκε από τον Smits και τους συνεργάτες του ένα μοντέλο (**Εικόνα Α6**) σύμφωνα με το οποίο όταν το κύτταρο αντιμετωπίζει ένα γενωτοξικό ερέθισμα, η ενεργοποίηση της ATM κινάσης που είναι και ο κύριος ρυθμιστής των κυτταρικών αποκρίσεων στην βλάβη του DNA, έχει ως αποτέλεσμα την πυροδότηση δύο κατώτερων μονοπατιών που αναστέλλουν την CDC2

παρεμβαίνοντας στην μετα-μεταφραστική της τροποποίηση δηλ. την (από)φωσφορυλίωση: **α)** το μονοπάτι p53/p21 και **β)** το μονοπάτι Chk1/CDC25C. Το p53/p21 μονοπάτι παρεμποδίζει την ενεργοποιητική φωσφορυλίωση της CDC2, το δε Chk1/CDC25C μονοπάτι παρεμποδίζει την ενεργοποιητική αποφωσφορυλίωση της CDC2, από την κινάση CAK και την φωσφατάση CDC25C, αντίστοιχα. Όπως έχει υπογραμμισθεί από την προαναφερθείσα έρευνα, το μονοπάτι Chk1/CDC25C προηγείται χρονολογικά ως κυτταρική απόκριση στην βλάβη του DNA και έχει ρόλο στην επαγωγή της G2 παύσης ενώ η ενεργοποίηση του μονοπατιού p53/p21 είναι μεταγενέστερη και παίζει ρόλο στην διατήρηση της G2 παύσης.



Εικόνα Α6. Μοντέλο ρύθμισης της (από)φωσφορυλίωσης και της ενεργότητας της κρίσιμης για την G2/M μετάβαση κινάσης, CDC2 , μέσω των μονοπατιών p53/p21 και Chk1/CDC25C ως απόκριση στην ενεργοποίηση της ATM μετά από γενωτοξικό ερέθισμα (Smits et al. 2000a).

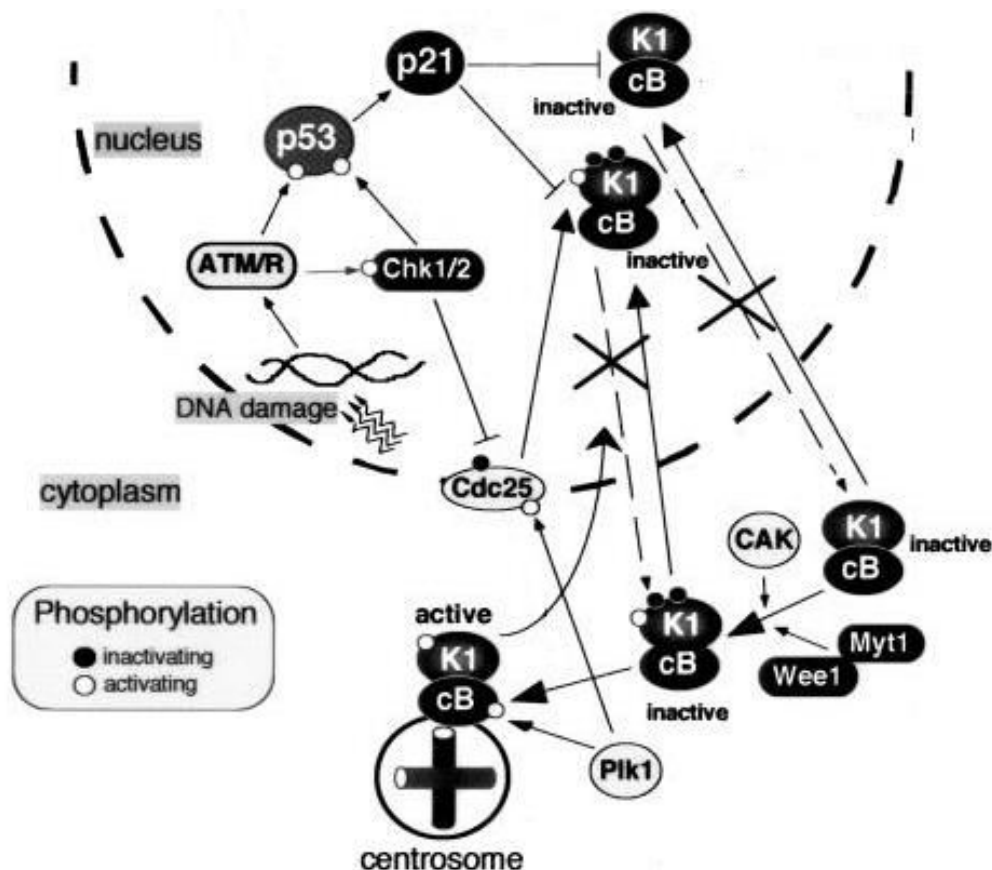
A.2.1.3.β. Η p21 προωθεί την πυρηνική παραμονή του συμπλόκου της κυκλίνης B1/CDC2 σε ανενεργό μορφή

Εκτός από τους προαναφερθέντες μηχανισμούς της p21-μεσολαβούμενης είτε άμεσης είτε έμμεσης αναστολής της δράσης του μιτωτικού συμπλόκου της κυκλίνης B1/CDC2, έχουν περιγραφεί και άλλοι μηχανισμοί αρνητικής ρύθμισης από την p21, με κοινό αποτέλεσμα την αναχαίτιση της εισόδου του κυττάρου στην μίτωση. Στους μηχανισμούς αυτούς, συγκαταλέγεται η p21-εξαρτώμενη παραμονή και παρακώλυση της p21 στον πυρήνα σε μία ανενεργό μορφή υπό συνθήκες γενωτοξικού στρες (**Εικόνα A7**). Συγκεκριμένα, η p21 προσδένεται σε ανενεργά σύμπλοκα κυκλίνης B1/CDC2 που απαντώνται είτε σε υπερφωσφορυλιωμένη μορφή φέροντας τόσο την ενεργοποιητική φωσφορυλίωση στην Thr161 όσο και τις ανασταλτικές φωσφορυλίσεις στις Tyr14 και Tyr15, καθώς και σε μία υποφωσφορυλιωμένη μορφή με κανένα κατάλοιπο της φωσφορυλιωμένο. Σε κάθε περίπτωση, η p21-εξαρτώμενη παρακώλυση του συμπλόκου της κυκλίνης B1/CDC2 έγκειται στην αναστολή της αποφωσφορυλίωσής του από τις CDC25 φωσφατάσες αλλά και στην αποτροπή της κυτοσολικής εντόπισης του συμπλόκου αυτού (**Charrier-Savournin, 2004**).

Το γεγονός αυτό αποκτά ιδιαίτερη λειτουργική βαρύτητα καθώς είναι καλά τεκμηριωμένο ότι πριν την μετατόπισή του στον πυρήνα όπου και ενεργοποιείται πλήρως μέσω της CDC25C-μεσολαβούμενης αποφωσφορυλίωσης των καταλοίπων Tyr14 και Tyr15, το σύμπλοκο κυκλίνης B1/CDC2 αρχίζει να ενεργοποιείται ήδη από το κυτοσόλιο όπου συσσωρεύεται στα κεντροσωμάτια κατά την όψιμη G2 φάση για να επιτελέσει τις μιτωτικές του λειτουργίες πριν από την επιτέλεση των πυρηνικών μιτωτικών του λειτουργιών. Η ενεργοποίηση αυτή συμβαίνει από το στάδιο της πρόφασης μέσω μερικής αποφωσφορυλίωσης της CDC2 σε ένα από τα δύο κατάλοιπα και μέσω της PLK1-μεσολαβούμενης φωσφορυλίωσης της κυκλίνης B1 (**De Souza et al. 2000; Jackman et al. 2003**).

Μετέπειτα έρευνες έδειξαν ότι μία από τις βασικές κυτοσολικές μιτωτικές λειτουργίες του συμπλόκου της κυκλίνης B1/CDC2 είναι η φωσφορυλίωση της κεντροσωμικής πρωτεΐνης Nlp (ninin-like protein) στα κατάλοιπα Ser185 και Ser589, που συντελεί στην PLK1-εξαρτώμενη παρεκτόπιση της Nlp από το κεντροσωμάτιο και στην

πρωτεόλυση της Nip, αντίστοιχα. Τα συμβάντα αυτά βοηθούν το κεντροσωμάτιο να μετατραπεί σε ένα ‘μιτωτικό ικρίωμα’ όπου θα συναρμολογηθεί η μιτωτική άτρακτος και είναι αναγκαία για την επιτυχή ολοκλήρωση της μίτωσης και την αποφυγή της δημιουργίας πολυπύρηνων κυττάρων (Zhao et al. 2010). Επομένως, η p21 με το να παρακρατά το σύμπλοκο της κυκλίνης B1/CDC2 στον πυρήνα σε ανενεργό κατάσταση, είναι αναμενόμενο να παρεμποδίζει την μιτωτική λειτουργία του κεντροσωματίου κι έτσι συμβάλλει καθοριστικά στην διατήρηση μίας μόνιμης G2 παύσης του κυτταρικού κύκλου όταν το κύτταρο έχει υποστεί μη επιδιορθώσιμες βλάβες στο γένωμά του. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως η απόκριση αυτή της πυρηνικής συσσώρευσης ανενεργού συμπλόκου κυκλίνης B1/CDC2 και αναχαίτισης της μίτωσης συμβαίνει μόνο σε φυσιολογικούς ινοβλάστες που εκφράζουν την p21 και όχι σε p21^{-/-} ινοβλάστες ή σε αθανατοποιημένες κυτταρικές σειρές που διατηρούν την ικανότητά τους να εισέρχονται στην μίτωση μετά από βλάβη του DNA.



Εικόνα A7. Ο μηχανισμός της p21-μεσολαβούμενης μόνιμης G2 παύσης. Η p21 προσδένεται τόσο α) σε ανενεργά μη φωσφορυλιωμένα (έλλειψη φωσφορυλίωσης σε

όλα τα κατάλοιπα) είδη του συμπλόκου της κυκλίνης B1/CDC2 στον πυρήνα παρεμποδίζοντας την ενεργοποιητική CAK-εξαρτώμενη φωσφορυλίωσή τους (λευκοί κύκλοι) είτε στον πυρήνα είτε στο κυτοσόλιο αφού προωθείται η πυρηνική τους συσσώρευση όσο και β) σε ανενεργά υπερφωσφορυλιωμένα σύμπλοκα, αναστέλλοντας την πυρηνική CDC25-μεσολαβούμενη ενεργοποιητική αποφωσφορυλίωση στα κατάλοιπα p-Tyr14 και p-Tyr15 (μαύροι κύκλοι). Στο κυτοσόλιο, το σύμπλοκο της κυκλίνης B1/CDC2 εντοπίζεται στα κεντροσωμάτια όπου επιτελεί τις κυτοσολικές μιτωτικές του λειτουργίες και γίνεται στόχος της PLK1 για φωσφορυλίωση. Επιπλέον, η PLK1 κατά την πρόφαση φωσφορυλιώνει την CDC25C προωθώντας έτσι την μετατόπισή της στον πυρήνα όπου και έχει στόχο να ολοκληρώσει την ενεργοποίηση του συμπλόκου της κυκλίνης B1/CDC2, η οποία όμως αναστέλλεται από την p21. Τα μόρια CAK και Wee1 έχουν ταυτόχρονα και πυρηνική και κυτοσολική εντόπιση αλλά για λόγους ευκρίνειας απεικονίζονται μόνο στο κυτοσόλιο (**τροποποιημένο από Charrier-Savournin, 2004**).

A.2.1.3.γ. Η p21 προωθεί την πρωτεασωμακή αποικοδόμηση της κυκλίνης B1 και καταστέλλει την μεταγραφή των γονιδίων της κυκλίνης B1 και της CDC2

Με μία σειρά πειραμάτων δείχθηκε πως στα κύτταρα HCT116 σε απόκριση στην ετοποσίδη που προκαλεί G2 παύση του κυτταρικού κύκλου αλλά και στην ιονίζουσα ακτινοβολία, επάγεται η έκφραση της p21 και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πρωτεολυτική αποικοδόμηση της κυκλίνης B1 από το πρωτεάσωμα. Πιθανόν το αποικοδομητικό αυτό μονοπάτι να μεσολαβείται από το κυκλώσωμα APC/C που διαθέτει δραστηριότητα E3 λιγάσης ουβικουϊτίνης και ρυθμίζει τα επίπεδα της κυκλίνης B1 και σε φυσιολογικές συνθήκες. Η απόκριση αυτή παρεμποδίζεται παρουσία του αναστολέα του πρωτεασώματος MG132. Επιπλέον, ενώ σε κύτταρα HCT116 αγρίου τύπου μετά από την έκθεση σε κάποιο γενωτοξικό παράγοντα που επάγει την p21 μειώνονται τα επίπεδα της κυκλίνης B1 και τα κύτταρα βρίσκονται σε G2 παύση ακόμα και 48 h μετά την βλάβη του DNA, σε κύτταρα HCT116 p21^{-/-} ή p53^{-/-} που δεν γίνεται επαγωγή της έκφρασης της p21 ύστερα από γενωτοξικό στρες, τα επίπεδα της κυκλίνης B1 δεν μειώνονται και από τις 48 h ήδη, τα κύτταρα ξεπερνούν το G2 σημείο ελέγχου, εισέρχονται στην μίτωση και γίνονται πολυπλοειδικά με περιεχόμενο DNA > 4N (**Gillis et al. 2009**). Έτσι φαίνεται πως η p21-μεσολαβούμενη πρωτεολυτική αποικοδόμηση της κυκλίνης B1 είναι ένας

επιπλέον μηχανισμός που μαζί με την ‘παγίδευση’ του συμπλόκου της κυκλίνης B1/CDC2 σε ανενεργό μορφή στον πυρήνα, συντελούν στην παρατεταμένη G2 παύση σε απόκριση στην βλάβη του DNA και αν αυτή είναι μεγάλης έκτασης και μη επιδιορθώσιμη, σε μία μόνιμη G2 παύση δηλ. την κυτταρική γήρανση.

Εκτός όμως από την αποικοδόμηση της κυκλίνης B1, η p21 πιθανόν να στρατολογεί και άλλους μηχανισμούς αρνητικής ρύθμισης του συμπλόκου της κυκλίνης B1/CDC2. Σε αυτό συνηγορούν ευρήματα από μικροσυστοιχίες cDNA που υποδεικνύουν ότι τόσο η κυκλίνη B1 όσο και η CDC2 καταστέλλονται από την p21 σε μεταγραφικό επίπεδο (**Chang et al. 2000**). Επομένως, γίνεται όλο και περισσότερο εμφανές πως η p21 ενορχηστρώνει πολλαπλά μονοπάτια αρνητικής ρύθμισης του συμπλόκου της κυκλίνης B1/CDC2 αφού αυτό αποτελεί τον κομβικό ρυθμιστή της εισόδου στην μίτωση και η p21 έχει πλέον έναν εδραιωμένο ρόλο στο G2 σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.

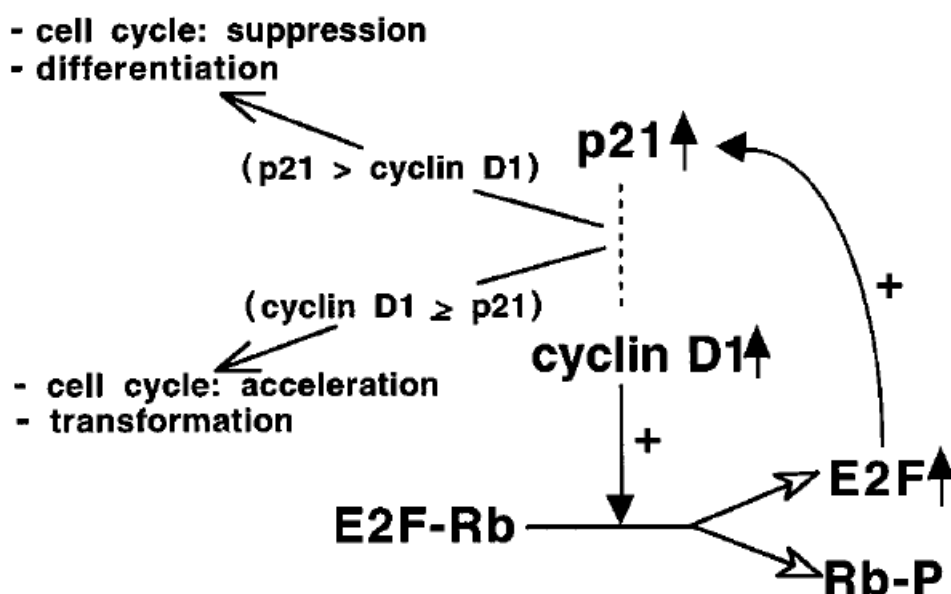
A.2.2. Η p21 ως θετικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου

A.2.2.1. Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης της p21 από τους E2Fs

Η πρωτεΐνη p21, σε πολλά διαφορετικά είδη ανθρώπινων όγκων εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα (**Marchetti et al. 1996; Jung et al. 1995**) και κατά την καρκινογένεση ο γενετικός τόπος *CDKN1A* δεν αποτελεί στόχο «χτυπημάτων» μεταλλαξιγένεσης όπως συμβαίνει με τον *TP53* τόπο που φέρει μεταλλάξεις σε ποσοστό ~50% των ανθρώπινων καρκίνων. Έτσι, η p21 ως συνιστώσα του μονοπατιού DDR (DNA damage response) έχει κυρίως χαρακτηριστεί ως κατώτερος τελεστής της p53 (**Dulić et al. 1994; el-Deiry et al. 1994**) με φυσιολογικό ρόλο να αναστέλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και να παράσχει χρόνο για την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA. Ωστόσο, υπάρχουν πολυάριθμα πειραματικά δεδομένα που καταδεικνύουν όχι μόνο την p53-ανεξάρτητη p21-μεσολαβούμενη σηματοδότηση αλλά και την πολυσχιδή δράση της p21 που ξεπερνάει τα στενά όρια της αρνητικής ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου σε απόκριση στην βλάβη του DNA.

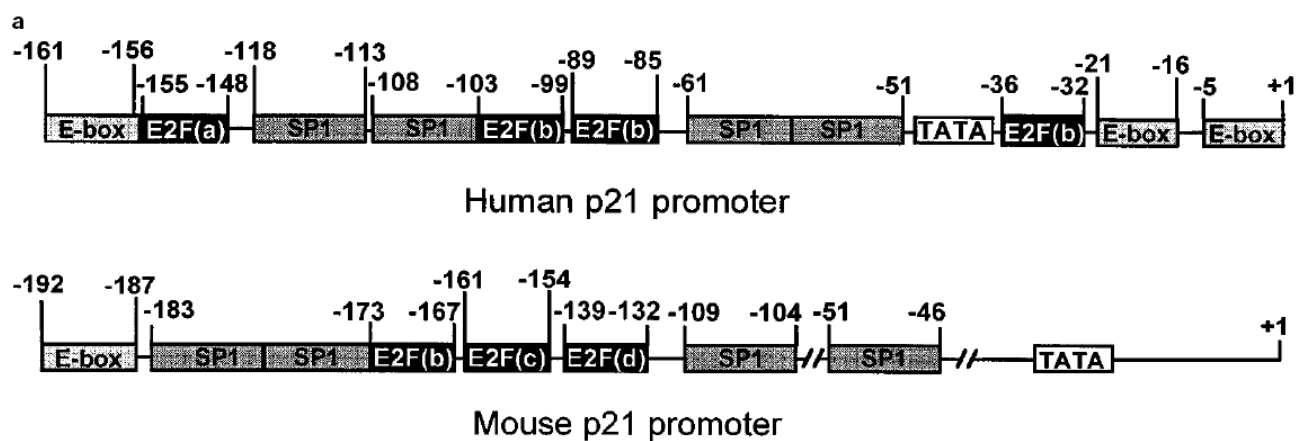
Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η p21 επάγεται μέσω του καταρράκτη των MAPK (mitogen-activated protein kinase) κινασών όταν στα κύτταρα επιδράσει είτε ορός

είτε αυξητικοί παράγοντες σε καθαρή μορφή (Macleod et al. 1995; Liu et al. 1996) και πως κατά παράδοξο τρόπο η p21 σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι απαραίτητη για την συγκρότηση λειτουργικών συμπλόκων κυκλίνης D1/CDK4 και πως η ενεργός CDK4 ανοσοκατακρημνίζεται μαζί με την p21 (LaBaer et al. 1997). Επιπλέον, έχει βρεθεί μία συσχέτιση μεταξύ της έκτοπης έκφρασης της κυκλίνης D1 και της p21, χωρίς αυτό να έχει ως αποτέλεσμα την παύση του κυτταρικού κύκλου (Hiyama et al. 1997). Σύμφωνα με το μοντέλο που προτάθηκε από τον Hiyama και τους συνεργάτες του, η κυκλίνη D1 επάγει την μεταγραφή του p21 γονιδίου κατά έναν E2F-εξαρτώμενο τρόπο, ενώ το κρίσιμο σημείο για την κυτταρική απόκριση αποτελεί η αναλογία κυκλίνης D1: p21. Όταν τα επίπεδα της p21 ξεπερνούν τα επίπεδα της κυκλίνης D1, τότε το αποτέλεσμα είναι η παύση του κυτταρικού κύκλου ή/και η κυτταρική διαφοροποίηση. Αντίθετα, όταν η στοιχειομετρία είναι κυκλίνη D1 $\geq$ p21, τότε δημιουργείται ένα σύμπλοκο κυκλίνης D1/CDK/p21 το οποίο προωθεί τον κυτταρικό μετασχηματισμό (Εικόνα A8).



Εικόνα A8. Ο κρίσιμος ρόλος της στοιχειομετρίας κυκλίνης D1:p21 για την λήψη κυτταρικών αποφάσεων που αφορούν την παύση ή την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, την διαφοροποίηση και τον μετασχηματισμό (Hiyama et al. 1997).

Σε συμφωνία με αυτά τα δεδομένα, από τον Hiyama και τους συνεργάτες του αποδείχθηκε με μία σειρά πειραμάτων που αναφέρονται αμέσως παρακάτω πως η p21 βρίσκεται υπό τον μεταγραφικό έλεγχο των E2Fs. Η έκφραση της p21 κατά τις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου ελέγχεται από τους παράγοντες E2Fs οι οποίοι και προσδένονται σε πολλαπλά E2F μοτίβα-αναγνώρισης. Η απόκριση του γονιδίου της p21 στους E2Fs οφείλεται στην αρχιτεκτονική οργάνωση των υποκινητών τόσο ανθρώπινης όσο και ποντικής προέλευσης: ο ανθρώπινος υποκινητής της p21 περιέχει 1 μοτίβο E2F(a) και 3 μοτίβα E2F(b) που διατρέχουν συνολικά την περιοχή -155/-32 bp πριν από το σημείο έναρξης της μεταγραφής ενώ ο ποντικός υποκινητής p21 περιέχει 3 μοτίβα αναγνώρισης του E2F τα οποία καταλαμβάνουν την περιοχή -173/-132 bp, ονόματι E2F(b), E2F(c) και E2F(d) (Εικόνα A9). Όλα αυτά τα μοτίβα παρουσιάζουν υψηλό ομολογίας με το «μοτίβο ομοφωνίας» πρόσδεσης των E2F παραγόντων (consensus E2F binding motif, cE2F) (Hiyama et al. 1998).

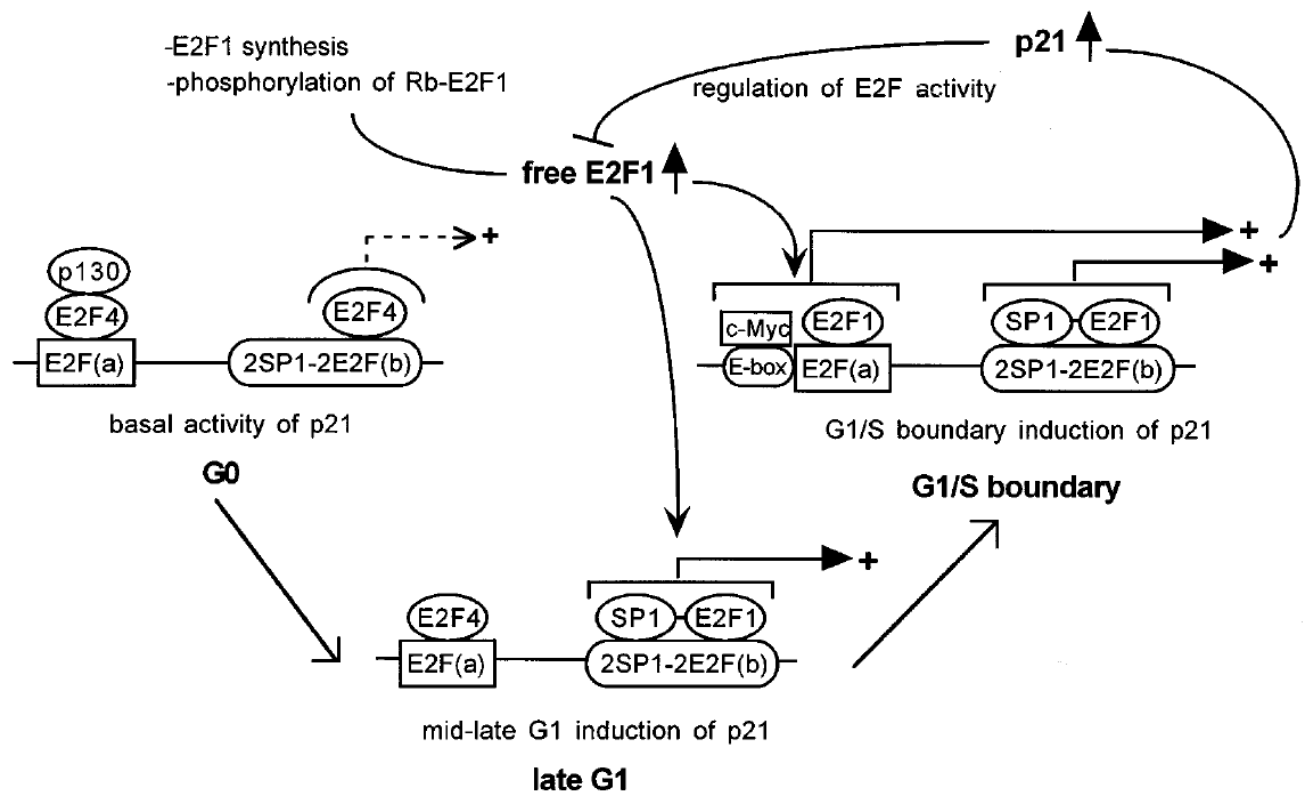




Εικόνα A9. Η «αρχιτεκτονική» οργάνωση του υποκινητή του γονιδίου της p21. Το ανθρώπινο και ποντικίσιο γονίδιο της p21 με τα διάφορα *cis* ρυθμιστικά στοιχεία (a) και (b) διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης E2F που έχουν βρεθεί σε αυτούς τους υποκινητές, συμπεριλαμβανομένης της αλληλουχίας «ομοφωνίας» (consensus E2F, cE2F) και των λοιπών E2F(a-d) αλληλουχιών που παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με την cE2F (τροποποιημένο από Hiyama et al. 1998).

Με την βοήθεια πειραμάτων EMSA (electrophoretic mobility shift assay) σε ανθρώπινα κύτταρα που επώαστηκαν με πυρηνικά εκχυλίσματα είτε **i)** από κύτταρα στην φάση «ηρεμίας» (κύτταρα στην G0) είτε **ii)** από κύτταρα που έχουν διεγερθεί με ορό (κύτταρα στην G1/S), χαρακτηρίστηκε η λειτουργία των μοτίβων αυτών στον ανθρώπινο υποκινητή p21 και προτάθηκε ένα μοντέλο τριών σταδίων (**Εικόνα A10**) για την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης της p21 αλλά και την ρύθμιση που ασκεί με την σειρά της η ίδια η p21 στον E2F1: **α)** κατά την φάση ηρεμίας του κυτταρικού κύκλου (G0) ο παράγοντας E2F4 σε σύμπλοκο με την κατασταλτική πρωτεΐνη p130 (μέλος της οικογένειας του ρετινοβλαστώματος) είναι προσδεδεμένος στο μοτίβο E2F(a) αφήνοντας την έκφραση του γονιδίου της p21 ανεπηρέαστη ενώ ένα μέρος

του ελεύθερου, p130-αδέσμευτου προσδένεται στα μοτίβα E2F(b) και στις παρακείμενες SP1 θέσεις, οι οποίες αναγνωρίζουν τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1. Αυτή η E2F4: E2F(b) και Sp1: SP1 αλληλεπίδραση ασκεί θετική ρύθμιση στα βασικά επίπεδα μεταγραφής της p21. **β)** Κατά το μέσον της G1 φάσης (mid G1) και την όψιμη G1 (late G1), το μεν E2F(a) μοτίβο καταλαμβάνεται από ελεύθερο, ενεργό E2F4, τα δε SP1- E2F(b) μοτίβα καταλαμβάνονται από τον Sp1 και τον ελεύθερο (νεοσυντιθέμενο ή αποδεσμευμένο από την Rb) E2F1, αντίστοιχα, καθώς οι Sp1 και E2F1 παράγοντες αλληλεπιδρούν και δρουν συνεργειστικά κατά την τρανσενεργοποίηση. Αυτά τα μοριακά συμβάντα ωστόσο, δεν επαρκούν για να πυροδοτήσουν την επαγωγή της p21. **γ)** Η τελευταία, λαμβάνει χώρα κατά το μεταίχμιο G1/S όταν πλέον το μοτίβο E2F(a) έχει καταληφθεί από τον ελεύθερο, ενεργό E2F1 αλλά και η παρακείμενη αλληλουχία αναγνώρισης της πρωτεΐνης c-Myc «E-box» καταληφθεί από την c-Myc. Μόνο τότε είναι δυνατή η G1/S μετάβαση (**Hiyama et al. 1998**).



Εικόνα A10. Μοντέλο για την ρύθμιση των βασικών και επαγωγίμων (απουσία γενωτοξικού στρες) επιπέδων της p21. Το μοντέλο αυτό περιλαμβάνει την ρύθμιση της φάσης «ηρεμίας» G0 έως και την G1/S από διαφορετικούς E2Fs (E2F4, E2F1), τον Sp1 και το c-Myc, αλλά και την αρνητική ανατροφοδότηση μεταξύ της p21 και του E2F1 (Hiyama et al. 1998).

Έτσι, κατά την G1/S επάγεται κατά έναν E2F1-εξαρτώμενο τρόπο η p21, η οποία με την σειρά της τόσο υποβοηθά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, όσο και μετέχει σε ένα κύκλωμα αρνητικής ανατροφοδότησης καταστέλλοντας έμμεσα τον E2F1 μέσω του ρόλου της ως αναστολέας κυκλο-εξαρτώμενων κινασών και παρεμποδίζοντας την υπερφωσφορυλίωση της pRb. Σε αυτήν άλλωστε την ανασταλτική δράση της p21 επί του παράγοντα E2F1 και συνεπώς και των E2F1 γονιδίων-στόχων, συμφωνούν και τα ευρήματα πως η έκτοπη έκφραση της p21 καταστέλλει τα επίπεδα των μεταγράφων των E2F1-στόχων ORC1 (origin recognition complex subunit 1) και DHFR (dihydrofolate reductase) που σχετίζονται λειτουργικά με την αντιγραφή του DNA κατά την φάση S (Chang et al. 2000).

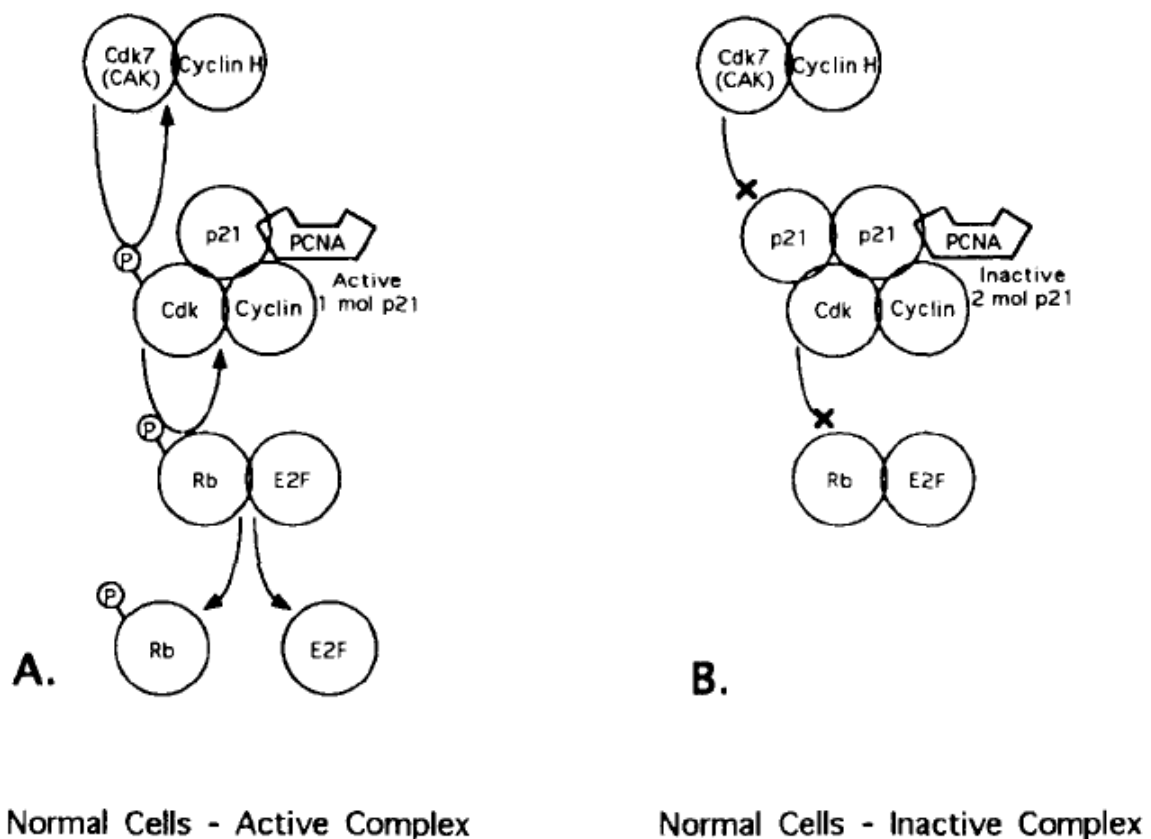
A.2.2.2. Η p21 ως παράγοντας συγκρότησης ενεργών συμπλόκων κυκλινών-CDKs

A.2.2.2.a. Ρόλος στην συγκρότηση συμπλόκων της G1 και S φάσης

Η p21 αλληλεπιδρώντας με τα σύμπλοκα κυκλινών-κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs) που είναι ειδικά για την ρύθμιση της G1 και S φάσης δεν σχετίζεται μόνο με την αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου αλλά και με την συγκρότηση ενεργών συμπλόκων κυκλινών. Σε αυτό συνηγορούν πειραματικά ευρήματα πως στην ενεργό τους μορφή οι CDKs CDK2 και CDC2 (CDK1) ανοσοκατακρημνίζονται με αντίσωμα αντι-p21 ως σύμπλοκα p21/PCNA/cyclin/CDK2 και p21/PCNA/cyclin/CDK1, αντίστοιχα, σε κύτταρα που εκφράζουν ενεργό p53 πρωτεΐνη, όπως οι φυσιολογικοί ανθρώπινοι διπλοειδείς ινοβλάστες και τα κύτταρα RKO αλλά και με αντισώματα αντι-CDK2, αντι-CDK4, αντι-κυκλίνη A και αντι-κυκλίνη B1 (Zhang et al. 1993, 1994; Xiong et al. 1992). Μάλιστα, στους ανθρώπινους αυξανόμενους ινοβλάστες, το μεγαλύτερο κλάσμα των CDKs συνεντοπίζεται με την p21 και το PCNA (Zhang et al. 1993). Αντίθετα, σε κύτταρα LSC041 που προέρχονται από ασθενείς με το σύνδρομο Li-Fraumeni και δεν εκφράζουν την p53 με αποτέλεσμα η p21 να μην είναι καν ανιχνεύσιμη, τα σύμπλοκα που ανοσοκατακρημνίζονται με το αντι-p21 αντίσωμα στερούνται ενζυμικής δραστηριότητας κινάσης (Zhang et al. 1994).

Επομένως, η p21 μαζί με τον παρτενέρ της PCNA, δεν πρέπει να χαρακτηρίζεται ως ‘καθολικός αναστολέας κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών’ (universal CDKI) αλλά πιο σωστά ως ένας ρυθμιστής των συμπλόκων κυκλινών-CDKs και συνεπώς και του κυτταρικού κύκλου, ως παράγοντας συγκρότησής τους (CDK assembly factor) και ως αναπόσπαστη ‘υπομονάδα’ τους κατά έναν τρόπο που εξαρτάται από την στοιχειομετρία της p21 και των κυκλινών-CDKs. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό (Zhang et al. 1994; Gartel et al. 1996b), στην ενεργό τους μορφή τα σύμπλοκα απαντώνται ως τετραμερή p21/PCNA/cyclin/CDK όπου περιέχουν ένα μόνο μόριο p21 ανά σύμπλοκο (Εικόνα A11). Τότε, η κινάση CAK (CDK-activating kinase) είναι ανεμπόδιστη να φωσφορυλιώσει (συνήθως το κατάλοιπο της θρεονίνης 161) την κινάση CDK2 ή CDK4 και CDK6 και να την ενεργοποιήσει. Αντίθετα, όταν η p21 είναι σε περίσσεια (συνθήκες κορεσμού), τότε σχηματίζονται διμερή ανενεργά

σύμπλοκα κυκλίνης/CDKs στα οποία τα >1 μόρια της p21 μαζί με το PCNA αλληλεπιδρώντας με τις κυκλίνες/CDKs παρεμποδίζουν την πρόσβαση της κινάσης CAK στο υπόστρωμά της την CDK με αποτέλεσμα να μην λαμβάνει χώρα η CAK-μεσολαβούμενη ενεργοποιητική φωσφορυλίωση των διαφόρων CDKs και αυτές να παραμένουν στην ανενεργό τους μορφή ως διμερή με τις αντίστοιχες κυκλίνες.

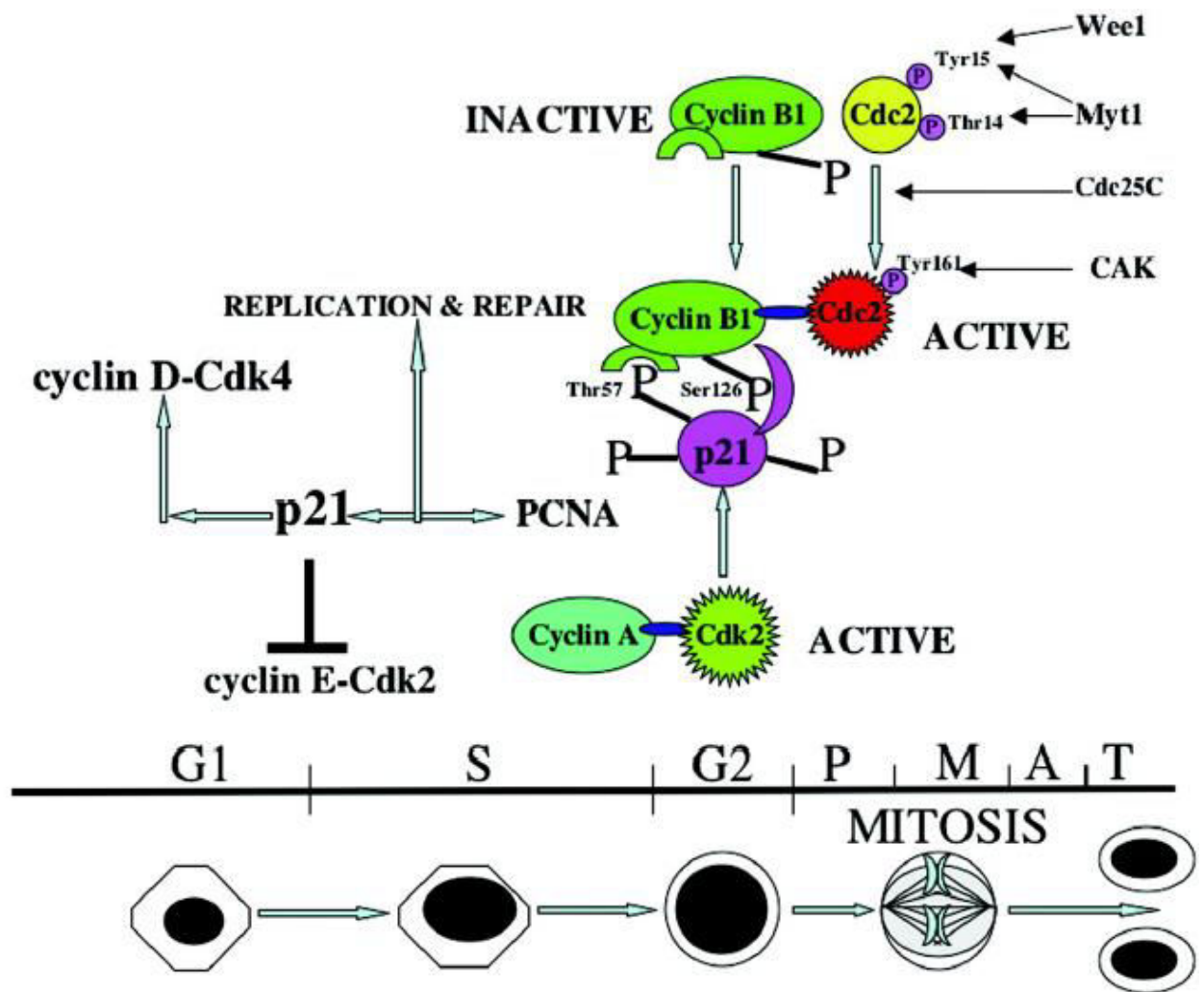


Εικόνα A11. Η στοιχειομετρία p21:σύμπλοκο κυκλίνης-CDK ως καθοριστικός παράγοντας του σχηματισμού ενεργών ή ανενεργών συμπλόκων κυκλίνης-CDK σε φυσιολογικά κύτταρα. Η στοιχειομετρία αυτή είναι κρίσιμη γιατί καθορίζει την ενεργοποιητική φωσφορυλίωση της CDK από το σύμπλοκο της CAK που απαρτίζεται από την κυκλίνη H/CDK7 (Gartel et al. 1996b).

A.2.2.2.β. Ρόλος στην συγκρότηση συμπλόκων της M φάσης

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η p21 ανοσοκατακρημνίζεται με αντισώματα αντι-CDK1 και αντι-κυκλίνη B1 κι επομένως έχει ταυτοποιηθεί ως ‘υπομονάδα’ όχι μόνο συμπλόκων ειδικών για την φάση G1 και S του κυτταρικού κύκλου αλλά και για την φάση G2/M (**Zhang et al. 1993**). Ο θετικός ρόλος της p21 στην συγκρότηση του συμπλόκου κυκλίνης B1/CDC2 (CDK1) έχει προταθεί ως κρίσιμο γεγονός για την G2/M μετάβαση, απουσία γενωτοξικού στρες. Σύμφωνα με το προτεινόμενο μοντέλο (**Εικόνα A12**), η p21 κατά την S/G2 φάση φωσφορυλιώνεται από την CDK2 στην θρεονίνη 57 (T57) και αυτό το γεγονός προωθεί την αλληλεπίδρασή της με την φωσφορυλιωμένη στην σερίνη 126 (S126) κυκλίνη B1. Η δημιουργία του συμπλόκου p21/κυκλίνης B1 λαμβάνει χώρα χρονικά πριν από την CAK-μεσολαβούμενη φωσφορυλίωση στην τυροσίνη 161 (Tyr161) της CDC2 αφού τόσο η κυκλίνη B1 όσο και η p21 δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την CDC2 όταν η Tyr161 δεν είναι φωσφορυλιωμένη. Μόνον μετά την φωσφορυλίωσή της στο κατάλοιπο αυτό της CDC2 δημιουργείται ενεργό σύμπλοκο κυκλίνης B1/CDC2, ενώ η έκφραση αγρίου τύπου p21 είναι αναγκαία προϋπόθεση για την συγκρότηση ενεργών συμπλόκων κυκλίνης B1/CDC2 (**Dash and El-Deiry, 2005**). Ας αναφερθεί ότι η φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο της S126 της κυκλίνης B1 που εντοπίζεται μέσα σε ένα ‘σινιάλο’ πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal, NLS) συμβαίνει από το ίδιο το σύμπλοκο κυκλίνης B1/CDC2 (αυτοφωσφορυλίωση) κι έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της πυρηνικής εξόδου της κυκλίνης B1.

Κατά συνέπεια, σε κύτταρα στα οποία έχει γίνει ομόζυγη απαλοιφή του γονιδίου της p21 (p21 null cells) ή σε κύτταρα που εκφράζουν μεταλλαγμένη μορφή p21 φέροντας την υποκατάσταση T57A, η καταλυτική δραστηριότητα κυκλίνης B1/CDC2 ανιχνεύεται με καθυστέρηση αρκετών ωρών σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκφράζουν αγρίου-τύπου p21, μετά την επίδραση νοκοδαζόλης (**Dash and El-Deiry, 2005**). Επομένως, ανάλογα με την φάση του κυτταρικού κύκλου αλλά και την στοιχειομετρία της, η p21 παίζει είτε θετικό είτε αρνητικό ρόλο στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.



Εικόνα A12. Οι διαφορετικοί ρόλοι της p21 ανάλογα με την φάση του κυτταρικού κύκλου. Απουσία γενωτοξικού στρες, η p21 είναι θετικός ρυθμιστής της προόδου του κυτταρικού κύκλου κατά την G1 φάση υποβοηθώντας την συγκρότηση ενεργών συμπλόκων κυκλίνης D/CDK4 ενώ αντίθετα, παρουσία βλάβης στο DNA, η p21 λειτουργεί ως αναστολέας των συμπλόκων κυκλίνης/CDK της φάσης S. Η p21 έχει επιπλέον θετικό ρόλο κατά την G2/M μετάβαση αφού είναι αναγκαία για την συγκρότηση ενεργών συμπλόκων κυκλίνης B1/CDC2 (Dash and El-Deiry, 2005).

A.3. Η p21 στην κυτταρική γήρανση

A.3.1. Ο διαφορικός ρόλος της p21 και της p16 στην γήρανση

Η κυτταρική γήρανση ορίζεται ως η μη αναστρέψιμη παύση του κυτταρικού κύκλου και έχει μελετηθεί κατά κόρον στους φυσιολογικούς ανθρώπινους διπλοειδείς ινοβλάστες (human diploid fibroblasts, HDFs). Σε καλλιέργεια έχει παρατηρηθεί πως οι HDFs έχουν πεπερασμένη ικανότητα διαιρέσεων και μετά από ~40 διαδοχικές μιτώσεις γηράσκουν σαν αποτέλεσμα της βράχυνσης των τελομερών τους. Το φαινόμενο αυτό, γνωστό και ως φαινόμενο του Hayflick, αφορά την λεγόμενη «αντιγραφική» γήρανση (replicative senescence) (**Hayflick and Moorhead, 1961**). Ωστόσο, η γήρανση μπορεί να επιτευχθεί πρόωρα (premature senescence) ως αποτέλεσμα της έκθεσης των κυττάρων σε στρεσογόνα ερεθίσματα συμπεριλαμβανομένων των ογκογόνων ερεθισμάτων (**Braig and Schmitt, 2006; Halazonetis et al. 2008**). Σε κάθε περίπτωση, υπάρχουν δύο διακριτά, συμπληρωματικά μονοπάτια που σχετίζονται μηχανιστικά με την κυτταρική γήρανση, i) το p53/p21-εξαρτώμενο μονοπάτι με την p21 να μπορεί να ενεργοποιείται είτε με p53-μεσολαβούμενο τρόπο είτε ανεξάρτητα της p53, και το ii) το p16/pRb μονοπάτι (**Campisi J, 2005; von Zglinicki et al. 2005; Kim et al. 2012**). Όπως θα αναλυθεί σε διαφορετική ενότητα, ένας βασικός p53-ανεξάρτητος μηχανισμός ελέγχου της γήρανσης μέσω ρύθμισης της p21 σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο είναι το Wig1-εξαρτώμενο μονοπάτι που περιγράφηκε μόλις πρόσφατα (**Kim et al. 2012**).

Τα σηματοδοτικά αυτά μονοπάτια καταλήγουν στην αναστολή της φωσφορυλίωσης της pRb κι επομένως στην αποτροπή της εισόδου στην φάση S και την αντιγραφή του DNA. Η έξοδος από τον κυτταρικό κύκλο έχει μη αναστρέψιμο χαρακτήρα αλλά η έκτοπη έκφραση ογκοπρωτεϊνών που προσδένονται στην pRb και την αδρανοποιούν όπως το αντιγόνο SV40 T από μόνο του ή σε συνέργεια με την Id-1 (inhibitor of differentiation 1) όταν η pRb-προσδένουσα περιοχή του SV40 T είναι μεταλλαγμένη, μπορεί να επανενεργοποιήσει την αντιγραφή του γενώματος (**Hara et al. 1996**).

Επιπλέον, η σημαντικότητα των προαναφερθέντων σηματοδοτικών οδών για την γήρανση υποδεικνύεται από τα ευρήματα πως η γήρανση παρακάμπτεται σε HDFs που δεν εκφράζουν την p21 (**Brown et al. 1997**) ενώ οι MEFs (mouse embryonic

fibroblasts) που φέρουν απαλοιφή του γενετικού τόπου *INK4A* ο οποίος κωδικοποιεί την p16 επίσης αποτυγχάνουν να γηράσουν (**Serrano et al. 1997**).

Παρ' όλο τον συμπληρωματικό χαρακτήρα των p53/p21-εξαρτώμενων και pRb-εξαρτώμενων μονοπατιών στην κυτταρική γήρανση, είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι η p21 και η pRb παίζουν διαφορετικούς ρόλους σε αυτήν την διαδικασία και σε μηχανιστικό επίπεδο αλλά και σε χρονολογικό επίπεδο. Έχει δειχθεί πειραματικά πως αυτά τα δύο μόρια διαθέτουν διαφορετική κινητική ενεργοποίησης κατά την γήρανση καθώς και διαφορετική φυσιολογική σημασία.

Συγκεκριμένα, κατά την διαδικασία της γήρανσης η p21 συσσωρεύεται σταδιακά με αποτέλεσμα τα κύτταρα να μεταβαίνουν από μία G1 παύση σε μία μόνιμη «απόσυρση» από τον κυτταρικό κύκλο εντός κάποιων ημερών. Αυτή η μόνιμη έξοδος από τον κυτταρικό κύκλο σχετίζεται με πρόσδεση της p21 σχεδόν σε όλα τα σύμπλοκα της κυκλίνης E/Cdk2 και της κυκλίνης D1/Cdk4 ή κυκλίνης D1/Cdk6 κι επομένως μείωση της φωσφορυλίωσης της pRb. Μετά όμως την επαγωγή της γήρανσης, τα επίπεδα της p21 αρχίζουν να φθίνουν ενώ αντίθετα τα επίπεδα της p16 αρχίζουν να αυξάνονται. Η αύξηση αυτή της p16 σε όψιμο στάδιο της γήρανσης σχετίζεται με αναστολή κυρίως του συμπλόκου της κυκλίνης D1/Cdk6 και την κυτταρική διαφοροποίηση που συνοδεύει τον γηρασμένο φαινότυπο και καταδεικνύεται από συγκεκριμένους δείκτες όπως η αύξηση του κυτταρικού όγκου και η θετική χρώση για SA (senescence associated)-β-γαλακτοσιδάση. Μάλιστα, η εμφάνιση αυτών των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών της γήρανσης λαμβάνει χώρα παράλληλα με την συσσώρευση της p16 (**Stein et al. 1999**).

Έτσι, προτείνεται ότι η γήρανση αυτή καθ' αυτή δεν αποτελεί ένα φαινόμενο στατικό αλλά ένα δυναμικό, πολυσταδιακό φαινόμενο με διακριτό πρώιμο (επαγωγή του φαινοτύπου) και όψιμο στάδιο (διατήρηση του φαινοτύπου) και την μεν p21 να παίζει ρόλο στην επαγωγή της γήρανσης και την σύζευξή της με την αναστολή των συμπλόκων των κυκλινών/Cdks και την G1 παύση, την δε p16 να είναι καθοριστική για την κυτταρική διαφοροποίηση που συνοδεύει την υιοθέτηση του γηρασμένου φαινοτύπου και την διατήρησή του αλλά όχι και την αναστολή των κυκλινών/Cdks (**Noda et al. 1994; Stein et al. 1999; Dulić et al. 2000**). Σε συμφωνία με την αναγκαιότητα της συνεχούς έκφρασης της p16 για την διατήρηση του γηρασμένου

φαινοτύπου, έχει βρεθεί πως η καταστολή της έκφρασής της σε ένα σύστημα Tet-OFF σε κύτταρα γλοιώματος επαρκεί για να αναστρέψει την γήρανση (Uhrbom et al. 1999). Κάτι τέτοιο όμως δεν παρατηρείται σε επαγωγίμο σύστημα έκφρασης της p21 όταν διακόπτεται η επαγωγή της στα καρκινικά κύτταρα H1299 (Wang et al. 1999).

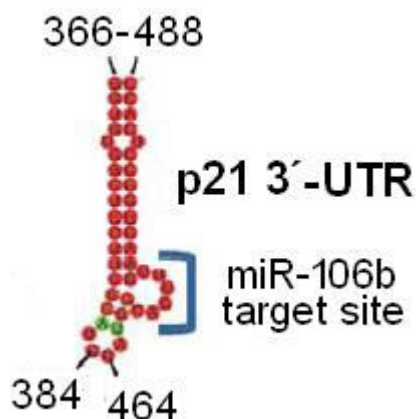
A.3.2. Η Wig1 είναι κρίσιμος αρνητικός ρυθμιστής της p21-μεσολαβούμενης γήρανσης

Σε συμφωνία με το γεγονός ότι η p21 ενώ παίζει κρίσιμο ρόλο σε ογκοκατασταλτικές διαδικασίες όπως η αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου είτε με παροδικό χαρακτήρα είτε με μόνιμο χαρακτήρα (κυτταρική γήρανση), αλλά σε δείγματα όγκων δεν ανιχνεύεται να φέρει «χτυπήματα» μεταλλάξεων, μία πρόσφατη έρευνα περιέγραψε για πρώτη φορά ένα μονοπάτι αρνητικής ρύθμισης της κυτταρικής γήρανσης μέσω μετα-μεταγραφικού ελέγχου στην p21.

Ο Kim και οι συνεργάτες του έδειξαν πως κατά έναν p53-ανεξάρτητο τρόπο η απάλειψη της dsRNA-προσδένουσας πρωτεΐνης Wig1 (wild-type p53-induced gene 1 ή επίσημα *ZMAT3*) η οποία κωδικοποιείται από ένα p53-επαγόμενο γονίδιο (Wilhelm et al. 2002; Méndez-Vidal et al. 2002) είναι ικανή να επάγει την γήρανση και σε φυσιολογικά και σε καρκινικά κύτταρα (Kim et al. 2012). Συγκεκριμένα, όταν με τεχνολογία αντισωματικών ολιγονουκλεοτιδίων αποσιωπάται η έκφραση της Wig1, τότε προκαλείται σταδιακά συσσώρευση της p21, μείωση της υπερ-φωσφορυλιωμένης μορφής της pRb και παύση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1 που από την 4^η ήδη ημέρα συντελούν στην εμφάνιση του φαινοτύπου της γήρανσης και την χρώση με SA (senescence-associated)-β-γαλακτοσιδάση.

Μηχανιστικά, η πρωτεΐνη Wig1 ελέγχει αρνητικά τα επίπεδα έκφρασης της p21 όχι σε επίπεδο ενεργοποίησης του υποκινητή του γονιδίου της *CDKN1A* όπως ελέγχθηκε με δοκιμασία της λουσιφεράσης αλλά ούτε με καταστολή της *de novo* πρωτεϊνοσύνθεσης όπως υπέδειξε η επίδραση του αντιβιοτικού κυκλοεξιμίδη που δρα ως αναστολέας της ευκαρυωτικής πρωτεϊνοσύνθεσης αλληλεπιδρώντας με την μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα. Αντίθετα, η Wig1 βρέθηκε ότι ελέγχει αρνητικά την σταθερότητα του μεταγράφου της p21 και μειώνει τον χρόνο ημίσειας ζωής του (5.34 έναντι 3.29 ώρες). Για την ακρίβεια, η Wig1 μέσω των δομών ZF1 (zinc finger 1) και

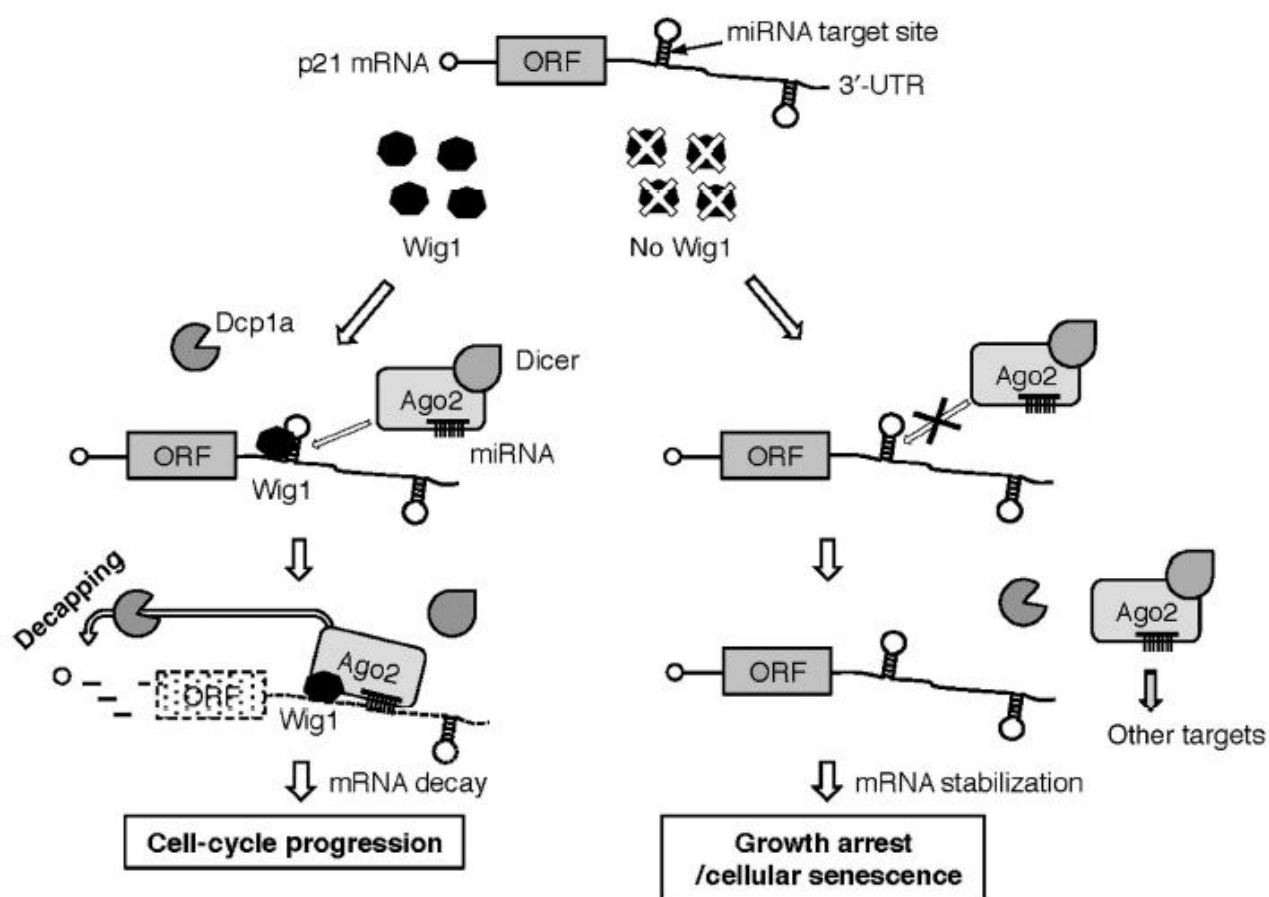
ZF2 (zinc finger 2) προσδένεται στην 3'-αμετάφραστη περιοχή (3'-untranslated region, UTR) του mRNA της p21 που χαρτογραφείται μεταξύ των νουκλεοτιδίων 366-488 τα οποία περιέχουν μία θέση αναγνώρισης του miR-106b και η οποία διαθέτει μία βιοπληροφορικά προβλεπόμενη δευτεροταγή διαμόρφωση του τύπου στέλεχος-θηλιά (stem loop, **Εικόνα A13**). Καθώς η Wig1 αλληλεπιδρά φυσικά με την νουκλεάση Ago2 (Argonaute 2) που είναι κύρια συνιστώσα του συμπλόκου αποσιώπησης RISC (RNA-induced silencing complex), προτάθηκε ένα μοντέλο μετα-μεταγραφικής ρύθμισης της p21 (**Εικόνα 14**) όπου η Wig1 προωθεί την miR-106b-καθοδηγούμενη αποσταθεροποίηση (νουκλεολυτική πέψη) του p21 μεταγράφου μέσω θερμοδυναμικής μεταβολής του RNA-στόχου και «χαλάρωσης» της δευτεροταγούς του δομής κοντά στην θέση αναγνώρισης του miR-106b, διευκολύνοντας έτσι την πρόσβαση της Ago2 (καταλυτική υπομονάδα του συμπλόκου RISC) και την νουκλεόλυση του p21 mRNA (σε συνέργεια με άλλους παράγοντες αποσιώπησης όπως η υδρολάση Dcp1a που αφαιρεί την καλύπτρα της 7-μεθυλο-γουανωσίνης από το 5'-άκρο των μεταγράφων και η ριβονουκλεάση ωρίμανσης των miRs, Dicer) (**Kim et al. 2012**).



Εικόνα A13. Πρόβλεψη της δευτεροταγούς διαμόρφωσης της περιοχής του 3'-αμετάφραστου άκρου (3'-UTR) του mRNA της p21 με το οποίο αλληλεπιδρά η Wig1 (νουκλεοτίδια 366-488) που περιλαμβάνει την θέση αναγνώρισης του miR-106b (πλήρης συμπληρωματικότητα βάσεων), μέσω βιοπληροφορικής (**Kim et al. 2012**).

Μάλιστα, η φυσιολογική σημαντικότητα αυτών των ευρημάτων αντανακλάται από την αναγκαιότητα της έκφρασης της Wig1 για την αύξηση διάφορων ανθρώπινων

καρκινικών ξενομοσχευμάτων σε ποντίκια (xenograft mouse models) και από το γεγονός ότι σε κλινικά δείγματα διαφορετικών ιστολογιών τύπων μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα, αδenoκαρκίνωμα ή βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα), υπάρχει αντίστροφη σχέση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των mRNAs της Wig1 και της p21, υποδεικνύοντας την αυξορρύθμιση της Wig1 ως έναν γενικό ογκογενετικό μηχανισμό (Kim et al. 2012). Είναι επίσης σημαντικό να τονισθεί πως και η Wig1 και η p21 είναι στόχοι της p53 και δρουν ανταγωνιστικά. Φαίνεται λοιπόν ότι επαγόμενα από το ίδιο ερέθισμα, τα δύο αυτά μόρια δρουν για να επιτευχθεί μία εξισορροπημένη κυτταρική απόκριση. Η σημαντικότητα της φυσιολογικής λειτουργίας της Wig1 υποδεικνύεται άλλωστε και από τον υψηλό βαθμό συντήρησής της από το ψάρι έως τον άνθρωπο (Hellborg and Wiman, 2004).



Εικόνα A14. Προτεινόμενο μοντέλο για την ρύθμιση της σταθερότητας του μεταγράφου της p21 από την Wig1. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η Wig1

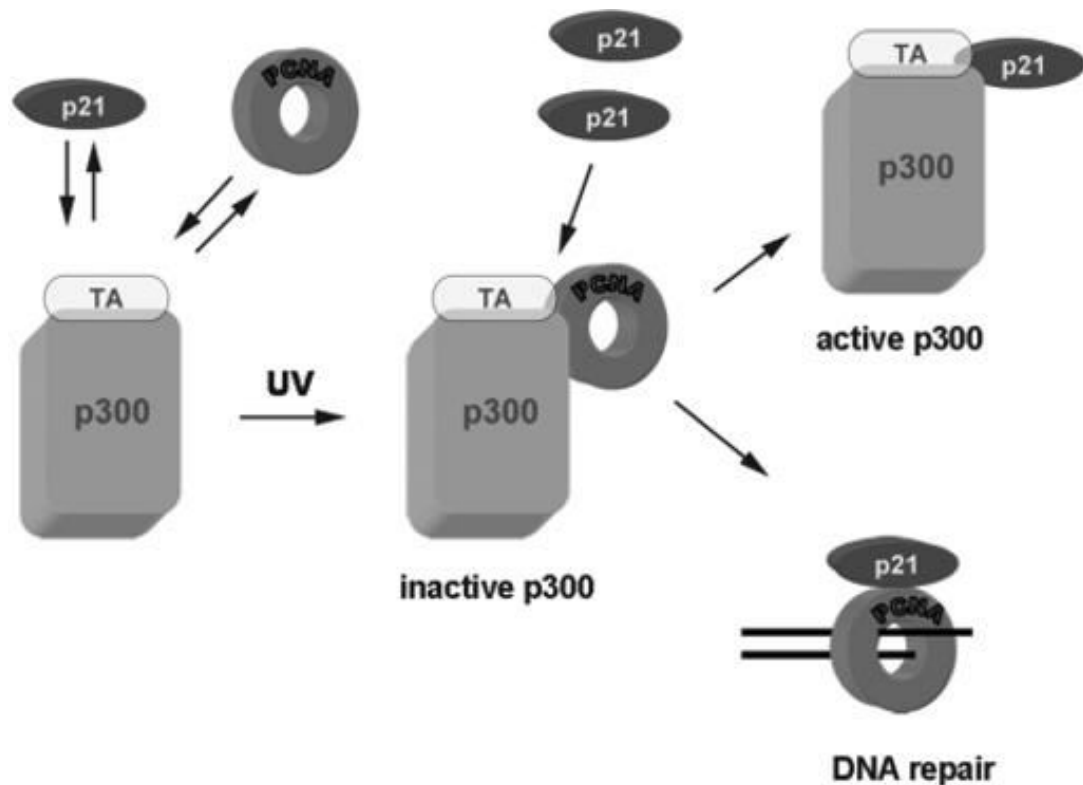
αλληλεπιδρά μέσω των δομών της ZF1 και ZF2 με μία δομή στελέχους-θηλιάς κοντά στην θέση αναγνώρισης του miR-106b στο 3'-αμετάφραστου άκρου του μεταγράφου της p21, διευκολύνοντας έτσι την πρόσβαση του συμπλόκου RISC (RNA-induced silencing complex) και την νουκλεόλυσή του από την πρωτεΐνη Ago-1 σε συνέργεια και με άλλους παράγοντες αποσιώπησης συμπεριλαμβανομένης της υδρολάσης Dcp1a. Συνεπώς, η απαλοιφή της Wig1 συντελεί στην σταθεροποίηση του mRNA της p21 κι επάγει την κυτταρική γήρανση (Kim et al. 2012).

A.4. Η p21 στην επιδιόρθωση του DNA

Ενώ ο ρόλος της p21 στο μονοπάτι απόκρισης στην βλάβη του DNA είναι καλά τεκμηριωμένος, η εμπλοκή της στην επιδιόρθωση του DNA που έπεται της πρόκλησης της βλάβης δεν ήταν διαλευκασμένη μέχρι πρόσφατα. Δεδομένου ότι η p21 αλληλεπιδρά ανασταλτικά με το PCNA το οποίο συμμετέχει στο μονοπάτι επιδιόρθωσης NER (nucleotide excision repair) μαζί με άλλους παράγοντες αντιγραφής του DNA εικαζόταν ότι η p21 μέσω πρόσδεσης στο PCNA να αναστέλλει όχι μόνο την αντιγραφή του DNA αλλά και την σηματοδότηση της επιδιόρθωσής του.

Με μια σειρά πειραμάτων, ο Cazzalini και οι συνεργάτες του έδειξαν πως η επαγωγή της p21 μετά από επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) είναι αναγκαία για την απελευθέρωση της ενζυμικής δραστηριότητας ακετυλτρανσφεράσης ιστονών (histone acetyltransferase, HAT) p300 η οποία ως γνωστό συμπλοκοποιείται με μεταγραφικούς ενεργοποιητές (transcriptional activators, TAs) και σε απόκριση στην βλάβη του DNA συμβάλλει στην υιοθέτηση μιας «χαλαρής» διαμόρφωσης της χρωματίνης, δηλ. χρωματίνης με όχι «σφιχτά» πακεταρισμένο DNA γύρω από τα νουκλεοσώματα, ούτως ώστε να καθίσταται δυνατή η «πρόσβαση» παραγόντων επιδιόρθωσης (DNA repair factors) γύρω από την περιοχή της βλάβης. Η p300 είναι ένας μεταγραφικός συμπαραγόντας με ενεργό ρόλο στην επιδιόρθωση καθώς αλληλεπιδρά με το PCNA αλλά και με το νεοσυντιθέμενο DNA κατά την επιδιόρθωση μετά από ακτινοβολία με UV (Hasan et al. 2001).

Συγκεκριμένα, απουσία γενωτοξικού ερεθίσματος, δείχθηκε πως η p300 πιθανόν μαζί με κάποιον ΤΑ αλληλεπιδρά τόσο με την p21 όσο και με το PCNA. Παρουσία βλάβης του DNA (ακτινοβόληση με UV) τα εργαστηριακά δεδομένα οδήγησαν σε ένα μοντέλο (**Εικόνα A15**) σύμφωνα με το οποίο η p21 που εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε σχέση με τους άλλους δύο παρτενέρ της είναι ικανή σχηματίζοντας διμερή p21-PCNA και p21-p300 να παρεμποδίζει την ανασταλτική πρόσδεση του PCNA στην p300, προωθώντας έτσι την υιοθέτηση της χαλαρής διαμόρφωσης της χρωματίνης και την επιδιόρθωση. Απουσία της p21 ή όταν η p21 δεν διαθέτει ικανότητα πρόσδεσης στο PCNA, αυτό παραμένει προσδεμένο στην χρωματίνη για παρατεταμένο διάστημα και η δραστηριότητα της HAT είναι μειωμένη μετά από βλάβη του γενώματος. Στα σημεία της βλάβης που όταν πρόκειται για ακτινοβόληση με UV είναι κυρίως κυκλοβουτανικά διμερή (cyclobutane pyrimidine dimers, CPDs), **α)** και το p21-PCNA σύμπλοκο παίρνει μέρος στην επιδιόρθωση του DNA και επιπλέον, **β)** προσελκύονται παράγοντες επιδιόρθωσης του μονοπατιού GG-NER (global genome- nucleotide excision repair) στο p21-p300 σύμπλοκο όπου ανακτάται η δραστηριότητα HAT, όπως ο παράγοντας επιδιόρθωσης XPG (xeroderma pigmentosum group G). Έτσι, γύρω από το σημείο βλάβης του DNA διευκολύνεται η πρόσβαση PCNA-εξαρτώμενων παραγόντων επιδιόρθωσης του GG-NER μονοπατιού που σχετίζεται με σύνθεση νέου DNA (DNA repair synthesis), με κύριο θετικό ρυθμιστή την p21 που δρα παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ PCNA και p300 (**Cazzalini et al. 2008**).



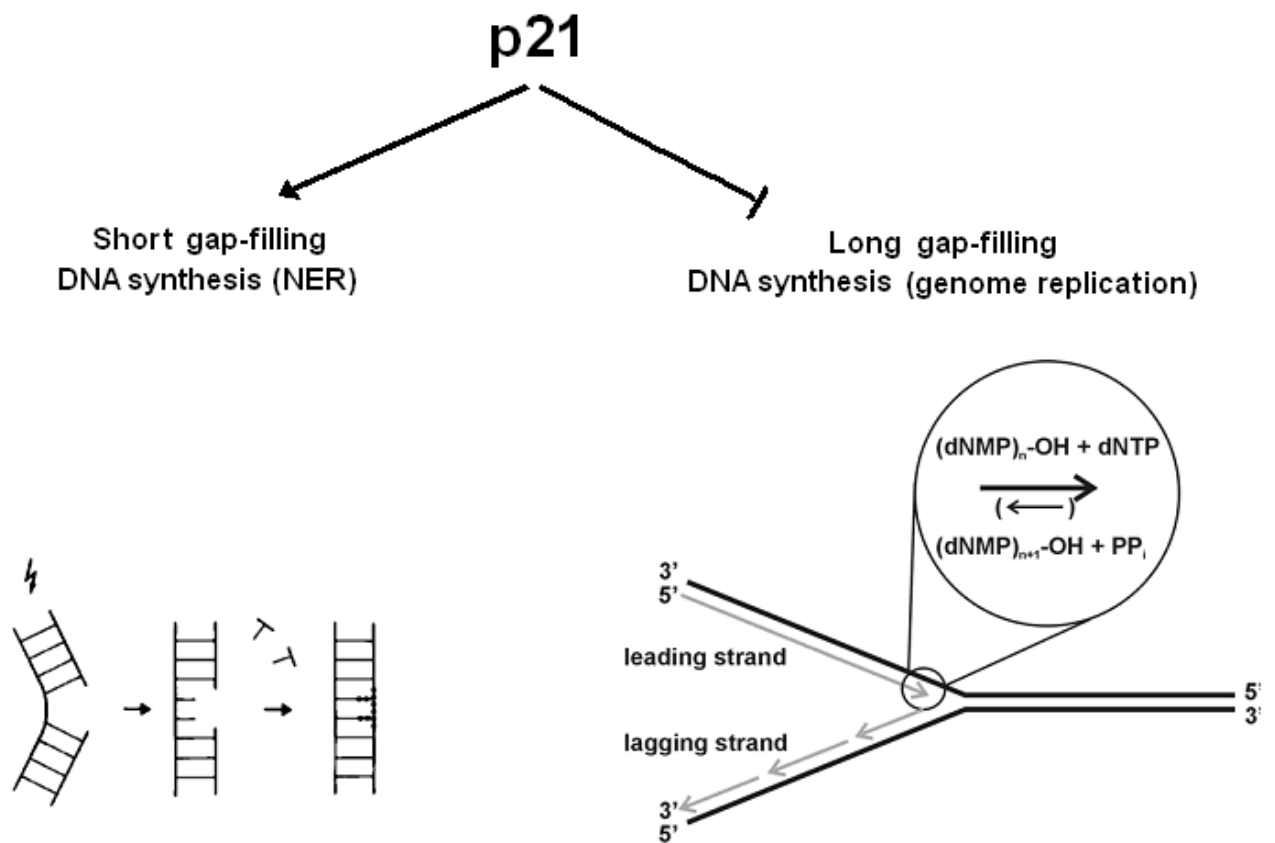
Εικόνα A15. Μοντέλο του θετικού ρόλου της p21 στο PCNA-εξαρτώμενο GG-NER (global genome- nucleotide excision repair) μονοπάτι επιδιόρθωσης του DNA που επιδιορθώνει μη-μεταγραφόμενες γενωμικές περιοχές. Στο σύμπλοκο p21-p300/TA προσδένονται και παράγοντες επιδιόρθωσης όπως ο XPG (xeroderma pigmentosum group G) αλλά για λόγους ευκρίνειας δεν απεικονίζονται εδώ (Cazzalini et al. 2008).

Αυτός ο θετικός ρόλος της p21 στην επιδιόρθωση του DNA όπως προτάθηκε από τον Cazzalini και τους συναδέλφους του συμφωνεί με προηγούμενα ευρήματα πως ενώ παρατηρείται η αναστολή της PCNA-εξαρτώμενης γενωμικής αντιγραφής πολλών κιλοβάσεων όπως αυτής του γενώματος του ιού SV40 σε *in vitro* συστήματα από την p21, η PCNA-εξαρτώμενη αντιγραφή μικρών τμημάτων «κενών» στο DNA που έχει υποστεί βλάβη (“gap filling”) και έχουν μήκος ορισμένων μόνο νουκλεοτιδίων από τις πολυμεράσες δ και ε δεν αναστέλλεται από την p21 (Li et al. 1994; Flores-Rozas et al. 1994). Με άλλα λόγια, ενώ το p21 αλληλεπιδρώντας με το PCNA αναστέλλει την χρωμοσωμική αντιγραφή ως αναπόσπαστο μέρος της αναχαιτιστικής της δράσης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ωστόσο επιτρέπει την σύνθεση DNA που είναι

συζευγμένη με την επιδιόρθωση (DNA repair synthesis) και αφορά την κάλυψη μικρών κενών στους κλώνους του DNA.

Μηχανιστικά, αυτό πρέπει να σχετίζεται με το γεγονός ότι για την αντιγραφή μεγάλων τμημάτων DNA είναι απαραίτητοι πολλοί κύκλοι διαδοχικής δέσμευσης και αποδέσμευσης του δακτυλίου του PCNA γύρω από το DNA-υπόστρωμα, μια διαδικασία η οποία αναχαιτίζεται από την p21, ενώ για μικρά τμήματα λίγων νουκλεοτιδίων η λειτουργία του PCNA στην αντιγραφή του DNA μένει ανεπηρέαστη, παρά την πρόσδεση της p21 σε αυτό. Στην τελευταία περίπτωση, η p21 όπως προαναφέρθηκε, παίζει ενεργό ρόλο στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης (chromatin remodelling) και την προσέλκυση PCNA-εξαρτώμενων επιδιορθωτικών παραγόντων του μονοπατιού NER. Η διαφορική δράση της p21 στην NER-μεσολαβούμενη επιδιόρθωση του DNA που σχετίζεται με τη σύνθεση μικρών νουκλεοτιδικών τμημάτων (short gap-filling DNA synthesis) και στην αντιγραφή μεγάλων γενωμικών τμημάτων κατά την φάση S, απεικονίζεται σχηματικά στην **Εικόνα A16**. Οι δύο αυτές φαινομενικά αντίθετες δράσεις της p21 έχουν σαν κοινό τελικό αποτέλεσμα την κυτταρόσταση, αφού και στις δύο περιπτώσεις το ζητούμενο είναι η παροχή χρόνου ώστε το κύτταρο να επιδιορθώσει τις βλάβες του όταν αυτές είναι επιδιορθώσιμες.

Σύμφωνα με την αρνητική συσχέτιση της p21 και του PCNA, σε απόκριση στην ακτινοβόληση με UV και κατά έναν τρόπο που εξαρτάται από την ικανότητα της p21 να αλληλεπιδρά με το PCNA μέσω της δομής PIP, η αποικοδόμηση της p21 είναι απαραίτητη για την στρατολόγηση στην χρωματίνη TSL πολυμερασών και της προόδου της αντιγραφής του DNA. Αυτή η UV-πυροδοτούμενη αποικοδόμηση της p21 είναι έτσι αναγκαία ώστε το κύτταρο να ανακάμψει από τις γενωμικές βλάβες της ακτινοβόλησης και να διατηρήσει την γενωμική του σταθερότητα (**Mansilla et al. 2013**). Δεδομένου ότι όπως προαναφέρθηκε η p21 είναι αναγκαία για το επιδιορθωτικό μονοπάτι NER που επίσης πυροδοτείται από την UV, φαίνεται πως αυτό που στην ουσία είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο είναι η διατήρηση μίας λεπτής ισορροπίας στα επίπεδα της p21. Άλλωστε, στα βλαστικά κύτταρα είναι γνωστός ο θετικός ρόλος της p21 στην επιδιόρθωση του DNA (**Insinga et al. 2013**), πιθανώς μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει τον έλεγχο της μεταγραφής όχι όμως του μονοπατιού NHEJ (Non-homologous end-joining).



Εικόνα A16. Ο διττός ρόλος της p21 στην θετική ρύθμιση της σύνθεσης μικρών τμημάτων DNA κατά την επιδιόρθωση μέσω του μονοπατιού NER (short gap-filling DNA synthesis) και η αρνητική ρύθμιση της σύνθεσης γενωμικών περιοχών (long gap-filling DNA synthesis) κατά τον αναδιπλασιασμό του DNA στην S φάση (από <http://herkules.oulu.fi/isbn9514265815/html/i275971.html> και Korr et al. 1998).

A.5. Ο ρόλος της p21 στην απόπτωση

A.5.1. Η p21 ως αρνητικός ρυθμιστής της απόπτωσης

A.5.1.1. Η p21 ως αρνητικός ρυθμιστής της p53-εξαρτώμενης απόπτωσης

Όπως προαναφέρθηκε, όταν σε απόκριση στην βλάβη του DNA σταθεροποιείται η πρωτεΐνη p53 τότε αυτή επάγει μεταγραφικά την p21. Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα, αυτό το p53-p21 μονοπάτι μπορεί να οδηγήσει είτε σε παύση του κυτταρικού κύκλου είτε σε αναστολή της προ-αποπτωτικής δράσης της ίδιας της p53, με τον μηχανισμό της λήψης της κυτταρικής απόφασης για κυτταρόσταση ή απόπτωση να είναι αμυδρά κατανοητός.

Χαρακτηριστικά, όταν το μονοπάτι p53-p21 «διακόπτεται» από διάφορους μηχανισμούς που αναστέλλουν την επαγωγή ή την λειτουργία της p21, τα καρκινικά κύτταρα σε απόκριση στην p53 αποφασίζουν εκλεκτικά να ακολουθήσουν το μονοπάτι της απόπτωσης παρά της κυτταρόστασης (**Εικόνα A17**). Για παράδειγμα, όταν στα HSC3 κύτταρα υπερεκφράζεται η μεταλλαγμένη μορφή της p53, p53-273L (Arg --> Leu), η οποία στερείται της τρανσενεργοποιητικής της ικανότητας τότε η αναστολή της κυτταρικής αύξησης παρατηρείται σε μεγαλύτερο βαθμό απ' ότι όταν στα ίδια κύτταρα υπερεκφράζεται η αγρίου-τύπου p53 (wt-p53). Μηχανιστικά, τα μεν HSC3 κύτταρα που εκφράζουν την wt-p53 οδηγούνται σε παύση στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, τα δε HSC3 κύτταρα που εκφράζουν την p53-273L οδηγούνται σε συγκριτικά μεγαλύτερη αναστολή της αύξησής του μέσω απόπτωσης (**Kaneuchi et al. 1999**). Παρόμοια, το μετάλλαγμα p53-123A όταν εκφράζεται έκτοπα στα Saos-2 κύτταρα, μέσω ενός μηχανισμού που σχετίζεται με την επαγωγή του Fas, επιδεικνύουν αυξημένη ραδιοευαισθησία έναντι των wt-p53-Saos-2 κυττάρων. Η 123A μετάλλαξη στην p53 έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της τρανσενεργοποιητικής ικανότητας της p53 εκλεκτικά ως προς την p21, αφήνοντας ανεπηρέαστη την ικανότητά της να επάγει άλλους στόχους όπως την MDM2 και την Bax. Επομένως, καταδεικνύεται ο ρόλος της p21 ως p53-στόχος ως μόριο που προάγει την κυτταρική επιβίωση και απαιτείται η αναχαίτιση της μεταγραφικής της

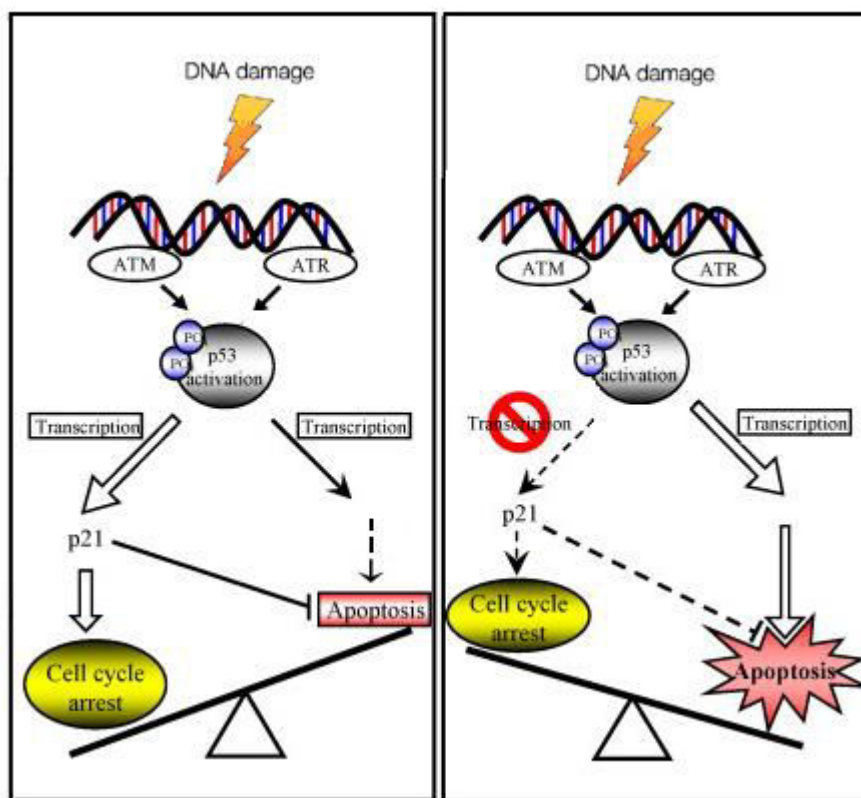
επαγωγής ώστε η p53 να οδηγήσει τα κύτταρα στον αποπτωτικό θάνατο (**Okaichi et al. 1999**).

Επιπλέον, εκτός από την αναχαίτιση της p21 σε επίπεδο μεταγραφής, η παρεμπόδιση της p21 μέσω διάσπασής της σε επίπεδο πρωτεΐνης επιφέρει ανάλογα κυτταρικά αποτελέσματα: στα κύτταρα A549 που εκφράζουν λειτουργικά ακέραιη την wt-p53 και αποπίπτουν σε απόκριση στην καμπτοθεκίνη παρατηρείται διάσπαση της p21 από την κασπάση-3 στην θέση DHVD112L με το p21-θραύσμα που προκύπτει να στερείται τόσο της ικανότητάς του να εντοπίζεται στον πυρήνα όσο και της ικανότητάς του να προσδένεται στο PCNA. Κατ' αυτόν τον τρόπο, τα κύτταρα οδηγούνται στην απόπτωση παρά στην παύση στο G1 σημείο του κυτταρικού κύκλου (**Zhang et al. 1999**). Αντίστροφα, η απόπτωση των καρκινικά κυττάρων A431 που εκφράζουν μια μορφή μεταλλαγμένης p53 η οποία δεν επάγει μεταγραφικά την p21, ύστερα από ακτινοβολήση με UV αναστέλλεται παρουσία του αλκαλοειδούς μιμοσίνη που είναι ένας p53-ανεξάρτητος επαγωγέας της p21, γνωστή για την κυτταροστατική του δράση (**Bissonnette and Hunting, 1998**). Συνολικά πιστεύεται ότι η p21 είναι το καθοριστικό μόριο η λειτουργικότητα του οποίου διαμορφώνει την απόφαση του κυττάρου για απόπτωση ή κυτταρόσταση σε απόκριση στην σταθεροποίηση της p53.

Παρουσία γενωτοξικής βλάβης, το p21^{-/-} γενετικό υπόβαθρο ή η απενεργοποίηση της p21 από την φυσική της αλληλεπίδραση με την E1A ευνοούν την απόπτωση στα HCT116 κύτταρα (**Bunz et al. 1999; Chan et al. 2000; Chattopadhyay et al. 2001**).

Η επαγωγή του πρωτο-ογκογονιδίου c-Jun μετά από ακτινοβολήση με UV συντελεί στην παρατεταμένη παύση του κυτταρικού κύκλου και αντοχή στην απόπτωση σε ποντικίσιους ινοβλάστες, παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση της p53 με τον υποκινητή του γονιδίου της p53 (**Shaulian et al. 2000**). Επιπλέον, η p21 προστατεύει κύτταρα οστεοσαρκώματος που εκφράζουν ακέραιη p53 από την απόπτωση σε απόκριση με το χημειοθεραπευτικό ετοποσίδη (**Prabhu et al. 2000**). Ο Polyak και οι συνεργάτες του διέκριναν δύο κατηγορίες υποπληθυσμών καρκινικών κυττάρων παχέος-ορθού ανάλογα με την διαφορική τους απόκριση στην υπερέκφραση της p53: τις κυτταρικές σειρές «τύπου A» όπου η p53 επάγει την παύση του κυτταρικού κύκλου και τις κυτταρικές σειρές «τύπου D» όπου η p53 πυροδοτεί την απόπτωση με την απενεργοποίηση της p21 να είναι ικανή να μετατρέψει τα κύτταρα τύπου A σε

κύτταρα τύπου D (Polyak et al. 1996). Επίσης, η p21 μέσω της αναστολής της p53-μεσολαβούμενης απόπτωσης ασκεί κυτταροπροστατευτικό ρόλο και στα κύτταρα μελανώματος SK-MEL-110 (Gorospe et al. 1997).



Εικόνα A17. Ο καθοριστικός ρόλος της p53-μεσολαβούμενης τρανσενεργοποίησης της p21 σε απόκριση σε γενωτοξικό ερέθισμα στην κυτταρική λήψη απόφασης υπέρ της παύσης του κυτταρικού κύκλου και της αναστολής της p53-μεσολαβούμενης απόπτωσης (επαγωγή της p21) ή της p53-εξαρτώμενης απόπτωσης απουσία μεταγραφικής ενεργοποίησης της p21 (τροποποιημένο από Hill et al. 2008).

A.5.1.2. Η p21 ως αρνητικός ρυθμιστής της p53-ανεξάρτητης απόπτωσης

Το μονοπάτι της απόπτωσης εκτός από την p53 πρωτεΐνη μπορεί να πυροδοτηθεί και από άλλα ερεθίσματα όπως οι αναστολείς απακετυλασών των ιστονών (histone deacetylase inhibitors, HDACIs) καθώς και κυτοκίνες συμπεριλαμβανομένων της ιντερφερόνης γ (IFN- γ), του TGF- β και του TNF- α (Gartel and Tyner, 1999). Η p21 έχει δειχθεί όπως συζητείται αμέσως παρακάτω ότι αναστέλλει αυτές τις p53-

ανεξάρτητες αποπτωτικές οδούς. Συνολικά λοιπόν, η κυτταροπροστατευτική δράση της p21 λαμβάνει χώρα τόσο με αναστολή των p53-εξαρτώμενων όσο και με αναστολή των p53-ανεξάρτητων οδών.

Η p21 ανταγωνίζεται την TNF- α -επαγόμενη απόπτωση στα κακοήθη κύτταρα Ewing. Στα κύτταρα αυτά, η έκφραση της p21 επάγεται μεταγραφικά από τον NF- κ B, ο οποίος με την σειρά του ενεργοποιείται από τον ίδιο τον TNF- α ως ένας μηχανισμός αυτορρύθμισης της αποπτωτικής του δράσης. Κατά συνέπεια, η αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B στα κύτταρα Ewing άρει την p21-εξαρτώμενη αντι-αποπτωτική προστασία και ευαισθητοποιεί τα κακοήθη κύτταρα στον αποπτωτικό θάνατο (**Javelaud et al. 2000**). Με παρόμοιο τρόπο, ένα NF- κ B/p21-εξαρτώμενο μονοπάτι προστατεύει τα μονοκύτταρα κατά την διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα από την TNF- α -επαγόμενη απόπτωση (**Pennington et al. 2001**) ενώ στα ενδοθηλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς η p21 προσδίδει αντοχή στην TGF- β -μεσολαβούμενη απόπτωση (**Yan and Sage, 1998**). Οι μεταγραφικοί παράγοντες STATs είναι γνωστό ότι ενεργοποιούν τον υποκινητή του γονιδίου *CDKN1A*. Μέσω του μονοπατιού STAT-p21 έχειδειχθεί πως η τόσο η IFN- γ στα κύτταρα αδενοκαρκινώματος HCT116 όσο και οι κυτοκίνες της οικογένειας IL-6 IL-6 και OSM (oncostatin M) στα οστεοβλαστικά κύτταρα ασκούν προστατευτική δράση αναστέλλοντας την p53-ανεξάρτητη απόπτωση (**Hobeika et al. 1999; Bellido et al. 1998**).

Η καταστολή της έκφρασης της p21 αυξάνει την τοξικότητα του αναστολέα απακετυλασών ιστονών SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) σε λευχαιμικά κύτταρα (**Vrana et al. 1999**). Στα κύτταρα καρκινώματος του παχέος HCT116, η αναστολή της διάσπασης της p21 από μία κασπάση που αναγνωρίζει την ακολουθία DEVD και τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p21 σχετίζονται με ανθεκτικότητα στην απόπτωση που πυροδοτείται από το λιπαρό οξύ βραχείας αλυσίδας, n-βουτυρικό, το οποίο έχει δραστηριότητα HDACi και διαθέτει χημειοπροστατευτική δράση (**Chai et al. 2000**). Σε συμφωνία με το εύρημα αυτό, σε ένα p21^{-/-} υπόβαθρο, η p53-ανεξάρτητη προ-αποπτωτική δράση του n-βουτυρικού στην ίδια κυτταρική σειρά είναι ενισχυμένη απ' ότι όταν εκφράζεται η p21, υποδεικνύοντας ότι η p21 ανταγωνίζεται την απόπτωση που επάγουν οι HDACIs, ανεξάρτητα της p53 (**Mahyar-Roemer et al. 2000**). Μηχανιστικά, οι HDACIs

επάγουν την p53-ανεξάρτητη έκφραση της p21 σε επίπεδο μεταγραφής μέσω των μεταγραφικών παραγόντων Sp1 και Sp3 συνεργειστικά με την ακετυλτρανφεράση ιστονών p300 (Xiao et al. 2000) και κατά έναν τρόπο που προϋποθέτει την ακεραιότητα των *cis* ρυθμιστικών Sp1 θέσεων (γνωστές και ως «GC-κουτιά») που χαρτογραφούνται -82 or -69 βάσεις από το σημείο έναρξης της μεταγραφής στον υποκινητή του γονιδίου της p21 (Sowa et al. 1999).

Στα ανθρώπινα κύτταρα γλοιοβλαστώματος U87MG, η ακεραιότητα του μονοπατιού p53-p21 φάνηκε να έχει καθοριστικό ρόλο στην απόκριση στον αλκυλιωτικό παράγοντα καρμουστίνη ή BCNU (1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea) που ανήκει στην ομάδα των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων των νιτροζουριών. Συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι στα U87MG κύτταρα που το παραπάνω μονοπάτι είναι ακέραιο, η έκθεση στην BCNU έχει ως αποτέλεσμα την κυτταρόσταση και την ενεργοποίηση επιδιορθωτικών μονοπατιών του DNA και την κυτταρική επιβίωση. Αντίθετα, στα U87MG κύτταρα στα οποία το μονοπάτι p53-p21 κατέστη δυσλειτουργικό μέσω έκτοπης έκφρασης της ογκοπρωτεΐνης E6 που απενεργοποιεί την p53 ούτως ώστε να μην επάγεται η p21, μετά από μια μόνιμη κυτταρόσταση πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές ανώμαλες μιτώσεις, με συνέπεια τα κύτταρα να γίνουν πολυπλοειδικά και να οδηγηθούν στην απόπτωση, προφανώς με μηχανισμό μιτωτικής καταστροφής (Xu et al. 2001). Επομένως, η p21 προσφέρει προστασία κατά της p53-ανεξάρτητης απόπτωσης και κατά παράδοξο τρόπο, η έκφραση μιας κατ' εξοχήν ογκοπρωτεΐνης, της E6, και η καταστολή του ογκοκατασταλτικού μονοπατιού p53-p21, συμβάλλουν στην χημειοευαισθητοποίηση. Παρόμοια κυτταροπροστατευτική δράση επιδεικνύει η p21 και στα p53^{-/-} κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα H1299 όπου προσφέρει ανθεκτικότητα στον p53-ανεξάρτητο αποπτωτικό θάνατο σε απόκριση στην δοξορουβισίνη και την γ-ακτινοβολήση, χωρίς όμως να προσφέρει ανάλογη προστασία και στην ταξόλη (Wang et al. 1999).

Δεδομένου ότι το ~50% των ανθρώπινων όγκων φέρουν μεταλλάξεις στον γενετικό τόπο της p53, τα επίπεδα της p21 σε αυτές τις περιπτώσεις έχουν προβλεπτική αξία στην επιτυχία της χημειοθεραπείας. Άλλωστε, όπως θα συζητηθεί και σε ξεχωριστή ενότητα, η p21 φαίνεται διαθέτει έναν p53-ανεξάρτητο ογκογόνο ρόλο στην διευκόλυνση της γένεσης λεμφώματος: σε ATM^{-/-} ποντίκια όπου η επαγωγή της p53 μετά από γενωτοξική βλάβη είναι δυσλειτουργική, η ταυτόχρονη απώλεια της

έκφρασης της p21 επιβραδύνει την γένεση θυμικών λεμφωμάτων και σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα τόσο αυθόρμητης απόπτωσης όσο και απόπτωσης μετά από ακτινοβολία (Wang et al. 1997).

Επιπλέον, η p21 έχειδειχθεί πως ότι αναγνωρίζεται ως υπόστρωμα από την κινάση AKT για φωσφορυλίωση στην Thr145 καθοδικά του υποδοχέα HER-2/neu σε καρκινικά κύτταρα και πως το μονοπάτι αυτό σχετίζεται με την κυτοσολική εντόπιση της p21 και την δράση της p21 υπέρ της κυτταρικής αύξησης. Μάλιστα, τα μοριακά αυτά συμβάντα είναι προαπαιτούμενα για την HER-2/neu-εξαρτώμενη προώθηση της κυτταρικής αύξησης αφού η αναχαίτιση αυτού του AKT-p21 μονοπατιού μέσω έκφρασης μίας επικρατούσας αρνητικής (dominant negative, DN) μεταλλαγμένης μορφής κινάσης AKT, έχει ως αποτέλεσμα την αποκατάσταση της πυρηνικής εντόπισης της p21 και της ανασταλτικής της δράσης στην κυτταρική αύξηση (Zhou et al. 2001). Είναι σημαντικό πως η ταυτόχρονη κυτοσολική εντόπιση της p21 και η υπερέκφραση του υποδοχέα HER-2/neu αποτελεί δείκτη πτωχής πρόγνωσης σε ασθενείς με καρκίνο μαστού όπου η υπερέκφραση του HER-2/neu συνήθως μέσω γονιδιακής ενίσχυσης είναι συχνό εύρημα (Xia et al. 2004). Στα καρκινικά κύτταρα μαστού η αποσιώπηση της p21 με τεχνολογία αντιονηματικών ολιγονουκλεοτιδίων ευαισθητοποιεί τα κύτταρα αυτά στην απόπτωση που επάγεται από την ταξόλη (Yu et al. 1998), καταδεικνύοντας την χρησιμότητα της p21 ως φαρμακευτικού στόχου σε αυτήν την περίπτωση.

Είναι έτσι φανερό πως η p21 επιδεικνύει ένα είδος «διαμερισματοποιημένης» δράσης ως προς την μεταγωγή θετικών (κυτοσόλιο) ή αρνητικών (πυρήνας) σημάτων για την ογκογένεση, με την ογκογόνο δράση της στο κυτοσόλιο να σχετίζεται με προώθηση της κυτταρικής αύξησης και αντοχή στην απόπτωση ανεξάρτητα από την p53, αφού ως γνωστό η αποπτωτική δράση της p53 έχει να κάνει με ενεργοποίηση της έκφρασης των γονιδίων-στόχων αυτού του τετραμερή μεταγραφικού παράγοντα.

Όσον αφορά τον μηχανισμό που η p21 αναστέλλει την απόπτωση, αυτός μπορεί να είναι είτε μέσω της ιδιότητάς της να επάγει την κυτταρόσταση, προσφέροντας χρόνο στο κύτταρο για επιδιόρθωση του DNA, είτε μέσω της ικανότητάς του να σταθεροποιεί σε επίπεδο πρωτεΐνης τον αναστολέα της απόπτωσης cIAP1 (Steinman and Johnson, 2000). Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός είναι μέσω της δράσης της ως

αναστολέας των CDKs καθώς οι κινάσες αυτές έχουν δειχθεί πως είναι αναγκαίοι τελεστές των κασπασών και ότι είναι απαραίτητες για την εκδήλωση ορισμένων χαρακτηριστικών της απόπτωσης όπως η συμπύκνωση της χρωματίνης και η αποκόλληση από το υπόστρωμα, αφήνοντας ωστόσο την εκδήλωση άλλων χαρακτηριστικών (διατάραξη της ασυμμετρίας των φωσφολιπιδίων της πλασματικής μεμβράνης και κατάρρευση του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού, $\Delta\Psi_m$) ανεπηρέαστη (Harvey et al. 2000).

A.5.2. Η p21 ως επαγωγέας της απόπτωσης

Παραδόξως, ενώ η p21 όπως προαναφέρθηκε έχει δειχθεί πως δρα ανταγωνιστικά και στην p53-εξαρτώμενη και στην p53-ανεξάρτητη απόπτωση, υπό συγκεκριμένες συνθήκες κυτταρικού στρες και κατά ένα τρόπο που εξαρτάται από το εκάστοτε κυτταρικό σύστημα η p21 μπορεί να δράσει και ως προ-αποπτωτικό μόριο ανεξάρτητα ή όχι της p53. Όσον αφορά τον μηχανισμό της p21-μεσολαβούμενης απόπτωσης, η p21 εκτός από την ικανότητά της να επάγει την έκφραση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax (Kang et al. 1999) όπως αναφέρεται παρακάτω, η p21 έχει δειχθεί πως συμμετέχει σε Fas/CD95- και TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)-εξαρτώμενα αποπτωτικά μονοπάτια (Hingorani et al. 2000; Goke et al. 2001), καθώς και στην απόπτωση που επάγεται από την επιδιορθωτική πρωτεΐνη RAD50 (Shin et al. 2001).

Η p21 αυξάνει την τοξικότητα της *cis*-πλατίνης σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος τόσο με μηχανισμό p53-ανεξάρτητο στα κύτταρα GB-1 όσο και με p53-εξαρτώμενο μηχανισμό στα κύτταρα U87-MG (Kondo et al. 1996). Παρόμοια p21-μεσολαβούμενη αύξηση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου που επάγεται στην *cis*-πλατίνη παρατηρείται και στα κύτταρα καρκινώματος ωοθήκης OVCAR3 και SCO3 τα οποία δεν εκφράζουν την p53, κι επομένως και σε αυτήν την περίπτωση η χημειοευαισθητοποίηση που προσφέρει η p21 είναι ανεξάρτητη της p53 (Lincet et al. 2000). Εκτός από καρκινικές κυτταρικές σειρές, η p21 ενισχύει και την αποπτωτική απόκριση σε φυσιολογικά θυμοκύτταρα ύστερα από ακτινοβολία με ιονίζουσα ή υπεριώδη ακτινοβολία σε διαγονιδιακά ποντίκια όπου η p21 εκφράζεται εκλεκτικά σε κύτταρα της T σειράς (Fotedar et al. 1999).

Η p21 προωθεί την απόπτωση και σε κυτταρικές σειρές ηπατώματος Hep3B που δεν εκφράζουν την p53 μέσω ενός μηχανισμού αυξορρύθμισης της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax τόσο σε απόκριση στο C₆-κεραμίδιο όσο και στο ρετινοϊκό οξύ (**Kang et al. 1999; Hsu et al. 1999**). Επιπλέον, μέσω ενός παρόμοιου μονοπατιού p21-μεσολαβούμενης αυξορρύθμισης της Bax πυροδοτείται η απόπτωση στα κύτταρα καρκίνου του μαστού MDA-MB-231 σε απόκριση στο γενωτοξικό ισοφλαβονοειδές γενιστεΐνη που διαθέτει δραστηριότητα αναστολέα τυροσινικής κινάσης. Καθώς στα MDA-MB-231 η p53 είναι μεταλλαγμένη, και σε αυτήν την περίπτωση η p21-μεσολαβούμενη απόπτωση είναι p53-ανεξάρτητη (**Li et al. 1999**). Επειδή η αναλογία αντι-αποπτωτικών (π.χ. Bcl-2) προς προ-αποπτωτικών μελών (π.χ. Bax) της οικογένειας Bcl-2 είναι καθοριστική για την απόφαση κυτταρικής επιβίωσης ή αποπτωτικού θανάτου, η αυξορρύθμιση της Bax από την p21 που μεταβάλλει αυτήν την αναλογία οδηγεί στην απόπτωση.

Απόπτωση σε απόκριση στην έκτοπη έκφραση της p21 παρατηρείται και σε καρκινικά κύτταρα του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (**Tsao et al. 1999**) αλλά και σε κύτταρα πλακώδους καρκινώματος του οισοφάγου (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) (**Kadowaki et al. 1999**) όχι όμως και σε κύτταρα μελανώματος (**Yang et al. 1995**), υποδεικνύοντας ότι η προ-αποπτωτική δράση της p21 εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο. Μάλιστα, στην περίπτωση του ESCC, η p21-επαγόμενη αποπτωτική απόκριση είχε σχέση με την επαγωγή μίας τελικής διαφοροποίησης στα καρκινικά κύτταρα καθώς σχετιζόταν με την αύξηση των επιπέδων της ινβολουκρίνης η οποία αποτελεί συστατικό του πρωτεϊνικού φακέλου (cornified cell envelope, CEE) που βρίσκεται κάτω από την πλασματική μεμβράνη των τελικώς διαφοροποιημένων κερατινοκυττάρων των πολύστιβων πλακωδών επιθηλίων, και συνιστά έναν φυσικό φραγμό στην επιδερμίδα. Αυτά τα τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα δεν είναι ζωντανά αλλά έχουν πεθάνει με ένα διακριτό είδος απόπτωσης, της κερατινοποίησης (cornification). Αυτό το εύρημα συμφωνεί με τον ρόλο της p21 στην κυτταρική διαφοροποίηση ο οποίος θα συζητηθεί σε ξεχωριστή ενότητα.

Συνολικά λοιπόν, η p21 διαθέτει και αντι-αποπτωτική δράση και αντι-αποπτωτική. Αυτό της το χαρακτηριστικό της «ανταγωνιστικής δυαδικότητας» είναι παρόμοιο με τους φαινομενικά αντιφατικούς ρόλους στην απόπτωση κι άλλων κρίσιμων μορίων στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και την ογκογένεση όπως το Myc και ο E2F1,

αντισταθμίζοντας έτσι την δράση τους υπέρ του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (**Evan et al. 2001**). Οι μεν αντι-αποπτωτική δράση της p21 θεωρείται προκαρκινική ιδιότητα, η δε προ-αποπτωτική της δράση θεωρείται μέρος της ιδιότητάς της στην καταστολή της ογκογένεσης. Κατ' αυτόν τον τρόπο, η p21 μοιράζεται κοινά χαρακτηριστικά με κλασσικές ογκοπρωτεΐνες όπως οι Myc και E2F1. Άλλωστε, όπως θα συζητηθεί και σε ξεχωριστή ενότητα ο ρόλος της p21 ως ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης είναι αμφισβητήσιμος.

A.6. Οι αντιφατικοί ρόλοι της p21 στην ογκογένεση

A.6.1. Η έκφραση της p21 στα καρκινικά κύτταρα

Παρ' όλο που στον γενετικό τόπο *CDKN1A* έχουν ταυτοποιηθεί διάφοροι πολυμορφισμοί (**Chedid et al. 1994; Li et al. 1995; Koopmann et al. 1995**), η ανίχνευση μεταλλάξεων είναι σπάνιο φαινόμενο κι έτσι ακόμα και σε καρκινικές σειρές εκφράζεται η αγρίου-τύπου (wt) p21. Σε μία μεγάλη μελέτη εφαρμογής της τεχνικής SSCP (single-strand conformation polymorphism) σε 36 διαφορετικές μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές αλλά και σε 351 βιοψίες 14 διαφορετικών ανθρώπινων κακοηθειών, δεν ανιχνεύθηκαν σωματικές μεταλλάξεις στον *CDKN1A* τόπο (**Shiohara et al. 1994**). Ωστόσο, σε μία κυτταρική σειρά λεμφώματος Burkitt καθώς και σε κάποια δείγματα προερχόμενα από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη βρέθηκε μία μετάλλαξη στο κωδικόνιο 63 (Phe --> Leu) και ενθέσεις απλής βάσης, αντίστοιχα (**Bae et al. 1995; Gao et al. 1995**). Και στις δύο αυτές περιπτώσεις φάνηκε πως η ογκοκατασταλτική ή έστω η αντι-πολλαπλασιαστική ιδιότητα της p21 παρεμποδίζεται.

Σε κάθε περίπτωση όμως, η βιολογική συμπεριφορά της p21 δεν παραλληλίζει αυτήν της p53. Τα διαγονιδιακά ποντίκια που δεν εκφράζουν την p53 αναπτύσσουν αυθόρμητα όγκους σε νεαρή ηλικία (**Donehower et al. 1992; Harvey et al. 1993; Jacks et al. 1994**), αντίθετα με τα p21 ^{-/-} ποντίκια τα οποία παρουσιάζουν φυσιολογικό πρότυπο ανάπτυξης και αναπτύσσουν όγκους σε προχωρημένη ηλικία, από τους 16 μήνες ζωής κι έπειτα (**Deng et al. 1995; Martín-Caballero et al. 2001**). Φαίνεται πως η απουσία της έκφρασης της p21 πρέπει να δράσει συνεργειστικά με άλλες ογκοπρωτεΐνες όπως οι MYC, H-RAS ή τις χιμαιρικές BCR-ABL1 και

AML1-ETO για να επάγει την ογκογένεση ή έλλειψη της έκφρασης της p21 να συνοδεύεται με απαλοιφή του ογκοκατασταλτικού τύπου *Ink4* (Carnero et al. 2004; Forster et al. 2008; Carbone et al. 2007). Επιπλέον, η σπανιότητα της ανίχνευσης μεταλλάξεων στον *CDKN1A* τόπο σε κλινικά δείγματα κακοηθειών, έρχεται σε αντίθεση με την αυξημένη εξελικτική πίεση που δέχεται ο *TP53* τύπος κατά την καρκινογένεση με αποτέλεσμα ~50% των ανθρώπινων κακοηθειών να φέρουν σε αυτόν απενεργοποιητικές μεταλλάξεις (Hollstein et al. 1991; Greenblatt). Συνεπώς, ενώ οι p53 και p21 πρωτεΐνες λαμβάνουν μέρος σε κοινό σηματοδοτικό μονοπάτι σε συνθήκες γενωτοξικού στρες και η p53 διαθέτει αμιγώς ογκοκατασταλτική δράση ως «φύλακας του γενώματος» (Lane, 1992), μία τέτοια γενίκευση για την p21 δεν είναι δυνατή και τα δεδομένα σε σχέση με την δράση της p21 στην ογκογένεση είναι αντιφατικά.

A.6.2. Οι ογκοκατασταλτικές ιδιότητες της p21

Σε πολλές μελέτες έχειδειχθεί ότι η p21 διαθέτει ογκοκατασταλτικές ιδιότητες *in vitro* και *in vivo*. Όταν υπερεκφράζεται τόσο σε φυσιολογικά, μη-μετασχηματισμένα κύτταρα αλλά και σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές η p21 επιδεικνύει ανασταλτική δράση στην κυτταρική αύξηση και τον πολλαπλασιασμό, κάτι το οποίο συμφωνεί και με τον ρόλο της ως αναστολέα των CDKs. Αυτή η δράση της p21 ανάλογα το κυτταρικό σύστημα που χρησιμοποιείται κάθε φορά, εκδηλώνεται είτε σαν παύση του κυτταρικού κύκλου στην G0/G1 ή την G1 κι επομένως μείωση του ποσοστού των κυττάρων που διανύουν την φάση S (Harper et al. 1995; Katayose et al. 1995; Yang et al. 1995) ή ακόμα σαν κυτταρόσταση που σχετίζεται με κυτταρική διαφοροποίηση σε κύτταρα μελανώματος (Yang et al. 1995). Επίσης, παράλληλα με την αντι-πολλαπλασιαστική της δράση η p21 σε κυτταρικές σειρές καρκινώματος του προστάτη και του παχέος εντέρου, έχει δείξει ότι αναστέλλει την ανεξάρτητη της κυτταρικής προσκόλλησης κυτταρική αύξηση (anchorage-independent cell growth)- μία ιδιότητα που κλασσικά χαρακτηρίζει τις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες (Chen et al. 1995). Κατά έναν περίεργο τρόπο, η ογκοκατασταλτική δράση της p21 έχειδειχθεί σε κάποιες περιπτώσεις να σχετίζεται με τα επίπεδα της έκφρασής της. Για παράδειγμα σε ένα ποντικίσιο μοντέλο καρκινογένεσης του μαστικού αδένα η μονοαλληλική απώλεια της p21 (p21^{+/}) ενισχύει την ογκογένεση αλλά η διαλληλική (p21^{-/-}) όχι (Jones et al. 1999).

In vivo, όταν η p21 ενύεται τοπικά σε όγκους που έχουν ήδη σχηματισθεί σε ποντίκια, επάγει την υποχώρησή τους (Yang et al. 1995) ενώ ο σχηματισμός όγκων σε ποντίκια μέσω ενοφθαλμισμού τους με καρκινικά κύτταρα επίσης αναστέλλεται όταν τα κύτταρα αυτά υπερεκφράζουν την p21 (Chen et al. 1995). Έτσι λοιπόν, αυτά τα *in vivo* δεδομένα έρχονται να συμπληρώσουν τα δεδομένα *in vitro* που συνηγορούν υπέρ της δράσης της p21 ως μία ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη. Όπως όμως αναφέρεται αμέσως παρακάτω, η p21 επιδεικνύει και χαρακτηριστικά που θα ταίριαζαν σε μια ογκοπρωτεΐνη και κατά συνέπεια ο χαρακτηρισμός της σε σχέση με την ογκογένεση μάλλον δεν είναι μία τόσο εύκολη υπόθεση.

A.6.3. Οι ογκογενετικές ιδιότητες της p21

Η p21 όπως ήδη προαναφέρθηκε έχει κατά κόρον χαρακτηριστεί ως ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, όμως υπάρχουν πολλές μελέτες που υποδεικνύουν ότι παραδόξως η p21 διαθέτει χαρακτηριστικά που θα ταίριαζαν σε μία ογκοπρωτεΐνη με αποτέλεσμα η γενίκευση της δράσης της στην καταστολή της καρκινογένεσης να αμφισβητείται (Roninson, 2002; Gartel, 2006, 2009). Τα ογκογενετικά αυτά χαρακτηριστικά η p21 τα εκδηλώνει υπό ορισμένες συνθήκες και με τρόπο που εξαρτάται από το γενετικό υπόβαθρο, την κυτταρική της εντόπιση αλλά και την στοιχειομετρία της έκφρασής της ως προς άλλα μόρια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο.

Συγκεκριμένα, βρέθηκε πως η απαλοιφή του *Cdkn1a* τόπου στο ποντίκι αναστέλλει τόσο την επαγόμενη από ακτινοβόληση με ιονίζουσα ακτινοβολία λεμφομαγένεση ανεξάρτητα από την παρουσία αγρίου-τύπου p53 ή όχι (Martin-Caballero et al. 2001; De la Cueva et al. 2006), καθώς και την αυθόρμητη ανάπτυξη λεμφωμάτων σε ποντίκια που έχουν προδιάθεση στην ογκογένεση λόγω ομόζυγης απαλοιφής στον γενετικό τόπο *Trp53* ή *Atm* (De la Cueva et al. 2006; Wang et al. 1997). Αυτά τα *in vivo* δεδομένα σε μοντέλα ζώων (προκλινικά δεδομένα) που συνηγορούν στον ογκογενετικό ρόλο της p21 έρχονται σε συμφωνία με κλινικά δεδομένα όπου η υπερέκφραση της p21 χαρακτηρίζει ένα ευρύ φάσμα κακοηθειών όπως ο η ΟΜΛ (οξεία μυελογενής λευχαιμία) (Zhang et al. 1995a), το πολλαπλό μυέλωμα (Ohata et al. 2005) ο καρκίνος του μαστού (Winters et al. 2001, 2003; Xia et al. 2004), του προστάτη (Baretton et al. 1999; Aaltomaa et al. 1999), του παγκρέατος (Biankin et

al. 2001), των οωθηκών (Ferrandina et al. 2000), του οισοφάγου (Sarbia et al. 1998), σαρκωμάτων μαλακών μορίων (Pindzola et al. 1998) και γλοιωμάτων (Korkolopoulou et al. 1998) και πολλές φορές σχετίζεται με πτωχή πρόγνωση, πτωχό κλινικό αποτέλεσμα, μετάσταση, επανεμφάνιση και πτωχή συνολική επιβίωση.

Για την εξήγηση των ογκογενετικών ιδιοτήτων της p21, έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί. Από τους βασικότερους, είναι:

- ✓ Η καλά τεκμηριωμένη αντι-αποπτωτική δράση της p21 σε διάφορα κυτταρικά συστήματα αλλά και *in vivo* (Gartel and Tyner, 2002), με χαρακτηριστική περίπτωση τα αυξημένα ποσοστά απόπτωσης στα θυμώματα που σχηματίζονται σε ποντίκια με διπλή *Cdkn1a/Atm* απαλοιφή (Wang et al. 1997) συγκριτικά με τα εκείνα τα θυμώματα που αναπτύσσονται σε ποντικούς με απλή *Atm* απαλοιφή. Η αντοχή στα αποπτωτικά σήματα είναι ένα βασικό χαρακτηριστικό του καρκίνου (Hanahan and Weinberg, 2011).
- ✓ Η προώθηση της κυτταρικής αύξησης από την p21 μέσω της p21-εξαρτώμενης συναρμολόγησης των συμπλόκων των κυκλινών τύπου D με τις αντίστοιχες CDKs, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την περίπτωση τον ρόλο της p21 στην βιολογία του ολιγοδενδρογλοιώματος με αναγκαία την ακεραιότητα των δομών Cy (Liu et al. 2007).
- ✓ Ο ρόλος της κυτοσολικής p21 υπέρ της κυτταρικής αύξησης μέσω αδιευκρίνιστων p21-στόχων στο κυτοσόλιο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η περίπτωση της αναγκαιότητας ενός AKT-p21 μονοπατιού όπου η AKT αναγνωρίζει την p21 ως υπόστρωμα και την φωσφορυλιώνει στην Thr145, για την κυτοσολική εντόπιση της p21 και την HER-2/neu-μεσολαβούμενη προώθηση της κυτταρικής αύξησης. Όταν το μονοπάτι αυτό παρεμποδίζεται και το πρότυπο της έκφρασης της p21 είναι πυρηνικό, αναστέλλεται και η HER-2/neu-εξαρτώμενη κυτταρική αύξηση στα καρκινικά κύτταρα (Zhou et al. 2001). Μάλιστα, η χρώση για κυτοσολική/φωσφο-p21 (p-Thr145) σε κλινικά δείγματα καρκίνου του μαστού όπου ως γνωστό ο HER-2/neu παίζει κρίσιμο ρόλο, σχετίζεται με πτωχή συνολική επιβίωση των ασθενών (Xia et al. 2004).

- ✓ Ο αναπάντεχος ρόλος της p21 στην διατήρηση της ικανότητας αυτο-ανανέωσης των λευχαιμικών βλαστοκυττάρων, καθώς η κυτταροστατική δράση της p21 είναι απαραίτητη για την αποτροπή της φυσιολογικής «εξάντλησης» των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων υπό στρεσογόνες συνθήκες υπερ-πολλαπλασιασμού. Έτσι, έχει προταθεί πως η στόχευση της p21 θα μπορούσε όχι μόνο να ελαττώσει αλλά να εκριζώσει τα λευχαιμικά κύτταρα, αφού εικάζεται ότι ο κλώνος των λευχαιμικών κυττάρων δημιουργείται από βλαστικά κύτταρα που έχουν παροδικά παύσει να διανύουν τον κυτταρικό κύκλο. Κατ' αυτόν τον τρόπο, η p21 στην λευχαιμογένεση δεν λειτουργεί ως κλασσική ογκοπρωτεΐνη που επάγει *per se* τον κυτταρικό μετασχηματισμό, αλλά ως μία ιδιότυπη ογκοπρωτεΐνη η οποία προστατεύοντας τα κύτταρα από την συσσώρευση βλαβών του DNA λόγω αντιγραφικού stress, υποβοηθά την διατήρηση των λευχαιμικών κυττάρων (Viale et al. 2009).
- ✓ Η ικανότητα της p21 να επάγει την διεξαγωγή ανώμαλων μιτώσεων και την ενδο-επαναντιγραφή (endoreduplication) του χρωμοσωμικού DNA και συνεπώς να προκαλεί ανευπλοειδία στα κύτταρα που επαναεισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο μετά από την p21-μεσολαβούμενη παύση (Chang et al. 2000a) αλλά και η εμπλοκή της στην επανα-αδειοδότηση της αντιγραφής του γενώματος οδηγώντας πάλι στην ανευπλοειδογένεση όταν η φυσιολογική της αποικοδόμηση αναχαιτίζεται (Kim et al. 2008).
- ✓ ο ρόλος της p21 στην επαγωγή της έκφρασης εκκρινόμενων μορίων με ογκογενετικές (αντι-αποπτωτικές ή μιτογόνες) ιδιότητες (Chang et al. 2000b) όπως η βήτα 2-μικροσφαιρίνη (Currid et al. 2006; Nomura et al. 2006; Huang et al. 2010). Αυτό άλλωστε συμφωνεί και με την προ-καρκινική παρακρινή δράση των γηρασμένων κυττάρων (Rodier and Campisi, 2011) στα οποία η p21 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα και τέλος,
- ✓ ο ρόλος της p21 στο να ενισχύει την ανεξάρτητη της προσκόλλησης σε υπόστρωμα κυτταρική αύξηση (anchorage-independent cell growth) και τον σχηματισμό επιπλέοντων σφαιροειδών πολυκυτταρικών συσσωματωμάτων

(multicellular spheroids, MCSs) σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου μέσω επαγωγής της έκφρασης της E-καντχερίνης (Mueller et al. 2000).

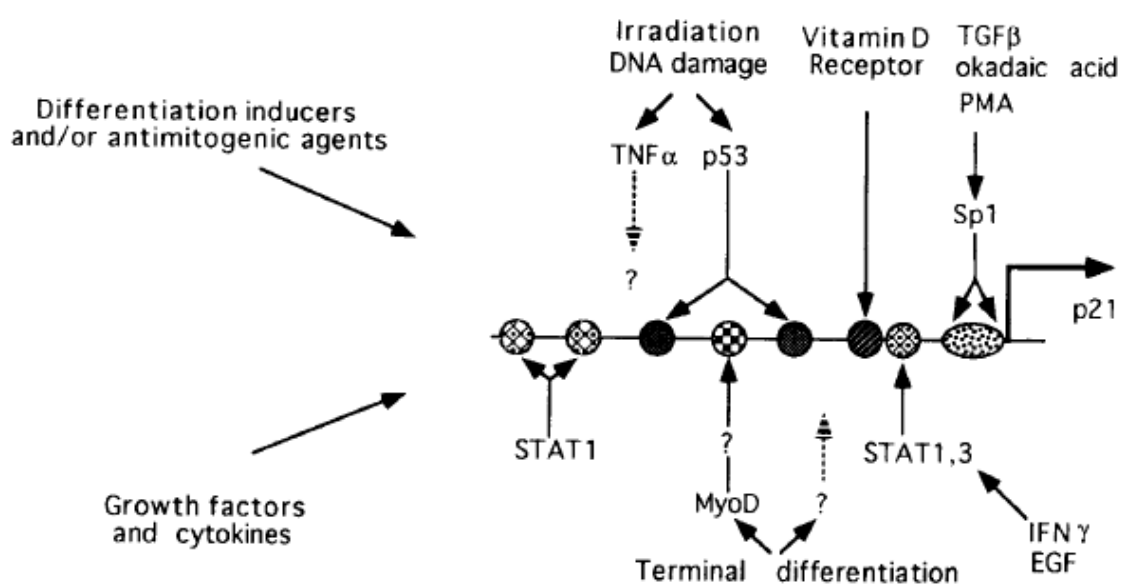
A.7. Η p21 στην κυτταρική διαφοροποίηση και στην εμβρυογένεση

A.7.1. Η p21 στην κυτταρική διαφοροποίηση

Η έκφραση του γονιδίου της p21 μπορεί να διεγερθεί κατά έναν p53-ανεξάρτητο τρόπο από ένα σετ διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων του MyoD, των Sp1 και Sp3, των STAT1 και STAT3 καθώς και του πυρηνικού υποδοχέα VDR (vitamin D receptor) (Gartel and Tyner, 1999; Muto et al. 1999), μέσω αντίστοιχων ρυθμιστικών *cis*-στοιχείων απόκρισης στον υποκινητή του (Εικόνα A18). Έτσι, η p21 παίζει ρόλο σε μονοπάτια διαφοροποίησης η οποία προϋποθέτει την παύση του κυτταρικού κύκλου, τόσο σε μη μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές όσο και σε καρκινικά κύτταρα ύστερα από ερέθισμα διάφορων προ-διαφοροποιητικών φυσικών ή χημικών σημάτων στους οποίους συγκαταλέγονται η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ), οι εστέρες φορβόλης, το οκαδαϊκό οξύ, οι αναστολείς απακετυλασών ιστονών (HDACIs) και η διατήρηση κυττάρων σε καλλιέργεια σε συνθήκες «συρροής» όπου δηλ. τα κύτταρα έχουν φτάσει και ξεπεράσει την μέγιστη πυκνότητά τους (confluence).

Για παράδειγμα, στην πολυδύναμη κυτταρική σειρά 10T1/2 που χρησιμοποιείται ως *in vitro* μοντέλο για την μελέτη της διαφοροποίησης σε κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης (Pinney and Emerson, 1989), η υπερέκφραση του μυογενετικού παράγοντα MyoD επάγει την έκφραση της p21 και οδηγεί στην διαφοροποίηση σε μυοβλάστες (Parker et al. 1995; Halevy et al. 1995). Στα κύτταρα αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου Caco-2 που καλλιεργούνται σε συνθήκες συρροής, ακολουθείται ένα πρόγραμμα διαφοροποίησης που μοριακά σχετίζεται με την επαγωγή της p21 και φαινοτυπικά εκδηλώνεται από την υιοθέτηση πολικότητας, των σχηματισμό μικρολαχνών και την έκφραση υδρολυτικών ενζύμων που είναι ειδικά για τα διαφοροποιημένα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου (Gartel et al. 1996; Pinto et al. 1983). Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν πως αυτό το p21-εξαρτώμενο πρόγραμμα διαφοροποίησης στα Caco-2 κύτταρα σχετίζεται με την Sp1/Sp3-

μεσολαβούμενη ενεργοποίηση του υποκινητή του *CDKN1A* (Gartel et al. 2000). Σε κύτταρα ηπατώματος στα οποία επάγεται η διαφοροποίηση ύστερα από έκθεση στον προ-διαφοροποιητικό παράγοντα με ενεργότητα HDACI, βουτυρικό οξύ, η αυξορρύθμιση της p21 είναι επίσης χαρακτηριστική της διαδικασίας της κυτταρικής διαφοροποίησης (Steinman et al. 1994). Σε όλες τις προαναφερθείσες περιπτώσεις, η επαγωγή της p21 λαμβάνει χώρα κατά έναν p53-ανεξάρτητο τρόπο.



Εικόνα A18. Ρυθμιστικά *cis*-στοιχεία στον υποκινητή του γονιδίου *CDKN1A*. Τα στοιχεία αυτά μεσολαβούν την μεταγραφή του σε απόκριση στην βλάβη του DNA, κατά έναν p53-εξαρτώμενο τρόπο και ως απάντηση σε προ-διαφοροποιητικούς παράγοντες (π.χ. οκαδαϊκό οξύ, εστέρες φορβόλης, ο MyoD και η IFN-γ) με έναν p53-ανεξάρτητο μηχανισμό (Gartel et al. 1996b).

Στα UF-1 κύτταρα προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας που εμφανίζουν αντοχή στην διαφοροποίηση που επάγεται από το ρετινοϊκό οξύ (ATRA) η επαγωγή της διαφοροποίησης μπορεί να γίνει από την 1,25(OH)2D3 (1,25-διϋδροξυβιταμίνη D3) μέσω του πυρηνικού υποδοχέα VDR κι ενός στοιχείου απόκρισης σε αυτόν, VDRE (vitamin D3-responsive element), στον υποκινητή του γονιδίου της p21, και σχετίζεται με αύξηση της έκφρασης και της p21 αλλά και της p27 (Muto et al. 1999). Σε ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα U937 η έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις (1 μM) ενός άλλου HDACI, του MS-275 έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή του

πολλαπλασιασμού και την έκφραση δεικτών διαφοροποίησης, ενώ η αποσιώπηση της p21 ευαισθητοποιεί τα κύτταρα αυτά στην MS-275-επαγόμενη απόπτωση που ειδάλλως (παρουσία της p21) πυροδοτείται από υψηλότερες συγκεντρώσεις του MS-275 (Rosato et al. 2003).

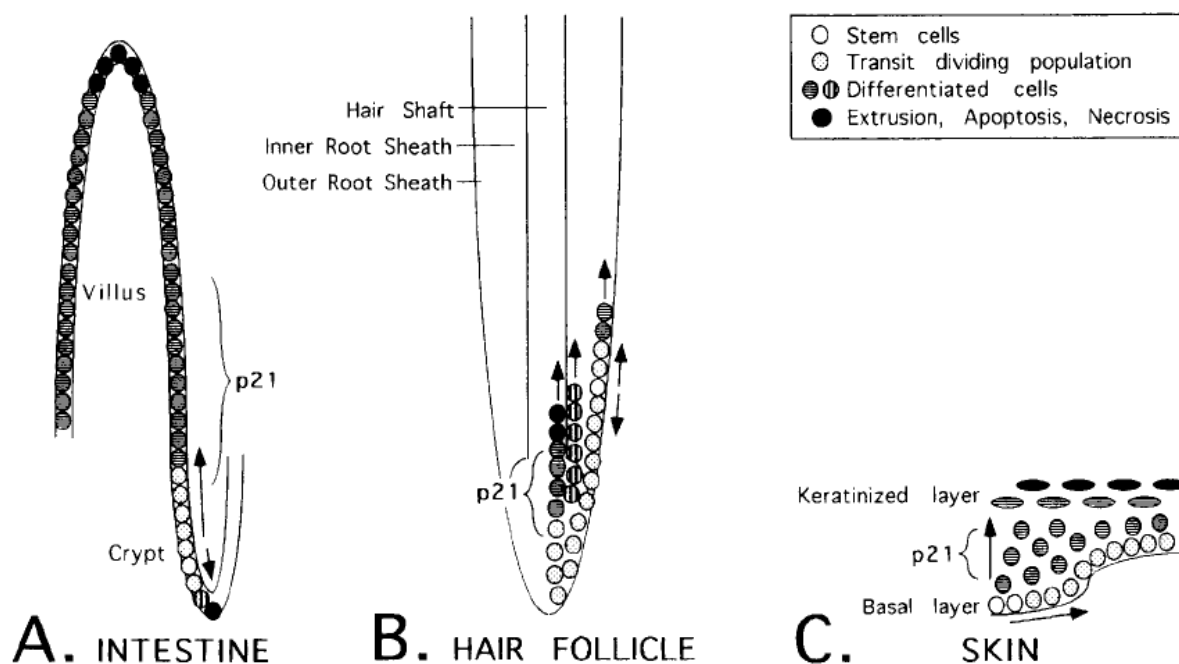
Κατά την μελέτη της διαφοροποίηση κυττάρων της σειράς των μονοκυττάρων/μακροφάγων από την IFN- γ που ως γνωστό ενεργοποιεί το μονοπάτι JAK/STAT (Ihle et al. 1995), το οκταδαϊκό οξύ ή τον εστέρα φορβόλης TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) σε ανθρώπινους λευχαιμικούς μονοβλάστες U937, παρατηρείται η p53-ανεξάρτητη αυξορρύθμιση της p21 που σχετίζεται με παύση του κυτταρικού κύκλου και διαφοροποίηση (Zhang et al. 1995b). Για την διαφοροποίηση της ίδιας κυτταρικής σειράς (U937) προς μονοκύτταρα/μακροφάγα σε απόκριση στον TPA και μέσω επαγωγής της p21, βρέθηκε πως είναι απαραίτητος ο μεταγραφικός παράγοντας IRF-1 (interferon regulatory factor-1) (Manzella et al. 1999). Αντίθετα, μία άλλη κυτοκίνη ο TGF- β (transforming growth factor- β) που διαθέτει κυτταροστατική δράση για τα επιθηλιακά κύτταρα αλλά προάγει τον πολλαπλασιασμό των μεσεγχυματικών κυττάρων, καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου της p21 και την μυογενετική διαφοροποίηση των μυοβλαστών (Murakami et al. 2008).

A.7.2. Η p21 σε οντογενετικές διαδικασίες

Όπως υποδεικνύουν τα πρότυπα έκφρασης της p21 κατά την κυτταρική διαφοροποίηση και εμβρυογένεση, η p21 πρωτεΐνη εμπλέκεται στις διαδικασίες αυτές. Για την ακρίβεια, στο αναπτυσσόμενο έμβρυο ποντικού, το μετάγραφο της p21 ανιχνεύεται από την 8.5 ημέρα p.c. (post coitum) στον νευρικό σωλήνα και το οπίσθιο εμβρυϊκό έντερο, με την έκφρασή του να επάγεται μάλλον κατά ένα p53-ανεξάρτητο τρόπο στους περισσότερους ιστούς (Parker et al. 1995; Schmid et al. 1991; Gartel et al. 1996; Missero et al. 1995; Gartel et al. 1996b).

Λειτουργικά, η έκφραση της p21 τόσο σε κυτταρικές σειρές όσο και σε έμβρυα ποντικού σχετίζεται με την κυτταρόσταση η οποία έπεται από την επαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα A19**, στο ενήλικο ποντίκι, η p21 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε ιστούς με αυξημένο ρυθμό ανακύκλισης

(turn-over) και ανανέωσης όπως στα διαφοροποιημένα κύτταρα των λαχνών του εντερικού επιθηλίου καθώς και τα διαφοροποιημένα κύτταρα των τριχοθυλακίων και του δέρματος (Huppi et al. 1994; Gartel et al. 1996a; Schmid et al. 1991).



Εικόνα A19. Η p21 ανιχνεύεται σε υψηλά επίπεδα σε επιθήλια με αυξημένο ρυθμό ανανέωσης όπως το εντερικό επιθήλιο (A), το τριχοθυλάκιο (B) και το δέρμα (C). Η έκφραση είναι ειδική για τα κύτταρα που ήδη έχουν διαφοροποιηθεί ή έχουν σταματήσει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου κι έχουν εισέλθει σε ένα πρόγραμμα διαφοροποίησης (Gartel et al. 1996b).

Κατά περίεργο τρόπο, στα επιθηλιακά κύτταρα ποντικών που δεν εξέφραζαν την p21, δεν έχουν παρατηρηθεί μορφογενετικές αλλαγές και τουλάχιστον μέχρι τους 7 μήνες ζωής, ποντίκια που δεν εκφράζουν την p21 σε κανέναν ιστό αναπτύσσονται φυσιολογικά (Brugarolas et al. 1995; Deng et al. 1995). Στο ποντίκι, η p21 έχει δείχθει πως παίζει ρόλο και στην οδοντογένεση ως μέρος του ρυθμιστικού μονοπατιού Tbx1/Pitx2/p21 που είναι αναγκαίο για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό προγονικών κυττάρων του οδοντικού επιθηλίου (Cao et al. 2010). Στην *Drosophila*, η p21 έχει δείχθει πως παίζει ρόλο στον σχηματισμό κυττάρων του οφθαλμού όπως

τα κωνία και οι πρόδρομοι των φωτοδεκτικών κυττάρων R1, R6 και R7 (**de Nooij et al. 1995**).

A.8. Η πρωτεΐνη ARF και οι κυτταρικές της λειτουργίες

Η ARF όπως αναφέρεται αναλυτικά παρακάτω έχει μόνο τον ρόλο ενός αισθητήρα στα έκτοπα μιτογόνα σήματα. Ωστόσο, αποκρίνεται και σε άλλα είδη κυτταρικού στρες όπως το οξειδωτικό στρες και το θερμικό στρες (**Damalas et al. 2011**). Επιπλέον, τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν πως η ARF είναι ουσιαστικά μία πολύ-λειτουργική πρωτεΐνη που εμπλέκεται σε πολλές διαδικασίες συμπεριλαμβανομένης της ανοσορύθμισης (**Través et al. 2012**), της προστασίας κατά της αθηρογένεσης (**González-Navarro et al. 2010**), της ρύθμισης της ωρίμανσης των πρόδρομων rRNAs (**Sugimoto et al. 2003**) καθώς και αναπτυξιακών διεργασιών (**Thornton et al. 2005; Gromley et al. 2009; Churchman et al. 2011**). Ας σημειωθεί ότι κατά την ανάπτυξη στο ποντίκι, παρ' όλο που η ARF είναι μη ανιχνεύσιμη στους περισσότερους ιστούς (**Zindy et al. 1997, 2003**), εκφράζεται κυρίως στον αναπτυσσόμενο οφθαλμό και τους όρχεις όπως και στις ομφάλιες αρτηρίες και η έκφρασή του ελέγχεται από τον παράγοντα TGFβ2 (**Freeman-Anderson et al. 2009**).

A.8.1. Η ARF στην καταστολή της ογκογένεσης

A.8.1.1. Η ARF συμμετέχει σε πολλαπλά ογκοκατασταλτικά δίκτυα

Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη ARF κωδικοποιείται από τον γενετικό τόπο *INK4A/ARF*. έναν τόπο που πολύ συχνά φέρει «χτυπήματα» στους ανθρώπινους όγκους και κωδικοποιεί επιπλέον και μία άλλη ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, τον αναστολέα κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών p16 INK4A. Η ARF και η p16 INK4A δρουν μέσω συγκεκριμένων σηματοδοτικών μονοπατιών ώστε τελικά να καταλήξουν στην σταθεροποίηση της p53 και την προώθηση της κυτταροστατικής δράσης της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb), αντίστοιχα. Η ARF τυπικά έχει ως αποτέλεσμα στην αυξορρύθμιση των επιπέδων της p53 μέσω της αναστολής της αποικοδόμησής της από την E3 λιγάση ουβικουΐτινης MDM2. Η ενεργοποίηση του ARF/MDM2/p53 δικτύου είτε σταματά τον κυτταρικό κύκλο είτε πυροδοτεί την απόπτωση (**Quelle et al. 1995; Sherr, 2000**). Μία άποψη που επικρατούσε για πολύ καιρό ήταν πως η ARF χρησιμεύει ως ένα είδος ογκογονικού «αισθητήρα», δεδομένου ότι ρυθμιζόταν θετικά από τα ογκογονίδια Myc, E1A και RAS (**Zindy et**

al. 1998; de Stanchina et al. 1998; Palmero et al. 1999) και ότι η δράση της ήταν αποσυζευγμένη από το μονοπάτι της απόκρισης στη βλάβη του DNA (DNA damage response, DDR) (**Kamijo et al. 1997, 1999a; Sherr, 2006**).

Παρ' ότι οι πρωτεΐνες ARF και p53 συμμετέχουν στο ίδιο μονοπάτι, ο φαινότυπος της απαλοιφής της ARF στο ποντίκι είναι διαφορετικός με εκείνον της απαλοιφής της p53. Έτσι, τα ποντίκια που δεν εκφράζουν την ARF αναπτύσσουν κυρίως σαρκώματα ενώ τα ποντίκια που στερούνται λειτουργικής p53 χαρακτηρίζονται από την ανάπτυξη θυμικών λεμφωμάτων (**Kamijo et al. 1999b**). Αυτό ήταν και μία από τις πρώτες πειραματικές αποδείξεις πως η ARF και η p53 μπορούν και λειτουργούν ανεξάρτητα η μία από την άλλη και πως εκπληρώνουν διαφορετικούς ρόλους στην «επιτήρηση» κατά της καρκινογένεσης.

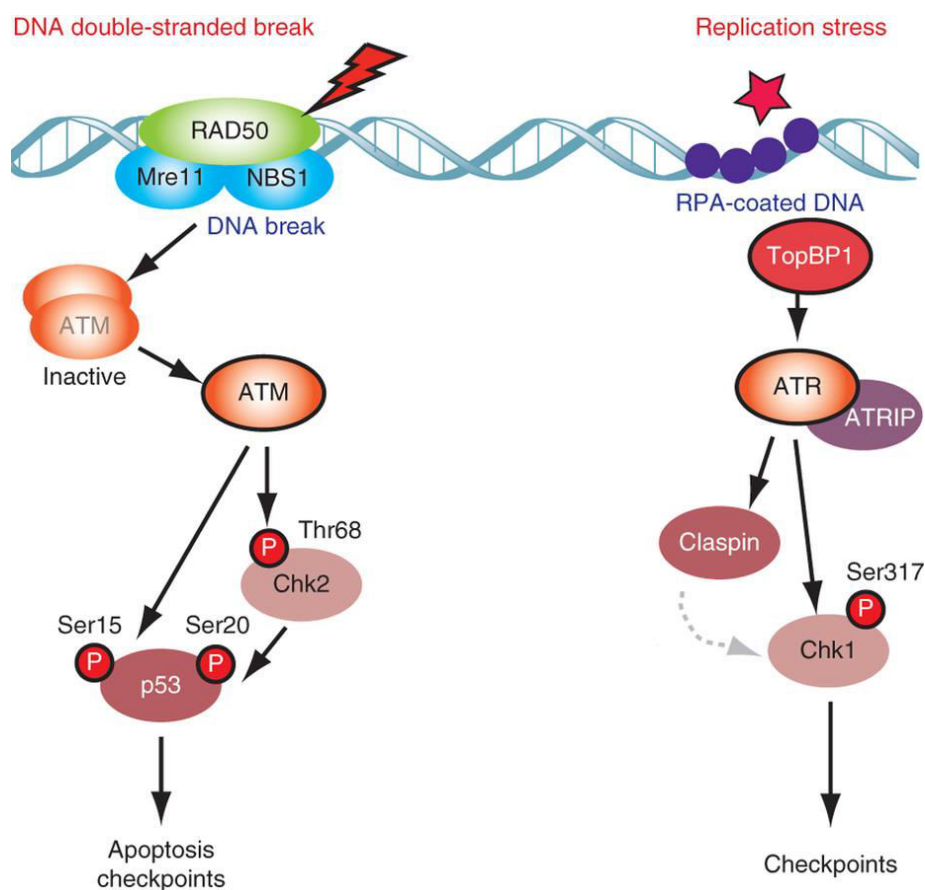
Πρόσφατες δημοσιεύσεις υποδεικνύουν την ύπαρξη και την λειτουργική σημασία μιας διασταυρούμενης επικοινωνίας μεταξύ της ARF και της DDR (**Velimezi et al. 2013; Kotsinas et al. 2014**) και πώς η ARF μπορεί να δρα σαν ένας εφεδρικός ογκοκατασταλτικός «συναγερμός» σε περίπτωση που η p53 απενεργοποιηθεί κατά την καρκινογένεση (**Evangelou et al. 2013**).

A.8.1.2. Η ARF επιδεικνύει ογκοκατασταλτικές δράσεις σε αλληλεπίδραση με το μονοπάτι της απόκρισης στη βλάβη του DNA (DDR)

A.8.1.2.a. Το μονοπάτι της απόκρισης στη βλάβη του DNA και η σημασία του για την καρκινογένεση

Η απόκριση στην βλάβη του DNA είναι ένα καλά ενορχηστρωμένο μονοπάτι και μεσολαβείται από μόρια που παίζουν ρόλο σε διαφορετικά επίπεδα (**Εικόνα A20**) που καταλήγει στην ενεργοποίηση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Έτσι π.χ. η βλάβη αυτή καθ' αυτή γίνεται αισθητή από σύμπλοκα που δρουν ως «αισθητήρες» όπως το σύμπλοκο MRN (Mre11-RAD50-NBS1) τα οποία και μεταγουν το σήμα σε κινάσες τοποθετημένες στην κορυφή της ιεράρχησης της μεταγωγής του σήματος της βλάβης (apical kinases) όπως η ATM. Η ATM με τη σειρά της όταν ενεργοποιείται μετατρέπεται από ένα ανενεργό διμερές σε ένα ενεργό

μονομερές και διεγείρει άλλες κινάσες όπως την Chk2 καθώς και την κομβική πρωτεΐνη-τελεστή (effector), την p53.

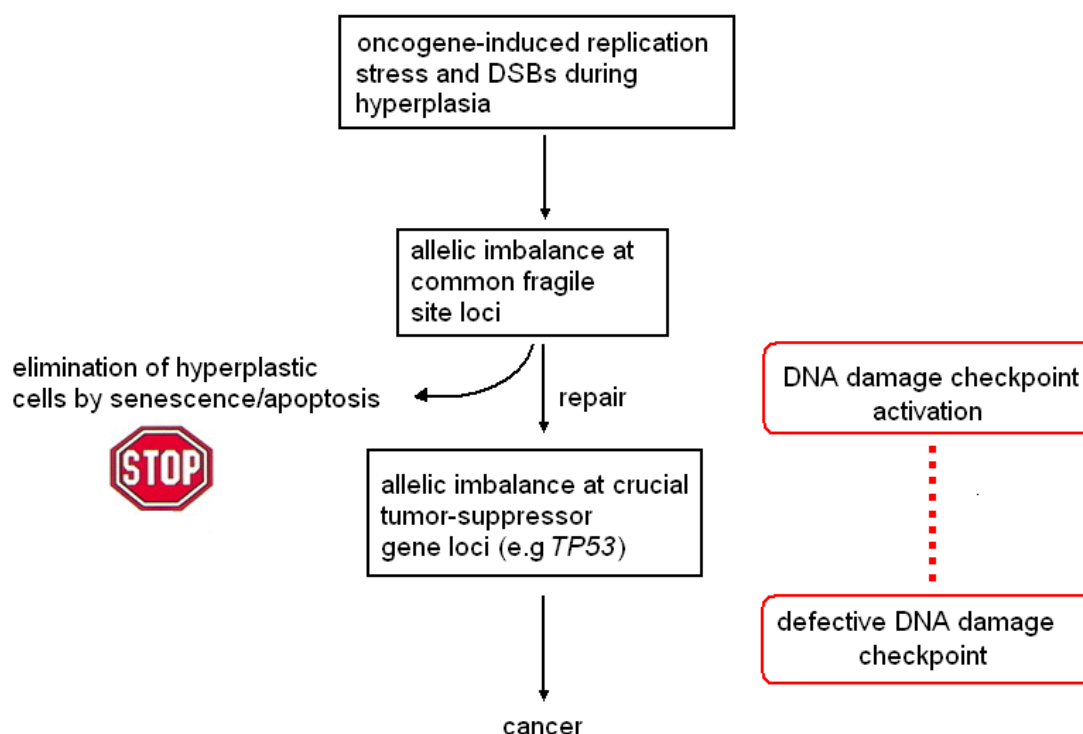


Εικόνα A20. Η ATM/R-μεσολαβούμενη μεταγωγή σήματος κατά την απόκριση στην βλάβη του DNA. Τα μονοπάτια αυτά φαινομενικά είναι ξεχωριστά. Ωστόσο, επειδή οι δικλωνικές θραύσεις (double strand breaks, DSBs) που ενεργοποιούν την ATM μετατρέπονται τελικά σε μονόκλωνο DNA (single-stranded DNA, ssDNA) μέσω της νουκλεολυτικής δράσης της Mre11 (**Jazayeri et al. 2006**), η ενεργοποίηση της ATM συνυπάρχει με την ενεργοποίηση της ATR (τροποποιημένο από **McKinnon et al. 2013**).

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις με κυρίαρχη την φωσφορυλίωση παίζουν κρίσιμο ρόλο στη μεταγωγή του σήματος στην DDR. Η ATM ενεργοποιείται κυρίως σε απόκριση στις δικλωνικές θραύσεις, ενώ η ATR που ανήκει στην ίδια πρωτεϊνική

οικογένεια με την ATM, την οικογένεια των PI3KK κινασών, ενεργοποιείται σε απόκριση σε παρακωλυμένες διχάλες αντιγραφής. Η ATR ενεργοποιείται από την TopBP1 κατά έναν ATRIP-εξαρτώμενο τρόπο και ενεργοποιεί την κινάση Chk1.

Το μονοπάτι της απόκρισης στην βλάβη του DNA (DDR) έχει πολύ σημαντικό λειτουργικό ρόλο κατά την καρκινογένεση. Η έκθεση των κυττάρων σε ογκογονικά ερεθίσματα έχει ως αποτέλεσμα το κύτταρο να τελεί υπό συνθήκες αντιγραφικού stress. Το επακόλουθο είναι η γενωμική βλάβη που πυροδοτεί την γενωμική αστάθεια· ένα κύριο χαρακτηριστικό του καρκίνου (**Halazonetis et al. 2008**). Επιπλέον, το ογκογονικό stress επάγει την ενεργοποίηση του μονοπατιού της DDR και τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (checkpoints). Με την σειρά της, η DDR επιβάλλει τους δύο μεγάλους αντικαρκινικούς φραγμούς, εκείνον της κυτταρικής γήρανσης και της απόπτωσης (**Εικόνα A21**). Επίσης, το ογκογονικό stress επιφέρει και μία αυξορρύθμιση του mRNA της ARF κατά έναν DDR-ανεξάρτητο τρόπο. Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 χρησιμεύει ως ένα κομβικό μόριο τελεστής στην DDR (**Liu and Kulesz-Martin, 2001; Sengupta and Harris, 2005; Kotsinas et al. 2014**).



Εικόνα A21. Η διαδικασία της καρκινογένεσης σε σχέση με την DDR (DNA damage response). Το αντιγραφικό stress που προκαλείται από την βεβιασμένη

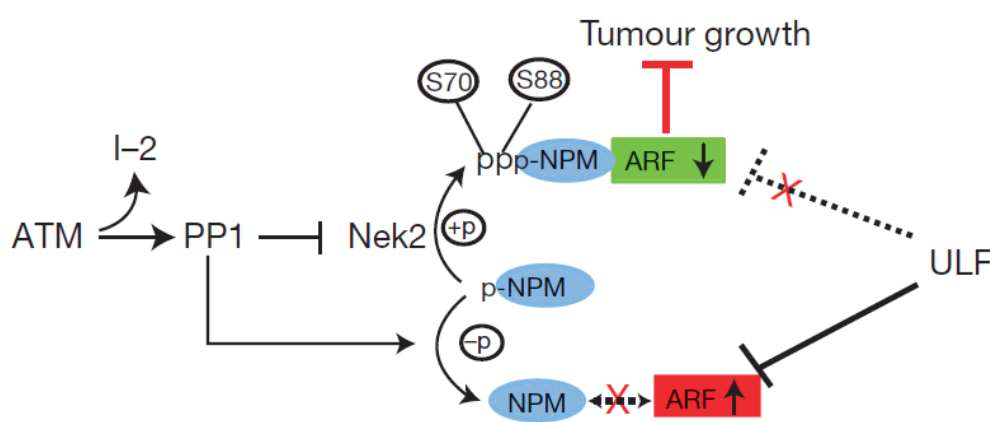
αντιγραφή του γενώματος (hyperreplication) δημιουργεί δικλωνικές θραύσεις (DSBs, double-strand breaks). Τα περισσότερα ευαίσθητα σημεία του γενώματος που υφίστανται πρώτα τις θραύσεις είναι τα λεγόμενα εύθραυστα σημεία («common fragile sites»). Η DDR της οποίας η ενεργοποίηση λαμβάνει μέρος ήδη από το πρώιμο στάδιο της υπερπλασίας, επιβάλλει τους δύο μεγάλους αντικαρκινικούς φραγμούς της γήρανσης και της απόπτωσης. Παρ' όλα αυτά, η γενετική αστάθεια (αστάθεια αλληλομόρφων, allelic imbalance ή LOH) που και αυτή είναι παρούσα από το στάδιο της υπερπλασίας, κατά την καρκινογένεση πλήττει τελικά τις ίδιες τις συνιστώσες της DDR π.χ. τους τύπους *TP53* or *CHK2* και τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (checkpoints) καταρρέουν επιτρέποντας έτσι την πρόοδο στην κακοήθεια.

A.8.1.2.β. Η αλληλεπίδραση της DDR με την ARF

Σε πρόσφατη δημοσίευση (Velimezi et al. 2013) δείχθηκε πως υπάρχει μία ανταγωνιστική σχέση μεταξύ της ATM κινάσης και της ARF, καθώς η ATM ρυθμίζει αρνητικά τα επίπεδα της ARF πρωτεΐνης μέσω ενός PP1-Nek2-NPM/B23 μονοπατιού (Εικόνα A22). Απουσία της ATM η ARF υφίσταται μία αύξηση στα επίπεδά της που δεν σχετίζεται με μεταγραφική ενεργοποίηση και οι p53-ανεξάρτητες δράσεις της όπως η αναστολή της βιοσύνθεσης των rRNAs και η καταστολή της μηχανής της μετάφρασης ενισχύονται. Όπως ήταν αναμενόμενο, αυτό έχει αρνητικό αντίκτυπο στην αύξηση των καρκινικών κυττάρων *in vitro* όπως και στην αύξηση των όγκων σε ξενομοσχεύματα ποντικών.

Πιστεύεται ότι αυτό το φαινομενικά αυτο-αντικρουόμενο δίκτυο ATM-ARF χρησιμεύει σαν ένα είδος δεύτερης γραμμής, «εφεδρικού» αντικαρκινικού φραγμού ο οποίος εγείρεται σε περίπτωση που η δραστηριότητα της ATM πλήττεται κατά την καρκινογένεση και ως εκ τούτου, τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου που ενορχηστρώνονται από την ATM καταρρέουν. Δεδομένου ότι η χορήγηση της καφεΐνης που είναι αναστολέας της ATM σε ξενομοσχεύματα επέφερε μία σημαντική μείωση στο μέγεθος του όγκου κατά παρόμοιο τρόπο που επέφερε και η αποσιώπηση της ATM με λεντιϊούς, είναι λογικό κάποιος να υποθέσει ότι οι αναστολείς της ATM ή της βιοτεχνολογικής στόχευσής της μπορούν να βρουν κλινική εφαρμογή στο πεδίο της θεραπείας του καρκίνου (Velimezi et al. 2013). Αυτό θα είχε ιδιαίτερη σημασία

ειδικά στους ασθενείς που φέρουν απενεργοποιημένη p53 αφού σε αυτήν την περίπτωση, η χαμηλή δραστηριότητα της ATM έχειδειχθεί να σχετίζεται με πιο μακρά επιβίωση μετά από χημειοθεραπεία, τουλάχιστον στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού (Jiang et al. 2009). Επιπλέον, τα προαναφερθέντα ευρήματα έρχονται σε συμφωνία με την καλά-τεκμηριωμένη αντικαρκινική δράση της καφεΐνης (Sabisz and Skladanowski, 2008) που και χρησιμοποιείται ως βοηθητικό της χημειοθεραπείας.



Εικόνα A22. Μοντέλο του μονοπατιού ATM/PP1/Nek2/NPM που ελέγχει την σταθερότητα της ARF πρωτεΐνης. Η ενεργοποίηση της ATM συντελεί στην φωσφορυλίωση της ανασταλτικής I-2 ρυθμιστικής υπομονάδας της φωσφατάσης PP1. Η ενεργοποίηση της PP1 με την σειρά της ανταγωνίζεται την Nek2-μεσολαβούμενη φωσφορυλίωση της νουκλεοφωσμίνης (NPM), κι επομένως την αλληλεπίδραση NPM-ARF που προστατεύει την ARF από αποικοδόμηση από την ULF στο πυρηνόπλασμα (Velimezi et al. 2013).

Στα κύτταρα που προέρχονται από ασθενείς με σύνδρομο AT (αταξίας τηλεαγγειεκτασίας) η απουσία της ATM σχετίζεται με ελαττωματικά σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και επιρρέπεια στην καρκινογένεση (Jeggo et al. 1998). Αντίθετα, στα μετασχηματισμένα κύτταρα η αναστολή της ATM αυξάνει τα επίπεδα της ARF (Velimezi et al. 2013) προκειμένου εκείνη να εκπληρώσει τα ογκοκατασταλτικά της «καθήκοντα». Αυτό υποδεικνύει μία δυαδικότητα στην

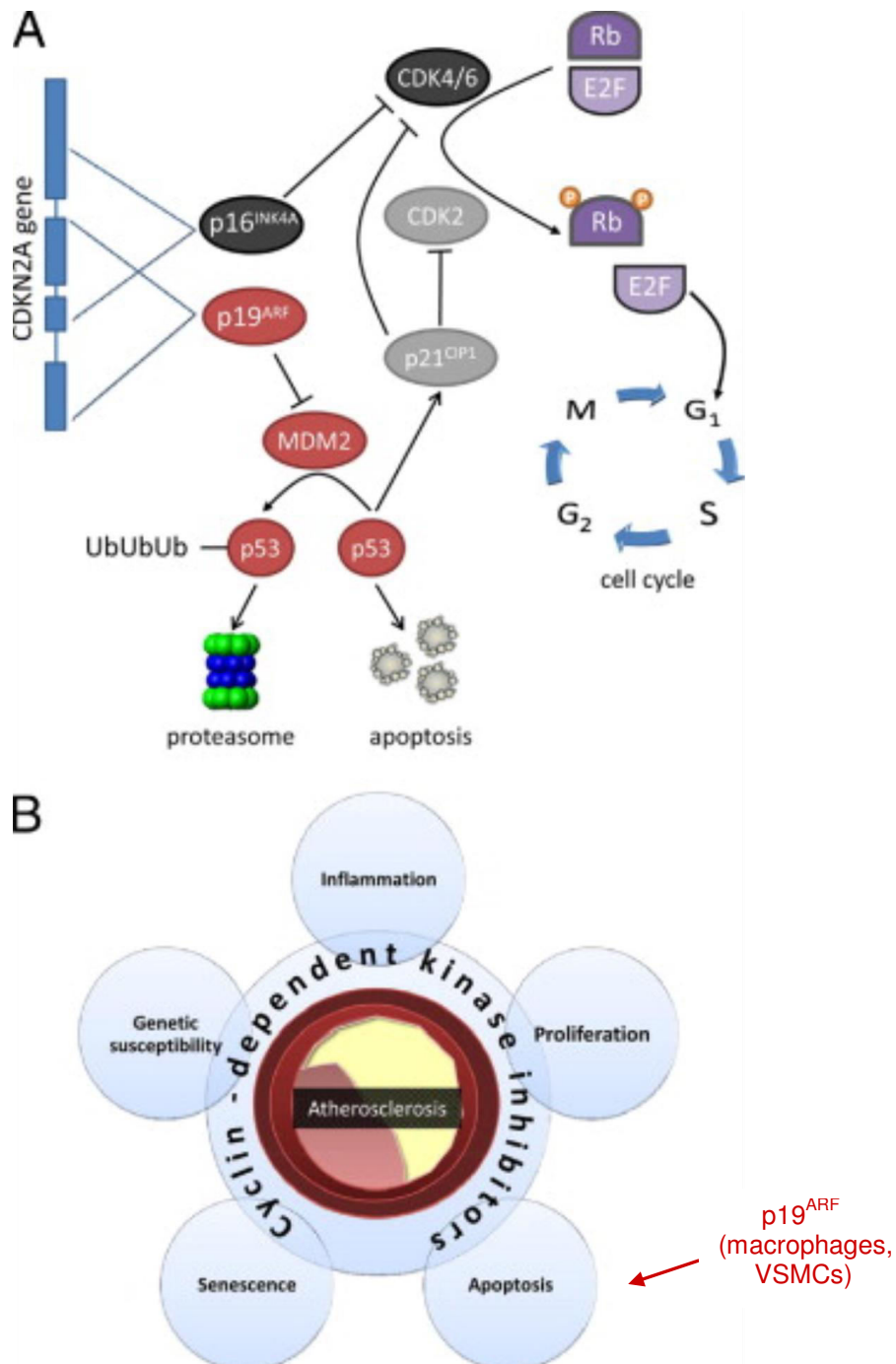
συμπεριφορά της ATM στην καρκινογένεση. Επομένως, θα μπορούσε κάποιος να ισχυρισθεί ότι ο επί μακράν καθιερωμένος ρόλος της ATM στην διατήρηση της γενωμικής σταθερότητας και της ογκοκαταστολής (Lavin et al. 2005; Shiloh, 2003) συνιστά την «καλή» της πλευρά ενώ το γεγονός ότι η απουσία παρά η παρουσία της ATM αίρουν την αναστολή των p53-ανεξάρτητων δράσεων της ARF κατά του καρκίνου, συνιστά το «σκοτεινό προσωπείο» της ATM που θα μπορούσε να στοχευθεί είτε φαρμακολογικά είτε βιοτεχνολογικά. Παρ' όλα αυτά, μάλλον η αντίστροφη αυτή σχέση μεταξύ της ATM και της ARF είναι ανταγωνιστική μόνο φαινομενικά και στην ουσία πρόκειται για έναν ογκοκατασταλτικό μηχανισμό εφεδρείας σε περίπτωση απενεργοποίησης της ATM κατά την καρκινογένεση.

A.8.2. Η ARF στην προστασία κατά της αθηρογένεσης

Ο González-Navarro και οι συνεργάτες του, χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο ποντικού για την αθηροσκλήρωση το οποίο χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια για την έκφραση apoE (απολιποπρωτεΐνη E) συνέβαλλαν στο χαρακτηρισμό ενός νέου ρόλου της ARF, τουλάχιστον του ποντικίσιας (p19^{ARF}), εφαρμόζοντας επιπλέον απαλοιφή της p19^{ARF}. Με μία σειρά πειραμάτων αποδείχθηκε ότι η ARF διαθέτει προστατευτικό, αντι-αθηρογενετικό ρόλο που αποδίδεται αποκλειστικά και μόνο στην προ-αποπτωτική της δράση σε διαφορετικά κυτταρικά στοιχεία των αθηροματικών πλακών (αγγειακές λείες μυϊκές ίνες και μακροφάγα). Αναπάντεχα, ενώ η ARF είναι ένας κλασικός αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών, ο αρνητικός της ρόλος στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ή ακόμα και ο ρόλος της στην ρύθμιση αγγειακών δικτύων δεν έχουν καμία σχέση με την επίδρασή της στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης· κάτι που θα μπορούσε να ισχύει δεδομένου του ρόλου της αγγειογένεσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στην ασθένεια αυτή (Εικόνα A23).

Απουσία της p19^{ARF} η αθηρογένεση επιταχύνεται σε ανατομικά σημεία που είναι γνωστά για την επιρρέπειά τους στην δημιουργία αθηρωματικής πλάκας. Αυτό υποδεικνύει ότι η ARF παίζει ρόλο μάλλον στην εξέλιξη της νόσου σε προχωρημένα στάδια παρά κατά την έναρξη των παθογενετικών διεργασιών. Ας σημειωθεί πως η απώλεια της έκφρασης της p19^{ARF} μπορεί λειτουργικά (ως προς την προστασία κατά της αθηροσκλήρωσης και όχι ως προς την επαγωγή της απόπτωσης) να αναπληρωθεί

από την p16 INK4A, καταδεικνύοντας την λειτουργική αλληλοεπικάλυψη αυτών των δύο πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τον ίδιο τόπο, τουλάχιστον σε αυτήν την περίπτωση.



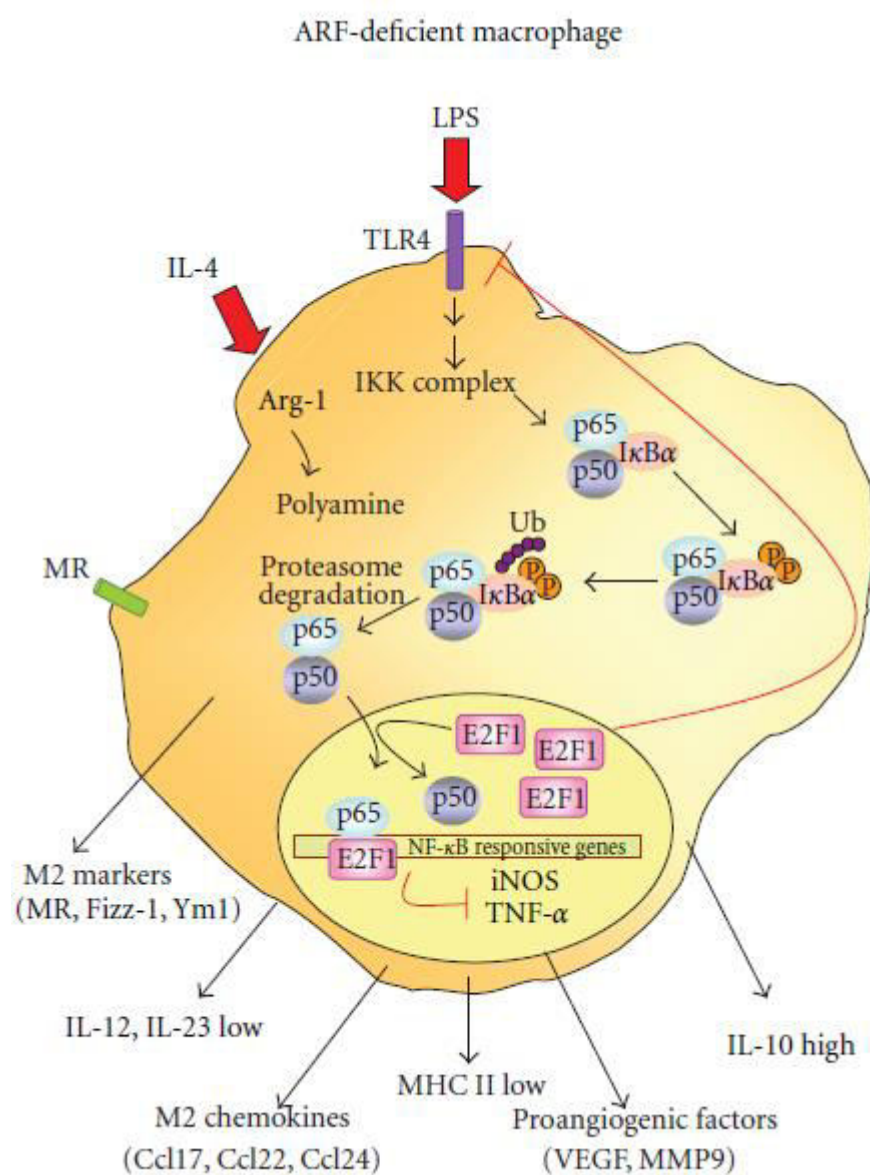
Εικόνα A23. Ο ρόλος της ARF στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (**A**) και σε διεργασίες που επηρεάζουν την αθηρογένεση (**B**). VSMCs, αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα (vascular smooth muscle cells) (τροποποιημένο από **Wessely, 2010**).

A.8.3. Η ανοσορυθμιστική δράση της ARF

Η σχέση του όγκου με το μικρο-περιβάλλον του είναι ένα φαινόμενο καλά καθιερωμένο (**Hanahan and Weinberg, 2011**). Σε αυτό το μικρο-περιβάλλον ανήκουν και τα ανοσοκύτταρα όπως είναι τα μακροφάγα τα επονομαζόμενα TAMs (tumor-associated macrophages) που έχουν συσχετισθεί με πτωχή πρόγνωση σε ασθενείς με καρκίνο. Είναι ενδιαφέρον πως τα TAMs μοιράζονται πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα μακροφάγα τύπου 2 (M2) όπως η έκφραση του M2 δείκτη Arg-1, που εμπλέκεται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των πολυαμινών (**Través et al. 2012**). Ας αναφερθεί ότι οι πολυαμίνες έχουν δείχθει πως είναι αναγκαίες για την μέγιστη ενεργοποίηση των μακροφάγων.

Στα αγρίου-τύπου μακροφάγα, ανάλογα τα εξωκυτταρικά σήματα, είναι δυνατόν και τηρείται μία ισορροπία μεταξύ του M1 και του M2 φαινοτύπου. Η διατήρηση αυτής της ισορροπίας είναι πολύ σημαντική γιατί τα M2 μακροφάγα εκκρίνοντας μία σειρά από κυτοκίνες και προ-αγγειογενετικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων ορισμένων μεταλλοπρωτεασών (VEGF, IL10, MMP9 κτλ.) ενοχοποιούνται στην προώθηση της καρκινογένεσης (ανθεκτικότητα κατά της απόπτωσης, διαφυγή από την ανοσοεπιτήρηση, επαγωγή της αγγειογένεσης κ.α.) και της μεταστατικής εξάπλωσης. Είναι ενδιαφέρον ότι στα μακροφάγα που στερούνται της έκφρασης της ARF, προάγεται η υιοθέτηση του M2 φαινοτύπου και η προαναφερθείσα M1/M2 ισορροπία διαταράσσεται. Το φαινόμενο αυτό έχει αποδοθεί σε ένα ARF/E2F1/NFκB-εξαρτώμενο μονοπάτι (**Través et al. 2012**). Μηχανιστικά, η ARF (τουλάχιστον η ανθρώπινη p14 ARF) είναι γνωστό πως αλληλεπιδρά με τον E2F1 κατά έναν p53-ανεξάρτητο, MDM2-εξαρτώμενο τρόπο αναστέλλοντας την μεταγραφική του ικανότητα (**Eymin et al. 2001**). Κατ' αυτόν τον τρόπο αίρεται η ανασταλτική επίδραση του E2F1 επί του IKK/NFκB μονοπατιού που είναι κρίσιμο για το προφίλ των κυτοκινών που εκκρίνονται από τα μακροφάγα (**Εικόνα A24**). Για την ακρίβεια, ο E2F1 προσδένεται κατά έναν τρόπο που εξαρτάται από την DP-1 και την DNA-προσδένουσα δομή του στην υπομονάδα p65 του NFκB, εκτοπίζοντας έτσι ανταγωνιστικά την p50 και τον σχηματισμό λειτουργικού NFκB (**Tanaka et al. 2002**). Μέσω αυτού του μονοπατιού η ARF είναι καθοριστική για την βιολογία των

μακροφάγων και κατ' επέκταση του καρκίνου. Αυτή η ανοσορυθμιστική δράση της ARF είναι αναπόσπαστο μέρος των ογκοκατασταλτικών της ιδιοτήτων.

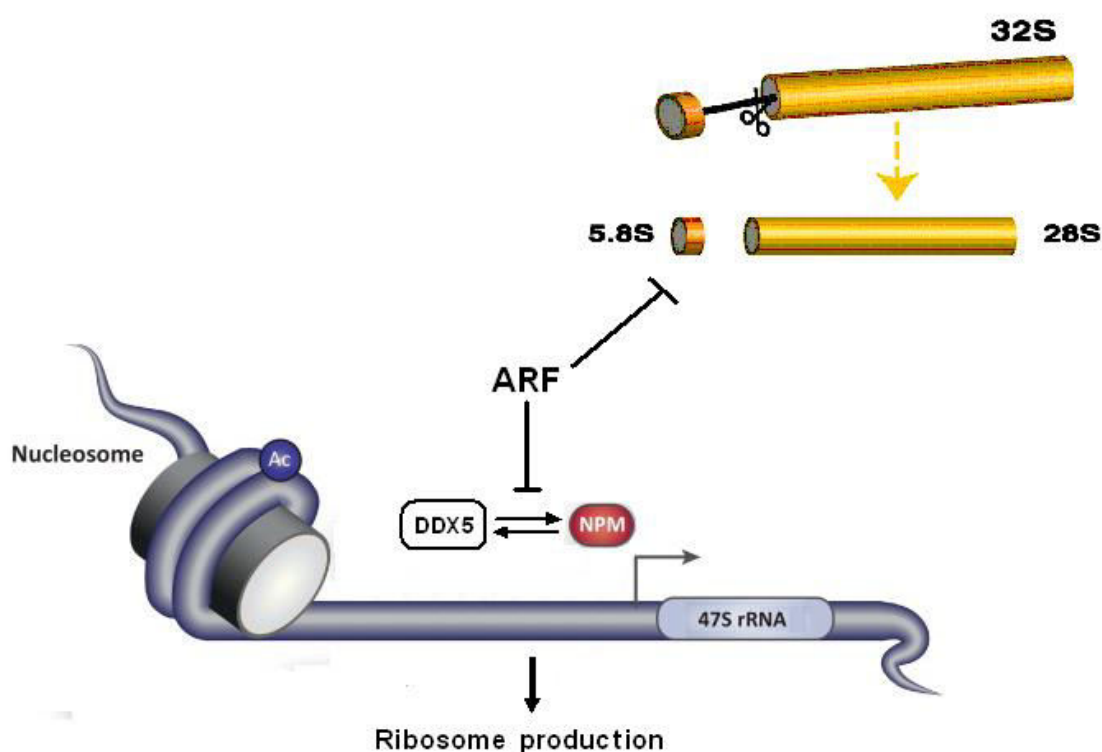


Εικόνα Α24. Η μεταγωγή σήματος σε ένα μακροφάγο που στερείται της ARF προωθεί την υιοθέτηση του M2 φαινοτύπου (Través et al. 2012).

Α.8.4. Η ARF ως αρνητικός ρυθμιστής της rRNA βιοσύνθεσης

Στις p53-ανεξάρτητες δράσεις της ARF που επιδρούν αρνητικά στην κυτταρική αύξηση, συγκαταλέγεται και η ικανότητά της να αναστέλλει την ωρίμανση του

πρόδρομου 47S/45S rRNA μορίου αλλά και την παραγωγή των 28S και 5.8S rRNAs μέσω του κοψίματος του προδρόμου μορίου 32S rRNA (Bertwistle et al. 2004). Η ARF είναι μία πρωτεΐνη που εντοπίζεται στον πυρηνίσκο και μάλιστα ελέγχει το πυρηνισκικό πρωτέωμα. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι απουσία της ARF, τα επίπεδα της DDX5 ελικάσης στον πυρηνίσκο αυξάνονται και αυτό συνοδεύεται από αύξηση στην παραγωγή ριβοσωμάτων.



Εικόνα A25. Μηχανισμοί της καταστολής της βιοσύνθεσης των rRNAs από την ARF. Η ARF αναστέλλει την μεταγραφή του 47S RNA μέσω της παρεμπόδισης της αλληλεπίδρασης της ελικάσης DDX5 με την νουκλεοφωσμίνη (NPM) στον πυρηνίσκο. Επιπλέον, η ARF αναστέλλει το κόψιμο του προδρόμου μορίου 32S σε 5.8 και 28S rRNA (τροποποιημένο από Hein et al. 2013 και O'Donohue et al. 2010).

Σε μηχανιστικό επίπεδο δείχθηκε ότι η DDX5 ανεξάρτητα της ενεργότητάς της ως ελικάση αλλά λειτουργώντας σαν μεταγραφικός συνενεργοποιητής, αλληλεπιδρά με την νουκλεοφωσμίνη (NPM) και προσδένεται στον rDNA promoter για να διεγείρει την μεταγραφή του 47S προδρόμου rRNA (pre-rRNA). Η ARF αναστέλλει το

μονοπάτι αυτό παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση της DDX5 με την NPM (**Εικόνα A25**). Η σηματοδοτική αυτή οδός έχει ιδιαίτερη σημασία για την ογκογένεση αφού τα μετασχηματισμένα από την ογκοπρωτεΐνη RasV12 κύτταρα εξαρτώνται ολοκληρωτικά («addiction») από την DDX5 ελικάση ως προς την ικανότητά τους να σχηματίζουν αποικίες σε μαλακό άγαρ και την αύξηση όγκου σε ποντίκια. Συνολικά λοιπόν, η ARF ελέγχει την παραγωγή του 47S rRNA τόσο σε επίπεδο ωρίμανσης όσο και σε επίπεδο μεταγραφής και η δράση της αυτή αποτελεί μία σημαντική πτυχή της p53-ανεξάρτητης ογκοκατασταλτικής της λειτουργίας (**Saporita et al. 2011**).

A.8.5. Ο ρόλος της ARF στην σπερματογένεση

Η σπερματογένεση είναι μία χωρο-χρονικά αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία μέσω της οποίας τα αδιαφοροποίητα σπερματογόνια (δηλ. τα βλαστικά κύτταρα που βρίσκονται στη βασική μεμβράνη των σπερματοφόρων αγωγών) παράγουν σπερματοκύτταρα στον αυλό μετά από μία σειρά μιτωτικών και μειωτικών διαιρέσεων (**Cooke and Saunders, 2002**). Στο ποντίκι, ο Sherr και οι συνάδελφοί του διαπίστωσαν ότι κατά την σπερματογένεση η ARF εκφράζεται εκλεκτικά στα μιτωτικά σπερματογόνια αλλά όχι στα σπερματοκύτταρα των αγωγών που είναι θετικά για μειωτικούς δείκτες. Απουσία της ARF οι όρχεις των ποντικών ατροφούν και παράγουν πολύ λιγότερη ποσότητα σπέρματος συγκριτικά με τα ζώα αγρίου-τύπου. Αυτές οι φαινοτυπικές αλλαγές συνοδεύονται από αυξημένα επίπεδα απόπτωσης στα γαμετοκύτταρα σε όλα τους τα αναπτυξιακά στάδια. Έτσι, η παρεμπόδιση της έκφρασης της ARF στα σπερματογόνια είναι ικανή να παρεμποδίσει ολόκληρη την σπερματογένεση, επηρεάζοντας αρνητικά την αναπαραγωγική ζωή του ζώου (**Gromley et al. 2009**).

Μεταγενέστερα πειράματα που διεξήχθησαν από την ίδια ερευνητική ομάδα έδειξαν πως η ARF είναι απαραίτητη για να εγγυηθεί την φυσιολογική πρόοδο της μείωσης και την επιβίωση των σπερματοκυττάρων μέσω ενός προγράμματος πρόδρασης (feedforward) στα προγονικά τους κύτταρα, τα σπερματογόνια. Είναι αξιοσημείωτο ότι η έκφραση της ARF στα σπερματογόνια δεν έχει ως αποτέλεσμα την παύση του κυτταρικού κύκλου αλλά τα ARF-θετικά σπερματογόνια είναι θετικά και για τον δείκτη της G1 φάσης, την κυκλίνη D. Επιπλέον, η ατροφία των όρχεων και η ελλιπής παραγωγή ώριμου σπέρματος στα ποντίκια που δεν εκφράζουν την ARF είναι

μηχανιστικά άσχετη με έναν διαταραγμένο υποθαλαμο-υποφυσιακό άξονα άξονα ή διαταραγμένα επίπεδα των ορμονών FSH (θυλακιοτρόπος ορμόνη) και LH (ωχρινοτρόπος ορμόνη) στην κυκλοφορία. Ωστόσο, απουσία της ARF παρατηρείται μία αύξηση στον αριθμό των σπερματοκυττάρων που υπόκεινται σε ένα πρόγραμμα p53-εξαρτώμενης απόπτωσης στο στάδιο της παχυταινίας της πρόφασης I (**Churchman et al. 2011**).

Ας σημειωθεί ότι κατά την διάρκεια του ομόλογου ανασυνδυασμού στην μείωση, η τρανσεστεράση Spo11 φυσιολογικά δημιουργεί δικλωνικές θραύσεις (DSBs) οι οποίες στη συνέχεια πυροδοτούν την ενεργοποίηση της ATM και τον σχηματισμό γ-H2AX, εκλεκτικά στα στάδια της λεπτοταινίας και της ζυγοταινίας (**Inagaki et al. 2010**). Στην παχυταινία όταν η σύναψη των ομόλογων χρωμοσωμάτων έχει ολοκληρωθεί, η γ-H2AX που είναι δείκτης βλάβης του DNA φυσιολογικά δεν ανιχνεύεται. Παρ' όλα αυτά, *in situ* αναλύσεις ότι σε ένα υπόβαθρο έλλειψης της ARF, αυξάνεται σημαντικά ο σχηματισμός γ-H2AX στα σπερματοκύτταρα στο στάδιο της παχυταινίας (**Churchman et al. 2011**). Αυτό δείχνει ότι η μείωση είναι ελαττωματική και απειλείται έτσι η γενωμική ακεραιότητα των σπερματοκυττάρων. Επιπλέον ενδείξεις μειωτικών ανωμαλιών προσφέρθηκε από την ανίχνευση ασυναπτικών περιοχών όπως και της υποεκπροσώπησης των ρεκομπινασών Rad51 και Dmc1 οι οποίες και λαμβάνουν μέρος στην επιδιόρθωση των DSBs που προκύπτουν κατά τον ομόλογο ανασυνδυασμό. Συνολικά, οι συγγραφείς των προαναφερθέντων δημοσιεύσεων συμπέραναν ότι η ARF μέσω ενός ακόμα μη καλά κατανοητού μηχανισμού αλληλεπιδρά με την μηχανή του ομόλογου ανασυνδυασμού για να διατηρήσει την πιστότητα της μείωσης στα σπερματοκύτταρα, προστατεύοντάς τα έτσι από βλάβη στο γένωμά τους και αποτρέποντας την p53-εξαρτώμενη απόπτωση (**Churchman et al. 2011**). Η αναστολή παρά η πυροδότηση της p53-εξαρτώμενης απόπτωσης από την ARF είναι ένα ιδιάζων χαρακτηριστικό των γαμετοκυττάρων των αρσενικών και έρχεται σε αντίθεση με τον ρόλο της ARF στα σωματικά κύτταρα όπου και προωθεί την p53-εξαρτώμενη απόπτωση (**Lowe and Sherr, 2003**).

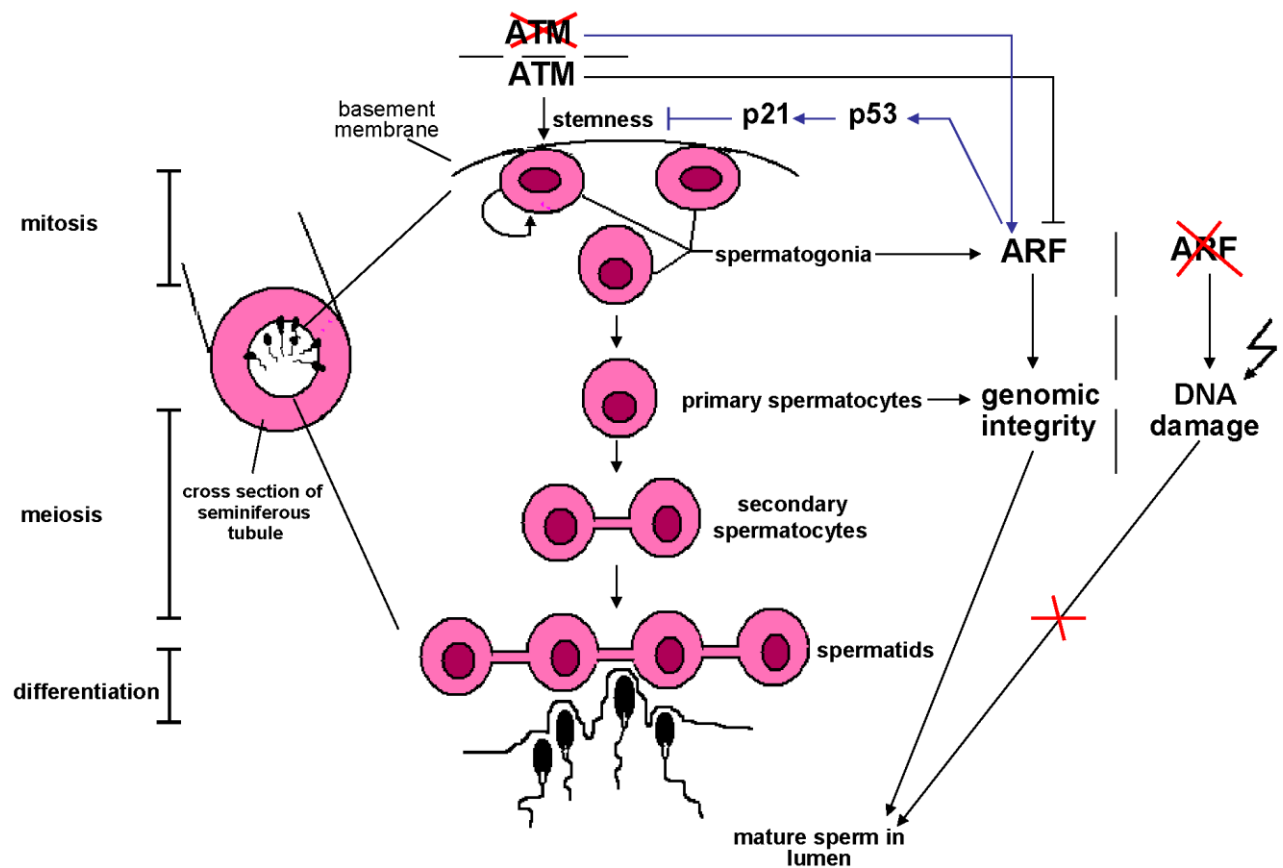
Είναι σημαντικό πως η ARF δεν είναι η μόνη DDR πρωτεΐνη που παρεμβαίνει στο πρόγραμμα των σπερματογονίων (**Εικόνα A26**). Η DDR κινάση ATM είναι κι αυτή αναγκαία για την ακεραιότητα του αναπτυξιακού προγράμματος των

αδιαφοροποιήτων σπερματογονίων και την διατήρηση της αυτο-ανανεωτικής τους ικανότητας που χαρακτηρίζει τα βλαστοκύτταρα. Στους ποντικίσιους όρχεις η έλλειψη της ATM κινάσης συντελεί στην σταδιακή εξάλειψη του πληθυσμού των αδιαφοροποιήτων σπερματογονίων. Αυτό έχει λειτουργική σχέση με απώλεια της γενωμικής ακεραιότητας, βλάβες στο προ-μειωτικό επίπεδο και κυτταρόσταση. Μηχανιστικά, η έλλειψη της ATM είναι συνδεδεμένη με την συσσώρευση βλάβης στο DNA και την ενεργοποίηση ενός ARF/p53/p21 Waf1-εξαρτώμενου μονοπατιού. Ας σημειωθεί ότι σε δοκιμασίες μετεμφύτευσης όπου σε μεταλλαγμένα ποντίκια με ελαττωματική σπερματογένεση μεταφέρονται σπερματογόνια στους σπερματοφόρους αγωγούς, η έλλειψη της έκφρασης της p21 Waf1 είναι ικανή να οδηγήσει στην ανάκαμψη του πληθυσμού των σπερματογονίων απουσία της ATM (**Takubo et al. 2008**).

Στον Takubo και τους συνεργάτες του προξένησε έκπληξη το γεγονός ότι απουσία παρά παρουσία της ATM ενεργοποιούνταν το p53/p21 Waf1 μονοπάτι. Δεδομένου ότι οι όγκοι γαμετικών κυττάρων δημιουργούνται στους όρχεις ποντικών όταν αυτοί δεν εκφράζουν τόσο την ATM όσο και την p21 Waf1 (**Shen et al. 2005**), το προαναφερθέν μονοπάτι έχει μόνο όχι αναπτυξιακή σημασία αλλά και λειτουργική σημασία ως ένας πιθανός ογκοκατασταλτικός μηχανισμός. Επιπλέον, είναι αξιοσημείωτο πως τα αποτελέσματα της παραπάνω έρευνας έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη όπου διαπιστώθηκε μία διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ της μηχανής της DDR και της ARF και υποδεικνύει ότι η ATM επιδρά στα επίπεδα της ARF όχι μόνο στα σωματικά κύτταρα αλλά και στα σπερματογόνια (**Velimezi et al. 2013**). Σε συμφωνία με αυτό, η πρωτεΐνη ARF στα σπερματογόνια υπόκειται σε σημαντική μειορρύθμιση σε απόκριση στην ενεργοποίηση της ATM *in vivo* μετά από ακτινοβολία (**Velimezi et al. 2013**).

Συνολικά, η ARF συμμετέχει σε μοριακά δίκτυα που ελέγχουν την σπερματογένεση σε πολλαπλά επίπεδα· τόσο πριν από τη μείωση όσο και κατά την διάρκεια της μείωσης. Στην πρώτη περίπτωση, (δηλ. πριν τη μείωση), η ARF αποτρέπει την διάδοση της γενωμικής βλάβης μέσω της επαγωγής της παύσης του κυτταρικού κύκλου στα σπερματογόνια. Από την άλλη μεριά, η ARF είναι κατά κάποιο τρόπο απαραίτητη κατά την διάρκεια της μείωσης για να αποτρέψει την βλάβη του DNA στα σπερματοκύτταρα στο στάδιο της παχυταινίας. Επομένως, η αλληλεπίδραση

μεταξύ της ARF και της DDR δεν επηρεάζει μόνο την ογκογένεση αλλά και αναπτυξιακές διεργασίες.



Εικόνα A26. Διάγραμμα των διαφόρων σταδίων της σπερματογένεσης κατά μήκος του τοιχώματος σπερματοφόρου αγωγού και της αλληλεπίδρασης του με συνιστώσες του μονοπατιού της απόκρισης στην βλάβη στο DNA (DNA damage response, DDR).

Β. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1. Καλλιέργεια κυττάρων

B.1.1. Κυτταρικές σειρές και χειρισμός των κυττάρων

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα κύτταρα οστεοσαρκώματος Saos-2 ή τα κύτταρα που προέρχονται από αυτά Saos2-p21 Tet ON, τα κύτταρα μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC) H1299 και τα κύτταρα καρκίνου του τραχήλου της μήτρας HeLa. Σε όλες τις σειρές αυτές δεν εκφράζεται λειτουργική p53 ενώ τα κύτταρα H1299 και HeLa εκφράζουν την ARF σε ανιχνεύσιμα επίπεδα ακόμα και χωρίς να εκφραστεί σε αυτά έκτοπα κάποιο ογκογονίδιο. Επιπλέον, στα κύτταρα αυτά το μονοπάτι της DDR είναι διαρκώς ενεργοποιημένο (**Velimezi et al. 2013**).

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό D-MEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) το οποίο εμπλουτίστηκε με 10% ορό εμβρύου μόσχου και αντιβιοτικά (Clontech, Lab Supplies, Greece) στους 37 °C παρουσία 5% CO₂. Για την επαγωγή της έκφρασης έγινε προσθήκη 1μg/ml δοξυκυκλίνης στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων Saos2-p21^{CIP1/WAF1} Tet-ON (**Εικόνα B1**, βλ. παράγραφο B.6.3.). Τα κύτταρα στα οποία έγινε επαγωγή αλλά και εκείνα στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε επαγωγή συλλέχθηκαν 12, 48 και 96 ώρες μετά την προσθήκη δοξυκυκλίνης χρησιμοποιώντας θρυψίνη (Gibco, Antisel, Greece).

Η επίδραση του αναστολέα της ATM Ku55933 (Cat#118500, Calbiochem, MERCK) στα κύτταρα (10 μM) έγινε όταν τα κύτταρα βρίσκονταν σε 80% συρροή (confluency) στο τρυβλίο για 24 h και ακολούθως συλλέχθηκαν. Τα κύτταρα ελέγχου (control) εκτέθηκαν σε DMSO (dimethyl sulfoxide) που είναι ο διαλύτης του αναστολέα Ku55933. Για την πρόκληση αντιγραφικού stress στα H1299 κύτταρα και την ενεργοποίηση της ATR πραγματοποιήθηκε έκθεση σε HU (Hydroxyurea, 2 mM) (Cat#127-07-1, Sigma-Aldrich) για 24 h και κατόπιν τα κύτταρα συλλέχθηκαν.

Για την αποσιώπηση της TBP1 και της TBP1IP χρησιμοποιήθηκαν siRNA duplexes [StealthTM Select RNAi, (σετ 3 ολιγονουκλεοτιδίων), Invitrogen]. Για την ανάλυση western blot της TBP1 και της TBP1IP χρησιμοποιήθηκαν δύο μονοκλωνικά

αντισώματα ποντικού σε αραίωση 1:500 από την Abcam. Η ακτίνη (πολυκλωνικό αντίσωμα λαγού σε αραίωση 1:1000 (Cat#4967, Cell Signaling Technology Inc.) χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισόποσης φόρτωσης των δειγμάτων. Τα αντιδραστήρια για την αποσιώπηση της Cdc6 και της ATM έχουν περιγραφθεί σε προηγούμενες μελέτες (Velimezi et al. 2013; Sideridou et al. 2011). Η διαμόλυνση έγινε χρησιμοποιώντας Lipofectamine 2000 (Cat#11668027, Invitrogen).



Εικόνα B1. Western Blot ανάλυση για την επιβεβαίωση της επαγωγής της έκφρασης της p21 WAF1/Cip1 πρωτεΐνης στα κύτταρα Saos2-p21^{CIP1/WAF1} Tet-ON. Η εκτίμηση των επιπέδων έγινε σε τρία διαφορετικά χρονικά σημεία των 12, 48, και 96 ωρών μετά την επαγωγή μέσω προσθήκης δοξυκυκλίνης στο θρεπτικό υλικό. («off» είναι η κατάσταση κατά την οποία δεν έχει γίνει επαγωγή). Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ότι τα δείγματα έχουν ισοφορτωμένα.

B.1.2. Διαδικασία κυτταροκαλλιέργειας

Καλλιέργεια

Παίρνουμε ένα 100άρι τρυβλίο βάζουμε 10 ml θρεπτικό υλικό π.χ DMEM με 10% Fetal Bovine Serum (φτιάχνεται στα 300 ml στην φιάλη) και το τοποθετούμε για ~10 min στον κλίβανο στους 37 °C για να μην είναι κρύο το θρεπτικό και τα κύτταρα υποστούν stress. Εναλλακτικά θερμαίνουμε ολόκληρη την φιάλη στο υδατόλουτρο για λίγο. Αφήνουμε το τρυβλίο με το θρεπτικό μέσα στο hood.

Βγάζουμε την αμπούλα με τα κύτταρα από τους -80 °C με το υγρό άζωτο και την βουτάμε για λίγο στο υδατόλουτρο να ξεπαγώσει κι έπειτα απλά χύνουμε το περιεχόμενό της στο τρυβλίο με το θρεπτικό. Αναδεύουμε λίγο με το χέρι και μεταφέρουμε στον κλίβανο. Επειδή είναι η πρώτη μέρα που ανοίγουμε την αμπούλα και η διαδικασία αυτή είναι στρεσογόνος για τα κύτταρα με αποτέλεσμα πολλά από αυτά να πεθάνουν, μία μέρα μετά το άνοιγμα της αμπούλας κάνουμε αλλαγή του θρεπτικού υλικού. Θρυψινοποίηση κάνουμε αφήνοντας μεσοδιάστημα τουλάχιστον 3 ημερών από την καλλιέργεια ή την τελευταία θρυψινοποίηση γιατί είναι κι αυτή πολύ στρεσογόνος.

Ό,τι φιάλη μπαίνει στο hood ψεκάζεται με EtOH, τα γάντια μας τα ψεκάζουμε και επίσης τα πόματα από τις φιάλες τα σφραγίζουμε με parafilm. Τα καπάκια των τρυβλίων τα αφήνουμε πάντα ανάποδα και δεν βγάζουμε τα χέρια μας πολύ έξω από το hood. Μόλις μπορούμε στο δωμάτιο βγάζουμε την μπρίζα από το UV δωματίου, ανοίγουμε από τα κουμπιά το φως και τον αέρα στο hood, ανοίγουμε το hood με φορά αντίστροφη από αυτή του ρολογιού και βγάζουμε την μπρίζα του UV του hood και το βγάζουμε έξω. Στο τέλος αντίστροφα ξαναβάζουμε το UV του hood στην μπρίζα με το πιστόλι να κοιτάει την λάμπα, κλείνουμε το hood, κλείνουμε το φως και τον αέρα και ξαναβάζουμε στην μπρίζα το UV του δωματίου.

Αλλαγή θρεπτικού υλικού

Κάποια κύτταρα που έχουν πεθάνει μία μέρα μετά το άνοιγμα της αμπούλας επιπλέουν (floating cells). Επιπλέον θέλουμε να απομακρύνουμε το αναμειχθέντα με το παλαιό υλικό DMSO. Ρουφάμε με το πιστολάκι όλο το θρεπτικό υλικό και το πετάμε στα waste, χωρίς αυτό να επηρεάζει τα ζωντανά προσκολλημένα στον πάτο του τρυβλίου κύτταρα (adherent cells).

Μετά παίρνουμε 5 ml PBS (το $\frac{1}{2}$ της ποσότητας του θρεπτικού υλικού που είναι 10 ml) αναδεύουμε λίγο, το τραβάμε με το πιστόλι (το επάνω κουμπί ρουφάει και το κάτω αφήνει) και το απορρίπτουμε. Με άλλη πιπέτα τέλος 10άρα ρίχνουμε νέο θρεπτικό υλικό και μεταφέρουμε στον κλίβανο.

Ανανέωση κυτταροκαλλιέργειας

Βγάζουμε το θρεπτικό υλικό και προσθέτουμε 5 ml PBS για ένα ξέπλυμα πρώτα, βγάζουμε το PBS και βάζουμε 3 ml θρυψίνη. Αφήνουμε να περάσουν ~5 min μέσα στον θάλαμο νηματικής ροής (hood) όταν η εξωτερική θερμοκρασία είναι υψηλή ή στον κλίβανο, μετά με μία πιπέτα κάνουμε πολλαπλές αναρροφήσεις και ρίχνουμε δυνατά και απότομα κάθε φορά την θρυψίνη στον πάτο ώστε τα προσκολλημένα ατρακτοειδή κύτταρα αποκολληθούν και να γίνουν στρογγυλά (μικροσκοπική παρατήρηση) και η θρυψίνη να γίνει χαρακτηριστικά θολή.

Προσθέτουμε 5 ml θρεπτικό υλικό, αναδεύουμε αναρροφώντας με την πιπέτα. (αλλιώς θα μεταφερθεί στα θυγατρικά τρυβλία μόνο θρεπτικό χωρίς κύτταρα) και από τα 8 ml συνολικά μεταφέρουμε τα 2 ml (αραίωση 1:4) σε νέο τρυβλίο και συμπληρώνουμε με 8 ml θρεπτικό (να φτάσει πάλι τα 10 ml ο τελικός όγκος). Τέλος, μεταφέρουμε στον κλίβανο. Εάν τα κύτταρα δεν είναι καρκινικά π.χ ινοβλάστες και αυξάνονται πιο αργά, βάζουμε 2 ml θρυψίνη και κάνουμε 1:2 αραίωση.

Μικροσκοπική παρατήρηση

Μετά από την καλλιέργεια και τις αλλαγές του θρεπτικού παρατηρούμε 3 τύπους κυττάρων : 1. κύτταρα νεκρά που μετακινούνται όταν κουνάμε λίγο το τρυβλίο και συμπαρασύρονται με το υγρό θρεπτικό υλικό (floating cells), 2. Ζωντανά κύτταρα στην μεσόφαση που λόγω της προσκόλλησής τους (adherent cells) στην επιφάνεια του τρυβλίου έχουν μία ατρακτοειδή μορφή και 3. Ζωντανά διαιρούμενα μεταφασικά κύτταρα που έχουν μία στρογγυλεμένη μορφή (rounded cells).

Με τις αλλαγές του θρεπτικού υλικού η καλλιέργεια είναι επιτυχής όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει όλη την επιφάνεια του τρυβλίου. Με την θρυψινοποίηση όμως θα δούμε εκείνη την στιγμή τα ατρακτοειδή κύτταρα να αποκολλώνται και να γίνονται όλα τους στρόγγυλα επιπλέοντας (floating cells) και μετά από μία ή δύο μέρες τα ατρακτοειδή κύτταρα στο τρυβλίο να έχουν ανάμεσά τους κάποια κενά.

Φύλαξη κυττάρων μέσω κρυοσυντήρησης

Για 10 ml είναι: 7 ml θρεπτικό, 2 ml cryoFBS (ξεχωριστό falcon στην κατάψυξη) και 1 ml DMSO. Για μία αμπούλα που θέλει 1,5 ml φτιάχνουμε 5 ml κυττάρων για κρυοσυντήρηση: 3,5 ml θρεπτικό, 1 ml cryoFBS και 0,5 ml ή 500 µl DMSO. Τα κύτταρα για κρυοσυντήρηση τα φτιάχνουμε σε falcon των 15 ml και στο τέλος ανακινούμε με αναρροφήσεις με την χιλιάρα πιπέτα.

Με την πιπέτα των 1000 µl βάζουμε μέσα στο falcon με το ίζημα 1,5 ml κυττάρων για κρυοσυντήρηση και κατόπιν αναταράσσουμε τα κύτταρα με το ρύγχος της πιπέτας και με πολλαπλές αναρροφήσεις ώστε να ανακατευθούν σε όλο το υγρό και αυτό να γίνει χαρακτηριστικά θολό. Μόλις γίνει αυτό, παίρνουμε με την χιλιάρα την πιπέτα ή με μία 5άρα γυάλινη 1,5 ml και το ρίχνουμε στην αμπούλα με προσοχή να μην επιμολυνθεί το πώμα της.

Γράφουμε την ετικέτα της (ημερομηνία δημιουργίας και κυτταρική σειρά) και την τυλίγουμε με πολλές στρώσεις χαρτιού και ταινία για αποφυγή επιμόλυνσης.

Τοποθετούμε για 20 min στην κατάψυξη του ψυγείου, 2 μέρες στους -80 °C στον καταψύκτη και μετά η αμπούλα τοποθετείται στο υγρό άζωτο, σταδιακά για προσαρμογή γιατί αλλιώς τα κύτταρα θα πεθάνουν από shock.

Παρασκευή θρεπτικού υλικού

Για 500 ml θρεπτικό η αναλογία είναι:

365 ml WFI (water for injection)

50 ml FBS ορός

50 ml DMEM

20 ml Na bicarbonate (ρύθμιση του pH)

10 ml L-γλουταμίνη

5 ml penicillin/streptomycin

500 ml

-Τα ρίχνουμε κατά προτίμηση με αυτήν τη σειρά στην μπουκάλια και αναδεύουμε στο τέλος με μία 25άρα πιπέτα.

Για 1 L είναι οι διπλές ποσότητες.

Παρασκευή δ/τος PBS

Για να φτιάξουμε PBS δ/μα χρησιμοποιούμε τις ταμπλέτες που η κάθε μία αντιστοιχεί για παρασκευή 200 ml δ/τος 1x. Συνήθως ρίχνουμε για να έχουμε 2 ταμπλέτες σε 400 ml και τα βάζουμε με μαγνητάκι να αναδεύονται δίχως θέρμανση γιατί μετά το μπουκάλι θα αποστειρωθεί και θα μπει στο ψυγείο.

Προετοιμασία των κυττάρων για εκχύλιση πρωτεΐνης

Αδειάζουμε σε Falcon το υλικό από τα 2 x100 ίδια τρυβλία (συλλογή του υπερκείμενου των κυττάρων) και βάζουμε PBS στα τρυβλία όσο περίπου ήταν και το θρεπτικό. Ξύνουμε με το scraper (προς τα κάτω και εμπρός) γρήγορα γιατί τα

κύτταρα είναι εκτός ψύξης και όταν δούμε ότι ξεκολλήσουν τα αδειάζουμε στο αντίστοιχο Falcon (συλλογή του pellet των κυττάρων). Καθαρίζουμε με χαρτάκι και 70% EtOH το scraper όταν έχουμε να ξύσουμε άλλο είδος τρυβλίου.

Καθώς για την φυγοκέντρωση θέλουμε ανά ζεύγη να είναι ισόποσα τα Falcon στο τέλος συμπληρώνουμε όποια και αν χρειάζεται με PBS. Φυγοκεντρούμε όχι σε ήπιες συνθήκες γιατί τα κύτταρα είναι νεκρά στο 60% (~4000 στροφές) για 5 min. Αποχύνουμε το υπερκείμενο γρήγορα και με ένα απότομο τίναγμα και φυλλάσουμε τα κύτταρα ως ίζημα στους -80°C στον καταψύκτη, έχοντας πάντοτε σημειώσει τα Falcon.

B.1.3. Το σύστημα Tet-ON

Ανάμεσα στα πιο δημοφιλή, εμπορικά διαθέσιμα συστήματα στην αγορά για την επαγωγή έκφραση μίας κασέτας είναι το Tet-ON μαζί με το παραπλήσιο Tet-Off σύστημα που διατίθεται από την εταιρία Clontech Inc. Στο βακτήριο *E. coli* η πρωτεΐνη του καταστολέα Tet (TetR) ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση των γονιδίων ενός οπερονίου ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη που βρίσκεται πάνω στο τρανσποζόνιο Tn10. Η TetR εμποδίζει την μεταγραφή των γονιδίων του οπερονίου μέσω πρόσδεσης στον χειριστή (operator) *tet* ή αλλιώς *tetO* απουσία της τετρακυκλίνης (Tc). Η TetR και το *cis* στοιχείο του *tetO* αποτελούν την βάση και την ουσία της ρύθμισης της «επαγωγίμης έκφρασης» στα κυτταρικά συστήματα θηλαστικών. Το σύστημα Tet-On δίνει στους ερευνητές την ικανότητα της ελεγχόμενης γονιδιακής έκφρασης σε υψηλό βαθμό, όπως αρχικά περιγράφηκε από τον Gossen και τους συναδέλφους του το 1995. Στο σύστημα Tet-On η γονιδιακή έκφραση επάγεται όταν στο θρεπτικό μέσω προστεθεί η δοξυκυκλίνη (Dox) που είναι παράγωγο της Tc. Το εν λόγω κυτταρικό σύστημα επιτρέπει την αυστηρή ρύθμιση της έκφρασης ενός επιθυμητού γονιδίου σε απόκριση σε διάφορες συγκεντρώσεις Dox.

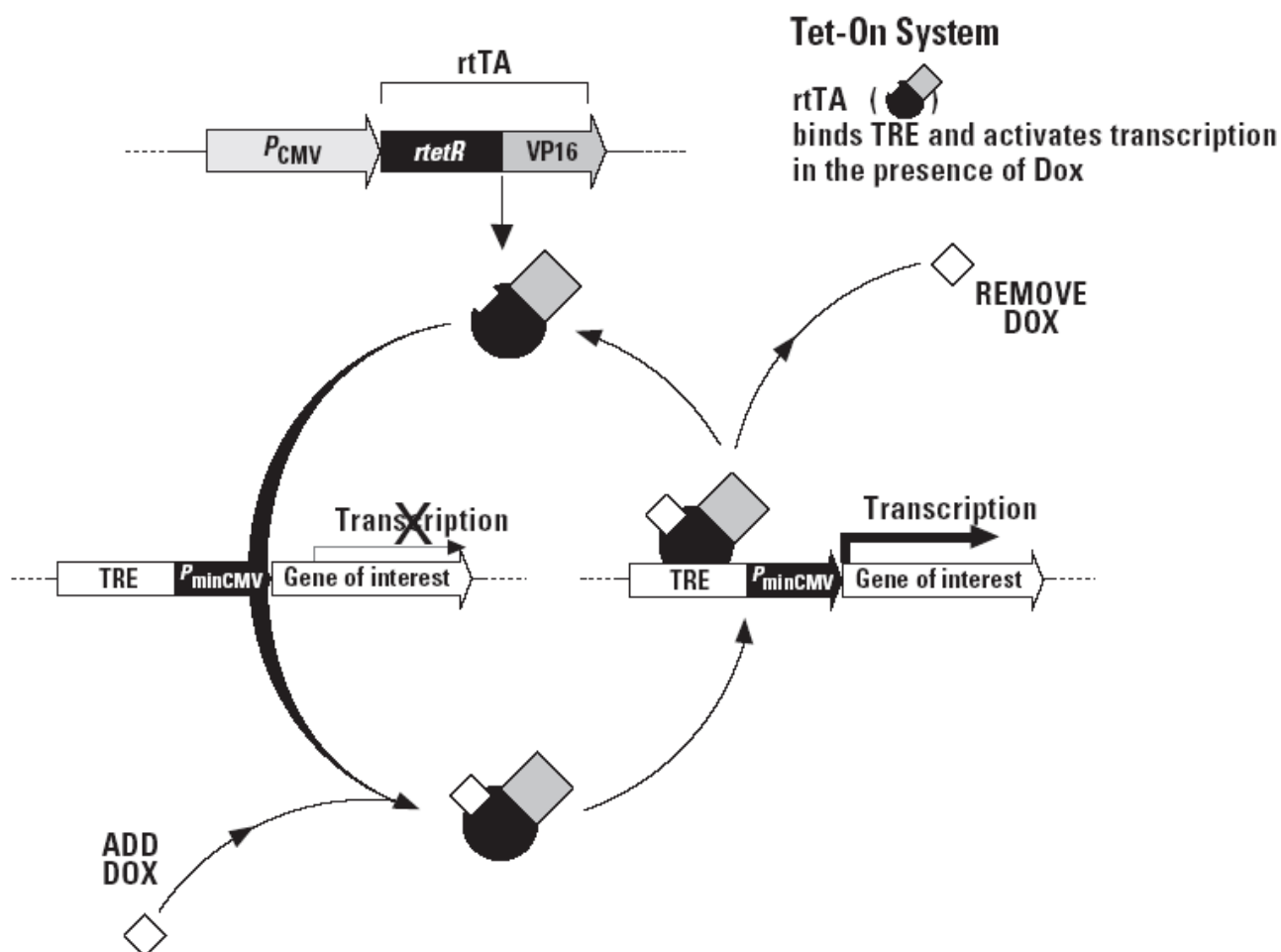
Η πρώτη κρίσιμη συνιστώσα του συστήματος Tet-On είναι μία *ρυθμιστική πρωτεΐνη* που βασίζεται στην φιλοσοφία της λειτουργίας της TetR. Συγκεκριμένα, το σύστημα Tet-On στηρίζεται στην πρωτεΐνη «ανάστροφος καταστολέας Tet (reverse Tet

repressor, rTetR) η οποία δημιουργήθηκε μέσω τεσσάρων αμινοξικών υποκαταστάσεων στην TetR. Η δε TetR αντιστοιχεί στην tTA (tetracycline-controlled transactivator) μία συνθετική χιμαιρική πρωτεΐνη 37-kDa που προκύπτει από την σύντηξη των αμινοξέων 1–207 της TetR και 127 αμινοξέων του C-τελικού άκρου της δομής ενεργοποίησης (activation domain, AD) του τρανσενεργοποιητή VP16 του ερπητοϊού HSV-1 (Herpes simplex virus-1), λειτουργώντας έτσι ως μεταγραφικός ενεργοποιητής παρά ως καταστολέας (**Εικόνα B2**). Η προκύπτουσα πρωτεΐνη, η rtTA(reverse tTA), κωδικοποιείται από το ρυθμιστικό πλασμίδιο pTet-On που επιπλέον είναι σχεδιασμένο να φέρει και κάποιο γονίδιο ανθεκτικότητας σε ένα ή δύο αντιβιοτικά.

Η δεύτερη κρίσιμη συνιστώσα του συστήματος Tet-ON είναι το πλασμίδιο απόκρισης το οποίο εκφράζει το γονίδιο που μας ενδιαφέρει (Gene X ή “gene of interest”, GOI) υπό τον έλεγχο ενός *cis* στοιχείου απόκρισης στην τετρακυκλίνη, το TRE (tetracycline-response element). Η εταιρία Clontech Inc. παρέχει μία σειρά από διαφορετικούς φορείς απόκρισης για τα συστήματα Tet. Για παράδειγμα, το πλασμίδιο pTRE και τα παράγωγά του περιέχουν το στοιχείο TRE που αποτελείται από επτά επαναλήψεις μιας αλληλουχίας 42-bp και περιέχει τον *tetO* ακριβώς πριν από τον υποκινητή *PminCMV* (minimal CMV promoter). Ο υποκινητής *PminCMV* στερείται των ισχυρών ενισχυτών που βρίσκονται φυσιολογικά στον IE (immediate early) υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού. Επειδή απουσιάζουν αυτά τα *cis* στοιχεία υπάρχει εξαιρετικά χαμηλή έκφραση («διαρροή») του γονιδίου Gene X απουσία της Tc (www.clontech.com).

Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως για να εγκαθιδρυθεί μία τέτοια επαγωγίμη κυτταρική σειρά είναι αναγκαία να πραγματοποιηθεί διπλή διαμόλυνση των κυττάρων που ενδιαφέρουν. Παρόλα αυτά, η Clontech Inc. προσφέρει διάφορες κυτταρικές σειρές ποικίλης προέλευσης που είναι μόνιμα διαμολυσμένες με φορείς υπεύθυνους για την παραγωγή της ρυθμιστικής πρωτεΐνης. Έτσι, οι ερευνητές μένει μόνο να πραγματοποιήσουν μία διαμόλυνση είτε παροδική είτε μόνιμη με το πλασμίδιο απόκρισης που φέρει το Gene X υπό τον έλεγχο του στοιχείου TRE το οποίο και καθιστά την έκφραση επαγωγίμη.

Το σύστημα Tet-ON



Εικόνα B2. Αρχές λειτουργίας του συστήματος Tet-ON. Ο «ανάστροφος» καταστολέας Tet (rTetR) φέρει 4 αμινοξικές υποκαταστάσεις που αντιστρέφουν την απόκρισή του στην Dox συγκριτικά με την απόκριση της TetR. Το ρυθμιστικό πλασμίδιο είναι σχεδιασμένο κατά τέτοιον τρόπο που παράγει μία χιμαιρική πρωτεΐνη την rtTA αποτελούμενη από την DNA-προσδένουσα δομή της rTetR και την δομή ενεργοποίησης (activation domain, AD) της ιϊκής VP16. Όταν τα στοιχεία *trans* (rtTA που παρέχεται από το ρυθμιστικό πλασμίδιο) και τα *cis* (το Gene X κλωνοποιημένο 3' του TRE που παρέχεται από το πλασμίδιο απόκρισης) του επαγωγίμου συστήματος είναι παρόντα στον πυρήνα των διαμολυσμένων κυττάρων, η έκφραση του Gene X επάγεται μόνο όταν το αντιβιοτικό Dox προστεθεί στο θρεπτικό μέσο (www.clontech.com).

B.2. Πέψη πρωτεϊνών και σήμανση με τα αντιδραστήρια iTRAQ

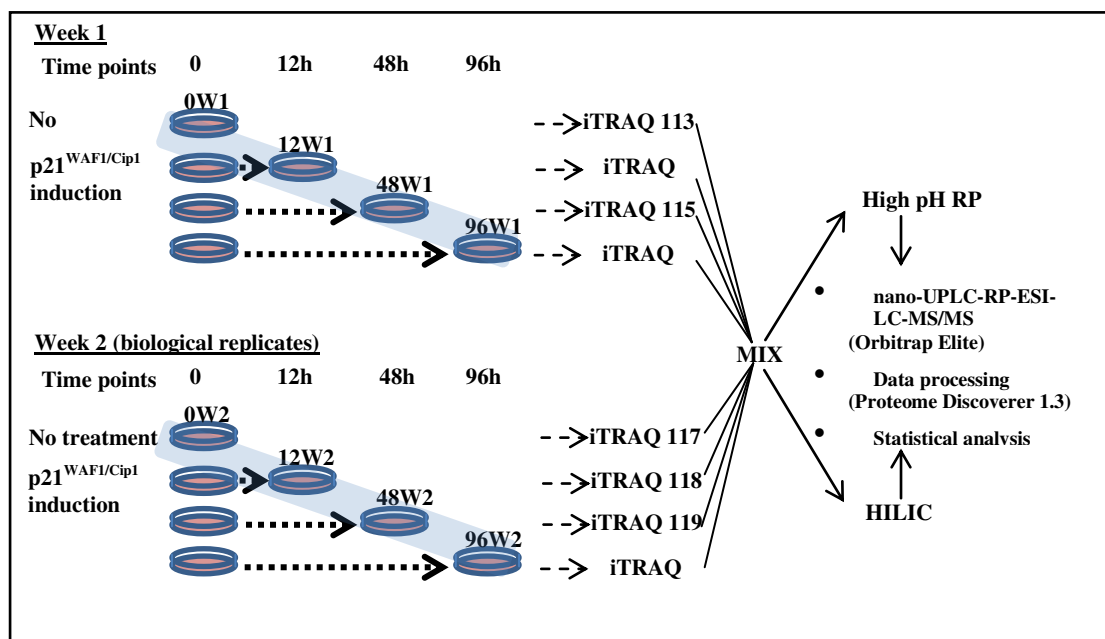
B.2.1. Πέψη και σήμανση

Τα κυτταρικά ιζήματα διαλυτοποιήθηκαν σε 200 μ L buffer διαλυτοποίησης 0.5 M TEAB (δικαρβονικό τριεθυλαμμώνιο), 0.05 % SDS με εκτεταμένη ανάδευση σε vortex, 5 min θέρμανση στους 90 °C και ομογενοποιήθηκε μέσω παλμικής εκπομπής υπερήχων για 20 sec. Τα μη διαλυτοποιημένα κυτταρικά θραύσματα διαχωρίστηκαν από το πρωτεϊνικό διάλυμα με φυγοκέντρηση στα 13,000 rpm for 10 min. Για κάθε δείγμα μία συνολική ποσότητα πρωτεΐνης 100 μ g μετρήθηκε με την δοκιμασία Bradford (Bio-Rad Protein Assay) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και αραιώθηκε με την προσθήκη buffer διαλυτοποίησης έως έναν τελικό όγκο 20 μ L.

Η αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών κυστεΐνης πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 2 μ L του αναγωγικού παράγοντα TCEP (τρις-2-καρβοξυμεθυλοφωσφίνη) ακολουθούμενης από 1 h επώαση σε συσκευή θέρμανσης στους 60 °C. Τα κατάλοιπα κυστεΐνης «απενεργοποιήθηκαν» με την προσθήκη 1 μ L 200 mM MMTS (μεθανοθειοσουλφονικό) σε ισοπροπανόλη και επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα δείγματα αραιώθηκαν με 14 μ L απεσταγμένο νερό και προστέθηκε διάλυμα 6 μ L θρυψίνης υψηλής καθαρότητας, ενζυμικής δραστηριότητας και εκλεκτικότητας proteomics grade trypsin (Roche Diagnostics) κατάλληλης για πειράματα πρωτεομικής συγκέντρωσης 500 ng/ μ L για ολονύκτια πέψη στους 37 °C. Ένας όγκος 50 μ L ισοπροπανόλης προστέθηκε σε κάθε φιαλίδιο με αντιδραστήριο iTRAQ 8plex και μετά από ανάδευση vortex το περιεχόμενο του κάθε φιαλιδίου iTRAQ μεταφέρθηκε σε κάθε σωλήνα δείγματος σύμφωνα με την αρίθμηση και την αναπαράσταση της **Εικόνας B3**. Η αντίδραση σήμανσης ολοκληρώθηκε εντός διαστήματος 2 h σε θερμοκρασία δωματίου, τα δείγματα συλλέχθηκαν και το συνολικό μίγμα χωρίστηκε σε δύο ίσα μέρη που υπέστησαν ξήρανση με φυγοκεντρικό συμπυκνωτή Speed Vac. Τα δύο πανομοιότυπα πεπτιδικά δείγματα

αποθηκεύθηκαν στους -20°C έως την χρωματογραφική κλασμάτωση με τις τεχνικές χρωματογραφίας υψηλού-pH ανάστροφης φάσης (high-pH Reverse Phase, RP) και υδροφιλικής αλληλεπίδρασης (Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC).



Εικόνα B3. Η ροή εργασίας για την πρωτεωμική ανάλυση.

B.2.2. Η πρωτεωμική μέθοδος iTRAQ

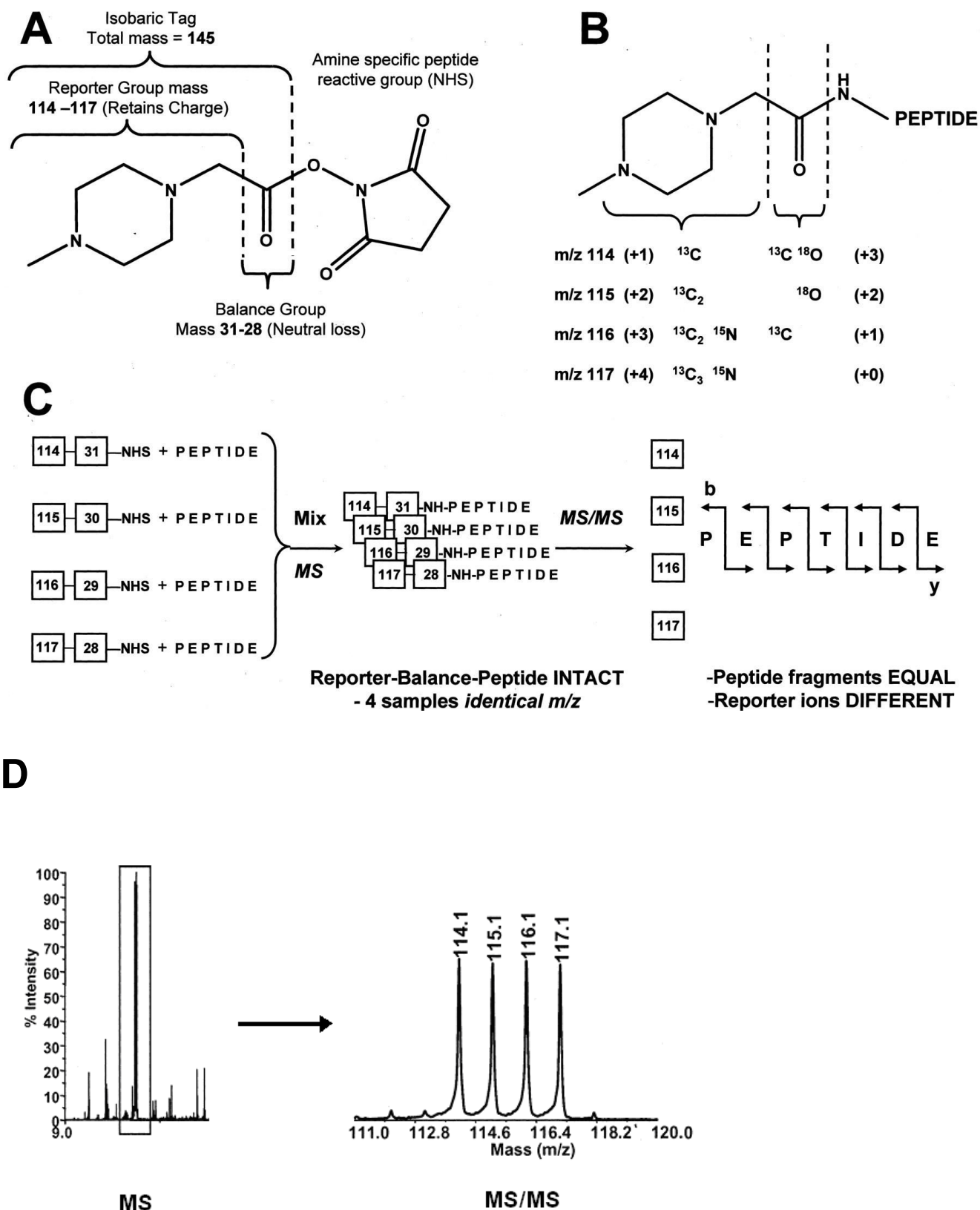
Οι πρωτεωμικές στρατηγικές σήμανσης ισοτόπων όπως η ICAT (Isotope-Coded Affinity Tags) και η SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture) διακρίνονται από μία ιδιαιτερότητα στο επίπεδο της ποσοτικοποίησης μέσω της εκτίμησης της διαφοράς μάζας ύστερα από την σήμανση. Υπάρχουν όμως σημαντικοί περιορισμοί στις τεχνικές αυτές. Η έννοια της διαφοράς μάζας για πολλούς πρακτικούς λόγους περιορίζεται σε ένα διπλό (2-plex) σετ αντιδραστηρίων και αυτό καθιστά την σύγκριση πολλαπλών «καταστάσεων» (δηλ. πειραματικών συνθηκών) ένα δύσκολο εγχείρημα. Το 2004, ο Ross και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μία μεθοδολογία ισοβαρούς σήμανσης, την λεγόμενη «iTRAQ» (isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation) καθιστώντας την ταυτόχρονη ανάλυση

πολλαπλών δειγμάτων δηλ. την ποσοτικοποίηση ενός 4-plex σετ διαφορετικών πρωτεϊνικών δειγμάτων εφικτή. Κατά την ανάλυση iTRAQ χρησιμοποιούνται για την σήμανση ισοβαρή αντιδραστήρια. Τέτοια αντιδραστήρια αποτελούνται από **α)** ένα group αναφοράς (reporter group) βασισμένο στην *N*-μεθυλοπιπεραζίνη, **β)** ένα καρβονυλικό group «εξισορρόπησης» της μάζας και **γ)** ένα group που αντιδρά με πεπτίδια· έναν εστέρα NHS (N-hydroxy succinimide). Η συνολική μάζα του group αναφοράς και του group εξισορρόπησης ενός μορίου διατηρείται σταθερή χρησιμοποιώντας διαφορικό ισοτοπικό εμπλουτισμό με άτομα ^{13}C , ^{15}N , και ^{18}O (**Εικόνα B4.A, B**). Το group αναφοράς κυμαίνεται στην μάζα από 114.1 to 117.1 m/z ενώ το group εξισορρόπησης ποικίλει στην μάζα από 28 έως 31 Da ούτως ώστε η συνολική μάζα να παραμένει σταθερή για κάθε ένα από τα 4 αντιδραστήρια. Όταν αντιδράσει με ένα πεπτίδιο, η ετικέτα σήμανσης (tag) σχηματίζει έναν αμιδικό δεσμό με οποιαδήποτε πεπτιδική NH_2 ομάδα (είτε N-τελική είτε ε αμίνη λυσίνης). Αυτοί οι αμιδικοί δεσμοί διασπώνται κατά παρόμοιο τρόπο με τους πεπτιδικούς δεσμούς όταν υπόκεινται σε διαδικασία CID (Collision-Induced Dissociation) όπου ιονισμένα πεπτίδια σε φασματομετρία μάζας διασπώνται σε αμινοξέα μέσω ουδέτερων μορίων όπως το αργό.

Ένα μίγμα τεσσάρων πανομοιότυπων πεπτιδίων το καθένα σημασμένο με ένα διαφορετικό μέλος του group αναφοράς εμφανίζεται σαν ένα απλό πρόδρομο ιόν στην φασματομετρία μάζας (πανομοιότυπο m/z). Μετά την διαδικασία CID, τα 4 ιόντα του group αναφοράς εμφανίζονται ως συγκεκριμένες μάζες εύρους 114–117 Da. Όλα τα άλλα ιοντικά θραύσματα που είναι χρήσιμα από άποψη πληροφίας σχετικά με την αλληλουχία (b-, y-, etc.) παραμένουν ισοβαρή και τα μεμονωμένα σήματα ιοντικού ρεύματος (ένταση σήματος) είναι αθροιστικά. Αυτό ισχύει ακόμα και για τα πεπτίδια που είναι σημασμένα τόσο στο N-τελικό άκρο όσο και στις πλευρικές ομάδες λυσίνης όσο και για τα πεπτίδια που περιέχουν εσωτερικά κατάλοιπα λυσίνης λόγω ατελούς πέψης με θρυψίνη. Επομένως, η σχετική συγκέντρωση των πεπτιδίων εκτιμάται βάση των σχετικών εντάσεων του σήματος των αντίστοιχων ιόντων αναφοράς. Σε αντίθεση με την τεχνική ICAT και παρόμοιες τεχνικές σήμανσης διαφοράς μάζας, η ποσοτικοποίηση στην μέθοδο iTRAQ πραγματοποιείται στο στάδιο της διαδοχικής φασματομετρίας μάζας (MS/MS) παρά στο στάδιο της MS. Ας σημειωθεί πως αντίθετα με την MS, η MS/MS περιλαμβάνει

την διάσπαση μέσω CID του ιονισμένου πεπτιδίου σε αμινοξέα, παρέχοντας έτσι πληροφορία για την πρωτοταγή αλληλουχία του πεπτιδίου (Ross et al. 2004).

Με άλλα λόγια, η iTRAQ παρέχει πληροφορία μόνον στο όψιμο στάδιο της MS/MS (Εικόνα B4.D), καθώς στο φάσμα MS συγκεκριμένα πανομοιότυπα πεπτίδια που προέρχονται από διαφορετικές «καταστάσεις» στην καλλιέργεια και είναι διαφορετικά σημασμένα με συγκεκριμένες ετικέτες ισοβαρών ομαδοποιούνται αδιακρίτως μαζί ως ένα «πρόδρομο ιόν» και αντιστοιχούν στην ίδια κορυφή του φάσματος MS. Παρ' όλα αυτά αυτό το είδος κοινής κατηγοριοποίησης πανομοιότυπων πεπτιδίων από διαφορετικές πηγές είναι που καθιστά δυνατή την ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων, επειδή μειώνει ουσιαστικά την πολυπλοκότητά τους. Κάθε ένα πεπτίδιο που σημαίνεται με μία από τις τέσσερις ετικέτες διαθέτει την ίδια «κατ' όνομα» μάζα· ένα σημαντικό χαρακτηριστικό που προσδίδει αυξημένη ευαισθησία έναντι των υπόλοιπων στρατηγικών σήμανσης διαφοράς μάζας. Με τα ισοβαρή πεπτίδια το ιοντικό ρεύμα MS σε μία δεδομένη πεπτιδική μάζα είναι το άθροισμα του ιοντικού ρεύματος από όλα τα δείγματα σε ένα ισομοριακό 1:1:1:1 μίγμα, κι έτσι δεν υφίσταται διαχωρισμός του πρόδρομου σήματος MS με συνεπακόλουθη αύξηση της πολυπλοκότητας του φάσματος όταν συνδιάζονται δύο ή περισσότερα δείγματα προς ανάλυση.



Εικόνα B4. Η λογική και τα αντιδραστήρια της τεχνικής iTRAQ. Διάγραμμα που δείχνει τα στάδια ενός πειράματος σήμανσης ισοβαρών ετικετών για την ανάλυση πολλαπλών (τεσσάρων) δειγμάτων (A), την σήμανση και την ανάμιξη

πανομοιότυπων πεπτιδίων από τέσσερις διαφορετικές πηγές με το ίδιο m/z φάσμα **(B)** και η τελική διάσπαση των πεπτιδίων με CID σε αμινοξέα που προκαλεί την απελευθέρωση του group αναφοράς, παράγοντας έτσι τέσσερα διαφορετικά σήματα (114-117) στο φάσμα MS/MS **(C)**, την ένταση που είναι ανάλογη με την ποσότητα του πεπτιδίου που είναι σημασμένο με ετικέτα. Παράδειγμα φάσματος MS/MS του πεπτιδίου TRHPALTEAK από ένα πρωτεϊνικό μίγμα πρωτεϊνών μετά από πέψη το οποίο ετοιμάστηκε μέσω σήμανσης τεσσάρων ξεχωριστών προϊόντων πέψης με κάθε ένα από τα τέσσερα αντιδραστήρια ισοβαρών ετικετών και συνδιασμό των μιγμάτων αντίδρασης σε μία αναλογία 1:1:1:1. **(D)** Σε αυτό το παράδειγμα η διάσπαση του προδρόμου πεπτιδίου (μαρκαρισμένη με τετράγωνο κορυφή στο φάσμα MS) παρήγαγε τέσσερις κορυφές (κατ' αντιστοιχία στις 4 διαφορετικές ετικέτες ισοβαρών αντιδραστηρίων) της ίδιας έντασης, κάτι που σημαίνει πως τα τέσσερα διαφορετικά δείγματα που αναλύθηκαν περιείχαν την ίδια ποσότητα αυτής της πρωτεΐνης **(Ross et al. 2004)**.

Συνολικά, η ανάλυση iTRAQ περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- ✓ Απομόνωση της πρωτεΐνης και μετουσίωσή της με απορρυπαντικό
- ✓ Πέψη με θρυψίνη
- ✓ Αντίδραση με τα iTRAQ αντιδραστήρια για τη σήμανση
- ✓ Ανάμειξη των πρωτεϊνικών δειγμάτων (μπορεί να φτάσουν έως και τα 8 όταν χρησιμοποιούνται 8 διαφορετικά αντιδραστήρια)
- ✓ Χρωματογραφία ιοντικής ανταλλαγής για τον καθαρισμό των αναμεμιγμένων και σημασμένων πρωτεϊνικών προϊόντων πέψης από το απορρυπαντικό και τέλος,
- ✓ MS/MS (διαδοχική φασματομετρία μάζας) και επεξεργασία των δεδομένων με κατάλληλο λογισμικό.

B.3. Κλασμάτωση πεπτιδίων

B.3.1. Κλασμάτωση πεπτιδίων μέσω χρωματογραφίας υψηλού-pH ανάστροφης φάσης

Η υγρή χρωματογραφία υψηλού-pH ανάστροφης φάσης (high-pH «RP» peptide fractionation) σε ρητίνη C₁₈ των σημασμένων πεπτιδίων με το σετ των iTRAQ 8plex αντιδραστηρίων πραγματοποιήθηκε σε αντλία Dionex P680 εξοπλισμένη με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιοδίων (photodiode array) PDA-100 χρησιμοποιώντας την στήλη Waters, XBridge C18 150 x 4.6 mm, 3.5 μm). Η κινητή φάση (A) αποτελούνταν από 2% ακετονιτρίλιο, 0.05 % υδροξείδιο του αμμωνίου και η στατική φάση (B) αποτελούνταν από 100 % ακετονιτρίλιο και 0.05 % υδροξείδιο του αμμωνίου. Ένα από τα πανομοιότυπα πεπτιδικά ιζήματα διαλυτοποιήθηκε σε 200 μL κινητής φάσης (A) με υδρόλουτρο υπερήχων (Elma, transsonic 460/H). Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 13,000 rpm για 5 min και το υπερκείμενο εισήχθη στον βρόχο (loop) εισαγωγής του δείγματος 200 μL. Η μέθοδος του διαχωρισμού ήταν ως εξής: για 10 min ισοκρατική έκλουση 5 % (B), για 50 min βαθμωτή έκλουση έως 50 % (B), για 10 min βαθμωτή έκλουση έως 70 % (B), για 10 min έως 95 % (B) με ένα ρυθμό ροής 0.4 mL/min. Το σήμα ανιχνεύθηκε στα 280, 254 και 215 nm και η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 30 °C. Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν ανά λεπτό υπέστησαν αποξήρανση με συμπυκνωτή speedvac για 4-5 h και αποθηκεύθηκαν στους -20 °C έως την ανάλυση LC-MS.

B.3.2. Κλασμάτωση πεπτιδίων μέσω χρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης

Το δεύτερο μέρος των σημασμένων πεπτιδίων κλασματώθηκε μέσω χρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης with (Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC) χρησιμοποιώντας τη στήλη Core-Shell Kinetex 150 × 2.1 mm. Η κινητή φάση (A) αποτελούνταν από 100 % ακετονιτρίλιο, 0.1 % φορμικό οξύ και η κινητή φάση (B) αποτελούνταν από 2 % ακετονιτρίλιο και 0.1% φορμικό οξύ. Το δείγμα διαλυτοποιήθηκε σε 20 μL μείγματος των κινητών φάσεων (A) και (B) αναλογίας 1:1, εισήχθη μέσω ενός βρόχου των 20 μL και υπέστη διαχωρισμό με βαθμωτή έκλουση

ως εξής: Για 5 min ισοκρατική έκλουση 10 % (B), για 85 min βαθμωτή έκλουση έως 35 % (B), για 20 min βαθμωτή έκλουση έως 50 %, για 20 min βαθμωτή έκλουση έως 95 % (B), για 60 min ισοκρατική έκλουση 95 % (B) και για 5 min έως 5 % (B). Ο ρυθμός ροής ήταν 65 $\mu\text{L}/\text{min}$ και η στήλη της θερμοκρασίας ρυθμίστηκε στους 35 °C. Τα κλάσματα συλλέχθηκαν ανάλογα με το σήμα στα 280 nm, αποξηράνθηκαν με συμπυκνωτή speedvac και αποθηκεύθηκαν στους -20 °C έως την ανάλυση LC-MS.

B.4. Φασματομετρική ανάλυση

B.4.1. Ανάλυση LC-MS

Όλα τα πειράματα LC-MS πραγματοποιήθηκαν με το σύστημα Dionex Ultimate 3000 UHPLC (ultra high-performance liquid chromatography) σε συνδιασμό με το φασματοφωτόμετρο μάζας υψηλής ανάλυσης nano-ESI Orbitrap-Elite (Thermo Scientific). Τα μεμονωμένα πεπτιδικά κλάσματα από την υψηλού-pH RP και την HILIC αναδιαλύθηκαν σε 30 μL διαλύματος φορτώματος που αποτελούνταν από 2 % ακετονιτρίλιο και 0.1 % φορμικό οξύ. Ένας όγκος 2 μL volume εισήχθη και φορτώθηκε για 8 min στην στήλη αποσυγκέντρωσης (trapping column) Acclaim PepMap 100, 100 $\mu\text{m} \times 2 \text{ cm}$ C18, 5 μm , 100 Å με τον τρόπο εισαγωγής ulPickUp και την αντλία φόρτωσης των δειγμάτων να είναι ρυθμισμένη σε έναν ρυθμό ροής 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Για τον διαχωρισμό των πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκε η στήλη Acclaim PepMap RSLC, 75 $\mu\text{m} \times 25 \text{ cm}$, nanoViper, C18, 2 μm , 100 Å που προσαρτήθηκε σε βελόνα ηλεκτροψεκασμού PicoTip emitter (FS360-20-10-D-20-C7) για την βαθμωτή έκλουση σε πολλαπλά βήματα. Η κινητή φάση (A) αποτελούνταν από 2 % ακετονιτρίλιο και 0.1 % φορμικό οξύ και η κινητή φάση (B) αποτελούνταν από 100% ακετονιτρίλιο και 0.1 % φορμικό οξύ. Η βαθμωτή έκλουση πραγματοποιήθηκε ως εξής: για 80 min βαθμωτή έως το 40 % (B), για 5 min βαθμωτή έως το 85 % (B), για 5 min ισοκρατική 85 % (B), for 2 min έως 3 % (B), για 8 min ισοκρατική εξισορρόπηση 3 % (B). Ο ρυθμός ροής ήταν 300 nL/min και η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 35 °C. Η μετάβαση σε αέρια φάση των διαχωρισμένων πεπτιδίων επιτεύχθηκε μέσω θετικού ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό εφαρμόζοντας μία διαφορά δυναμικού 2.5 kV.

Για κάθε σάρωση αναζήτησης MS, τα 10 πιο άφθονα πολλαπλά φορτισμένα πρόδρομα ιόντα με αναλογία m/z μεταξύ 350 και 1900 και κατώφλι έντασης 500 μετρήσεων επιλέχθηκαν από 240,000 με την ανάλυση μάζας FT (Fourier Transformation) και υπέστησαν θραυσματοποίηση HCD (Higher-energy Collisional Dissociation) με ένα παράθυρο απομόνωσης των 1.2 Da. Τα φάσματα αποκτήθηκαν με ανάλυση FT από 15,000 εντός ενός φάσματος λόγου m/z των 100-1900. Η κανονικοποιημένη ενέργεια σύγκρουσης τέθηκε στο 35 και οι ήδη στοχευμένοι πρόδρομοι αποκλείστηκαν δυναμικά για περαιτέρω απομόνωση και ενεργοποίηση για 30 sec με όριο εμπιστοσύνης (mass tolerance) 5 ppm.

B.5. Ανάλυση δεδομένων

B.5.1. Αναζήτηση βάσης δεδομένων για την πρωτεωμική ανάλυση

Τα περίπου 5×10^5 φάσματα από θραυσματοποίηση HCD (Higher-energy collisional dissociation) διαδοχικής φασματομετρίας μάζας (tandem mass spectrometry ή MS/MS) που συλλέχθηκαν τόσο από τα κλάσματα χρωματογραφίας ανεστραμμένης φάσης RP (reverse phase) και χρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης HILIC (Hydrophilic interaction liquid chromatography) εισήχθησαν στην μηχανή αναζήτησης Sequest που βρίσκεται στο πρόγραμμα Proteome Discoverer software version 1.3.0.339 για την ταυτοποίηση πεπτιδίων και πρωτεϊνών.

Όλα τα φάσματα αναζητήθηκαν έναντι ενός αρχείου UniProt Fasta που περιείχε 20,200 ανασκοπημένες καταχωρήσεις ανθρώπινης προέλευσης. Ο κόμβος αναζήτησης του Sequest περιλάμβανε τις εξής παραμέτρους: όριο εμπιστοσύνης Precursor Mass Tolerance ορισμένο στα 10 ppm (parts per million), όριο εμπιστοσύνης Fragment Mass Tolerance ορισμένο στα 20 mmu (millimass units), οι Δυναμικές Τροποποιήσεις (Dynamic Modifications) ήταν Οξείδωση του καταλοίπου M (+15.995 Da), Απαμίνωση του N, Q (+0.984 Da), Φωσφορυλίωση του S (+79.966 Da) και οι Στατικές Τροποποιήσεις ήταν iTRAQ 8plex σε κάθε N-τελικό άκρο, K, Y (+304.205 Da) και μεθυλοθειϊκή τροποποίηση σε C (+45.988 Da).

Ο κόμβος του Percolator χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του επιπέδου εμπιστοσύνης κατά την ταυτοποίηση πεπτιδίων με την μεθοδολογία αναζήτησης με «ψευδείς βάσεις δεδομένων» (decoy database searching). Ένας αυστηρός λόγος FDR

(False Discovery Rate)· όπου $FDR = FP$ (false positive matches/ FP (false positive matches) + TP (true positive matches), τέθηκε στο 0.01, ενώ ο ελαστικός FDR τέθηκε στο 0.05 και η επικύρωση βασίστηκε στην τιμή q (q -Value).

Ο κόμβος Reporter Ion Quantifier περιλάμβανε την Μέθοδο Ποσοτικοποίησης (Quantification Method) για το παραδοσιακό iTRAQ 8plex (Thermo Scientific Instruments), όριο εμπιστοσύνης (integration window tolerance) στα 20 ppm και την μέθοδο ολοκλήρωσης Most Confident Centroid. Οι λόγοι των πρωτεϊνών κανονικοποιήθηκαν σε πρωτεϊνικούς μέσους και τα πεπτίδια που απουσίαζαν από τα κανάλια iTRAQ αποκλείστηκαν από την σχετική ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών. Η πιθανότητα εντοπισμού φωσφορυλίωσης (Phosphorylation localization probability) εκτιμήθηκε με τον κόμβο phosphoRS.

B.5.2. Βιοστατιστική και βιοπληροφορική ανάλυση

Για την ανάλυση των δεδομένων της πρωτεωμικής οι αναλογίες του σήματος των πρωτεϊνών (χρονικό σημείο/χρόνος 0) μετατράπηκαν σε $\log(2)$ και στρογγυλοποιήθηκαν. Τα διαστήματα εμπιστοσύνης (confidence intervals) 95% των μέσων αναλογιών $\log(2)$ υπολογίστηκαν για κάθε χρονικό σημείο ώστε να καθοριστούν οι στατιστικώς σημαντικές κατωφλικές τιμές είτε της υπερέκφρασης είτε της καταστολής της έκφρασης. Επιπλέον, τα σέτ των αναλογιών $\log-2$ για τα διάφορα χρονικά σημεία αναλύθηκαν με ανάλυση διασποράς (ANalysis Of VAriation, ANOVA) ώστε να ανιχνευθεί μία στατιστικά σημαντική μεταβολή οπουδήποτε εντός των τριών χρονικών σημείων λαμβάνοντας υπ' όψιν και την επαναληψιμότητα των πειραματικών μετρήσεων, καθώς σε αντίθεση με την ANOVA, η ανάλυση Kruskal–Wallis (η μη-παραμετρική αντίστοιχη ανάλυση της ANOVA) είναι δυνατό να εφαρμόζεται σε 3 επαναλήψεις ενώ η πρωτεωμική ανάλυση έγινε με δύο επαναλήψεις. Οι πρωτεΐνες των οποίων η αναλογία $\log-2$ ήταν πάνω ή κάτω των προαναφερθέντων τιμών κατωφλικών τιμών υπερέκφρασης και καταστολής της έκφρασης, αντίστοιχα, και η τιμή p (p -value) ήταν <0.05 θεωρήθηκαν ότι είχαν υποστεί ρύθμιση από την p21 Waf1. Όλοι οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πακέτο R.

Οι αναλύσεις εμπλουτισμού σηματοδοτικών μονοπατιών και βιολογικών διεργασιών (Pathway and biological-process enrichment analysis) και ο σχεδιασμός των

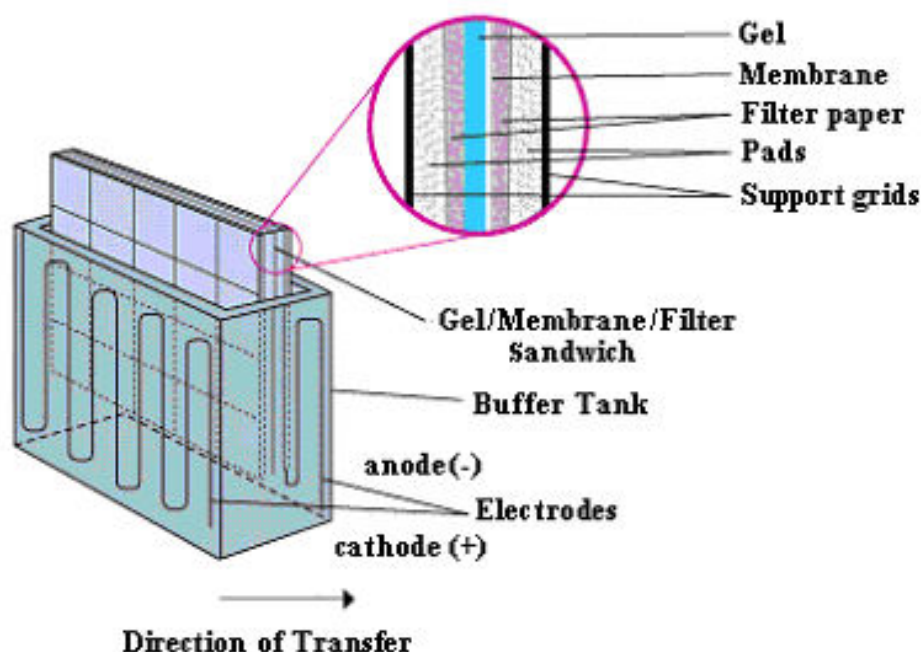
μονοπατιών με βάση τα σετ των δεδομένων της πρωτεωμικής πραγματοποιήθηκαν με τα προγράμματα Ariadne Genomics Pathway Studio v 9.0. Το ίδιο πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε και για την ανεύρεση των ρυθμιστών των MKK7 και ARF και των στόχων τους.

B.6. Ανάλυση Western blotting (ανοσοστυπώματος)

B.6.1. Βασικές αρχές

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε gel πολυακρυλαμιδίου μπορεί να ακολουθηθεί από περαιτέρω ανάλυση συγκεκριμένων πρωτεϊνικών αντιγόνων μέσω της μεταφοράς των διαχωρισμένων σε μπάστες πρωτεϊνών στην επιφάνεια μίας μεμβράνης· μία διαδικασία που είναι γνωστή ως «στύπωμα» (blotting). Η μεταφορά αυτή λαμβάνει χώρα είτε με τη βοήθεια τριχοειδών δυνάμεων (capillary blotting) ή μέσω της εφαρμογής κενού (vacuum blotting) είτε μέσω της εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου (electroblotting) μέσω κατάλληλων συσκευών. Αφού επιτευχθεί η μεταφορά (η μεταφορά πιστοποιείται μέσω του ορατού ακόμα και πριν το στάδιο της εμφάνισης της μπάστας που μας ενδιαφέρει μέσω του κεχρωσμένου έγχρωμου δείκτη μοριακού βάρους (M.W. marker ή ladder) που έχει μεταφερθεί στην μεμβράνη) η μεμβράνη επωάζεται με πρωτογενές αντίσωμα (ανοσοστύπωμα ή western blotting) ειδικό για την προς διερεύνηση πρωτεΐνη και ακολούθως με σημασμένο δευτερογενές αντίσωμα (Ab) το οποίο αναγνωρίζει το πρωτογενές και συμμετέχει στην αντίδραση παραγωγής του σήματος που συνήθως περιλαμβάνει χημειοφωταύγεια, αντίδραση ενός χρωμογόνου υποστρώματος με την αλκαλική φωσφατάση ή την παραγωγή σήματος μέσω της αντίδρασης αβιδίνης-βιοτίνης. Η ηλεκτρομεταφορά που εφαρμόζεται στην παρούσα μελέτη αναπαρίσταται στην **Εικόνα B5**.

Electroblotting

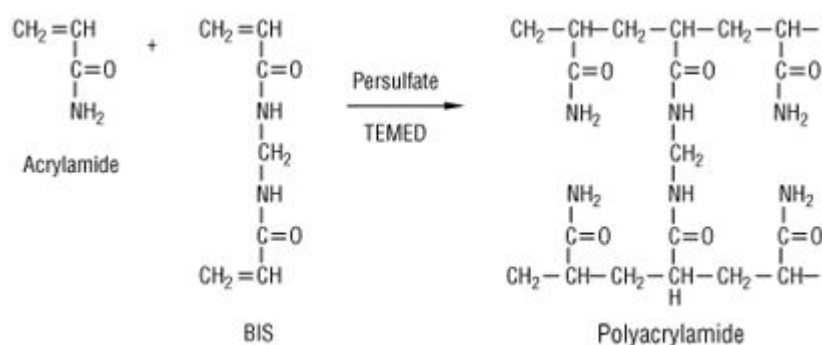


Εικόνα B5. Το ηλεκτροστύπωμα για την μεταφορά ηλεκτροφορήματος πρωτεϊνών σε μεμβράνη. Το ηλεκτροστύπωμα είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος μεταφοράς πρωτεϊνών σε gels πολυακρυλαμιδίου ενώ οι υπόλοιπες τεχνικές βρίσκουν περισσότερο εφαρμογή στην μεταφορά νουκλεϊκών οξέων παρά πρωτεϊνών (www.piercenet.com).

Η μεταφορά πρωτεϊνών τυπικά πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας του ηλεκτροστυπώματος που επιτρέπει την ποσοτικοποίηση, ειδικά όταν συνδιάζεται με πυκνομετρία δηλ. την σάρωση της μεμβράνης και την εκτίμηση της έντασης των μπαντών με ειδικό λογισμικό. Η δε μεμβράνη είναι κατασκευασμένη από πολυμερή όπως το PVDF (polyvinylidene difluoride) και η νιτροκυτταρίνη. Το PVDF είναι ένα φθοριοπολυμερές με υψηλή ανθεκτικότητα στα οξέα και την υψηλή θερμοκρασία καθώς και χημική συγγένεια για τα αμινοξέα. Σε ένα από τα τελικά στάδια της τεχνικής, η μεμβράνη στην οποία έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες επωάζεται και αντιδρά με το πρωτογενές και το δευτερογενές Ab.

Το gel πολυακρυλαμιδίου που χρησιμοποιείται κατά την SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) μπορεί να είναι είτε

προκατασκευασμένο (precast) ή χειροποίητο (home made) όπως και στην προκειμένη περίπτωση και είναι ασυνεχές όσον αφορά την σύνθεσή του με το ανώτερο τμήμα του να αποτελείται από το stacking gel και το κατώτερο τμήμα του από το separating ή running gel. Το stacking gel καθώς είναι όξινο και χαρακτηρίζεται από μεγάλη αντίσταση βοηθά τις πρωτεΐνες μέσω του υψηλού πεδίου που δημιουργείται σε μία πολύ στενή ζώνη να αρχίσουν να κινούνται προς την κάθοδο λόγω του αρνητικού τους φορτίου. Στο δε running gel που διαθέτει υψηλότερο pH οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάση του MW. Ο πολυμερισμός του ακρυλαμίδιου και του *bis*-ακρυλαμίδιου σε πολυακρυλαμίδιο κατά την παρασκευή των gels γίνεται παρουσία APS (υπερθειϊκού αμμωνίου) και TEMED σύμφωνα με την αντίδραση της **Εικόνας B6**.



Εικόνα B6. Η αντίδραση της διασταυρούμενης σύνδεσης και του πολυμερισμού για τον σχηματισμό του πολυακρυλαμίδιου (www.piercenet.com).

Ας σημειωθεί πως πριν την επώαση της μεμβράνης με τα αντισώματα, είναι απαραίτητη η επώασή της με γάλα ή ζελατίνη για την κάλυψη («blocking») των μη ειδικών θέσεων επί των οποίων θα μπορούσαν να προσδεθούν τα αντισώματα με αποτέλεσμα το σήμα να μην είναι ειδικό για την πρωτεΐνη που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε/ποσοτικοποιήσουμε. Ένα buffer δειγμάτων για SDS-PAGE εκτός από Tris-glycine περιέχει γλυκερόλη που καθιστά πιο εύκολο το φόρτωμα των πρωτεϊνών στα πηγαδάκια του gel την χρωστική κυανούν του βρωμοφαινυλίου που επιτρέπει την παρακολούθηση των πρωτεϊνών καθώς ηλεκτροφορούνται και το αποδιατακτικό

μέσω β-μερκαπτοαιθανόλη. Η αποδιάταξη των πρωτεϊνών επιπλέον προωθείται μέσω του βρασμού των δειγμάτων πριν τη φόρτωσή τους με τη βοήθεια ενός floater.

B.6.2. Πρωτόκολλο πειραματικής διαδικασίας για χειροποίητα gels

Η διαδικασία του Western Blot διαρκεί 2 ημέρες. Η μεμβράνη που έχουμε εμφανίσει, ξηραίνεται και μπορεί να φυλαχθεί σε χαρτοπετσέτα, σε προστατευμένο μέρος από υγρασία και φως. Μπορεί επιπλέον να ξαναχρησιμοποιηθεί για διαφορετικό αντίσωμα.

Running gel (κάθετη ηλεκτροφόρηση)

- ✓ Καθαρίζουμε τα τζάμια στα οποία θα φτιάξουμε το gel, με αιθανόλη 70%, τα κλείνουμε στεγανά και ελέγχουμε αν υπάρχουν διαρροές προσθέτοντας απεσταγμένο νερό. Αφού βεβαιωθούμε ότι δεν έχουμε διαρροές, αποχύνουμε το νερό και με ένα χαρτί “μαζεύουμε” τα υπολείμματα του νερού.
- ✓ Φτιάχνουμε το separating gel, σε πυκνότητα ανάλογα με το μέγεθος της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει και το τοποθετούμε στα τζάμια, με προσοχή να μην δημιουργήσουμε φυσαλίδες στο gel. Απο πάνω προσθέτουμε μια στρώση διαλύματος ισοβουτανόλης κορεσμένο με νερό (τοποθετείται για να δημιουργηθεί ευθύ μέτωπο και να διατηρηθεί το μέτωπο υγρό ώστε να μθούν οι πρωτεΐνες μέσα).
- ✓ Περιμένουμε να πήξει το gel παρακολουθώντας το υπόλειμμα που βρίσκεται στο δοχείο που φτιάξαμε το μίγμα. Παράλληλα φτιάχνουμε το stacking gel χωρίς να προσθέσουμε APS (ammonium persulfate) και TEMED.
- ✓ Μόλις πήξει το separating gel, ξεπλένουμε την ισοβουτανόλη πολύ καλά με απεσταγμένο νερό και πάλι μαζεύουμε τα υπολείμματα νερού με λίγο χαρτί.
- ✓ Φτιάχνουμε το stacking gel και το τοποθετούμε πάνω από το separating gel μέχρι το πάνω μέρος του μικρού τζαμιού. Στη συνέχεια τοποθετούμε τη χτένα με προσοχή ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες, κυρίως στο κάτω μέρος του κάθε πηγαδιού.
- ✓ Πάλι παρακολουθούμε το υπόλειμμα που βρίσκεται στο δοχείο που φτιάξαμε το μίγμα για να δούμε πότε θα πήξει το gel.

- ✓ Μόλις το gel είναι έτοιμο, φτιάχνουμε τα δείγματα με την πρωτεΐνη που θα φορτώσουμε καθώς και τα δείγματα μόνο με loading buffer για τα κενά πηγάδια του gel (αυτά στα οποία δεν θα τοποθετήσουμε δείγμα πρωτεΐνης).

Παρασκευή δειγμάτων:

- ✓ Τα δείγματα μπορούμε να τα φτιάξουμε από την προηγούμενη μέρα και να τα φυλάξουμε στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Συνήθως τα φτιάχνουμε τη στιγμή που είναι να τα φορτώσουμε.
- ✓ Ο όγκος των δειγμάτων που φορτώνουμε στα home made gel είναι συνήθως 20μl.
- ✓ Σε αριθμημένα eppendorffs τοποθετούμε σε αναλογία 1/1 loading buffer (LB ή Laemmli sample buffer της In Vitrogen, βρίσκεται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, σε stock διάλυμα 2x) και δείγμα πρωτεΐνης.
- ✓ Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που τοποθετούμε είναι 30μg περίπου. Αυτή εξαρτάται από το δείγμα μας, την ποιότητά του και μπορεί να είναι μικρότερη ή μεγαλύτερη. $V_{\text{δειγμα}}=10\mu\text{l}=\text{όγκο του δείγματος που περιέχει τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης που θέλουμε και συμπληρώνουμε με νερό μέχρι τα }10\mu\text{l}$. Αν η συγκέντρωση που θέλουμε βρίσκεται σε μεγαλύτερο όγκο από τα 10μl τότε κάνουμε συμπήκνωση του δείγματος και αναδιαλύουμε το ίζημα σε 1x LB.
- ✓ $V_{\text{τελ}}=20\mu\text{l} \rightarrow V_{\text{τελ}}=V_{\text{LB}}+V_{\text{δειγμα}}=10\mu\text{l}+10\mu\text{l}$
- ✓ Στις κενές θέσεις που φορτώνουμε μόνο loading buffer, το δείγμα που φτιάχνουμε περιέχει: $V_{\text{τελ}}=20\mu\text{l} \rightarrow V_{\text{τελ}}=V_{\text{LB}}+V_{\text{H}_2\text{O}}=10\mu\text{l}+10\mu\text{l}$
- ✓ Μόλις τα φτιάξουμε τα κρατάμε κατά προτίμηση στον πάγο μέχρι να τα θερμάνουμε για να τα φορτώσουμε.
- ✓ Αφαιρούμε το χτενάκι από το gel με προσοχή να μην χαλάσουν τα πηγάδια και ξεπλαίνουμε με απεσταγμένο νερό.
- ✓ Ετοιμάζουμε τη συσκευή της ηλεκτροφόρησης με το gel. Τοποθετούμε running buffer στον εσωτερικό χώρο της συσκευής και ελέγχουμε αν έχουμε διαρροές στον εξωτερικό χώρο της συσκευής.
- ✓ Αφού βεβαιωθούμε ότι η συσκευή είναι σωστά φτιαγμένη, βράζουμε τα δείγματα στους $95-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 3-5 min. Εν τω μεταξύ πλαίνουμε τα πηγάδια με running buffer.

- ✓ Κάνουμε ένα γρήγορο spin down των δειγμάτων και τοποθετούμε τα δείγματα με την πρωτεΐνη, τα δείγματα με το loading buffer και τον marker στα πηγάδια του gel.
- ✓ Συμπληρώνουμε τον εξωτερικό χώρο της συσκευής με running buffer, τοποθετούμε το καπάκι της συσκευής με τα ηλεκτρόδια και συνδέουμε τη συσκευή με το τροφοδοτικό.
- ✓ Οι συνθήκες που τρέχουμε συνήθως την κάθετη ηλεκτροφόρηση είναι: 125-160 V και 160-200 mA. Ο χρόνος της κάθετης ηλεκτροφόρησης παρακολουθείται ανάλογα με το ύψος του marker, συνήθως 1-2h.

Μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη

- ✓ Ενώ γίνεται η κάθετη ηλεκτροφόρηση προετοιμάζουμε τα υλικά μας για το blotting.
- ✓ Παίρνουμε 4-5 σφουγγάρια, κόβουμε 6 διηθητικά χαρτιά (whatman) για κάθε gel, στο μέγεθος περίπου των σφουγγαριών και τη μεμβράνη PVDF στο μέγεθος του gel που θα κόψουμε-χρειαζόμαστε για το blotting. Η μεμβράνη θέλει πολύ προσοχή στο χειρισμό, την πιάνουμε πάντα με γάντια και προσέχουμε να μην την βρέξουμε ή την χαράξουμε.
- ✓ Φτιάχνουμε το transfer buffer 250ml.
- ✓ Τοποθετούμε 3 μπανάκια στη σειρά και προσθέτουμε στο καθένα με την εξής σειρά: μεθανόλη, νερό δις απεσταγμένο, transfer buffer.
- ✓ Τοποθετούμε επίσης στον πάγκο που θα γίνει το transfer, την σπάτουλα για το άνοιγμα των τζαμιών, μια γυάλινη ράβδο και τις πλάκες που θα τοποθετηθεί το gel για το transfer.
- ✓ Μόλις τελειώσει το running (κάθετη ηλεκτροφόρηση), κλείνουμε το τροφοδοτικό, βγάζουμε τη συσκευή από το τροφοδοτικό και πηγαίνουμε μπροστά από τον νεροχύτη.
- ✓ Παίρνουμε το gel, αδειάζουμε τη συσκευή από το running buffer και την ξεπλύνουμε με νερό. Αν χρησιμοποιούμε το running buffer για πρώτη φορά, το φυλάμε για να το χρησιμοποιήσουμε και δεύτερη φορά.
- ✓ Ξεπλύνουμε το gel με απεσταγμένο νερό.
- ✓ Ανοίγουμε τα τζάμια με τη σπάτουλα με προσοχή να μην χαλάσει-κοπεί το gel.
- ✓ Ρίχνουμε λίγο transfer buffer στο gel για να μην ξεραθεί.

- ✓ Κόβουμε και πετάμε το stacking gel. Κόβουμε και πετάμε το gel που βρίσκεται πάνω και κάτω από την περιοχή του marker που μας ενδιαφέρει. Ταυτόχρονα βάζουμε τη μεμβράνη στη μεθανόλη για 1-2min μέχρι να ενυδατωθεί, στη συνέχεια στο νερό για 5 λεπτά περίπου και τέλος στο transfer buffer. Επειδή η διαδικασία της ενυδάτωσης διαρκεί λίγο, καλό είναι να την ξεκινάμε λίγο πριν σταματήσουμε το running για να μην στεγνώσει το gel μέχρι να τοποθετήσουμε την μεμβράνη απάνω σε αυτό.
- ✓ Μόλις ενυδατωθεί η μεμβράνη και είναι στο transfer buffer, την τοποθετούμε στο τμήμα του gel που μας ενδιαφέρει.
- ✓ Ενυδατώνουμε στο transfer buffer διαδοχικά τα 3 διηθητικά χαρτιά και τα τοποθετούμε πάνω από τη μεμβράνη.
- ✓ Αναποδογυρίζουμε το gel πάνω στο χέρι μας και το ξεκολλάμε από το τζάμι στο οποίο ακουμπάει. Πάλι με μεγάλη προσοχή για να μην χαλάσουμε το gel ή την μεμβράνη.
- ✓ Τοποθετούμε τα υπόλοιπα 3 διηθητικά χαρτιά πάνω στο gel αφού τα ενυδατώσουμε στο transfer buffer.
- ✓ Τοποθετούμε ένα σφουγγάρι ενυδατωμένο σε transfer buffer στη μία από τις δύο πλάκες.
- ✓ Στο “sandwich” αυτό που έχουμε φτιάξει στο χέρι μας η μεμβράνη βρίσκεται στο κάτω μέρος και το gel στο πάνω μέρος. Θα το τοποθετήσουμε με τέτοιο τρόπο στο σφουγγάρι που βρίσκεται πάνω στη μία πλάκα έτσι ώστε η μεμβράνη να κοιτάζει το θετικό πόλο και το gel τον αρνητικό πόλο (οι πρωτεΐνες κινούνται από τον αρνητικό πόλο στον θετικό).
- ✓ Στη συνέχεια “πλάθουμε” το sandwich με τη γυάλινη ράβδο για να φύγουν οι φυσαλίδες που τυχόν υπάρχουν μεταξύ της μεμβράνης και του gel (διαφορετικά οι πρωτεΐνες δεν θα μεταφερθούν στο σημείο εκείνο που υπάρχει φυσαλίδα).
- ✓ Ενυδατώνουμε και τα υπόλοιπα σφουγγάρια σε transfer buffer και τα τοποθετούμε πάνω από το sandwich.
- ✓ Κλείνουμε από πάνω με την άλλη πλάκα και τα τοποθετούμε στη συσκευή.
- ✓ Γεμίζουμε τον εσωτερικό χώρο με transfer buffer μέχρι να καλυφθούν τα σφουγγάρια. Κοιτάμε μήπως έχουμε διαρροή από τον εσωτερικό στον εξωτερικό χώρο της συσκευής.
- ✓ Γεμίζουμε τον εξωτερικό χώρο της συσκευής με νερό από τη βρύση.
- ✓ Κλείνουμε τη συσκευή με το καπάκι της και τη συνδέουμε με το τροφοδοτικό.

- ✓ Οι συνθήκες που γίνεται το transfer είναι συνήθως: 100 V και 200 mA για 45 min περίπου. Ο χρόνος εξαρτάται από το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης και το πάχος του gel. Όσο μεγαλύτερο μοριακό βάρος έχει τόσο περισσότερο χρόνο θέλει να μεταφερθεί στη μεμβράνη. Όσο πιο λεπτό είναι το gel τόσο λιγότερο χρόνο θέλουν οι πρωτεΐνες να μεταφερθούν στη μεμβράνη.
- ✓ Όσο διαρκεί το transfer προετοιμαζόμαστε για το blocking της μεμβράνης. Έτσι αν κάνουμε blocking με ζελατίνη την βγάζουμε από το ψυγείο να ξεπαγώσει (να υγροποιηθεί) ή αν κάνουμε blocking με γάλα φτιάχνουμε το αντίστοιχο διάλυμα.
- ✓ Μόλις τελειώσει το transfer κλείνουμε το τροφοδοτικό, βγάζουμε τα ηλεκτρόδια από το τροφοδοτικό και πηγαίνουμε μπροστά από το νεροχύτη. Βγάζουμε τις πλάκες με το sandwich και το ανοίγουμε.
- ✓ Αποκολλάμε τη μεμβράνη από το gel και την εμβαπτίζουμε σε ένα μπανάκι με διάλυμα blocking, έτσι ώστε η μεριά της μεμβράνης που ακουμπούσε στο gel να κοιτάει προς τα πάνω (είναι η μεριά της μεμβράνης που έχουν προσδεθεί οι πρωτεΐνες).
- ✓ Επώαση με το διάλυμα του blocking γίνεται τουλάχιστον για 2h. Αν το blocking γίνεται με γάλα τότε η επώαση διαρκεί 1h. Αν γίνει overnight η επώαση με τη ζελατίνη γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου (RT), αν γίνεται με το γάλα πρέπει να μπει στο ψυγείο γιατί το γάλα χαλάει.

Επώαση με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα

- ✓ Το πρωτογενές αντίσωμα το διαλύουμε στο αντίστοιχο διάλυμα ανάλογα με τον τρόπο του blocking (γάλα ή ζελατίνη) και επωάζουμε τη μεμβράνη υπό ανάδευση για 3h σε RT ή overnight στους 4 °C. Η αραίωση του πρωτογενούς γίνεται ανάλογα με το αντίσωμα, την εταιρεία από την οποία προέρχεται κ.α., για αυτό κάθε αντίσωμα έχει τη δική του αραίωση. Μετά την επώαση μπορεί το αραιωμένο αντίσωμα να φυλαχτεί στους -20 °C και να επαναχρησιμοποιηθεί.
- ✓ Στη συνέχεια κάνουμε 3 πλύσεις με το αντίστοιχο διάλυμα του blocking από 5min η κάθε πλύση.
- ✓ Επωάζουμε τη μεμβράνη σε δευτερογενές αντίσωμα, επίσης διαλυμένο στο αντίστοιχο διάλυμα ανάλογα με τον τρόπο του blocking (γάλα ή ζελατίνη), για 30min με 1h. Ο χρόνος επώασης του δευτερογενούς καθώς και η αραίωσή του

εξαρτάται από το δευτερογενές, δηλαδή τον τρόπο με τον οποίο θα γίνει η εμφάνιση της μεμβράνης (χημειοφωταύγεια ή αλκαλική φωσφατάση).

- ✓ Έπειτα κάνουμε 3 πλύσεις με το αντίστοιχο διάλυμα του blocking από 5min η κάθε πλύση. Εδώ ο χρόνος των πλυσιμάτων μπορεί να είναι και μεγαλύτερος.

Εμφάνιση PVDF μεμβράνης με χημειοφωταύγεια

- ✓ Το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιούμε πρέπει να είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP (Horse Radish Peroxidase). Το βάζουμε σε αραιώση 1/1000 και επωάζουμε για 45min σε RT. Η αραιώση μπορεί να διαφοροποιηθεί αν αλλάξει το stock του αντισώματος ή η εταιρεία που μας το παρέχει.
- ✓ 3 πλύσεις με το αντίστοιχο διάλυμα του blocking για 5min.
- ✓ Φτιάχνω το διάλυμα-μίγμα της χημειοφωταύγειας το οποίο θέλει κάποιο χρόνο επώασης (1-5min) ο οποίος εξαρτάται από το αντιδραστήριο της χημειοφωταύγειας (κυρίως εταιρεία που το παρέχει).
- ✓ Στραγγίζω τη μεμβράνη και την τοποθετώ πάνω σε μια μεμβράνη διαφανή (σελοφαν) με προσοχή ώστε να είναι επίπεδη (να μην τσαλακώνει το σελοφαν κάτω από τη μεμβράνη).
- ✓ Προσθέτω από πάνω το διάλυμα της χημειοφωταύγειας (0,5-1ml, ανάλογα με το μέγεθος της μεμβράνης) και το αφήνω για 1min (ή 5min ανάλογα με το αντιδραστήριο).
- ✓ Αφαιρώ το διάλυμα της χημειοφωταύγειας, με ένα κομμάτι χαρτί απορροφώ τα υπολείμματα, και καλύπτω τη μεμβράνη με το σελοφάν (πάλι με προσοχή να μην τσαλακωθεί το σελοφάν πάνω από την μεμβράνη).
- ✓ Την τοποθετώ στην κασσέτα εμφάνισης και πηγαίνω στο σκοτεινό δωμάτιο.
- ✓ Τοποθετώ από πάνω ένα κομμάτι φιλμ στο μέγεθος περίπου της μεμβράνης και μετρώ χρόνους για να πάρω διάφορες εκθέσεις της μεμβράνης σε διαφορετικά φιλμ μέχρι να πετύχω το επιθυμητό αποτέλεσμα. Ο χρόνος έκθεσης εξαρτάται από το δευτερογενές (συνήθως εταιρεία) και από το αντιδραστήριο της χημειοφωταύγειας (συνήθως εταιρεία, πόσο χρόνο είναι ανοιχτό).
- ✓ Εμφανίζω το κάθε φιλμ και το αφήνω να στεγνώσει.

Διαλύματα

- Separating gel

Πίνακας B1.

Διαλύματα	Πυκνότητα gel							
	15%	12%	10%	9%	8%	7.5%	6%	5%
Acrylamide/ Bis- acrylamide 37:1	6.76ml	5.4ml	4.5ml	4.05ml	3.6ml	3.38ml	2.7ml	2.25ml
2.25M Tris- HCl, pH=8.8	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml
Distilled Water	0.53ml	1.95 ml	2.85ml	3.3ml	3.75ml	3.97ml	4.65ml	5.1ml
10% SDS (w/v)	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl
Με την προσθήκη APS και TEMED το διάλυμα αρχίζει και πολυμερίζεται (πήζει) για αυτό τα προσθέτουμε μόλις είναι να φορτώσουμε το gel στα τζάμια								
10% APS (w/v)	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl
TEMED	10μl	10μl	10μl	10μl	10μl	10μl	10μl	10μl

Οι παραπάνω ποσότητες είναι για την παρασκευή 1 gel, 10ml συνολικά. Για την παρασκευή περισσότερων gel πολλαπλασιάζουμε τις παραπάνω ποσότητες με τον αριθμό των gel που θέλουμε να φτιάξουμε. Γενικά η ποσότητα του TEMED και APS που προσθέτουμε είναι σε κάθε 10 ml διαλύματος προσθέτω 10μl TEMED και 100μl APS. Αν υπάρχει καθυστέρηση στην πήξη του gel τότε μπορώ να προσθέσω επιπλέον 50% της αρχικής ποσότητας από κάθε αντιδραστήριο.

- Stacking gel

Πίνακας B2.

Διαλύματα	Πυκνότητα περίπου 4.8%
Acrylamide/Bis-acrylamide 37:1	2ml
0.5M Tris-HCl, pH=6.8	1.25ml
Distilled Water	5.6ml
10% SDS (w/v)	100μl
Με την προσθήκη APS και TEMED το διάλυμα αρχίζει και πολυμερίζεται (πήζει) για αυτό τα προσθέτουμε μόλις είναι να φορτώσουμε το gel στα τζάμια	
10% APS (w/v)	100μl
TEMED	10μl

Οι παραπάνω ποσότητες είναι για την παρασκευή ενός stacking gel. Για την παρασκευή παραπάνω πολλαπλασιάζουμε τις ποσότητες με τον αριθμό των gel που θέλουμε να φτιάξουμε.

- Acrylamide/Bisacrylamide

22.2 gr acrylamide, 0.6 gr bis-acrylamide (37:1 cross-linker ratio) σε 100ml νερό. Πρέπει να προστεθούν στο διάλυμα beads για να αποφευχθούν εναιωρήματα και για να καθαρίσει. Διαφορετικά γίνεται διήθηση του διαλύματος.

- ✓ Το διάλυμα Tris-HCl είναι Tris(hydroxymethyl)-aminomethan του οποίου το pH ρυθμίζουμε με HCl.
- ✓ APS: ammonium persulfate, ίζημα, σε RT.
- ✓ TEMED: N,N,N',N'-TETRA-METHYLETHYLENE-DIAMINE, είναι διάλυμα, στους 4°C.
- ✓ SDS: sodium dodecyl sulfate ή Lauryl sulfate, ίζημα, σε RT.

- Running buffer

Πίνακας B3.

Ουσίες	1x	5x	10x
Glycine	11.52gr	57.6gr	115.2gr
Tris Base (Trizma Base)	2.4gr	12gr	24.0gr
SDS	0.8gr	4gr	8.0gr
Συμπλήρωση με H ₂ O μέχρι	800ml	1lt	1lt

- Transfer buffer

Πίνακας B4.

Ουσίες	1x, 300ml	Stock solution 10x, 500ml
Tris Base (Trizma Base) 24.8mM	0.909gr	15.15gr
Glycine	4.32gr	72gr
Distilled Water	240ml	500ml
Methanol 20% v/v	60ml	Την προσθέτω όταν είναι να φτιάξω το working solution

- Ζελατίνη 2.5% σε TBS για το blocking

7.5gr ζελατίνης, 285ml απεσταγμένο νερό, 15ml TBS 20x, αποστείρωση του διαλύματος, φύλαξη στους 4 °C.

- Διάλυμα επώσεων και πλύσεων όταν το blocking γίνεται με ζελατίνη

TBS 1x, 0.5% v/v Tween-20. Στα 100ml βάζω 5ml TBS 20x, 0.5ml Tween-20, 95ml νερό. TBS: Tris Buffer Saline. Στο 1 lt προσθέτω 1gr Tris Base, 8.1gr NaCl, pH=7.6.

Συνήθως φτιάχνουμε διάλυμα stock 20x, οπότε σε 1lt προσθέτω 20gr Tris-Base, 162gr NaCl, pH 7.6.

- Διάλυμα Blocking με γάλα:

TBS 1x, Tween-20 0.1% v/v, γάλα 5% w/v. Στα 100ml βάζω 5ml TBS 20x, 0.1ml Tween-20, 5gr γάλα (σε σκόνη), 95ml νερό.

- Διάλυμα επώσεων και πλύσεων όταν το blocking γίνεται με γάλα:

TBS 1x, Tween-20 0.1% v/v, γάλα 0.5% w/v. Στα 100ml βάζω 5ml TBS 20x, 0.1ml Tween-20, 0.5gr γάλα, 95ml νερό.

- Loading buffer home made

SDS 2x: 20% glycerol, 4% SDS, 120mM Tris Cl pH 6.8, 0.003% bromophenol blue. Ακριβώς πριν την χρήση του διαλύματος για τη διάλυση των πρωτεϊνών προσθέτουμε 10% β-μερκαπτοαιθανόλη.

B.6.3. Αντιδραστήρια για το Western blotting

Το 1^ογενές αντι-p21 Waf1 αντίσωμα (Ab) που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των επιπέδων της p21 πριν και μετά την επαγωγή ήταν ποντικίσιο μονοκλωνικό και αγοράστηκε από την εταιρία Santa Cruz Biotechnology (Cat# sc-6246, κλώνος F-5) και η αραίωσή του ήταν 1:400. Το 2^ογενές που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή σήματος ήταν κατσικίσιο IgG αντίσωμα ειδικό για να αντιδρά με ποντικίσια αντισώματα (Cat# AF007) και αγοράστηκε από την εταιρία R&D Systems ενώ η αραίωσή του ήταν 1:1000.

Για την ανάλυση western blot της Ser125-NPM/B23 και της p14ARF χρησιμοποιήθηκαν ως 1^ογενή αντισώματα ένα μονοκλωνικό αντίσωμα λαγού (1:10000 dilution, Abcam, ab109546) και ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού (1:100 dilution, Abcam, ab49166), αντίστοιχα. Συνολικά, φορτώθηκαν στην συσκευή

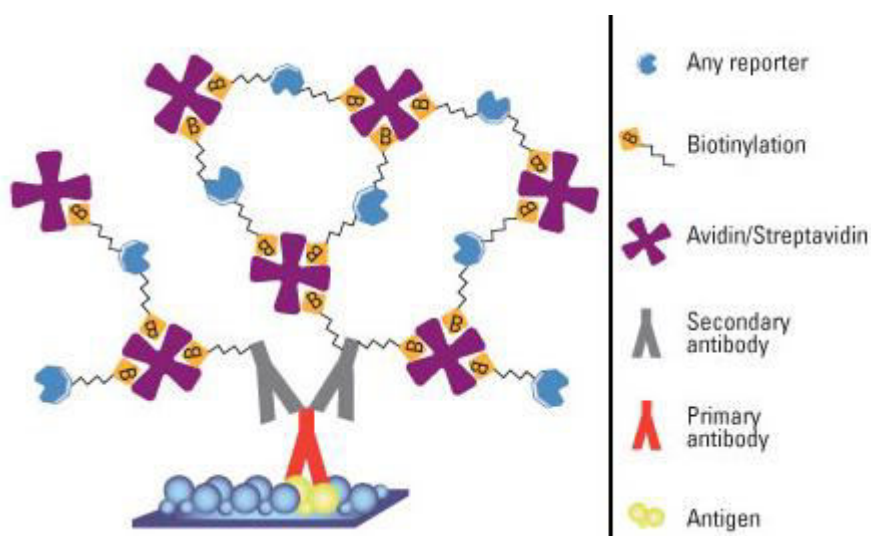
ηλεκτροφόρησης 20 µg πρωτεΐνης-δείγματος. Τα 2^ογενή αντισώματα αγοράστηκαν από την R&D Systems και η ανίχνευση του σήματος πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ECL (enhanced chemiluminescence) από την Thermo Fisher Scientific.

Για την ανάλυση western blot των καταλοίπων της νουκλεοφωσμίνης κατά μήκος του μορίου της χρησιμοποιήθηκαν τα 1^ογενή αντισώματα αντι-NPM/B23-pS4 (ποντικίσιο μονοκλωνικό αντίσωμα, Cell Signaling Tech), αντι-NPM/B23-pS125 (ποντικίσιο μονοκλωνικό αντίσωμα, Abcam), αντι-NPM/B23-pT95 (ποντικίσιο μονοκλωνικό αντίσωμα, Cell Signaling Tech), αντι-NPM/B23-pT199 (ποντικίσιο μονοκλωνικό αντίσωμα, Abcam) και αντι-NPM/B23-pT234/237 (ποντικίσιο μονοκλωνικό αντίσωμα, Abcam), όλα σε αραιώση 1:500. Τα αντιδραστήρια για την αποσιώπηση για την ανίχνευση της Cdc6 και της ATM με western blot έχουν περιγραφθεί σε προηγούμενες μελέτες (**Velimezi et al. 2013; Sideridou et al. 2011**).

B7. Ανάλυση ανοσοϊστοχημείας

B.7.1. Βασικές αρχές

Η ανάλυση ανοσοϊστοχημείας πραγματοποιήθηκε σε δείγματα μονιμοποιημένα με φορμαλίνη και εγκλεισμένα σε παραφίνη όπως έχει προηγουμένως περιγραφθεί (Liontos et al. 2007; Sideridou et al. 2011). Το σήμα ύστερα από την χρώση αξιολογήθηκε από δύο ανεξάρτητους παθολογοανατόμους που δεν γνώριζαν τα δεδομένα. Αξιολογήθηκε ένας ελάχιστος αριθμός 10 ανεξάρτητων οπτικών πεδίων ανά δείγμα ενώ το κάθε δείγμα υποβλήθηκε σε ανοσοϊστοχημική ανάλυση τουλάχιστον 3 φορές. Για την ανίχνευση της CD31 χρησιμοποιήθηκε ένα anti-CD31 αντίσωμα σε αραίωση 1:100 (rabbit polyclonal, Abcam, ab28364). Ως δευτερογενές χρησιμοποιήθηκε ένα βιοτινυλιωμένο αντίσωμα (goat anti-rabbit, 1:200). Η ενίσχυση και η παραγωγή του σήματος έγινε με την μεθοδολογία ABC (avidin-biotin complex, **Εικόνα B7**) με την υπεροξυδάση αγριοραπανιού (horseradish peroxidase, HRP) να αποτελεί το βιοτινυλιωμένο ένζυμο και το DAB (3,3'-diaminodbenzidine, Thermo Scientific Pierce) το χρωμογόνο υπόστρωμα.



Εικόνα B7. Σχηματική αναπαράσταση της ABC μεθόδου για την παραγωγή και ενίσχυση σήματος στην ανοσοϊστοχημεία (www.piercenet.com).

B.7.2. Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας

Αρχικά τοποθετούμε τα δείγματα προς μελέτη σε 60°C, το πολύ επί 30'.

Τα επόμενα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής

1. Αποπαραφίνωση των τομών σε ξυλόλη (διάλυση της παραφίνης).
 - α) Ξυλόλη I > 5'
 - β) Ξυλόλη II > 5'
 - γ) Ξυλόλη III > 5'
2. Ενυδάτωση των τομών σε διαλύματα αυξανόμενης περιεκτικότητας σε νερό.
 - γ) Αιθανόλη 100% > 10'
 - δ) Αιθανόλη 100% > 5'
 - ε) Αιθανόλη 96% > 2 x 5'
 - στ) Αιθανόλη 80% > 1 x 3' (5' για πολλά πλακάκια)
 - ζ) Αιθανόλη 70% > 1 x 3' (5' για πολλά πλακάκια)
 - η) Αιθανόλη 50% > 1 x 3' (5' για πολλά πλακάκια)
3. Αδρανοποίηση ενδογενούς υπεροξειδάσης με 3% H₂O₂ (από διάλυμα stock 30%, αραιώση 1:10). Για ένα μπανάκι προσθέτουμε 20ml H₂O₂ + 180ml TBS. Τα δείγματα παραμένουν επί 10'-14' στο σκοτάδι σε θ⁰ δωματίου. (διαφορετικά μπορούμε σε T.O.=50ml σε μπανάκι, 5ml H₂O₂ + 45ml ddH₂O)

Δ/μα. TBS: 8.1 gr NaCl/1gr TrizmaBase 1L (pH 7.6)/HCl 1N.

4. Ξεπλένουμε τις τομές επί 5' με TBS σε θ⁰ δωματίου (μπορεί να παρακαμφθεί).
5. Αποκάλυψη αντιγονικών θέσεων. Θέρμανση των τομών σε βραστήρα, steamer, επί 60' καλυπτόμενο το μπανάκι με αλουμινόχαρτο, αν και ο χρόνος τροποποιείται ανάλογα με το αντίσωμα) με διάλυμα κιτρικού νατρίου.
Διαλύματα που χρησιμοποιούμε:

Δ/μα. κιτρικού νατρίου: 2.1gr σε 1lt ddH₂O (water for injection) > pH: 6.0,
ρύθμιση με NaOH.

Μετά το πέρας αυτής της διαδικασίας αφήνουμε τις τομές να κρυσώσουν επί 20' περίπου.

6. Ξέπλυμα των δειγμάτων όπως είναι μέσα στο μπανάκι σε TBS για 5'.
7. Επώαση με 1γενές αντίσωμα. Για κάθε τομή 60λ είναι ικανοποιητικά, αν και εξαρτάται από το μέγεθος των τομών. Η επώαση γίνεται ολονύκτια στους 4°C.
8. Ξέπλυμα με TBS επί 5' σε θ° δωματίου.
9. Επώαση με 2γενές αντίσωμα. Η αραίωση είναι 1:200 για το 2γενές αντίσωμα. Η επώαση γίνεται επί 30' στους 37°C.

Προετοιμασία AB complex (Thermo Scientific Pierce), το οποίο φτιάχνουμε 30' πριν τη χρήση του και το διαφυλάττουμε στο σκοτάδι.

Διάλυμα AB complex: αραίωση 1:100 A, αραίωση 1:100 B σε TBS.

10. Ξέπλυμα με TBS επί 5' σε θ° δωματίου.
11. Επώαση με AB complex επί 20' σε 37°C.

Προετοιμασία DAB, ξεπάγωμα στο σκοτάδι.

12. Ξέπλυμα επί 5' σε θ° δωματίου σε TBS.

13. Εμβάπτιση τομών σε DAB. Χρησιμοποιούμε 1 aliquot/μπανάκι.

Διάλυμα DAB/μπανάκι: DAB (1 aliquot = 1ml) + 16λ H₂O₂ (από το stock 30%) ανάδευση και προσθήκη σε 50ml TBS (που περιέχει το μπανάκι).

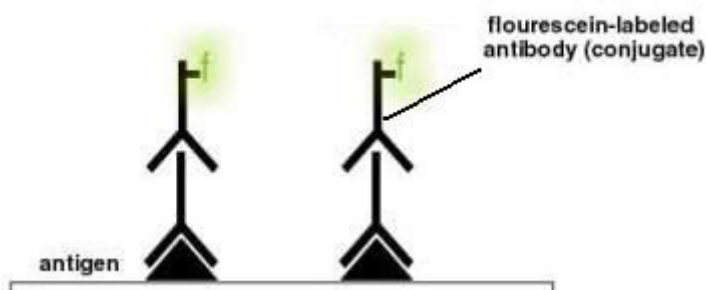
Ο χρόνος επώασης των τομών γίνεται σε θ° δωματίου και είναι εξατομικευμένος. Παρατηρούμε τη χρώση των τομών. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούμε γυάλινο μπανάκι.

14. Ξέπλυμα με άφθονο νερό επί 2' περίπου (τοποθετούμε το γυάλινο μπανάκι κάτω από τη βρύση).
15. Εμβάπτιση τομών σε αιματοξυλίνη (Ο χρόνος είναι πάλι εξατομικευμένος).
16. Ξεπλένουμε καλά τα δείγματα με άφθονο νερό βρύσης. Οι τομές πρέπει να είναι συνέχεια εμβαπτισμένες σε νερό ώστε να μην στεγνώσουν.
17. Αφυδάτωση τομών.
- Αιθανόλη 50% > 1 x 3' (5' για πολλές τομές)
- Αιθανόλη 70% > 1 x 3' (5' για πολλές τομές)
- Αιθανόλη 80% > 1 x 3' (5' για πολλές τομές)
- Αιθανόλη 96% > 2 x 5'
- Αιθανόλη 100% > 1 x 5'
- Αιθανόλη 100% > 1 x 10'
- Ξυλόλη III > 1x 5'
- Ξυλόλη II > 1 x 5'
- Ξυλόλη I > 1 x 5'
18. Κάλυψη των τομών με βάλσαμο του Καναδά (DPX) και εν συνέχεια με καλυπτρίδα.
19. Παρατήρηση των τομών στο οπτικό μικροσκόπιο.

B.8. Ανάλυση έμμεσου ανοσοφθορισμού

B.8.1. Βασικές αρχές

Η διαδικασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού (IF) είναι παρόμοια με αυτή της ανοσοϊστοχημείας, αλλά παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία. Χρησιμοποιήθηκε σε δείγματα κυττάρων στρωμένων σε καλυπτρίδες. Χρησιμοποιείται δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική (**Εικόνα B8**) και η παρατήρηση γίνεται σε μικροσκόπιο φθορισμού.



Εικόνα B8. Αρχές έμμεσου ανοσοφθορισμού (<http://www.dshs.state.tx.us>).

B.8.2. Πρωτόκολλο έμμεσου ανοσοφθορισμού

Για την ανάλυση έμμεσου ανοσοφθορισμού τα κύτταρα αναπτύσσονται πάνω σε καλυπτρίδες. Ξεπλένονται με PBS και μονιμοποιούνται με παγωμένη μεθανόλη για 5 λεπτά. Στην συνέχεια ξεπλένονται και διατηρούνται σε PBS στους 4°C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Για να επωαστούν με το πρωτογενές αντίσωμα πρέπει να ενυδατωθούν σε διαλύματα αιθανόλης διαδοχικά ελαττωμένης περιεκτικότητας σε θερμοκρασία δωματίου:

Αιθανόλη 100% για 10 λεπτά

Αιθανόλη 100% για 5 λεπτά

Αιθανόλη 96% 2 φορές για 5 λεπτά

Αιθανόλη 80% για 5 λεπτά

Αιθανόλη 70% για 5 λεπτά

Αιθανόλη 50% για 5 λεπτά

TBS για 5 λεπτά

Ακολουθεί επώαση με πρωτογενές αντίσωμα και φυσιολογικό μη ανοσοποιημένο ορό (αραίωση 1:20) διαλυμένα σε TBS. Η επώαση γίνεται ολονύκτια στους 4°C.

Τα κύτταρα ξεπλένονται σε TBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και επωάζονται με δευτερογενές αντίσωμα σημασμένο με φθοροχρωστική (Texas Red στην συγκεκριμένη περίπτωση, που προσδίδει κόκκινο χρώμα μετά την επίδραση του υπεριώδους φωτός) σε αραίωση 1:800 διαλυμένο σε TBS. Το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιείται έχει την ίδια προέλευση με τον ορό. Η επώαση γίνεται για 30 λεπτά στους 37°C.

Τα κύτταρα ξεπλένονται με TBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

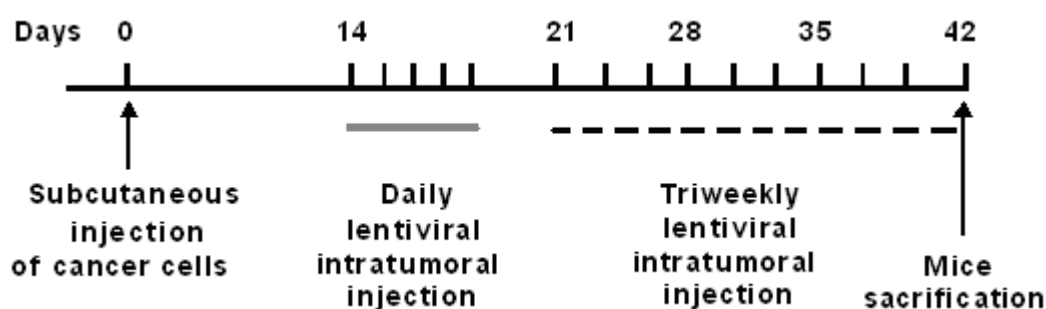
Στην συνέχεια επωάζονται με το χρωμογόνο DAPI (αραίωση 1:1000) για 5 λεπτά στους 37°C. Οι πυρήνες βάφονται μπλε ώστε να είναι διακριτοί. (Συγκέντρωση διαλύματος: 1γρ. σε 750ml TBS). Τα κύτταρα ξεπλένονται με TBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, καλύπτονται με διάλυμα 40% (v/v) γλυκερόλης και καλυπτρίδα και παρατηρούνται σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss AxioPLAN 2).

B.8.3. Αντιδραστήρια ανάλυσης έμμεσου ανοσοφθορισμού

Για την ανίχνευση της RPA (replication protein A) με IF χρησιμοποιήθηκε ένα μονοκλωνικό ποντικίσιο 1^ογενές αντίσωμα κατά της υπομονάδας RPA32 (1:1000 αραίωση, Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc166886). Ως 2^ογενές αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε ένα κατσικίσιο αντίσωμα (anti-mouse) συζευγμένο με την φθορίζουσα χρωστική Texas Red σε αραίωση 1:1000 (Abcam). Η χρώση πυρήνων (counterstaining) έγινε με 100 ng/ml 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma, Antisel).

B.9. Ξενομοσχεύματα και μεταχείριση ζώων

Τα κύτταρα H1299 ctl-shRNA που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας (control, 5×10^6 σε 200 μ l PBS) ενέθηκαν υποδόρια σε κάθε πλευρό ενός group ($n = 5$) τυχαία επιλεγμένων ανοσοκατεσταλμένων (SCID) ποντικών (*Mus musculus*) ηλικίας 8-12 εβδομάδων. Σε ένα δεύτερο group 5 ποντικών, 5×10^6 κύτταρα H1299 ctl-shRNA ή shARF ενέθηκαν υποδόρια και στις 2 πλευρές κάθε ποντικού. Δύο εβδομάδες αργότερα είχαν αναπτυχθεί μακροσκοπικά ορατοί όγκοι. Έπειτα, λεντιϊκό μη-στοχευμένο shRNA ή λεντιϊκό shATM ενέθηκε σύμφωνα με το χρονοδιάγραμμα του **Διαγράμματος B1**, όπως αυτό έχει πριν περιγραφθεί (Velimezi et al. 2013). Στο τέλος, τα ζώα θανατώθηκαν με ευθανασία, οι όγκοι αφαιρέθηκαν, ζυγίστηκαν, μονιμοποιήθηκαν με φορμαλίνη και εγκλείστηκαν σε παραφίνη σύμφωνα με το πρωτόκολλο που έχει περιγραφθεί (Sideridou et al. 2011).

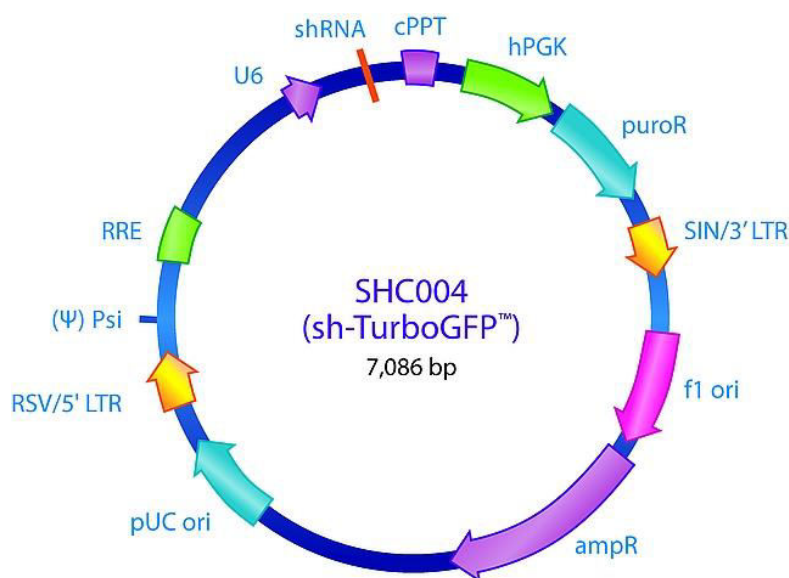


Διάγραμμα B1. (Velimezi et al. 2013).

B.10. Παραγωγή λεντιϊών/τιτλοποίηση και μεταγωγή των ξενομοσχευμάτων-όγκων

Για την παραγωγή των ιοσωματίων των λεντιϊών, 5×10^6 τα HEK293T κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία των 10 cm και διαμολύνθηκαν και διαμολύνθηκαν με πλασμίδια πακεταρίσματος τρίτης γενιάς (15 μ g pMDLg/pRRE, 6 μ g pRSV-REV, 3 μ g pMD2.G) χρησιμοποιώντας ως αντιδραστήριο μετασχηματισμού 50 μ l Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Για την αποσιώπηση της ATM στους όγκους-

ξενομοσχεύματα που δημιουργήθηκαν από H1299 και H1299 κύτταρα στα οποία είχε γίνει αποσιώπηση της ARF με shRNA, χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικοί φορείς, οι pLKO.1-short hairpin RNA MISSION vectors από την Sigma (**Velimezi et al. 2013**). Ο φορέας pLKO.1 TurboGFP (Sigma) χρησιμοποιήθηκε σαν φορέας-μάρτυρας (ctrl, **Εικόνα B9**). Τα υπερκείμενα με τα ισωμάτια συλλέχθηκαν 48, 72 και 96 h μετά την διαμόλυνση και συμπυκνώθηκαν με χρήση του συμπυκνωτή LentiX concentrator (Clontech) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το ιικό RNA απομονώθηκε από 150 μ l από κάθε συμπυκνωμένο λεντιϊό χρησιμοποιώντας το kit Viral RNA isolation kit (Macherey-Nagel) και η τιτλοποίηση έγινε με το kit LentiX qRT-PCR Titration Kit (Clontech) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μεταγωγή των λεντιϊών μέσω ένεσης εντός των όγκων των GFP, GFP siRNA (μη-στοχευμένο shRNA) ή τα ισωμάτια των λεντιϊών shATM (με έναν τίτλο ιών $6.2 \times 10^{11} \text{ ml}^{-1}$ λεντιϊκών σωματίων ανά ένεση) έλαβε χώρα καθημερινά για μία περίοδο 5 ημερών και κάθε 2 ημέρες για άλλες τρεις εβδομάδες μετά την εμφάνιση των όγκων.



Εικόνα B9. (<http://www.sigmaaldrich.com>).

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1. Αποτελέσματα για την p21WAF1/CIP1

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της p21WAF1/CIP1 σε κύτταρα που στερούνται λειτουργικής p53, χρησιμοποιήθηκε ένα επαγωγίμο κυτταρικό σύστημα που βασίζεται στα κύτταρα οστεοσαρκώματος Saos2, το επονομαζόμενο Saos2-p21WAF1/CIP1 σύστημα. Στο σύστημα αυτό η έκφραση της p21WAF1/CIP1 βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο της δοξυκυκλίνης.

Τα Saos2-p21WAF1/CIP1 κύτταρα συλλέχθηκαν πριν την επαγωγή (Time Point:0 hours) και σε τρία διαδοχικά χρονικά σημεία μετά την επαγωγή της p21WAF1/CIP1 (12hrs, 48hrs και 96hrs) και υποβλήθηκαν σε πρωτεωμική ανάλυση. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε ώστε να αποκτηθεί πληροφορία σχετικά με τον έλεγχο που ασκεί η p21WAF1/CIP1 σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Στον **Πίνακα Γ1** αναγράφονται οι πρωτεΐνες των οποίων τα επίπεδα βρέθηκαν να παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική μεταβολή και το είδος της μεταβολής δηλ. αυξορρύθμιση (up-regulation) ή μειορρύθμιση (down-regulation). Στο **Διάγραμμα Γ1** μορφής «πίτας». Όπως φαίνεται, οι πρωτεΐνες των οποίων η έκφραση μεταβλήθηκε μετά της επαγωγή της p21WAF1/CIP1 ήταν συνολικά 98. Από αυτές, η μεγάλη πλειοψηφία υπέστη μειορρύθμιση (οι 66 πρωτεΐνες) ενώ τα επίπεδα 32 συνολικά πρωτεϊνών παρουσίασαν αύξηση.

Πίνακας Γ1.

Gene Name	Description	Accession No.	Regulation
Early Response			
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1	P38936	Up-regulated
KLDC2	Kelch domain-containing protein 2	Q9Y2U9	Down-regulated

LUM	Lumican	P51884	Down-regulated
APOC3	Apolipoprotein C-III	P02656	Down-regulated
CDT1	DNA replication factor Cdt1	Q9H211	Up-regulated
Mid Response			
VRK1	Serine/threonine-protein kinase VRK1	Q99986	Down-regulated
RGAP1	Rac GTPase-activating protein 1	Q9H0H5	Down-regulated
BUB1B	Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 beta	O60566	Down-regulated
UBE2T	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 T	Q9NPD8	Down-regulated
ITB4	Integrin beta-4	P16144	Up-regulated
TM189	Transmembrane protein 189	A5PLL7	Up-regulated
APOE	Apolipoprotein E	P02649	Down-regulated
SG110	Putative uncharacterized serine/threonine-protein kinase SgK110	P0C264	Down-regulated

TOP2A	DNA topoisomerase 2-alpha	P11388	Down-regulated
PHLB2	Pleckstrin homology-like domain family B member	Q86SQ0	Up-regulated
TSP1	Thrombospondin-1	P07996	Down-regulated
PEDF	Pigment epithelium-derived factor	P36955	Down-regulated
NEP	Neprilysin	P08473	Up-regulated
MOFA1	MORF4 family-associated protein 1	Q9Y605	Down-regulated
MAD2L1	Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2A	Q13257	Down-regulated
INCE	Inner centromere protein	Q9NQS7	Down-regulated
SPDLY	Protein Spindly	Q96EA4	Down-regulated
PLK1	Serine/threonine-protein kinase PLK1	P53350	Down-regulated
CND3	Condensin complex subunit 3	Q9BPX3	Down-regulated
CND1	Condensin complex subunit 1	Q15021	Down-regulated
KIF4A	Chromosome-associated	O95239	Down-regulated

	kinesin KIF4A		
ERC6L	DNA excision repair protein ERCC-6-like	Q2NKX8	Down-regulated
CBS	Cystathionine beta-synthase	P35520	Up-regulated
BOREA	Borealin	Q53HL2	Down-regulated
O6C70	Olfactory receptor 6C70	A6NIJ9	Down-regulated
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1	P06493	Down-regulated
ARGI2	Arginase-2, mitochondrial	P78540	Up-regulated
ANLN	Actin-binding protein anillin	Q9NQW6	Down-regulated
CIP2A	Protein CIP2A	Q8TCG1	Down-regulated
ALBU	Serum albumin	P02768	Down-regulated
A2MG	Alpha-2-macroglobulin	P01023	Down-regulated
NAR4	Ecto-ADP-ribosyltransferase 4	Q93070	Down-regulated
CD63	CD63 antigen	P08962	Down-regulated
TRFL	Lactotransferrin	P02788	Down-regulated

APOM	Apolipoprotein M	O95445	Down-regulated
FETA	Alpha-fetoprotein	P02771	Down-regulated
MAGA3	Melanoma-associated antigen 3	P43357	Down-regulated
TATD2	Putative deoxyribonuclease TATDN2	Q93075	Down-regulated
H6ST1	Heparan-sulfate 6-O-sulfotransferase 1	O60243	Down-regulated
FETUA	Alpha-2-HS-glycoprotein	P02765	Down-regulated
H12	Histone H1.2	P16403	Down-regulated
RIR2	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2	P31350	Down-regulated
NF2L2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	Q16236	Down-regulated
KIF2C	Kinesin-like protein KIF2C	Q99661	Down-regulated
ORC1	Origin recognition complex subunit 1	Q13415	Up-regulated
SATT	Neutral amino acid transporter A	P43007	Up-regulated

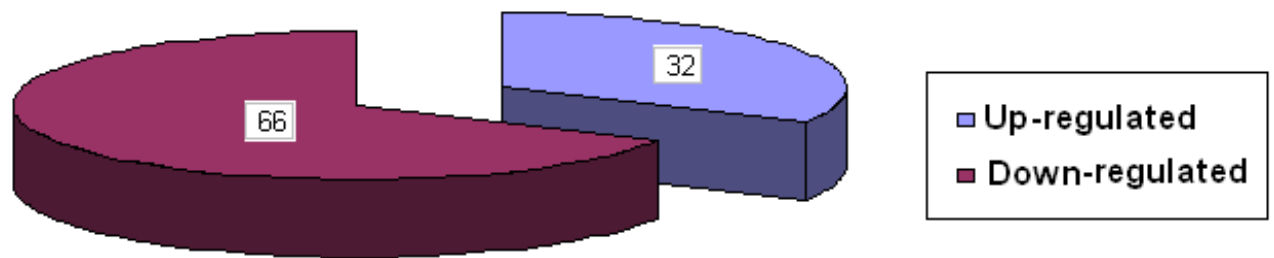
MYL1	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	P05976	Up-regulated
SFR15	Splicing factor, arginine/serine-rich 15	O95104	Down-regulated
MED14	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14	O60244	Down-regulated
TT39A	Tetratricopeptide repeat protein 39A	Q5SRH9	Down-regulated
FRMD8	FERM domain-containing protein 8	Q9BZ67	Up-regulated
KITH	Thymidine kinase, cytosolic	P04183	Down-regulated
SAS6	Spindle assembly abnormal protein 6 homolog	Q6UVJ0	Down-regulated
PRR11	Proline-rich protein 11	Q96HE9	Down-regulated
KIFC1	Kinesin-like protein KIFC1	Q9BW19	Down-regulated
CSPG4	Chondroitin sulfate proteoglycan 4	Q6UVK1	Down-regulated
KIF23	Kinesin-like protein KIF23	Q02241	Down-regulated
MO4L2	Mortality factor 4-like protein 2	Q15014	Down-regulated

CENPF	Centromere protein F	P49454	Down-regulated
RAD18	E3 ubiquitin-protein ligase RAD18	Q9NS91	Down-regulated
TACC3	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3	Q9Y6A5	Down-regulated
IGSF8	Immunoglobulin superfamily member 8	Q969P0	Up-regulated
SAHH3	Putative adenosylhomocysteinase 3	Q96HN2	Up-regulated
KIF11	Kinesin-like protein KIF11	P52732	Down-regulated
TPX2	Targeting protein for Xklp2	Q9ULW0	Down-regulated
DYSF	Dysferlin	O75923	Up-regulated
IMA2	Importin subunit alpha-2	P52292	Down-regulated
Late Response			
PCH2	Pachytene checkpoint protein 2 homolog	Q15645	Down-regulated
SMC4	Structural maintenance of chromosomes protein	Q9NTJ3	Down-regulated

	4		
STX8	Syntaxin-8	Q9UNK0	Down-regulated
CND2	Condensin complex subunit 2	Q15003	Down-regulated
CPMD8	C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containing protein 8	Q8IZJ3	Down-regulated
H2A2B	Histone H2A type 2-B	Q8IUE6	Down-regulated
NUCB1	Nucleobindin-1	Q02818	Down-regulated
F207A	Protein FAM207A	Q9NSI2	Down-regulated
IQGA3	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP3	Q86VI3	Down-regulated
CAF1B	Chromatin assembly factor 1 subunit B	Q13112	Up-regulated
CDC6	Cell division control protein 6 homolog	Q99741	Up-regulated
DCK	Deoxycytidine kinase	P27707	Up-regulated
SYNE2	Nesprin-2	Q8WXH0	Up-regulated
SCOT1	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mitochondrial	P55809	Up-regulated

IDH2	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	P48735	Up-regulated
SEPT5	Septin-5	Q99719	Up-regulated
RTN3	Reticulon-3	O95197	Up-regulated
AKA12	A-kinase anchor protein 12	Q02952	Up-regulated
SERA	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	O43175	Up-regulated
HERC5	E3 ISG15--protein ligase HERC5	Q9UII4	Up-regulated
GXLT1	Glucoside xylosyltransferase	Q4G148	Up-regulated
LGUL	Lactoylglutathione lyase	Q04760	Up-regulated
MGST1	Microsomal glutathione S-transferase 1	P10620	Up-regulated
SMCA2	Probable global transcription activator SNF2L2	P51531	Up-regulated
SHPS1	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1	P78324	Up-regulated
CING	Cingulin	Q9P2M7	Up-regulated

Διάγραμμα Γ1.



Upregulated			
Early	2		
Mid	13		
Late	17		
Down-regulated			
Early	3		
Mid	54		
Late	9		
Sum:	98		

Η GO-BP (Gene Ontology Biological Process enrichment analysis) ανάλυση αυτών των πρωτεϊνών αποκάλυψε ότι οι πρωτεΐνες που υφίστανται αυξορρύθμιση ανήκουν κυρίως στην κατηγορία της κυτταρικής διεργασίας «μεταβολισμός» (“metabolic process”, p-value=1,2357E-06) αλλά και στην κατηγορία που σχετίζεται με την G1-S φάση του κυτταρικού κύκλου και την αντιγραφή του DNA (p-value=1,4614E-06). Τα αποτελέσματα της GO-BP για τις πρωτεΐνες των οποίων τα επίπεδα αυξήθηκαν και μειώθηκαν, αντίστοιχα, συνοψίζονται στους **Πίνακες Γ2** και **Γ3**.

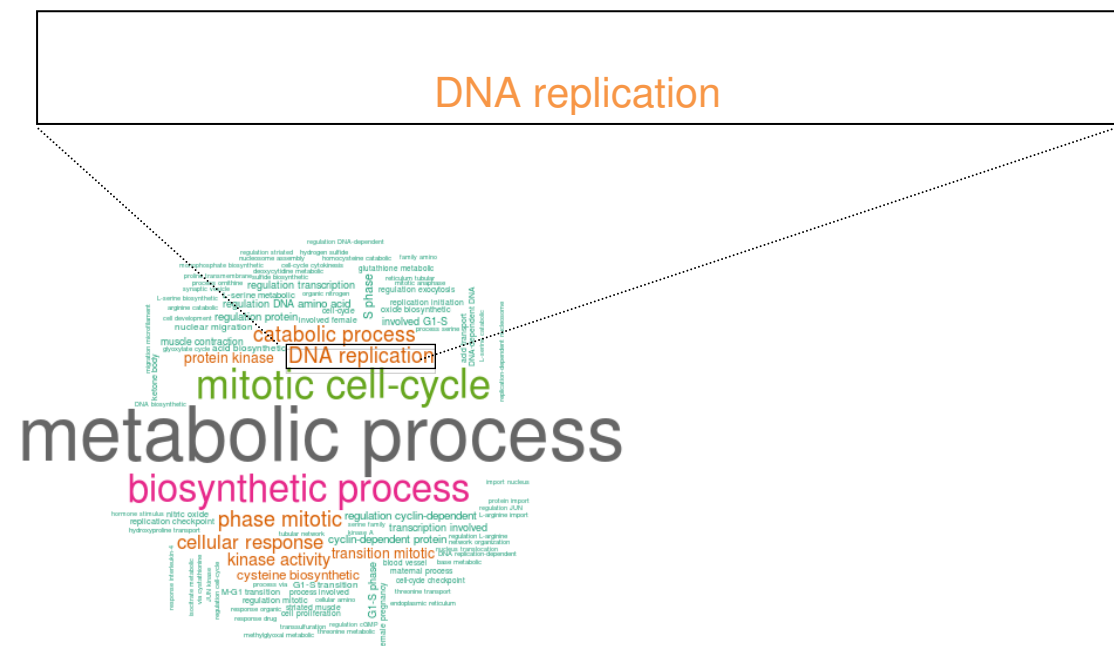
Πίνακας Γ2.

Up-regulated Proteins GO-BP Enrichment Analysis	
Name	p-value
metabolic process	1,2357E-06
regulation of transcription involved in G1-S phase of mitotic cell cycle (DNA Replication Licensing Factors CDC6,CDT1 & ORC1)	1,4614E-06

Πίνακας Γ3.

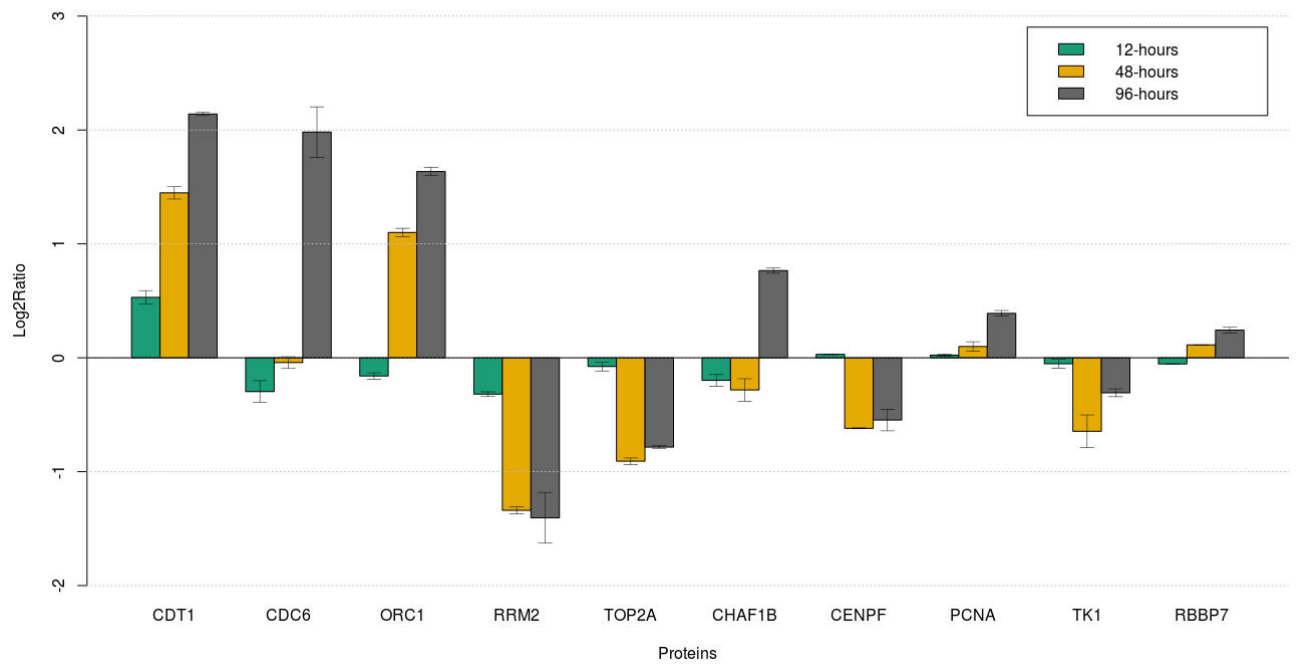
Down-regulated Proteins GO-BP Enrichment Analysis	
Name	p-value
mitosis	2,38867E-24
cell division	9,38846E-24
cell cycle	5,99801E-19
M phase of mitotic cell cycle	1,70544E-15
mitotic prometaphase	7,02803E-14
mitotic cell cycle	4,16278E-13
chromosome condensation	6,88036E-10
blood coagulation	1,37243E-08
mitotic chromosome condensation	1,76077E-08
cytokinesis	8,41185E-08
microtubule-based movement	9,01907E-08
protein localization to kinetochore	1,13727E-07
cell proliferation	1,05775E-06

Στις **Εικόνες Γ1** και **Γ2** φαίνεται αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης GO-BP για τις πρωτεΐνες των οποίων τα επίπεδα αυξήθηκαν και μειώθηκαν, αντίστοιχα, με την μορφή «σύννεφου ετικετών» (“tag cloud” visual).

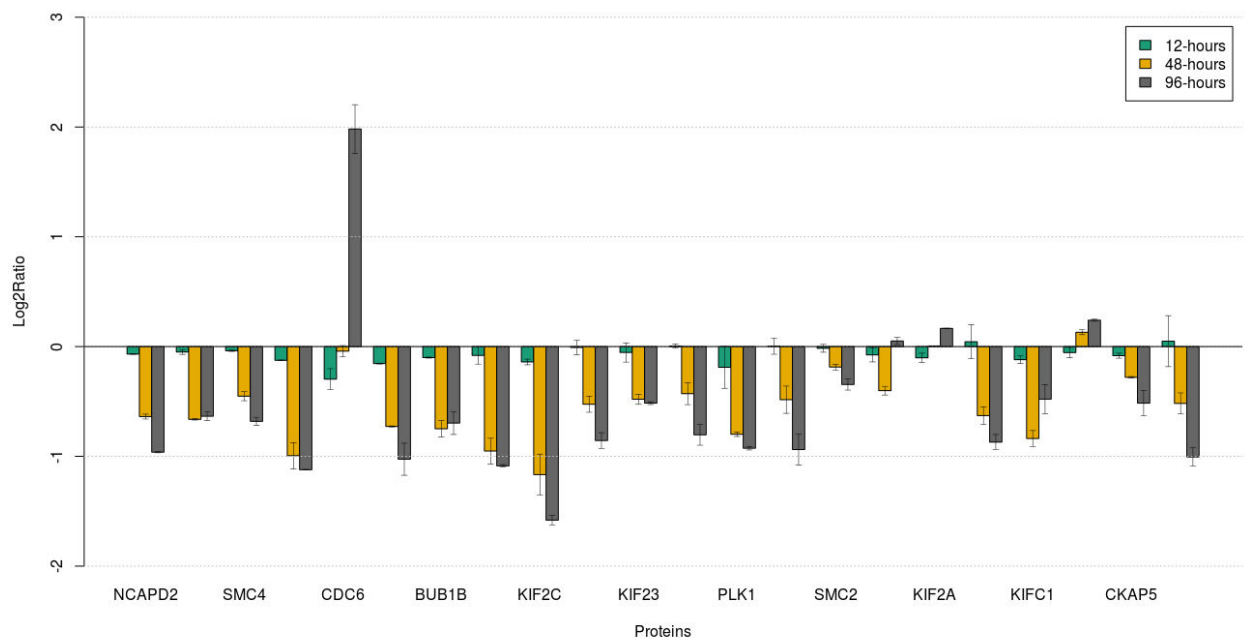


Εικόνα Γ1.

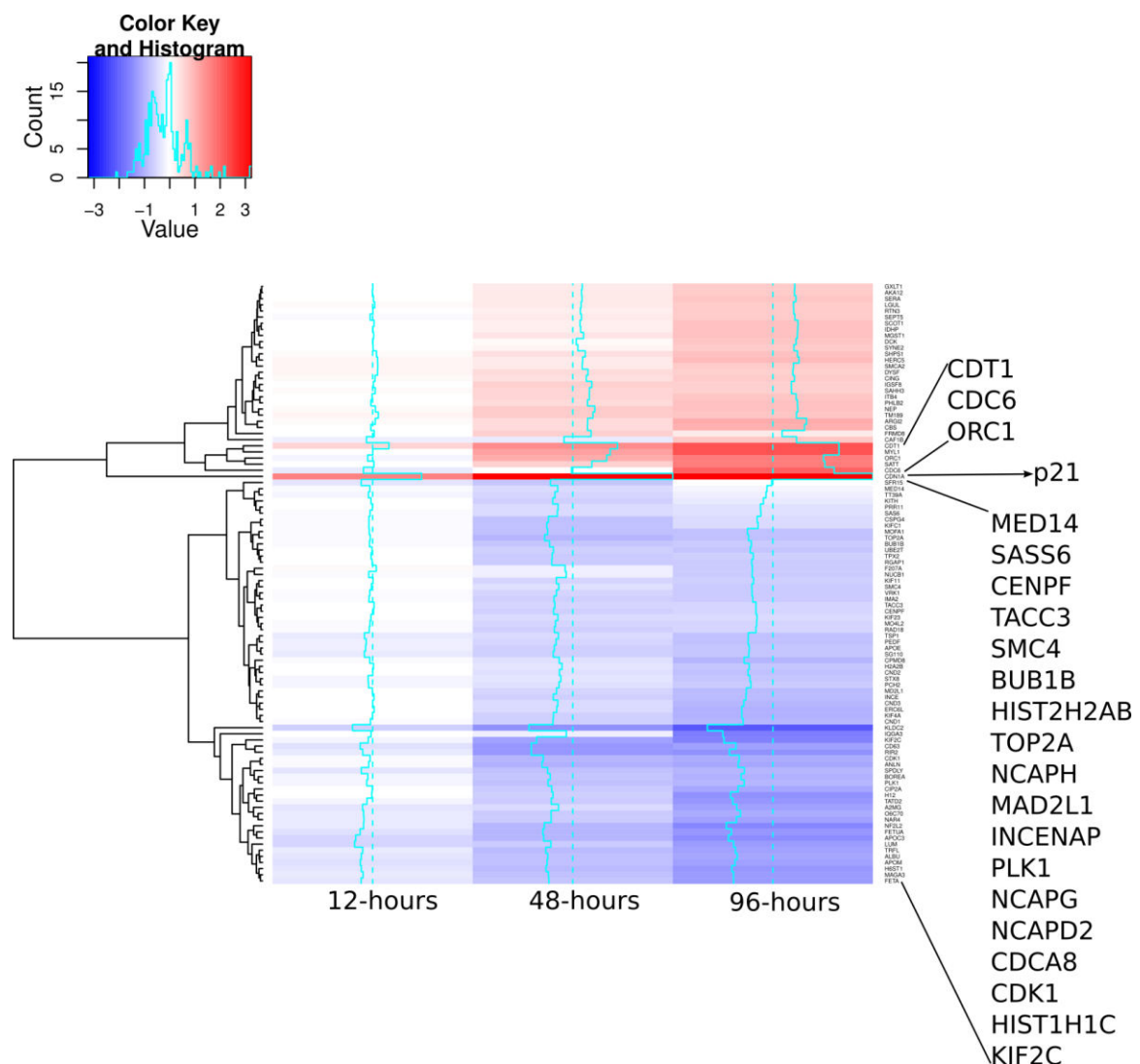
Διάγραμμα Γ2.



Διάγραμμα Γ3.



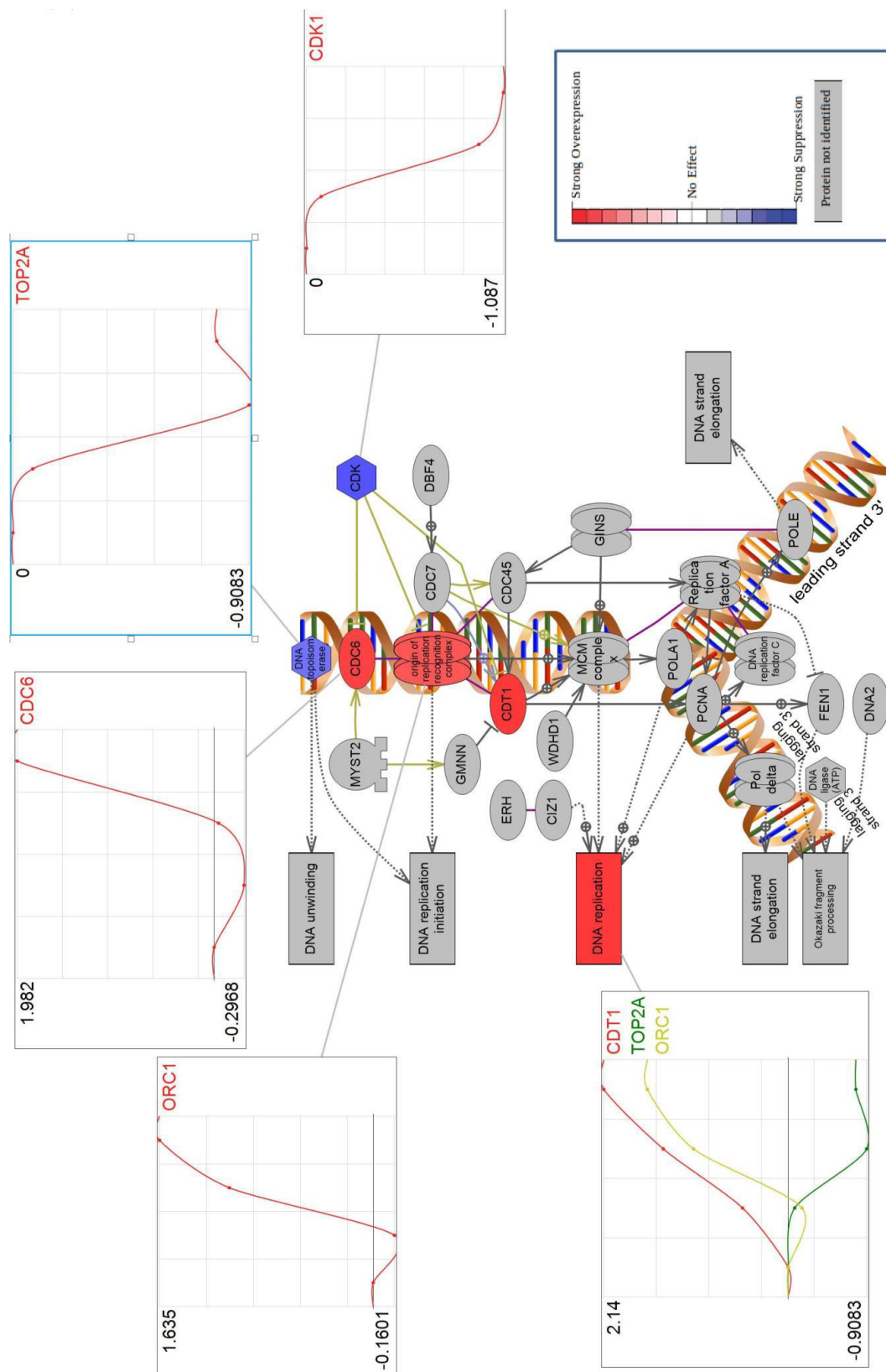
Η κατηγορία των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς η ανάλυση ιεράρχησης (clustering analysis) και ο «θερμικός χάρτης» (“heat map”, **Εικόνα Γ3**) έδειξαν ότι τρεις από τις κυριότερες πρωτεΐνες αυτής της κατηγορίας (CDT1, CDC6 και ORC1) σχηματίζουν ένα συγκεκριμένο group μορίων που υφίστανται θετική ρύθμιση από την p21. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα επίπεδα της CDT1 αυξάνονται μόλις 12 ώρες μετά την επαγωγή της p21. Επιπλέον, η υπερέκφραση των παραγόντων αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA (DNA replication licensing factors, RLFs) είναι ενδιαφέρον εύρημα γιατί έχει συνδεθεί με την επανα-αντιγραφή (re-replication) και την πυροδότηση της γενετικής αστάθειας.



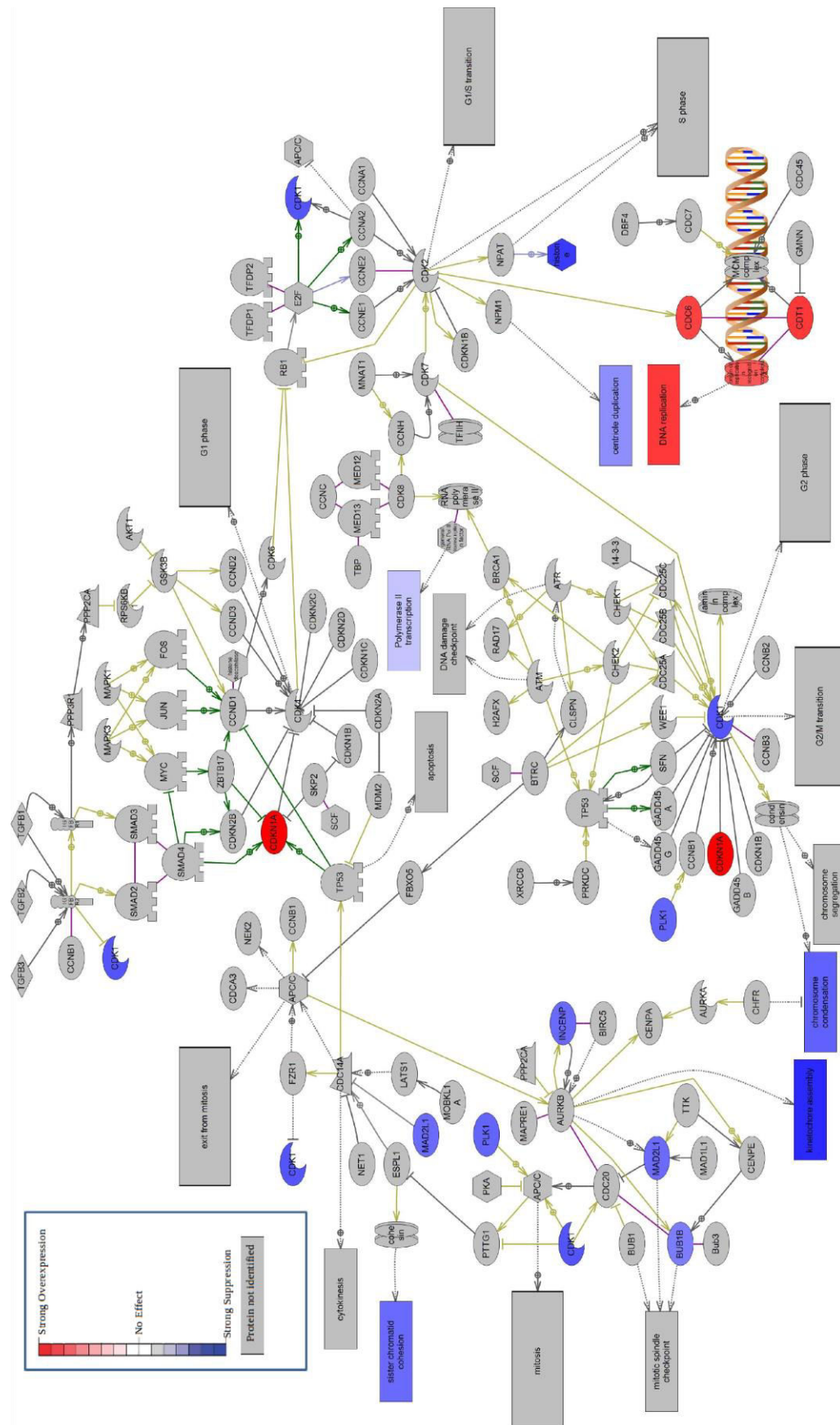
Εικόνα Γ3.

Στην **Εικόνα Γ4** αναπαρίσταται η χαρακτηριστική διχάλα της αντιγραφής του DNA. Επάνω σε αυτήν την διχάλα εντοπίζονται οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην μηχανή της αντιγραφής του DNA που όπως έδειξε η ανάλυση GO-BP μαζί με τον «κυτταρικό κύκλο» και την «μίτωση» αποτελούν τις κυτταρικές εκείνες διεργασίες που επηρεάζονται περισσότερο από την επαγωγή της p21. Συγκεκριμένα, στο σχήμα της **Εικόνας 4** εντοπίζονται όλες οι πρωτεΐνες των οποίων η έκφραση επηρεάζεται έως και τις 96 ώρες μετά την επαγωγή είτε θετικά (κόκκινο) είτε αρνητικά (μπλε), δηλ. τις ORC1, CDT1, CDC6 και TOP2A και CDK1, αντίστοιχα. Επίσης, στο σχήμα αναπαρίσταται η καμπύλης της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ($\log_2\text{ratio}$) αυτών βάσει των τριών χρονικών σημείων. Με γκρι χρώμα αναπαρίστανται πρωτεΐνες και κυτταρικές διεργασίες που είναι p21-ανεξάρτητες σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πρωτεομικής.

Ανάλυση Pathway enrichment αποκάλυψε ότι το περισσότερο επηρεαζόμενο σηματοδοτικό μονοπάτι είναι ο κυτταρικός κύκλος ($p\text{-value}=4.4\text{E-}18$). Οι αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών αυτών που σχετίζονται με την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου αναπαρίστανται στην **Εικόνα Γ5**. Οι πρωτεΐνες των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται θετικά από την επαγωγή της p21 είναι σημασμένες με κόκκινο ενώ εκείνες των οποίων τα επίπεδα μειώνονται με μπλε. Με γκρι χρώμα είναι σημασμένες οι πρωτεΐνες και οι κυτταρικές διεργασίες που δεν επηρεάζονται σημαντικά από την p21. Όπως φαίνεται, οι εν λόγω πρωτεΐνες συμμετέχουν σε σηματοδοτικά δίκτυα που αφορούν τόσο την αντιγραφή του DNA (DNA replication) όσο και διάφορες διεργασίες που συνιστούν παραμέτρους του μιτωτικού κυτταρικού κύκλου όπως η συγκρότηση του κινητοχώρου (“kinetochore assembly”) και η μιτωτική συμπύκνωση της χρωματίνης (“chromatin condensation”).



Εικόνα Γ4.



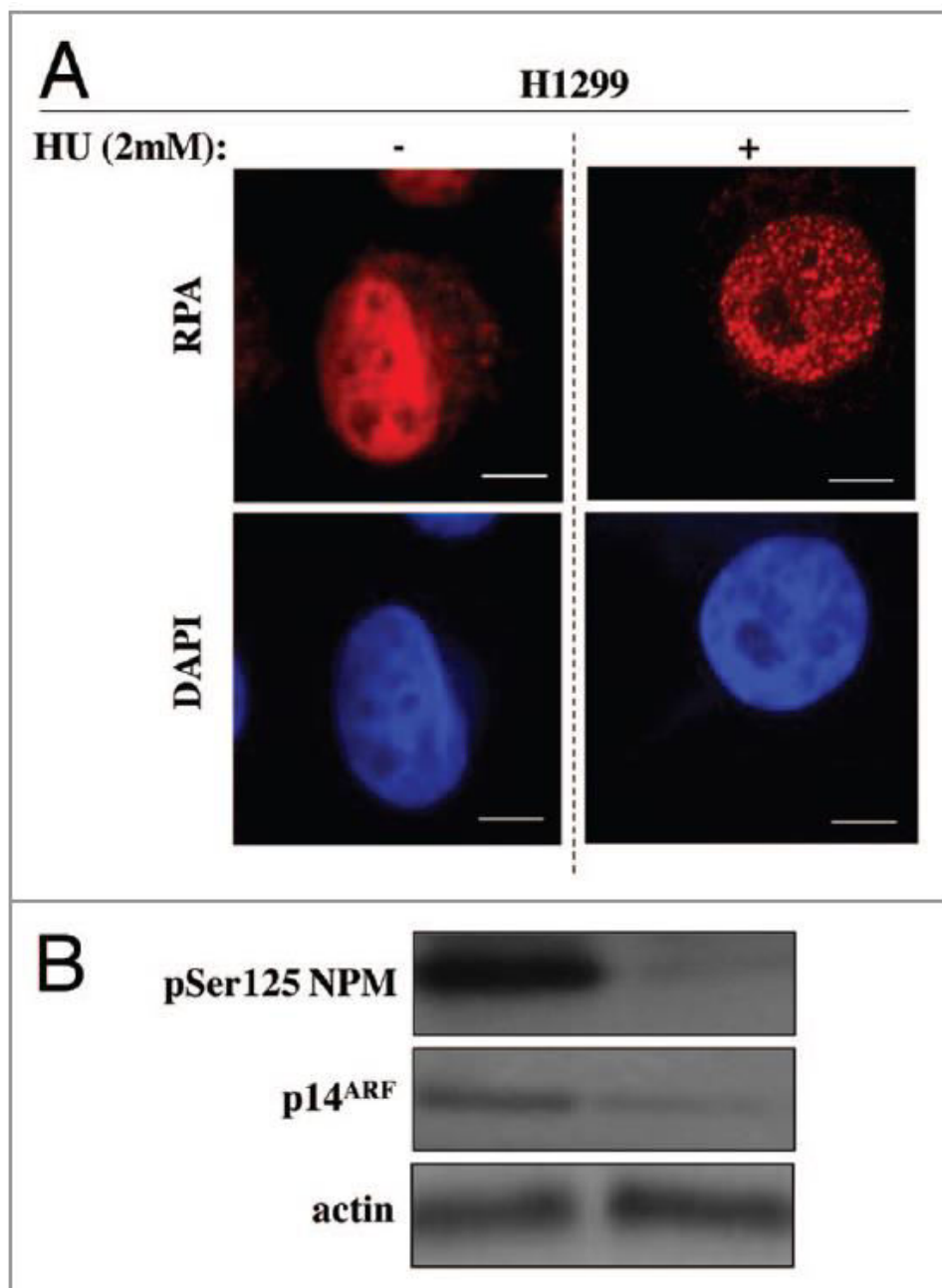
Εικόνα Γ5.

Γ.2. Αποτελέσματα για την ARF

Τα δεδομένα προηγούμενων μελετών υποστήριζαν πως υπάρχει μία σχέση μεταξύ της DDR κινάσης ATR και της ARF αλλά και του παρτενέρ της ARF, της NPM (νουκλεοφωσμίνης). Συγκεκριμένα, βρέθηκε πως παρουσία μεταλλαγμένης ATR ή της υδροξυουρίας (HU), γεγονότα που και τα δύο οδηγούν σε αντιγραφικό στρες (replication stress), η ARF όπως και η p16 INK4A επάγονται μεταγραφικά (**Monasor et al. 2013**). Σε άλλη μελέτη (**Carlos et al. 2013**), δείχθηκε πως σε ένα υπόβαθρο έλλειψης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης BRCA2 (κάτι που θεωρείται ως βιοισοδύναμο της έκτοπης έκφρασης ογκοπρωτεΐνης) η ακεραιότητα της δραστηριότητας της ATR είναι αναγκαία για την σταθεροποίηση της πρωτεΐνης ARF. Επιπλέον, ήταν γνωστό πως η ATR φωσφορυλίωσε την NPM στο κατάλοιπο της Ser 125 (**Maiguel et al. 2004; Nalabothula et al. 2010**).

Λαμβάνοντας αυτά υπ' όψιν, κρίθηκε ενδιαφέρον να διερευνηθεί εάν η ενεργοποίηση της ATR ύστερα από επίδραση HU επηρεάζει τα επίπεδα της Ser 125-φωσφοNPM και αν αυτό έχει συνέπεια με τη σειρά του στα επίπεδα της ARF. Για τον λόγο αυτό, τα κύτταρα NSCLC (μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα) H1299 που δεν εκφράζουν ενεργή p53 εκτέθηκαν σε 2 mM HU. Η ταυτοποίηση μέσω ανοσοφθορισμού της ανακατανομής της RPA (replication protein A) στον πυρήνα και ο σχηματισμός foci (κάτι που υποδηλώνει την ύπαρξη μονόκλωνου DNA και αντιγραφικού stress), χρησιμοποιήθηκε σαν δείκτης της ενεργοποίησης της ATR (**Εικόνα Γ6.A**).

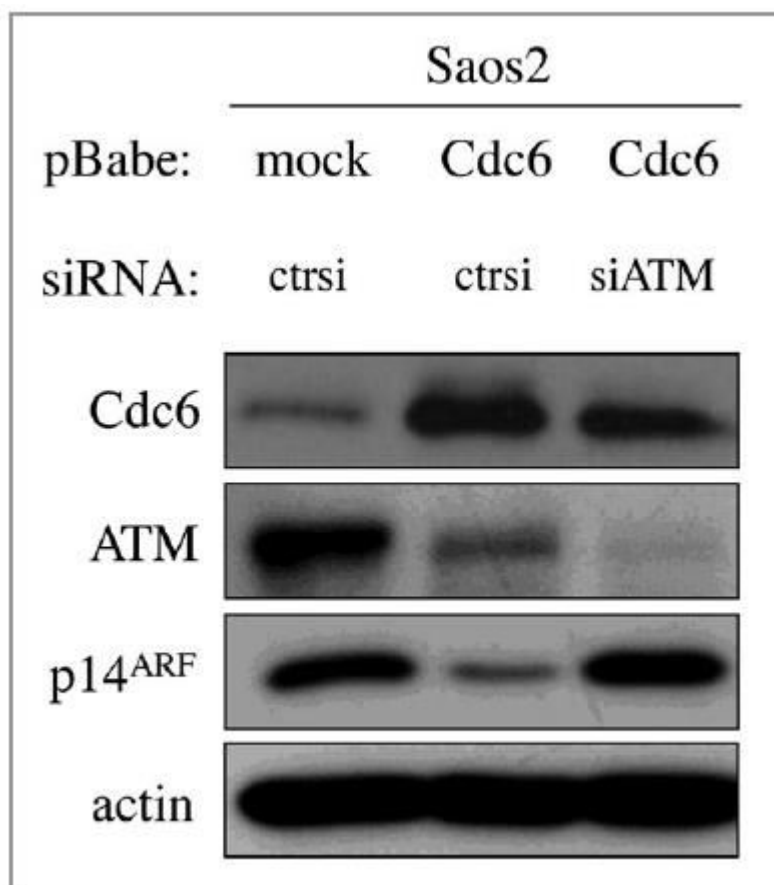
Είναι ενδιαφέρον πως τα αποτελέσματα ανάλυσης western blot έδειξαν ότι όταν η ATR είναι ενεργός τότε τα επίπεδα Ser 125-φωσφοNPM μειώνονται και αυτό συμβαδίζει με την μείωση των επιπέδων της ARF (**Εικόνα Γ6.B**). Από την μια αυτό για άλλη μια φορά υποδηλώνει τον σταθεροποιητικό χαρακτήρα της αλληλεπίδρασης της φωσφοNPM με την ARF για την τελευταία. Από την άλλη υποδεικνύει την ύπαρξη ενός ATR-εξαρτώμενου μονοπατιού που πιθανόν να μεσολαβείται από μία φωσφατάση σε αντιστοιχία με το προαναφερθέν (**Velimezi et al. 2013**) μονοπάτι όπου η ATR-σχετιζόμενη πρωτεΐνη ATM μέσω της φωσφατάσης PP1 ανταγωνίζεται την φωσφορυλίωση της NPM και την σταθερότητα της ARF που συμπλοκοποιείται με την φωσφοNPM, προστατευόμενη έτσι από αποικοδόμηση.



Εικόνα Γ6.

Ήταν γνωστό πως η Cdc6 πρωτεΐνη μέσω ενός ρυθμιστικού *cis* στοιχείου, του RD(INK4/ARF) προάγει την ετεροχρωματινοποίηση του γενετικού τόπου INK4/ARF, παρεμποδίζοντας έτσι την μεταγραφή της ARF αλλά και των p16INK4A και p15 INK4B (Gonzalez et al. 2006). Ωστόσο, σύμφωνα με το μοντέλο που είχε προταθεί (Halazonetis et al. 2008) η Cdc6 όταν εκφραστεί έκτοπα προκαλεί αντιγραφικό στρες και δικλωνικές θραύσεις που οδηγούν στην ενεργοποίηση του μονοπατιού της DDR και της ATM.

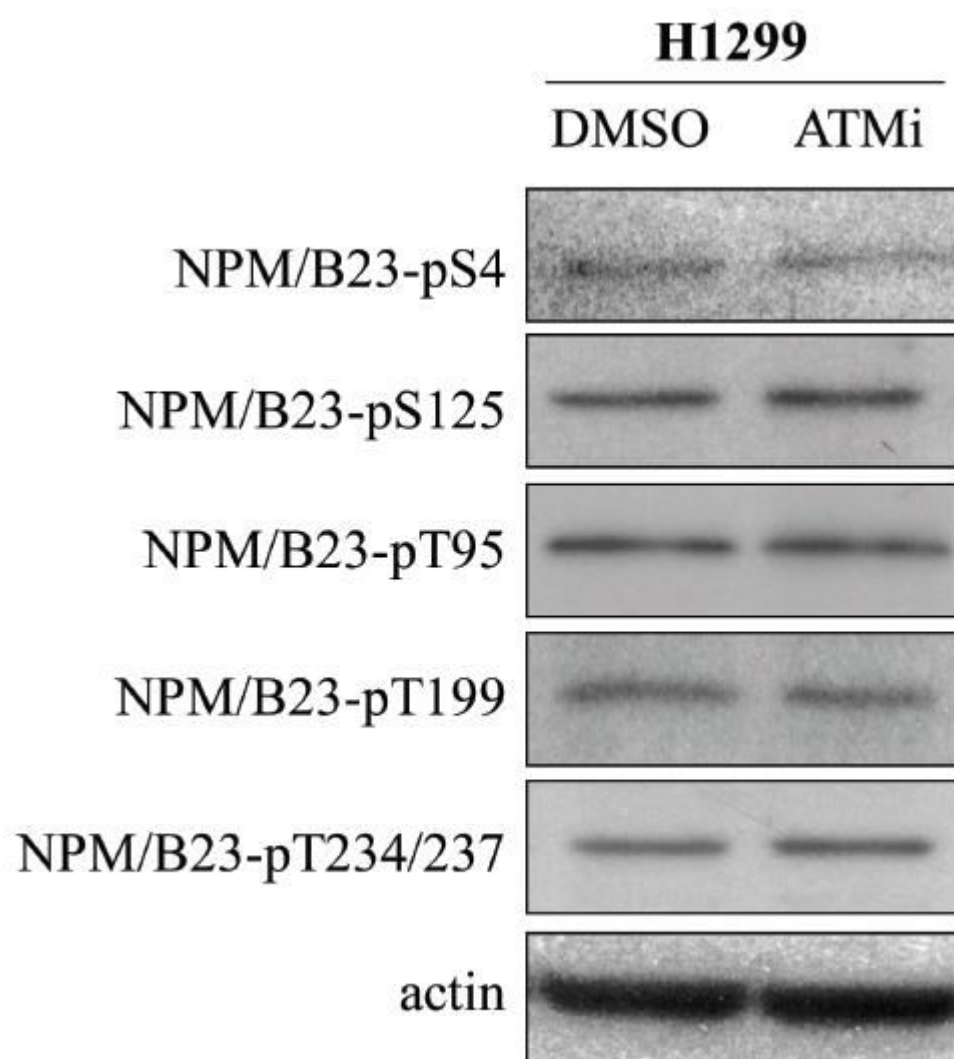
Καθώς η ATM ανταγωνίζεται την ARF (Velimezi et al. 2013), ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί ποιο από τα δύο προαναφερθέντα μονοπάτια δηλ. α. εκείνο της Cdc6/RD(INK4/ARF) ή β. εκείνο που μεσολαβείται από την ATM έχει μεγαλύτερο αντίκτυπο στην ρύθμιση της ARF. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε ανάλυση western blot για την ARF σε κύτταρα οστεοσαρκώματος Saos2 που δεν εκφράζουν την p53 σε συνθήκες υπερέκφρασης της Cdc6 παρουσία (control si, ctrsi) ή απουσία της ATM (siATM). Όπως διαπιστώθηκε, η Cdc6 επιφέρει μεν καταστολή στην έκφραση της ARF η οποία όμως αποκαθίσταται σχεδόν εντελώς όταν αποσιωπάται η ATM με την τεχνολογία του small interference RNA (Εικόνα Γ7). Αυτό υποδηλώνει την λειτουργική βαρύτητα του μονοπατιού DDR και της αλληλεπίδρασης της ATM με την ARF για την ρύθμιση των επιπέδων της τελευταίας.



Εικόνα Γ7.

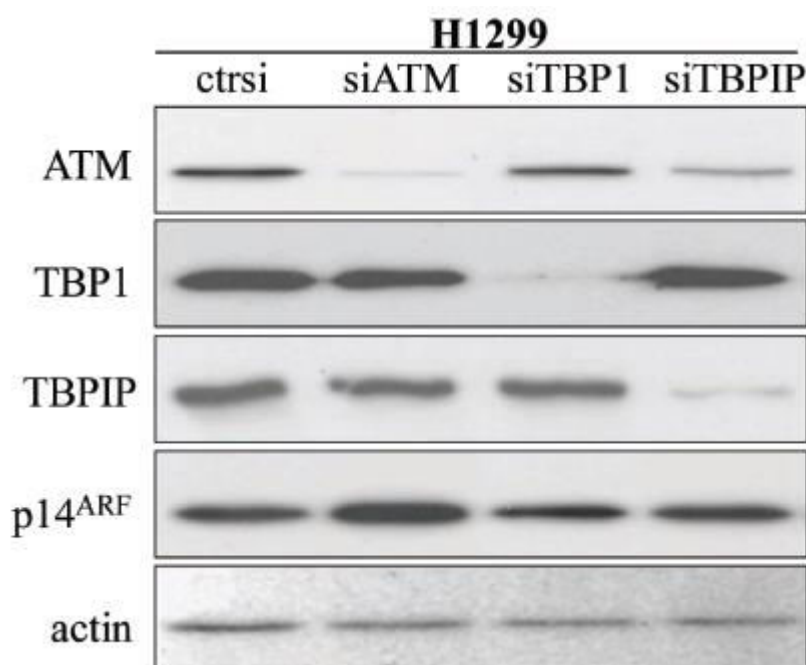
Προηγούμενη φωσφοπρωτεωμική ανάλυση είχε δείξει ότι απουσία της ATM τα κατάλοιπα Ser 70 και Ser 88 της NPM είναι φωσφορυλιωμένα. Αντίθετα όταν επιπρόσθετα απουσιάζει η δραστικότητα της κινάσης Nek2 η όταν η ATM είναι ακέραιη και ενεργοποιείται με το χημειοθεραπευτικό δοξορουμπισίνη, τότε δεν παρατηρείται φωσφορυλίωση στην Ser 70 της NPM (Velimezi et al. 2013).

Αυτά τα δεδομένα συνηγορούν υπέρ της ύπαρξης ενός μονοπατιού όπου η ATM ανταγωνίζεται ένα μονοπάτι όπου η Nek2 φωσφορυλιώνει την NPM στα κατάλοιπα Ser 70 και Ser 88. Όταν λοιπόν η ATM αποσιωπάται (ή αναστέλλεται) τότε τα επίπεδα Ser 70-φωσφοNPM και Ser 88-φωσφοNPM αυξάνονται. Με σκοπό να διαπιστωθεί εάν η αποσιώπηση της ATM επηρεάζει την φωσφορυλίωση της NPM και σε άλλα κατάλοιπα Ser και Thr που αποτελούν γνωστές θέσεις στόχευσης της NPM από κινάσες συμπεριλαμβανομένων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs), πραγματοποιήθηκε ένα σετ western blots στα κατάλοιπα Ser 4, Ser 125 (στόχος της ATR), Thr 95, Thr 199, Thr 234 και Thr 237 στα κύτταρα H1299 κάτω από συνθήκες αποσιώπησης της ATM (ATMi) ή όταν τα κύτταρα απλώς εκτέθηκαν στον διαλύτη DMSO του αντιδραστηρίου αποσιώπησης. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα Γ8**, οι θέσεις αυτές παραμένουν ανεπηρέαστες από την αποσιώπηση της ATM. Αυτό επιβεβαιώνει ότι *α.* η αλληλεπίδραση μεταξύ της ATM και της ARF αφορά τα επίπεδα φωσφορυλίωσης μόνο στις θέσεις Ser 70 και Ser 88 και ότι *β.* η θέση Ser 125 επηρεάζεται μόνο από ένα ATR-εξαρτώμενο μονοπάτι που μένει να διαλευκανθεί και όχι από την ATM.



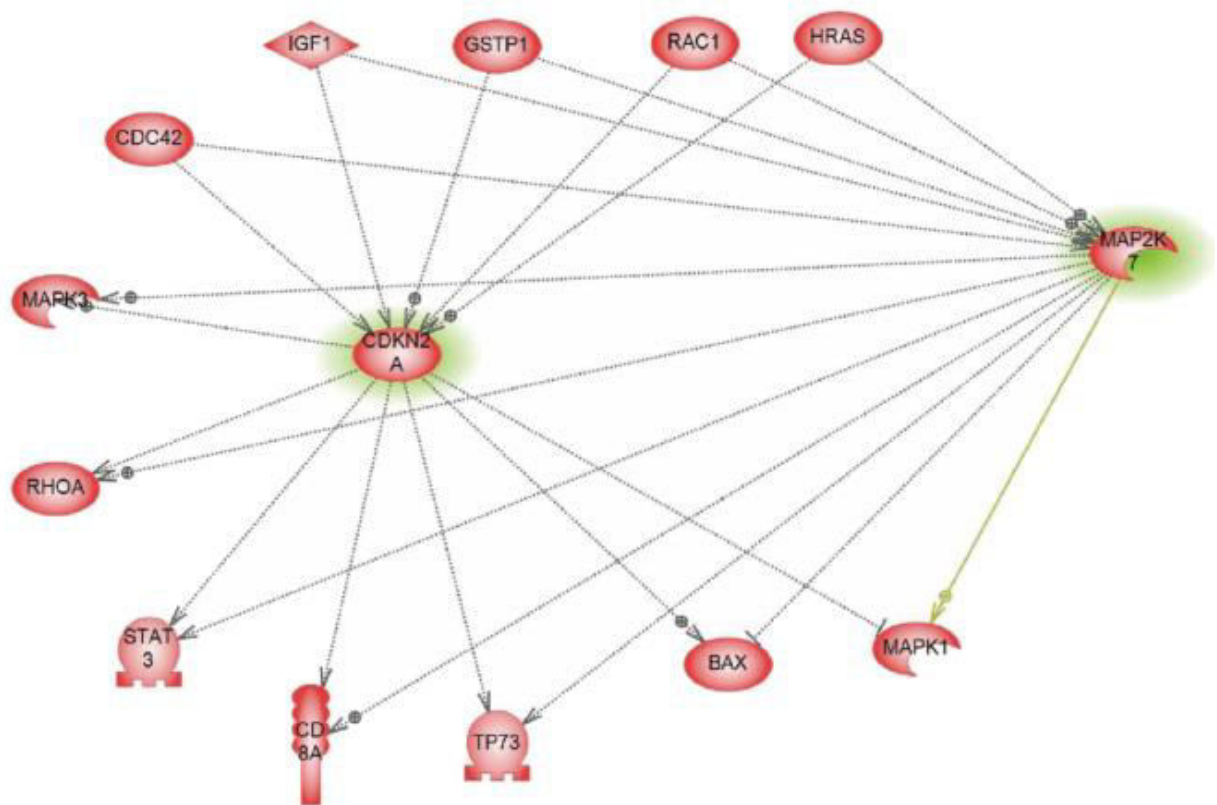
Εικόνα Γ8.

Μία μεγάλης κλίμακας μελέτη των στόχων φωσφορυλίωσης της ATM κινάσης έδειξε πως η πρωτεΐνη TBP-1-IP (Tat binding protein-1 interacting protein) είναι υπόστρωμα της ATM (**Matsuoka et al. 2007**). Θα μπορούσε λοιπόν κάποιος να υποθέσει ότι μπορεί να συμμετέχει στο μονοπάτι που η ATM επηρεάζει τα επίπεδα της ARF. Σε προηγούμενη δημοσίευση σημειώθηκε πως η εξάλειψη της E3 λιγάσης ουβικουΐτινης ULF (TRIP12) έχει σαν αποτέλεσμα η ενεργοποίηση της ATM μετά από έκθεση των κυττάρων στην δοξορουμπισίνη να μην δύναται να μειώσει τα επίπεδα της ARF (**Velimezi et al. 2013**). Αυτό υποδεικνύει ότι το ATM/ARF μονοπάτι είναι ULF-εξαρτώμενο. Για να διερευνηθεί εάν το ATM/ARF μονοπάτι έχει τυχόν εξάρτηση και από την TBP-1-IP ή και την πρωτεΐνη TBP1 (Tat binding protein-1) με την οποία η TBP-1-IP αλληλεπιδρά, πραγματοποιήθηκε μία σειρά από western blots χωρίς (ctrlsi) και με αποσιώπηση των πρωτεϊνών αυτών (siTBPIP και siTBP1). Όπως διακρίνεται στην **Εικόνα Γ9**, ενώ η αποσιώπηση της ATM (siATM) επέφερε αύξηση στα επίπεδα της ARF, κάτι τέτοιο δεν συνέβη και με την αποσιώπηση των TBP-1-IP και TBP1. Επομένως το ATM/ARF μονοπάτι είναι TBP-1-IP- και TBP1-ανεξάρτητο.



Εικόνα Γ9.

Σύμφωνα με τα ευρήματα προηγούμενης έρευνας (Schramek et al. 2011) η MKK7 είναι μία κινάση που είναι κρίσιμη για την μεταγωγή σήματος από τα ογκογόνα ερεθίσματα έως την p53 ώστε να επιτευχθεί η σταθεροποίησή της. Στην παρούσα μελέτη, όπως έδειξε η βιοπληροφορική ανάλυση (Εικόνα Γ10) το MKK7-εξαρτώμενο μονοπάτι μπορεί να ελέγχεται και από άλλους παράγοντες εκτός από ογκοπρωτεΐνες που επιφέρουν επιπρόσθετα αποτελέσματα.



Εικόνα Γ10.

Συγκεκριμένα, μπορεί να συντελούν στη δημιουργία ελεύθερων ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) όπως η H-RAS και η Rac1 (**Dolado et al. 2007; Deshpande et al. 2000**) ή στην περίπτωση της GSTP1 (glutathione S-transferase P1) και του IGF-1 (insulin-like growth factor-1) μπορεί να προσφέρουν αντιοξειδωτική προστασία (**Savic-Radojevic et al. 2007; Hao et al. 2011; Higashi et al. 2012**). Αυτό έρχεται σε συμφωνία με το γεγονός ότι η MKK7 αποκρίνεται σε οξειδωτικούς παράγοντες (**Kim et al. 2001**) καθώς και με το γεγονός ότι η p53 δέχεται και επεξεργάζεται ερεθίσματα διαφόρων ειδών κυτταρικού στρες (**Kishi et al. 2001; Liu et al. 2008**). Κατ' αυτόν τον τρόπο η MKK7 είναι δυνατό να συμβάλλει στην σταθεροποίηση της p53 όχι μόνο ως συνιστώσα της DDR αλλά και συμμετέχοντας σε μονοπάτια που σχετίζονται με την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου. Ενισχύεται λοιπόν η άποψη ότι η p53 διαθέτει πολλά διαφορετικά «δεκανίκια» προκειμένου να σταθεροποιηθεί που δρουν είτε συμπληρωματικά με τις υπόλοιπες συνιστώσες της DDR είτε τις υποκαθιστούν όταν η καρκινογένεση πλήξει την DDR και την καταστείλει.

Ένα άλλο σημαντικό εύρημα αυτής της βιοπληροφορικής ανάλυσης είναι ότι συνηγορεί υπέρ της ύπαρξης πιθανής σηματοδοτικής σχέσης ανάμεσα στην MKK7 και την ARF, καθώς όπως φαίνεται (**Εικόνα Γ10**) υπάρχουν κοινοί ρυθμιστές και κοινοί πρωτεϊνικοί στόχοι αυτών των μορίων. Αυτό καθιστά ακόμα πιο σαφή την λειτουργική σημαντικότητα της ARF σαν «εφεδρικού» ογκοκατασταλτικού μορίου (**Velimezi et al. 2013; Evangelou et al. 2013**) αφού πιθανόν μπορεί να ενεργοποιείται μέσω MKK7-εξαρτώμενων μηχανισμών ακόμα και όταν το μονοπάτι της DDR με το οποίο αλληλεπιδρά η ARF καταρρεύσει κατά την καρκινογένεση. Στον **Πίνακα Γ4** αναγράφεται η λειτουργία των μορίων που είναι κοινοί ρυθμιστές των MKK7 και ARF και κοινοί στόχοι σύμφωνα με την βιοπληροφορική ανάλυση και το είδος της ρύθμισης (θετικής ή αρνητικής) που ασκούν.

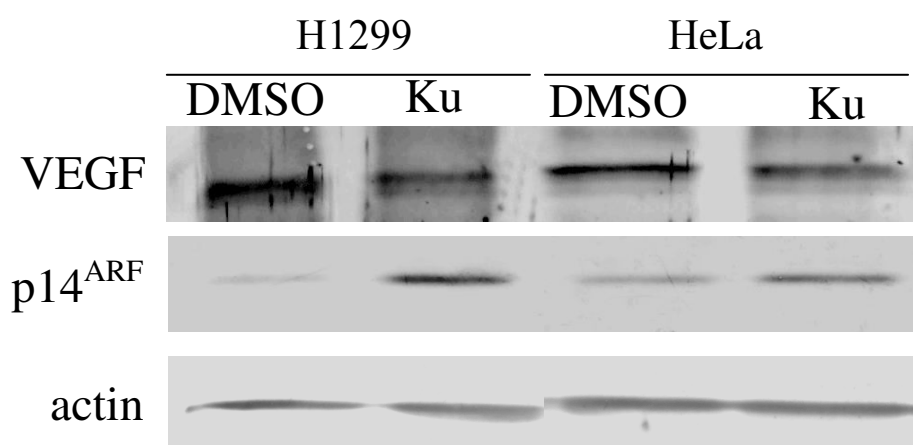
Πίνακας Γ4.

Upstream Common Regulators of ARF (CDKN2A) & MKK7 (MAP2K7)				
	Protein Name	Function	Type of Regulation	Refs.
CDC42	Cell division cycle 42	Small GTPase involved in the modulation of cytoskeletal dynamics	Positive control	(Bustelo et al. 2007; Heasman and Ridley, 2008; Stengel and Zheng, 2011)
IGF1	Insulin-like growth factor 1	Growth-promoting factor also implicated in glucose uptake	Positive control	(Frick et al. 2000; Laron, 2001)
GSTP1	Glutathione S-transferase P1	Anti-oxidant protein	Positive control	(Savic-Radojevic et al. 2007; Yucesoy et al. 2012)
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	Small GTPase involved in the modulation of cytoskeletal dynamics	Positive control	(Bustelo et al. 2007; Heasman and Ridley, 2008)
HRAS	Harvey Rat sarcoma viral oncogene homolog	Ras family member participating in oncogenetic pathways	Positive control	(Pylayeva-Gupta et al. 2011)

Downstream Common Targets of ARF (CDKN2A) & MKK7 (MAP2K7)				
MAPK3	Mitogen-activated protein kinase 3	Serine/threonine kinase mainly implicated in the control of cell proliferation	Positive control	(Zhang and Liu, 2002)
RHOA	Ras homolog family member A	Small GTPase involved in the modulation of cytoskeletal dynamics	Positive control	(Bustelo et al. 2007; Heasman and Ridley, 2008)
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3	Transcription factor mediating cytokine and growth factor signaling	Positive control	(Takeda and Akira, 2000; Gao et al. 2012)
CD8A	CD8 antigen	Involvement in T-cell responses	Positive control	(Gao and Jakobsen, 2000)
TP73	Tumor protein p73	p53 family transcription factor involved in tumor suppression and developmental pathways	Positive control	(Rosenbluth and Pietenpol, 2008)
BAX	BCL2-associated X	Proapoptotic protein	Positive control by ARF	(Lalier et al. 2007)

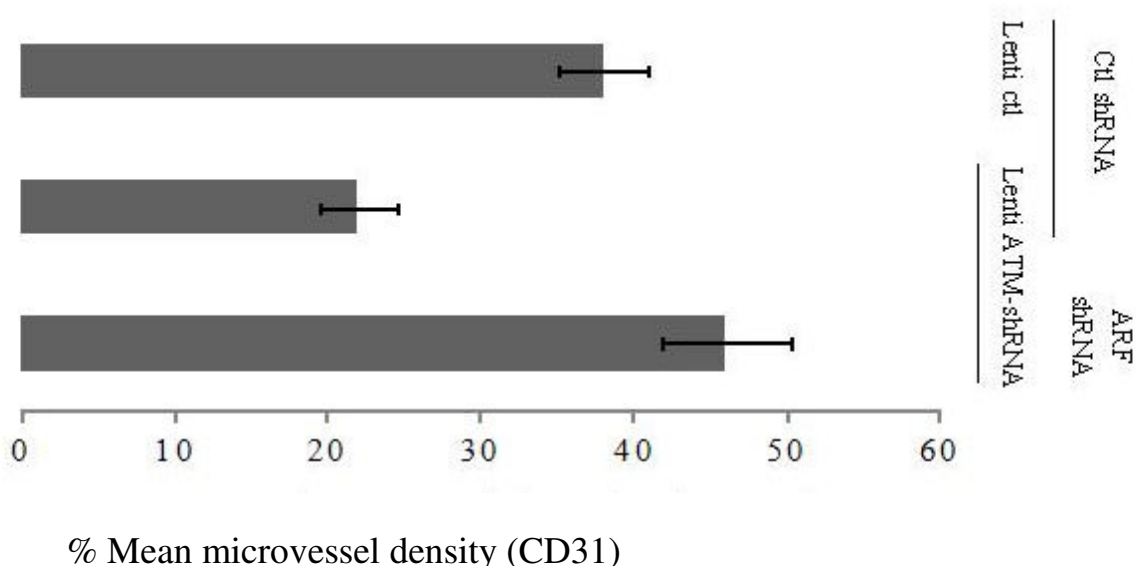
	protein		(CDKN2A) & negative control by MAP2K (MKK7)	
MAPK1	Mitogen- activated protein kinase 1	Serine/threonine kinase mainly implicated in the control of cell proliferation	Negative control by ARF (CDKN2A) & stimulatory post- transcriptional regulation by MAP2K (MKK7)	(Zhang and Liu, 2002)

Βασιζόμενοι σε πρόσφατα δεδομένα που έδειχναν ότι η ATM ελέγχει τα επίπεδα της ARF (Velimezi et al. 2013), και ότι η ARF διαθέτει αντι-αγγειογενετική δράση (Kawagishi et al. 2010; Ulanet and Hanahan, 2010) θεωρήθηκε ενδιαφέρον να διερευνηθεί εάν το ATM/ARF μονοπάτι επιδρά στον VEGF που ως γνωστό παίζει κεντρικό ρόλο στην αγγειογένεση (Crinò and Metro, 2014). Για τον σκοπό αυτό τα H1299 και τα HeLa κύτταρα που δεν εκφράζουν λειτουργική p53 εκτέθηκαν στον ATM αναστολέα Ku55933 προκειμένου να σταθεροποιηθεί η ARF. Παρατηρήθηκε ότι υπάρχει μία αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών ARF και VEGF (Εικόνα Γ11). Επομένως η αυξορρύθμιση της ARF μέσω της αναστολής της ATM μπορεί πιθανόν να χρησιμεύσει ως νέα αντι-αγγειογενετική μέθοδος ακόμα και στους όγκους εκείνους στους οποίους απουσιάζει λειτουργική p53.



Εικόνα Γ11.

Σε ένα επόμενο βήμα, διερευνήθηκε εάν η επαγωγή της ARF σε απόκριση στην καταστολή της ATM διαθέτει αντι-αγγειογενετική δράση *in vivo*. Προκειμένου να γίνει αυτό, τα κύτταρα H1299 χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία ξενομοσχευμάτων σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια. Τομές από τους όγκους που σχηματίστηκαν υποβλήθηκαν σε ανοσοϊστοχημεία με ένα αντίσωμα ειδικό για τον ενδοθηλιακό δείκτη CD31 ώστε να αξιολογηθεί η μικροαγγειακή πυκνότητα (microvessel density, MVD). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα Γ12**, η MVD μειώνεται αισθητά (> 2 φορές) στους όγκους στους οποίους ενέθηκε ένας λεντι-ϊικός φορέας shRNA (short-hairpin) σχεδιασμένου για την αποσιώπηση της ATM (ctl-shRNA/Lenti-shATM), ένας χειρισμός που ρυθμίζει θετικά τα επίπεδα της ARF. Η παρατηρηθείσα μείωση στην MVD είναι ένα ARF-εξαρτώμενο φαινόμενο αφού η MVD στα ξενομοσχεύματα που έγινε αποσιώπηση της ARF (H1299-shARF) εκτός από αποσιώπηση της ATM (shARF/Lenti-shATM) βρέθηκε να είναι περίπου η ίδια με τους ARF-θετικούς όγκους στους οποίους η δραστηριότητα της ATM ήταν ακέραιη (ctl-shRNA/Lenti-ctl). Επομένως, η σταθεροποίηση της ARF απουσία της ATM καταστέλλει την αγγειογένεση και *in vivo*, συνηγορώντας υπέρ της άποψης ότι ο p53-ανεξάρτητος ATM/ARF άξονας είναι δυνατόν να αξιοποιηθεί θεραπευτικά.



Εικόνα Γ12.

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δ.1. Συζήτηση επί των αποτελεσμάτων σχετικά με την p21 Waf1/CIP1

Δ.1.1. Η εμπλοκή της p21 Waf1/CIP1 σε μεταβολικά μονοπάτια

Υπάρχουν αρκετά πειραματικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων και τα μονοπάτια που ρυθμίζουν το μεταβολισμό αλληλοσυνδέονται. Για παράδειγμα, η βιοσύνθεση των λιπιδίων πιστεύεται πως πυροδοτεί μία κυτταροστατική απόκριση η οποία προφανώς αποσκοπεί στο να ενισχύσει την παραγωγή των λιπιδίων μέσω της παύσης στην φάση G1 και την πιθανή μη φυσιολογική κυτταρική διαίρεση, καθώς η λιπιδιακή υπερφόρτωση είναι ένα είδος κυτταρικού stress.

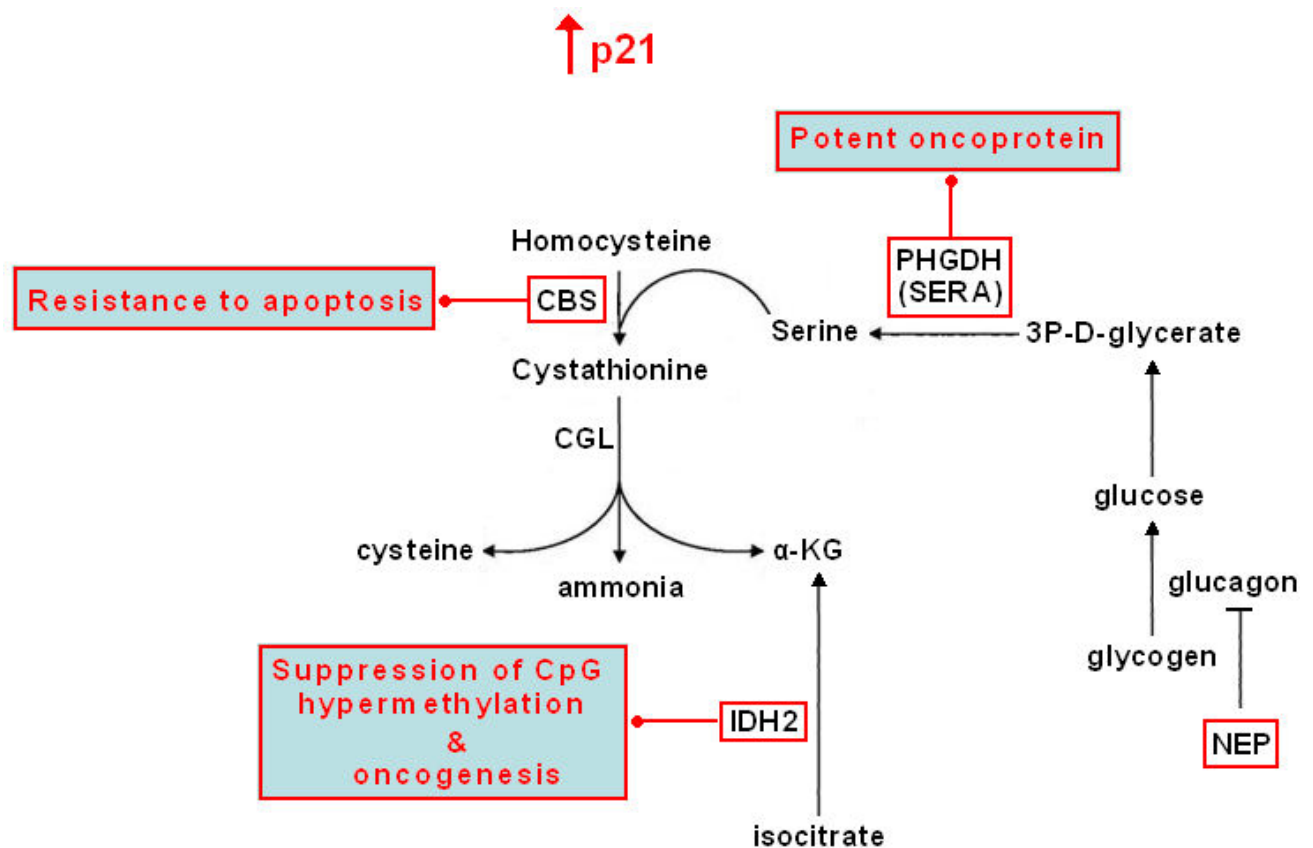
Ο μεταγραφικός παράγοντας των βιοσύνθεσης των λιπιδίων SREBP-1a (Sterol regulatory-binding protein 1a) του οποίου η έκφραση ρυθμίζεται θετικά στα κύτταρα που αυξάνονται ή σε λιπογενετικούς ιστούς ύστερα από στέρηση στερολών (διαιτητικά ή κατόπιν χορήγησης στατινών), έχει βρεθεί πως ενεργοποιεί τον υποκινητή του γονιδίου της p21, μέσω πρόσδεσης σε ένα στοιχείο SRE (Sterol responsive element) που βρίσκεται -98 to -90 bp σε σχέση με το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Αξίζει να σημειωθεί πως ο SREBP-1a μπορεί να ενεργοποιεί τον υποκινητή του *CDKN1A* ανεξάρτητα από την p53, και επιπλέον μπορεί να διεγείρει την γονιδιακή μεταγραφή πολύ πιο ισχυρά απ' ό τι η p53 όπως δείχνουν οι δοκιμασίες λουσιφεράσης. Χαρακτηριστικά, στα Saos-2 που δεν εκφράζουν την p53, η SREBP1a-μεσολαβούμενη συσσώρευση της p21 protein συμβαίνει σε πολύ μεγαλύτερη έκταση απ' ό τι στα κύτταρα HEK293 που εκφράζουν την p53 (**Inoue et al. 2005**). Αυτά τα πειράματα έριξαν φως σε μια ανεξιχνίαστη, p53-ανεξάρτητη δράση της p21 στην ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού εκτός της καλά τεκμηριωμένης δράσης της στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Στην πραγματικότητα, όπως έδειξαν τα δεδομένα μας, η p21 εκτός από κρίσιμος ρυθμιστής του πρωτεώματος διαθέτει και ρυθμιστική δράση στην μεταβολομική.

Επιπλέον, πρέπει κάποιος να έχει υπ' όψιν πως όλα τα μεταβολικά μονοπάτια είναι αλληλοσυνδεόμενα με την έννοια ότι μπορεί να χρησιμοποιούν/παράγουν κοινούς ενδιάμεσους μεταβολίτες και ότι η εκροή του ενός μονοπατιού επηρεάζει και τα υπόλοιπα μονοπάτια, ως ένα δίκτυο καλά ρυθμισμένο ώστε να αντεπεξέρχεται στις κυτταρικές ανάγκες. Το φουμαρικό οξύ π.χ. αποτελεί τον συνδετικό κρίκο του κύκλου της ουρίας με τον κύκλο του Krebs. Ακόμα, υπάρχει ως γνωστό μία αυστηρά ελεγχόμενη ισορροπία μεταξύ της διαχείρισης των λιπιδίων και των υδατανθράκων που χαρακτηριστικά αντανακλάται από το ρητό «τα λίπη καίγονται στην φλόγα των υδατανθράκων». Αυτό σημαίνει ότι η εξάλειψη των υδατανθράκων πυροδοτεί την ατελή καύση των λιπιδίων, συμβάλλοντας στο σχηματισμό κετονοσωμάτων) (**Berg et al. 2002, Biochemistry 5th edition**).

Κατά την πρωτεωμική ανάλυση που ακολουθήθηκε από βιοπληροφορική επεξεργασία των δεδομένων (GO BP Enrichment και απεικόνιση «tag cloud» διαπιστώθηκε πως η ομάδα των μορίων που ρυθμίζεται περισσότερο θετικά από την p21 είναι εκείνων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό (π.χ. MME, IDH2, CBS, MGST1 και PHGDH). Συγκεκριμένα, βρέθηκε πως η p21 αυξάνει τα επίπεδα μορίων όπως η εγκεφαλινάση (Membrane Metallo-Endopeptidase, MME, NEP ή enkephalinase). Το πρωτεολυτικό αυτό ένζυμο ευθύνεται για την απενεργοποίηση πολλών πεπτιδικών ορμονών συμπεριλαμβανομένης της γλυκαγόνης που ως γνωστό, εκκρινόμενη από το πάγκρεας δρα στον αντίποδα της ινσουλίνης αυξάνοντας τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Επιπλέον, βρέθηκε πως μετά την επαγωγή της p21 αυξάνονται τα επίπεδα της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (IDH2) που καταλύει την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του ισοκιτρικού σε α -κετογλουταρικό (α -KG ή 2-οξογλουταρικό) στα μιτοχόνδρια κατά τον κύκλο του Krebs. Το εύρημα αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό και ίσως σχετίζεται με την ογκοκατασταλτική πτυχή της δράσης της p21: η IDH2 βρίσκεται συχνά μεταλλαγμένη σε ένα μεγάλο σετ όγκων (ΑΜΛ, γλοίωμα κτλ.) τόσο συμπαγών όσο και αιματολογικών. Η μεταλλαγμένη της μορφή πολλές φορές σχετίζεται με αλλαγή της ενζυμικής της δραστηριότητας κατά έναν τέτοιο τρόπο που αντί για α -KG παράγει 2-υδροξυγλουταρικό (2-HG)· έναν γνωστό «ογκομεταβολίτη» (**Ward and Thompson, 2012**). Ο μεταβολίτης αυτός παρεμβαίνει στον «μεταβολισμό της χρωματίνης» αφού αναστέλλει πολλές διοξυγενάσες όπως οι απομεθυλάσες ιστονών. Αυτό με την σειρά του μπορεί να οδηγήσει σε υπερμεθυλίωση του DNA σε CpG νησίδες σε διάφορους γενετικούς τόπους και να

προωθήσει την ογκογένεση με διάφορους μηχανισμούς όπως η παρεμπόδιση της κυτταρικής διαφοροποίησης (Yang et al. 2012). Το γεγονός επομένως ότι η p21 επηρεάζει θετικά την έκφραση της IDH2, ίσως σχετίζεται λειτουργικά με τον ρόλο της p21 στην προώθηση της κυτταρικής διαφοροποίησης ή και ακόμα με τον αντι-ογκογενετικό της ρόλο. Είναι επίσης αξιοσημείωτο πως η p21 κατά την όψιμη απόκριση στην έκτοπη έκφρασή της αυξάνει τα επίπεδα της δεϋδρογενάσης του φωσφογλυκερινικού (PHGDH ή SERA)· ενός ενζύμου που λαμβάνει μέρος στην *de novo* σύνθεση της L-σερίνης και έχει χαρακτηριστεί ως πιθανό ογκογονίδιο βάσει μελετών που γίνανε στο μελάνωμα (Mullarky et al. 2011).

Ας αναφερθεί πως η p21 βρέθηκε ακόμα να εκφράζει θετικά την έκφραση πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε αποτοξινωτικές αντιδράσεις όπως η μικροσωμική γλουταθειονυλο-S-τρανσφεράση (MGST1) κάποιοι πολυμορφισμοί του γονιδίου της οποίας έχουν συσχετισθεί σε ρίσκο για εμφάνιση καρκίνου του παχέος σε συγκεκριμένους πληθυσμούς της Ασίας (Zhang et al. 2007a), καθώς και μορίων που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση της ομοκυστεΐνης (cystathionine-beta-synthase, CBS) ενός ενδιάμεσου στο μεταβολισμό της μεθειονίνης. Η έλλειψη της CBS προκαλεί ομοκυστεϊνουρία ενώ αντίθετα, η CBS-παραγόμενη κυσταθειονίνη έχει βρεθεί πως προστατεύει από την απόπτωση, την νέκρωση αλλά και την στεάτωση που προκαλείται από ER (endoplasmic reticulum) stress κατόπιν επίδρασης με τιουνικαμυκίνη (Maclean et al. 2012). Θα μπορούσε λοιπόν κάποιος να υποθέσει πως η παρατηρούμενη p21-μεσολαβούμενη επαγωγή της CBS αποτελεί ένα μηχανισμό με τον οποίο η p21 ως ογκογενετική πρωτεΐνη προκαλεί αντίσταση στην απόπτωση. Καθώς η ομοκυστεΐνη συμπυκνώνεται με σερίνη για να παραχθεί κυσταθειονίνη από την CBS και κατόπιν η κυσταθειονίνη διασπάται σε κυστεΐνη, αμμωνία και α-KG από την CGL (γ-λυάση της κυσταθειονίνης), δημιουργείται ένα «δίκτυο» αλληλοσυσχετίσεων της p21-ξαρτώμενης αυξορρύθμισης των IDH2, PHGDH (SERA) και CBS, όπως φαίνεται στην **Εικόνα Δ1**.



Εικόνα Δ1. Αλληλοσυνδέσεις μεταβολικών μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν p21-ρυθμιζόμενα ένζυμα (σημασμένα με κόκκινο) και λειτουργικές συσχετίσεις.

Η p21 βρέθηκε επίσης να καταστέλλει την έκφραση της υπομονάδας 14 του συμπλόκου «Mediator» ενός συμπλόκου που γεφυρώνει τους γενικούς με τους ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες και είναι απαραίτητο για την μεταγραφή από σχεδόν όλους τους Pol II-εξαρτώμενων υποκινητές. Δεδομένου ότι η υπομονάδα MED14 είναι απαραίτητη για την PPARγ-μεσολαβούμενη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων (Grøntved et al. 2010), επιβεβαιώνει ακόμα μία φορά τον κρίσιμο ρόλο της p21 στην ρύθμιση διαδικασιών διαφοροποίησης. Ωστόσο, δεδομένου ότι η p21 είχε βρεθεί σε προηγούμενη μελέτη να είναι αναγκαία για την διαφοροποίηση των πρόδρομων λιποκυττάρων σε λιποκύτταρα (Inoue et al. 2008), το δεδομένο αυτό υποδεικνύει ίσως την ύπαρξη ενός αντιρροπιστικού μηχανισμού. Αξιοσημείωτο είναι πως στην ίδια μελέτη (Inoue et al. 2008) βρέθηκε ότι τα p21^{-/-} ποντίκια χαρακτηρίζονται από μειωμένη μάζα λιπώδους ιστού και αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη, συνδέοντας έτσι την p21 με την παχυσαρκία και τον διαβήτη τύπου II.

Επιπλέον, η p21 βρέθηκε στην παρούσα πρωτεωμική μελέτη να καταστέλλει την έκφραση ενός σετ λιποπρωτεϊνών, των APO-E, APO-CIII και APO-M. Η APO-E ευθύνεται για την κάθαρση υπολειμμάτων χυλομικρών, η APO-CIII καταστέλλει τον καταβολισμό σωματιδίων πλουσίων σε τριακυλογλυκερόλες μέσω καταστολής της λιποπρωτεϊνικής και της ηπατικής λιπάσης, ενώ η APO-M προσδένεται με την HDL και πιστεύεται πως αντιτίθεται στην αθηρογένεση (Nielsen et al. 2009). Έτσι, η p21 φαίνεται να αποτελεί κρίσιμο ρυθμιστή του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών.

Δ.1.2. Οι επιπτώσεις της έκτοπης έκφρασης της p21 σε επιδιορθωτικούς παράγοντες

Κατά την πρωτεωμική ανάλυση βρέθηκε πως η p21 επηρεάζει αρνητικά τα επίπεδα των πρωτεϊνών RAD18 και UBE2T. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι E3 και E2 λιγάσες ουβικουΐτινης αντίστοιχα, και λειτουργικά λαμβάνουν μέρος σε επιδιορθωτικά μονοπάτια. Συγκεκριμένα, η RAD18 παίρνει μέρος στο μονοπάτι PRR (postreplication repair) που αφαιρεί λάθος ριβονουκλεοτίδια που τοποθετήθηκαν κατά λάθος στην αντιγραφή του DNA και το μονοπάτι HR του ομόλογου ανασυνδιασμού (Liu et al. 2012). Από την άλλη μεριά, η UBE2T (E2T) λαμβάνει μέρος στην μονοουβικουΐτινίωση της FANCD2 ύστερα από βλάβη του DNA στο επιδιορθωτικό μονοπάτι FA (Fanconi Anemia). Επιπλέον, έχει ενοχοποιηθεί για την πολυουβικουΐτινίωση και αποικοδόμηση της ογκοκατασταλτικής BRCA1 στα καρκινικά κύτταρα μαστού όπου και εικάζεται πως αποτελεί θεραπευτικό στόχο (Ueki et al. 2009). Τα ευρήματα αυτά δείχνουν πως η p21 πιθανόν να παίζει ευρύτερο ρόλο στην επιδιόρθωση του γενώματος, πέραν του μονοπατιού NER (Gazzalini et al. 2008) όπως περιγράφηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο. Επιπλέον, η παρατηρηθείσα p21-μεσολαβούμενη μείωση των επιπέδων της E2T ίσως να σχετίζεται με την ογκοκατασταλτική δράση της p21 αφού η αποσιώπηση του γονιδίου της E2T έχει βρεθεί πως αναχαιτίζει την αύξηση καρκινικών κυττάρων του μαστού (Ueki et al. 2009).

Δ.1.3. Η p21 επηρεάζει κινητήριες πρωτεΐνες και υπομονάδες του συμπλόκου της κοντενσίνης

Στην παρούσα πρωτεωμική ανάλυση βρέθηκε πως η p21 καταστέλλει ένα σετ πρωτεϊνών που αποτελούν κινητήριες πρωτεΐνες εξαρτώμενες από τους μικροσωληνίσκους (κινεσίνες), τις KIF4A, KIF2C, KIFC1, KIF23 και KIF11. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι κρίσιμες από λειτουργικής άποψης για την φυσιολογική οργάνωση της μιτωτικής ατράκτου.

Συγκεκριμένα, είναι γνωστό πως οι PLK1 με την KIF4 παρεμποδίζουν την επιμήκυνση της μεσαίας ζώνης της ατράκτου ή κεντρικής ατράκτου (μίας «πλατφόρμας» αντιπαράλληλων μικροσωληνίσκων όπου οργανώνεται η κυτοκίνηση) μέσω της αναστολής του πολυμερισμού του (+) άκρου των μικροσωληνίσκων (**Hu et al. 2011**). Επομένως, είναι πιθανό η p21-μεσολαβούμενη καταστολή της έκφρασης των PLK1 και KIF4 που παρατηρήθηκε εδώ να παρεμβαίνει στην φυσιολογική διαδικασία της κυτοκίνησης και να σχετίζεται με χρωμοσωμική αστάθεια (chromosomal instability, CIN) και πυροδότηση της καρκινογένεσης. Επιπλέον, και οι υπόλοιπες κινεσίνες που επηρεάζονται από την p21 είναι κρίσιμοι ρυθμιστές της δυναμικής της μιτωτικής ατράκτου. Η KIF23 καταστέλλεται από την p53, πιθανόν ως μηχανισμός αναστολής της κυτταρικής αύξησης, σε ένα μονοπάτι που μεσολαβείται από την p21 και ένα ρυθμιστικό στοιχείο CHR (Cell cycle genes Homology Region element) στον υποκινητή του γονιδίου της KIF23 (**Fischer et al. 2013**). Η εύρεση αυτού του ρυθμιστικού στοιχείου συμφωνεί με το εύρημα των Ferrándiz et al. πως τα περισσότερα γονίδια που καταστέλλονται από την p21 διαθέτουν κοντά στο σημείο έναρξης της μεταγραφής (transcription start site, TSS) το στοιχείο CHR, στο οποίο όπως πιθανολογείται προσδένονται μεταγραφικοί καταστολείς που αλληλεπιδρούν με την p21 (**Ferrándiz et al. 2012**).

Είναι αξιοσημείωτο ότι η αποσιώπηση του γονιδίου της KIF23 σε ξενομοσχεύματα γλοιωμάτων έχει ως αποτέλεσμα την συρρίκνωσή τους (**Takahashi et al. 2012**). Έτσι, ίσως η παρατηρούμενη p21-μεσολαβούμενη μείωση των επιπέδων της KIF23 να αποτελεί έναν μηχανισμό με τον οποίο η p21 δρα ογκοκατασταλτικά. Η KIFC1 από την άλλη μεριά, είναι απαραίτητη για την διπολική συγκρότηση των MTOCs (microtubule-organizing centers) και την διατήρηση της γενωμικής σταθερότητας

(Kim and Song, 2013). Εξίσου σημαντικό είναι και το εύρημα αυτής της πρωτεωμικής ανάλυσης ότι η p21 καταστέλλει την έκφραση ενός σετ SMC (SMC4) και μη-SMC συνιστωσών (CND1, CND2 και CND3) του συμπλόκου της κοντενσίνης I το οποίο είναι κρίσιμο για την συμπύκνωση της χρωματίνης κατά την μίτωση και την χρωμοσωμική οργάνωση (Hagstrom and Meyer, 2003). Ίσως και αυτό να σχετίζεται με έναν μηχανισμό με τον οποίο η p21 παρεμβαίνει στην φυσιολογική διαδικασία του διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων, πυροδοτώντας την γενωμική αστάθεια.

Δ.1.4. Η p21 ασκεί μια αντίστροφη ρύθμιση στην μηχανή αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA και την μιτωτική μηχανή

Μαζί με τον «μεταβολισμό» η GO BP ανάλυση εμπλουτισμού έδειξε πως οι πρωτεΐνες της G1-S φάσης CDC6, CDT1 & ORC1 που αποτελούν RLFs, αποτελούν μία λειτουργική ομάδα που και αυτή ρυθμίζεται θετικά από την p21. Συγκεκριμένα, η έκφραση της CDT1 ανεβαίνει ήδη από τις 12 ώρες από την επαγωγή της p21 ενώ η κορύφωση της αύξησης της CDC6 παρατηρήθηκε στις 96 ώρες. Η αυξορρύθμιση αυτών των δύο πρωτεϊνών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς προηγούμενη μελέτη της ομάδας έδειξε πως η υπερέκφραση των CDT1 και CDC6 προάγει την επανα-αντιγραφή του DNA (DNA rereplication). Αυτό με την σειρά του έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση βλαβών στο DNA, την ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης στις βλάβες του DNA (DDR) και την επακόλουθη έγερση των δύο αντικαρκινικών φραγμών της γήρανσης και της απόπτωσης (Liontos et al. 2007).

Εκτός από την παρατηρούμενη p21-επαγόμενη αυξορρύθμιση των RLFs, παρατηρήθηκε ότι ταυτόχρονα η p21 καταστέλλει την έκφραση πρωτεϊνών της μιτωτικής μηχανής. Παρόμοια δράση της p21 ως προς την κυτταρική μιτωτική μηχανή έχει παρατηρηθεί προηγουμένως και από άλλες ερευνητικές ομάδες (Ferrándiz et al. 2012) και επιβεβαιώνει για άλλη μια φορά τον κρίσιμο ρόλο της p21 ως ρυθμιστή μορίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο.

Αυτή η παρατηρηθείσα μειορρύθμιση της μιτωτικής μηχανής από την p21 πιθανόν να μην σχετίζεται λειτουργικά μόνο με την ικανότητά της να προκαλεί μιτωτική παύση

αλλά και με την πυροδότηση της γενωμικής αστάθειας. Όπως φαίνεται και στον πίνακα με τις p21-ρυθμιζόμενες πρωτεΐνες (**Πίνακας Γ1**), η p21 στις 48 ώρες καταστέλλει την έκφραση μορίων όχι μόνον κύριων μιτωτικών κινασών όπως η PLK1 αλλά και μορίων που συμμετέχουν στο σημείο ελέγχου της μιτωτικής ατράκτου ή απλώς «SAC» (spindle assembly checkpoint), δηλ. του BUB1B (BubR1) και του MAD2L1. Για την ακρίβεια, το απορρυθμισμένο SAC σχετίζεται αιτιολογικά με την γενωμική αστάθεια και την επιρρέπεια στην καρκινογένεση. Χαρακτηριστικά, η ετεροζυγωτία για την BubR1, μίας βασικής συνιστώσας του SAC, προάγει τον σχηματισμό μικροπυρήνων σε κυτταρικό επίπεδο (σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικών, MEFs) που είναι και γνώρισμα κυττάρων με γενωμική αστάθεια, ενώ σε επίπεδο οργανισμού τα ποντίκια με γενότυπο BubR1(+/-) αναπτύσσουν πιο εύκολα αδενοκαρκινώματα στον πνεύμονα και το έντερο σε απόκριση σε καρκινογόνα, συγκριτικά με τα BubR1(+/+) ποντίκια. Αυτό υποδεικνύει ότι η ενεργοποίηση του SAC είναι κρίσιμος ογκοκατασταλτικός μηχανισμός (**Dai et al. 2004**).

Τα απορρυθμισμένα επίπεδα της SAC πρωτεΐνης MAD2 έχουν και αυτά συσχετισθεί με την πρόκληση γενωμικής αστάθειας η οποία και αποτρέπεται με την αποκατάσταση των επιπέδων της (**Díaz-Rodríguez et al. 2011**). Επιπλέον, το γεγονός ότι η PLK1 υφίσταται μειорύθμιση, υποδεικνύει ότι είναι ενεργοποιημένο κάποιο σημείο ελέγχου βλάβης του DNA (στην φάση G2 ή την μίτωση), το οποίο ως γνωστό ευθύνεται και για την μείωση της δραστηριότητας της PLK1 (**Smits et al. 2000b**), και άρα συνηγορεί υπέρ της ύπαρξης γενωμικής βλάβης που πυροδοτεί με την σειρά της την γενωμική αστάθεια.

Συνεργειστικά, τόσο με την αυξορρύθμιση των RLFs όσο και με την καταστολή της μιτωτικής μηχανής, πιθανολογείται ότι η μακροπρόθεσμη έκφραση της p21 προκαλεί γενωμική αστάθεια προωθώντας έτσι την καρκινογένεση.

Δ.1.5. Η εξήγηση της «διπλοπροσωπίας» της p21 στον καρκίνο: πιθανά σενάρια

Η p21 (Waf1) είναι ένας αναστολέας του κυτταρικού κύκλου. Είναι στόχος της p53 στο μονοπάτι απόκρισης στην βλάβη του DNA (DNA damage response, DDR) που ως γνωστό προσφέρει αντι-καρκινική προστασία. Μετά από πρόκληση βλάβης του DNA, τα διαφοροποιημένα κύτταρα συμμετέχουν σε ένα τυπικό DDR μονοπάτι όπου

η ογκοκατασταλτική p53 παίζει έναν κεντρικό ρόλο (Eliaš et al. 2014) και οδηγεί στην ενεργοποίηση των δύο κύριων αντι-καρκινικών φραγμών· της απόπτωσης και της γήρανσης. Η έγερση αυτών των φραγμών αποτρέπει την μετάδοση γενωμικών βλαβών από τα μητρικά στα θυγατρικά κύτταρα. Παρ' όλο που η p21 έχει κατά κόρον χαρακτηριστεί ως μια ογκοκατασταλτική DDR πρωτεΐνη, υπάρχουν ωστόσο πολυάριθμες αναφορές προσφέροντας στοιχεία συνηγορώντας παραδόξως ότι η p21 συμπεριφέρεται κατά έναν τρόπο που θα ταίριαζε μάλλον σε μία ογκοπρωτεΐνη. Συνεπώς, το γενικευμένο συμπέρασμα πως η p21 διαθέτει έναν ογκοκατασταλτικό χαρακτήρα έχει αρχίσει να αμφισβητείται.

Πρόσφατα, δείχθηκε ότι σε αντίθεση με τα διαφοροποιημένα κύτταρα τα οποία σε απόκριση στην βλάβη του DNA συμμετέχουν σε ένα «τυπικό» p53-εξαρτώμενο DDR μονοπάτι ώστε να εξαλειφθούν τα κύτταρα που φέρουν εκτεταμένες γενωμικές βλάβες μέσω απόπτωσης ή να επιβληθεί ένας φαινότυπος γήρανσης, τα μη-εμβρυονικά, σωματικά βλαστικά κύτταρα (adult stem cells) σε απόκριση στην ιονίζουσα ακτινοβολία (ακτίνες X), ενεργοποιούν ένα ιδιότυπο DDR μονοπάτι όπου ο κεντρικός «παίκτης» δεν είναι η p53 αλλά η p21, με την p21 μάλιστα να λειτουργεί κατά έναν p53-ανεξάρτητο τρόπο. Όταν τα βλαστικά κύτταρα εκτίθενται στην ακτινοβολία, η p21 συμμετέχει σε επιδιορθωτικές διαδικασίες για να αποτρέψει την συσσώρευση βλαβών και την φυσιολογική «εξάντλησή» τους, επιτρέποντας έτσι σε αυτά να διατηρούν ανεμπόδιστα την ικανότητά τους να διπλασιάζονται. Κατά την διάρκεια αυτής της απόκρισης, η p21 όχι μόνο «χειραφετείται» από την p53 αλλά μπλοκάρει τις p53-εξαρτώμενες αποκρίσεις, συντελώνοντας έτσι σε δυσλειτουργική αποπτωτική μηχανή. Σε αυτήν την παράδοξη, «p21-κεντρική» DDR που είναι «διαζευγμένη» από την p53, υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η p21 ελέγχεται μεταγραφικά από την κινάση Chk2 και ότι η p21 προσδίδει στα βλαστικά κύτταρα ανθεκτικότητα στην απόπτωση μέσω διασταυρούμενης επικοινωνίας με το μονοπάτι Notch. Ακόμα, η p21 με κάποιο τρόπο υπαγορεύει την μεταβολή του τρόπου μιτωτικής διαίρεσης των βλαστικών κυττάρων από ασύμμετρες σε συμμετρικές. Ως γνωστό, οι ασύμμετρες διαιρέσεις λαμβάνουν χώρα υπό φυσιολογικές συνθήκες και συντελούν στο σχηματισμό θυγατρικών κυττάρων που υφίστανται διαφοροποίηση. Από την άλλη μεριά, οι συμμετρικές διαιρέσεις αντιστοιχούν σε αυτο-ανανεωτικές μιτώσεις. Χάριν αυτής της p21-εξαρτώμενης μεταβολής του προτύπου μιτωτικών διαιρέσεων, ένα γενωτοξικό ερέθισμα όχι μόνο

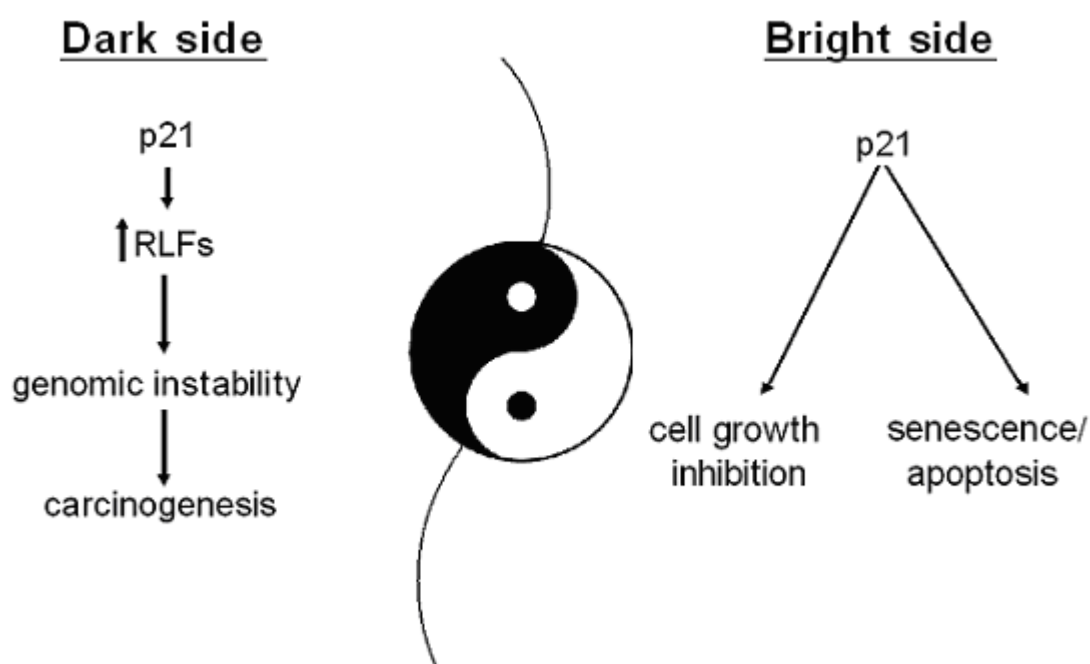
δεν ελαττώνει τον πληθυσμό των σωματικών βλαστικών κυττάρων αλλά αντίθετα, προάγει και την αύξησή του σε απόλυτους αριθμούς (**Insinga et al. 2013**). Η σχέση αυτών των δεδομένων με την ογκογονική δραστηριότητα της p21 ενισχύεται από το γεγονός ότι η p21 είχε σε προηγούμενη μελέτη βρεθεί να ασκεί παρόμοια κυτταροπροστατευτική δράση και σε λευχαιμικά βλαστικά κύτταρα (**Viale et al. 2009**). Όπως έχει προταθεί (**Insinga et al. 2013**), η υπερενεργοποίηση της DDR στα βλαστικά κύτταρα θα μπορούσε να υποθάλψει την κακοήγη εξαλλάγή τους αντί να λειτουργήσει ως φραγμός στην καρκινογένεση. Με άλλα λόγια, μια πιθανή υπόθεση για την ερμηνεία της «διπλοπροσωπίας» της p21 είναι ότι η p21 εκδηλώνει το κακό της «προσωπείο» όταν είναι ενεργά σηματοδοτικά μονοπάτια «βλαστοκυτταρικότητας» (stemness). Άλλωστε, σε αρκετά είδη καρκίνου που η p21 παίζει έναν ογκογόνο ρόλο όπως στον καρκίνο του προστάτη και των οωθηκών (**Abbas and Dutta, 2009**), φαίνεται πως η θεωρία των καρκινικών βλαστικών κυττάρων ισχύει (**McAuliffe et al. 2012; Dunning et al. 2011; Ilkhanizadeh and Weiss, 2013**).

Ένα άλλο πιθανό σενάριο είναι πως η p21 συμπεριφέρεται με έναν ογκογονικό τρόπο στην περίπτωση που συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια προωθούν την κυτοσολική της εντόπιση. Συγκεκριμένα, η p21 εμπλέκεται σε ένα μονοπάτι που οδηγεί στην μείωση της φωσφο-κοφιλίνης· μίας πρωτεΐνης που κόβει την πολυμερισμένη ακτίνη. Αυτό το μονοπάτι έχει περιγραφεί σε Ras-μετασχηματισμένους ινοβλάστες και τελικά οδηγεί στην αύξηση της κυτταρικής κινητικότητας μέσω αναδιατάξεων του κυτταροσκελετού, προάγοντας έτσι την διείσδυση και την μετάσταση. Σε αυτήν την περίπτωση, η εντόπιση της p21 στο κυτοσόλιο εξαρτάται από την ενεργό MEK (**Lee and Helfman DM, 2004**). Επιπλέον, στην ογκογένεση που προκαλείται από την ογκοπρωτεΐνη Her2/Neu έχει δοθεί μία σαφής μηχανιστική εξήγηση σχετικά με την διχοτομημένη συμπεριφορά της p21 στον καρκίνο. Σε αυτήν την περίπτωση, αυτό που καθορίζει την δράση της p21 είτε υπέρ είτε κατά της ογκογένεσης, είναι η φωσφορυλίωσή της από την κινάση Akt στο κατάλοιπο της θρεονίνης 145: Παρουσία αυτής της φωσφορυλίωσης η p21 εντοπίζεται στο κυτοσόλιο και προάγει την αύξηση των καρκινικών κυττάρων. Αντίθετα, απουσία αυτής της κρίσιμης μετα-μεταφραστικής τροποποίησης η p21 εντοπίζεται στον πυρήνα και καταστέλλει την κυτταρική αύξηση δρώντας έτσι αναχαιτιστικά στην ογκογένεση (**Zhou et al. 2001**).

Όπου και αν βρίσκεται η αλήθεια, περαιτέρω πειραματισμός είναι απαραίτητος για την διελεύκανση της μηχανιστικής δράσης της ογκογονικής λειτουργίας της p21 και της σύνδεσής της με την καθημερινή κλινική πρακτική. Παρ' όλο που υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες που συσχετίζουν θετικά ή αρνητικά την έκφραση της p21 με και/ή της ενδοκυτταρικής της εντόπισης με το κλινικό αποτέλεσμα σε καρκινοπαθείς (Abbas and Dutta, 2009), υπάρχει ένα βιβλιογραφικό κενό σχετικά με την ανοσοϊστοχημική ταυτοποίηση της εντόπισης/έκφρασης της p21 και της φωσφοκοφιλίνης (ανενεργός μορφή κοφιλίνης) ή της p21 και πιθανών δεικτών καρκινικών βλαστικών κυττάρων η ισομορφή ALDH1A3 της αφυδρογονάσης της αλδεϋδης (Ali et al. 2011) σε βιοπτικό υλικό και η συσχέτισή τους με καλή ή κακή πρόγνωση. Η έρευνα προς αυτή την κατεύθυνση θα βοηθούσε κατά πολύ στον σχεδιασμό test ελέγχου (screening tests) τα οποία και πιθανώς θα μπορούσαν να προβλέψουν την κακή «Yin» ή την καλή «Yang» πλευρά της p21 σε διαφορετικές μορφές κακοήθειας. Επιπλέον, αυτά τα test ελέγχου θα μπορούσαν να υποδείξουν σε ποιές περιπτώσεις «αντικαρκινικοί» παράγοντες που είναι γνωστό πως αυξάνουν τα επίπεδα της p21 όπως οι αναστολείς απακετυλασών ιστονών (histone deacetylase inhibitors, HDACIs) είναι πραγματικά ωφέλιμοι ή επιβλαβείς και αυξάνουν το ρίσκο της επανεμφάνισης του όγκου.

Συνολικά, η p21 μπορεί να δρα ογκογενετικά τουλάχιστον σε δύο διαφορετικές περιπτώσεις: (i) όταν ισχύει η θεωρία των καρκινικών βλαστικών κυττάρων ή (ii) όταν συγκεκριμένα μονοπάτια που προωθούν την κυτοσολική εντόπισή της είναι ενεργά. Σε κάθε περίπτωση, το μοριακό υπόβαθρο θα έπρεπε πάντοτε να λαμβάνεται υπ' όψιν όταν χορηγούνται «αντι-καρκινικά» φάρμακα που συντελούν στην αύξηση των επιπέδων της p21, όπως είναι οι HDACIs (Warfel and El-Deiry, 2013). Στην παρούσα πρωτεωμική μελέτη, βρέθηκε πως η p21 επιφέρει αύξηση των επιπέδων των παραγόντων αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA (DNA replication licensing factors, RLFs), Cdt1 και Cdc6. Α δημοσίευτα δεδομένα που προέρχονται από την ερευνητική μας ομάδα υποδεικνύουν πως η επαγωγή αυτή των RLFs είναι αποτέλεσμα της παρατεταμένης παύσης του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση και ότι πυροδοτεί την γενωμική αστάθεια όπως φαίνεται από την πρόκληση θραύσεων στο DNA. Αυτό οδηγεί σε βάθος χρόνου στην παράκαμψη του αντι-καρκινικού φραγμού της γήρανσης που ενεργοποιείται πιθανώς με έναν ATM/p73-εξαρτώμενο μηχανισμό και προκαλείται από αλλαγμένη κινητική των διχάλων αντιγραφής

(μειωμένη ταχύτητα προόδου). Τα παραπάνω παρατηρούνται σε ένα Saos-2-βασιζόμενο σύστημα που δεν εκφράζει την p53 και όχι παρουσία της p53, η οποία και φαίνεται να είναι καθοριστικής σημασίας για την εκδήλωση της p21-μεσολαβούμενης προώθησης της καρκινογένεσης ή όχι. Επιπλέον, η αύξηση των RLFs που επάγεται από την p21 δρα συνεργειστικά στην «πυρπόληση» της γενωμικής σταθερότητας με την p21-εξαρτώμενη μείωση παραγόντων της μιτωτικής μηχανής. Άρα, η παρατεταμένη παύση του κυτταρικού κύκλου φαίνεται να είναι ένας επιπρόσθετος μηχανισμός που απειλεί την σταθερότητα του γενόματος, προάγοντας έτσι την καρκινογένεση (**Εικόνα Δ2**). Σε αυτό συνηγορεί και το γεγονός ότι τα γηρασμένα κύτταρα είναι ανευπλοειδικά και δεν χαρακτηρίζονται από φυσιολογικό καρυότυπο (**Bernard and Augert, 2010**). Ίσως, η ιδιότητα της p21 για επιβολή μόνιμης παύσης του κυτταρικού κύκλου να είναι συνυφασμένη με τον «τορπιλισμό» της γενωμικής σταθερότητας.



Εικόνα Δ2. Η «διπλοπροσωπία» της p21 στην καρκινογένεση. Η αύξηση των επιπέδων των παραγόντων αδειοδότησης της αντιγραφής του DNA (replication licensing factors, RLFs) μετά από παρατεταμένη παύση του κυτταρικού κύκλου από

την p21, είναι ένας πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου εκδηλώνεται το κακό προσωπείο αυτής της πρωτεΐνης με διχοτομημένη συμπεριφορά στον καρκίνο.

Δ.1.6. Σύγκριση των πρωτεωμικών δεδομένων με τα ευρήματα προηγούμενων αναλύσεων μεγάλης κλίμακας: ομοιότητες και στοιχεία νεωτερισμού

Μεγάλης-κλίμακας μελέτες που να αφορούν το τρανσκρίπτωμα σε απόκριση στην p21 έγιναν έως τώρα δύο (Chang et al. 2000; Ferrándiz et al. 2012), ενώ κάποια αποτελέσματα πρωτεωμικής ανάλυσης μετά από έκτοπη έκφραση της p21 έχουν αναφερθεί σε μία προηγούμενη μελέτη έως τώρα (Kraljevic et al. 2006). Είναι ενδιαφέρον, ότι και στις δύο προηγούμενες τρανσκριπτομικές μελέτες η p21 έχει βρεθεί να επηρεάζει μία μεγάλη λίστα γονιδίων που σχετίζονται με την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Μάλιστα, όπως συνοψίζεται και στον **Πίνακα Δ1** πολλά από αυτά τα γονίδια έχουν βρεθεί και από την παρούσα μελέτη να είναι στόχοι της p21.

Συγκεκριμένα, ο Chang και οι συνεργάτες του αναφέραν ότι η p21 επηρεάζει αρνητικά την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν την CDK1 (CDC2), PLK1, Topo II, ORC1, καθώς και MAD2 (MAD2L1), BUBR1 (BUB1B) και CENP-F. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν πλήρως με τα ευρήματα αυτής της μελέτης. Ωστόσο, η ειδοποιός διαφορά ανάμεσα στην μελέτη του Chang et al. και την παρούσα μελέτη είναι ότι εδώ η ORC1 που σχετίζεται με την φάση S βρίσκεται να ρυθμίζεται θετικά από την p21. Επιπλέον, δεδομένα από αντίστοιχη τρανσκριπτομική μελέτη που πραγματοποιήθηκε για να συμπληρώσει την παρούσα πρωτεωμική, υποδεικνύουν ότι η ORC1 δεν ρυθμίζεται μεταγραφικά από την p21, σε αντίθεση με την πλειοψηφία των υπόλοιπων μιτωτικών μορίων για τα οποία τα δεδομένα τρανσκριπτομικής και πρωτεωμικής μελέτης συμφωνούν μεταξύ τους. Έτσι, προφανώς η ORC1 να ελέγχεται από την p21 σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Σε σύγκριση με τα δεδομένα των Ferrándiz et al., η p21 βρίσκεται και από αυτήν την μελέτη και από την παρούσα να καταστέλλει την έκφραση μίας σειράς μορίων που ρυθμίζουν μιτωτικές διεργασίες, τα KIF4A, KIF2C, CENP-F, MAD2L1, PLK1, και SMC4. Πάλι όμως το μόριο ORC1 φαίνεται να καταστέλλεται από την p21 σε αντίθεση με την παρούσα μελέτη που η p21 αυξάνει τα επίπεδα της ORC1.

Πίνακας Δ1. Σύνοψη συγκριτικών στοιχείων της παρούσας ανάλυσης με άλλες αναλύσεις p21-εξαρτώμενων στόχων μεγάλης κλίμακας (πρωτεωμικές ή τρανσκριπτομικές).

p21-Targets found in high-throughput analyses		
Common targets	Inferences	<i>Ref.</i>
CDK1, PLK1, Topo II, ORC1, MAD2L1, BUB1B, CENP-F	Down-regulation of mitotic targets and targets associated with DNA replication attributed to p21-mediated cell growth suppression	(Chang et al. 2000)
PLK1, ORC1, MAD2L1, CENP-F, KIF4A, KIF2C	Down-regulation of mitotic targets and targets associated with S phase attributed to p21-mediated cell growth suppression	(Ferrándiz et al. 2012)
—	p21 affects various proteins including those associated with metabolism & cytoskeleton (≤10 targets)	(Kraljevic et al. 2006)

	Down-regulation of mitotic targets and up-regulation of RLFs. Unpublished data support that p21-dependent up-regulation of RLFs fuels genomic instability	This study
--	---	--------------------------

Είναι αξιοσημείωτο πως μόνο μία προηγούμενη μελέτη υπάρχει σχετικά με το p21-επαγωγίμο πρωτέωμα (**Kraljevic et al. 2006**) στην οποία όμως ταυτοποιούνται μόνο έως 10 στόχοι που δεν αναδεικνύουν την p21 ως ρυθμιστή των επιπέδων μορίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο. Επιπλέον, και στις δύο προηγούμενες μελέτες μεγάλης κλίμακας οι στόχοι που αφορούν ρυθμιστικά μόρια της S φάσης υφίστανται μειορρύθμιση σε αντίθεση με την παρούσα μελέτη όπου η p21 επιφέρει αύξηση των επιπέδων των RLFs (replication licensing factors).

Συνολικά, και οι δύο προηγούμενες μεγάλης κλίμακας μελέτες χαρακτηρίζουν την p21 ως έναν κρίσιμο καταστολέα τόσο των μορίων που σχετίζονται με την μίτωση και των μορίων που σχετίζονται με την αντιγραφή του DNA και την φάση S· γεγονός που αποδίδεται στην δράση της p21 να αναστέλλει την κυτταρική αύξηση. Αντίθετα και για πρώτη φορά, σε αυτή την μελέτη αναφέρεται πως η p21 ενώ καταστέλλει μιτωτικά μόρια, επιφέρει αύξηση των επιπέδων μορίων που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA. Στα μόρια αυτά συγκαταλέγεται η ORC1 αλλά και οι RLFs CDC6 και CDT1 που υποδεικνύει ότι η p21 ίσως να προκαλεί γενωμική αστάθεια. Αυτό είναι ένα νέο δεδομένο που παρέχει αυτή η μελέτη. Έτσι φαίνεται πως η p21 ρυθμίζει αντίστροφα τα μιτωτικά μόρια και τα μόρια που ελέγχουν την αντιγραφή του DNA, και πως η παρατεταμένη κυτταρόσταση (G1 παύση) που επάγει η p21 και έχει ως αποτέλεσμα τα αυξημένα επίπεδα RLFs να «πυρπολεί» την γενωμική σταθερότητα. Ας αναφερθεί ότι για τα γονίδια *PLK1* και *TOP2A* υπάρχουν και άλλες προηγούμενες μελέτες -όχι σε μεγάλη κλίμακα- που σημειώνουν ότι η p21

καταστέλλει την έκφρασή τους (Lin et al. 2011; Zhang et al. 2007b; Zhu et al. 2002).

Όσον αφορά την ταυτόχρονη ρύθμιση της μιτωτικής μηχανής και των μορίων που ελέγχουν την αντιγραφή του DNA, είναι ενδιαφέρον ότι έχει περιγραφεί ένα δίκτυο εξαρτώμενο από τα μόρια PLK1/CDC6/CDK1/σεπαράση όπου η PLK1-μεσολαβούμενη φωσφορυλίωση της CDC6 είναι απαραίτητη για την άρση της αναστολής της σεπαράσης από το σύμπλοκο της κυκλίνης B/CDK1 κατά την ανάφαση, την έξοδο από την μίτωση και την διατήρηση της γενωμικής σταθερότητας (Yim and Erikson, 2010).

Επιπλέον, ως γνωστό, η δημιουργία του pre-RC (pre-replication complex) λαμβάνει χώρα κατά έναν χρονικά αυστηρώς ελεγχόμενο τρόπο. Συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση της CDC6 με το ORC είναι προαπαιτούμενο για την αλληλεπίδραση της CDT1 με το σύμπλοκο αυτό (Maiorano et al. 2000) και επίσης η CDC6 απαιτείται για την ισχυρή CDT1:MCM αλληλεπίδραση (Cook et al. 2004). Στην παρούσα μελέτη ωστόσο βρέθηκε πως η p21 επιφέρει πρώτα αύξηση στα επίπεδα της CDT1 στις 12 ώρες (early response) κι έπειτα αύξηση των ORC1 (mid response, 48 hs) και CDC6 (late response, 96 hs). Επομένως, είναι πιθανό ότι η p21 παρεμβαίνει στην φυσιολογική αλληλοδιαδοχή που είναι αναγκαία για την σωστή πυροδότηση των σημείων έναρξης της αντιγραφής (Ori sites), γεγονός που θα είχε δραματικές συνέπειες στην γενωμική σταθερότητα. Σε συμφωνία με αυτό, αδημοσίευτα δεδομένα του εργαστηρίου μας (combining assay) υποδεικνύουν ότι η παρατεταμένη έκτοπη έκφραση της p21 παρεμβαίνει στην κινητική των θέσεων Ori και μειώνει την ταχύτητα με την οποία προοδεύουν οι διχάλες της αντιγραφής.

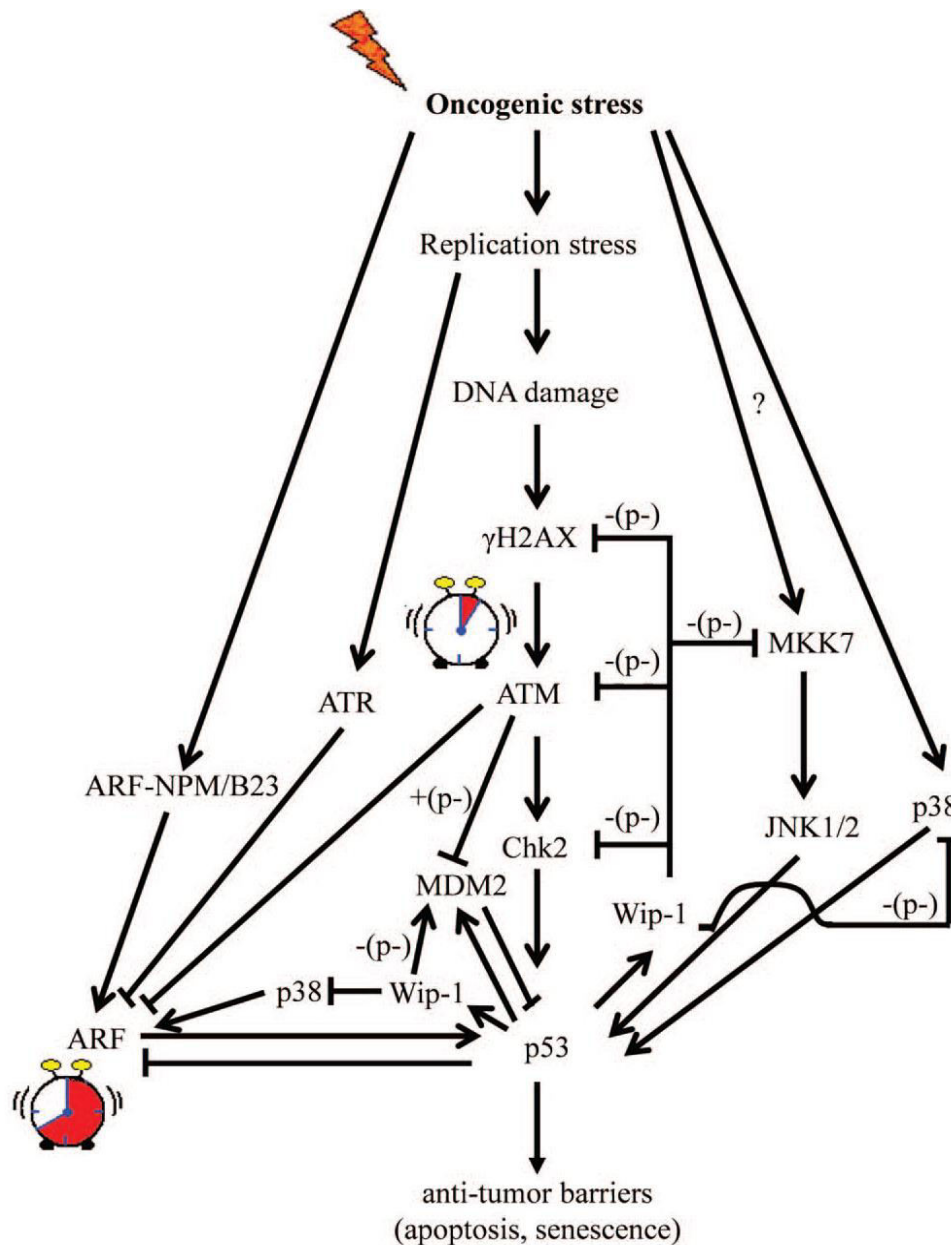
Δ.2. Συζήτηση επί των αποτελεσμάτων σχετικά με την ARF

Δ.2.1. Η Η ARF ως συνιστώσα του μονοπατιού της DDR

Είναι προφανές ότι σε απόκριση στα διάφορα γενοτοξικά ερεθίσματα, όπως το αντιγραφικό στρες που επάγεται από τα ογκογονίδια, το μονοπάτι DDR δεν είναι μία απλή, γραμμική οδός (**Εικόνα Δ3**). Ενώ προσφέρει έναν κύριο άξονα απόκρισης για ένα μεγάλο εύρος ερεθισμάτων, συχνά συμπληρώνεται και υποβοηθάται από άλλα μονοπάτια-παρακλάδια σε πολλαπλά επίπεδα. Ένα πρώτο επίπεδο είναι να λειτουργεί σαν αισθητήρας και να αποθέτει την πληροφορία για όλο το φάσμα των στρεσογόνων ερεθισμάτων μέσω των κατάλληλων σηματοδοτικών οδών. Επακολούθως, αυτά τα σήματα πρέπει να ολοκληρωθούν, με την p53 να αποτελεί έναν κρίσιμο τελεστή σε αυτό το ρόλο χάριν της ιδιότητάς του να ολοκληρώνει ένα μεγάλο εύρος πληροφοριών μέσω των πολυάριθμων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (post-translational modifications, PTMs) που δέχεται από το NH₂-τελικό έως το -COOH τελικό του άκρο (**Levine et al. 2006; Kruse and Gu, 2009; Lu, 2010; Horn and Vousden, 2007**). Τελικά, η μεταγωγή αυτών των σημάτων θα πρέπει να συνοδεύεται από διάφορες θηλιές ανάδρασης (feedback loops) οι οποίες λειτουργικά, είτε απενεργοποιούν είτε περαιτέρω ενεργοποιούν το δίκτυο. Έτσι, δημιουργούνται «διακλαδιζόμενες» κυτταρικές αποκρίσεις όπως έχει άλλωστε προαναφερθεί και στην περίπτωση της ATM με την ARF (**Velimezi et al. 2013; Evangelou et al. 2013**).

Η MKK7 έχει δειχθεί πως αποτελεί κρίσιμο μεταγωγέα σήματος για την σταθεροποίηση της p53 σε απόκριση σε ογκογονικά ερεθίσματα (**Schramek et al. 2011**). Είναι σημαντικό πως τα δεδομένα της *in silico* ανάλυσης (**Εικόνα Γ10**) συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι υπάρχει σηματοδοτική σχέση μεταξύ της ARF και της MKK7, αφού και τα δύο αυτά μόρια μοιράζονται κοινούς ρυθμιστές. Επιπλέον, η βιοπληροφορική ανάλυση αποκάλυψε πιθανούς κοινούς πρωτεϊνικούς στόχους. Η πιθανή ύπαρξη κοινών ρυθμιστών για τις ARF και MKK7 υπογραμμίζει τη λειτουργική σημασία της ARF ως ένα είδος «εφεδρικού» ογκοκατασταλτικού μορίου, στην περίπτωση που το μονοπάτι της DDR και πιθανόν και η διασταυρούμενη

επικοινωνία του με την MKK7, καταρρέουσιν κατά την διάρκεια της καρκινογένεσης.



Εικόνα Δ3. Το μονοπάτι της απόκρισης στην βλάβη στο DNA (DDR) δεν είναι γραμμικό, αλλά χαρακτηρίζεται από πολλές ρυθμιστικές διακλαδώσεις και ανάδρομους βρόχους. Το νεωτεριστικό στοιχείο στο μονοπάτι που προστέθηκε βάση της παρούσης μελέτης είναι ο άξονας ATR-ARF. Μία σηματοδοτική σχέση ARF-MKK7 είναι πιθανή σύμφωνα με την *in silico* ανάλυσης (δεν απεικονίζεται εδώ για λόγους απλότητας) (Kotsinas et al. 2014a).

Η απόκριση στο ποιο «θανάσιμο» για το κύτταρο γενοτοξικό ερέθισμα, τις δικλωνικές θραύσεις, επιτυγχάνεται μέσω μίας τοπικής συσσώρευσης πρωτεϊνών στην περιοχή που έχει υποστεί την βλάβη. Η συσσώρευση αυτή λαμβάνει χώρα πολύ γρήγορα σε μία καθορισμένη περιοχή του γενώματος χάριν ενός καταρράκτη PTMs (**Bartek and Lukas, 2007; Wang et al. 2007; Maya et al. 2001**). Η λήξη του μονοπατιού-σημείου ελέγχου (checkpoint) και η είσοδος πάλι στον κυτταρικό κύκλο εξαρτάται από την δράση μορίων που αναστρέφουν αυτές τις PTMs. Ανάμεσα σε αυτά τα μόρια, η φωσφατάση Wip-1, η οποία και στοχεύει πολλαπλές συνιστώσες της DDR συμπεριλαμβανομένης και της MKK7 (**Kotsinas et al. 2014a**), έχει προταθεί πως είναι ένας από τους καθοριστικούς παράγοντες σε αυτήν τη διαδικασία ανάκαμψης από την κυτταρόσταση που επιβάλλεται από το σημείο ελέγχου (**Le Guezennec and Bulavin, 2009**). Από την άλλη πλευρά, η Wip-1 θα μπορούσε να χρησιμεύει σαν ένας συντονιστής της DDR, συμβάλλοντας έτσι στην δόμηση ενός καλά οργανωμένου γενοπροστατευτικού σηματοδοτικού δικτύου.

Με όποιον τρόπο η παρατηρούμενη Wip-1-μεσολαβούμενη αποφωσφορυλίωση της MKK7 επηρεάζει την δραστικότητα της και την DDR εν γένει, τα πειραματικά δεδομένα καταδεικνύουν την Wip-1 ως ένα ομοιοστατικό «ρεοστάτη» και έναν πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο στην θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου, έχοντας έναν ευρύτερο ρόλο στην καρκινογένεση απ' ό,τι ήταν έως τώρα γνωστό (**Lu et al. 2008**).

Συλλογικά, οι DDR κινάσες, η ARF, η MKK7 και η Wip-1 είναι όλοι κρίσιμοι παίκτες στον συντονισμό της p53-εξαρτώμενης ογκοκαταστολής που διασυνδέονται τόσο λειτουργικά όσο και χρονικά με σχέσεις των οποίων η πολυπλοκότητα τελικά είναι πολύ μεγαλύτερη απ' ό,τι κάποιος θα μπορούσε να φαντασθεί. Ο χαρακτηρισμός και η επέκταση αυτών των πιθανών σηματοδοτικών διασυνδέσεων ως ένας μελλοντικός στόχος θα καταστήσει δυνατή την καλύτερη κατανόηση της βιολογικής βάσης της DDR καθώς και του θεραπευτικού της χειρισμού στην μάχη κατά του καρκίνου.

Δ.2.2. Η αντιαγγειογενετική δράση της ARF: η ARF στο σταυροδρόμι μονοπατιών που ρυθμίζουν την ογκογένεση και την ανάπτυξη

Τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν υποδεικνύουν την ύπαρξη νέων, μάλλον υποεκτιμημένων δράσεων της ARF οι οποίες είναι p53-ανεξάρτητες. Οι δράσεις αυτές συλλογικά βρίσκονται στο σταυροδρόμι των μονοπατιών που ρυθμίζουν την καρκινογένεση (Weber et al. 2000; Tago et al. 2005; Kawagishi et al. 2010; Evangelou et al. 2013) και τις αναπτυξιακές διαδικασίες (McKeller et al. 2002) (Εικόνα Δ4). Καθώς τόσο η ογκογένεση όσο και η ανάπτυξη είναι ζωτικής σημασίας για τους ζωντανούς οργανισμούς, εγείρεται η πιθανότητα της θεραπευτικής εκμετάλλευσης αυτών των δραστηριοτήτων της ARF, ειδικά στους όγκους εκείνους που δεν εκφράζουν λειτουργική p53.

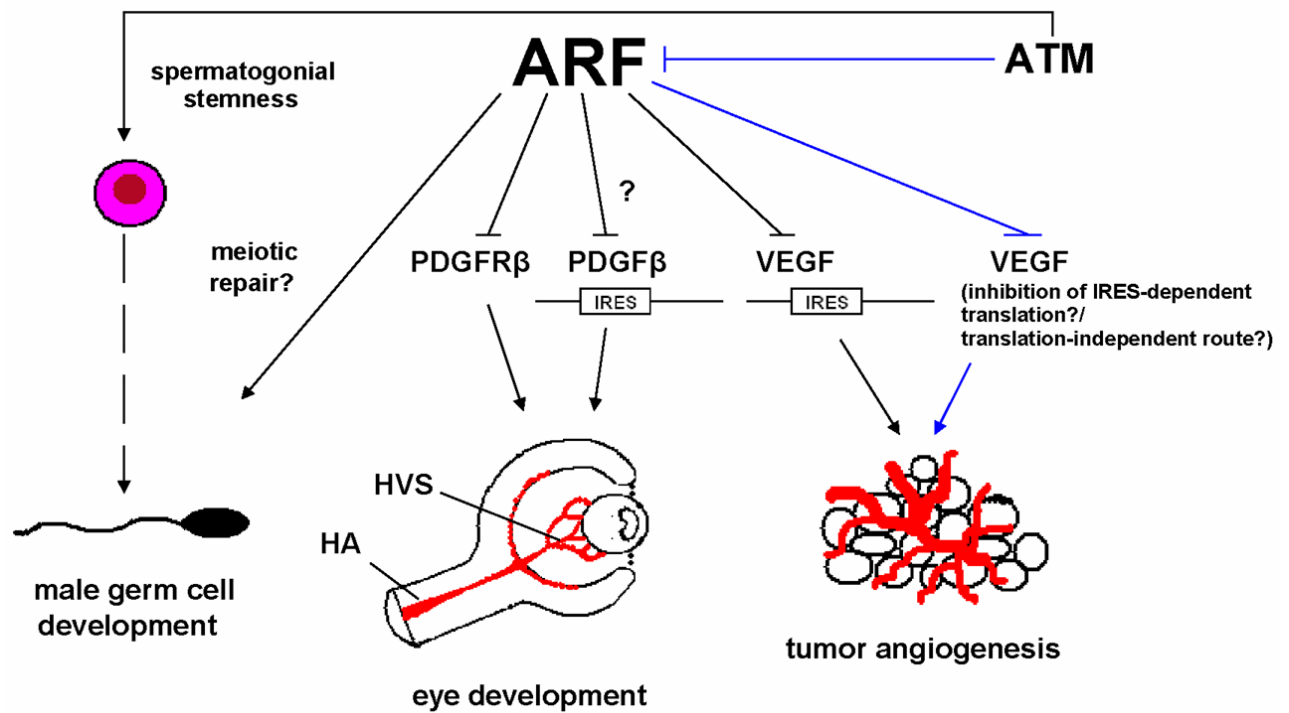
Η ARF ως ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη αναστέλλει την καρκινογένεση όχι μόνο με το να παρεμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή να επάγει την απόπτωση αλλά και μέσω της αρνητικής της επίδρασης σε άλλες σχετιζόμενες με την καρκινογένεση διαδικασίες, όπως αυτή της αγγειογένεσης (Kawagishi et al. 2010; Ulanet and Hanahan, 2010). Έτσι, σε όγκους που δεν εκφράζουν την p53, η αυξορρύθμιση της ARF μέσω καταστολής της ATM όπως έχειδειχθεί (Velimezi et al. 2013), θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως αντι-αγγειογενετικό «εργαλείο» κατά του καρκίνου (Εικόνες Γ11, Γ12). Αυτή η πιθανή θεραπευτική προσέγγιση θα μπορούσε να ενισχυθεί εάν συνδυαζόταν με άλλους αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες όπως τα αντι-VEGF μονοκλωνικά αντισώματα και οι αναστολείς κινάσης τυροσίνης που τώρα χρησιμοποιούνται. Από την άλλη πλευρά, μία τέτοια στρατηγική πιθανόν να επέτρεπε την χορήγηση χαμηλότερων δόσεων των αντι-αγγειογενετικών παραγόντων που τώρα χρησιμοποιούνται και διαθέτουν σημαντικές ανεπιθύμητες δράσης όπως η φαρμακοεπαγόμενη υπέρταση. Ας σημειωθεί ότι παρ' όλο που ο ATM αναστολέας Ku55933 διαθέτει αρκετά υψηλή εκλεκτικότητα για την ATM, οι φαρμακοκινητικές του ιδιότητες και η βιοδιαθεσιμότητά του θα μπορούσαν να βελτιωθούν (Golding et al. 2009). Όντως, ο ATM αναστολέας KU-60019 που χαρακτηρίζεται από ένα βελτιωμένο φαρμακολογικό προφίλ θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν αποτελεσματικός αντικαρκινικός παράγοντας (Golding et al. 2009).

Προκειμένου το ARF/VEGF να εκμεταλλευθεί θεραπευτικά μία άλλη επιλογή θα ήταν η χρήση συνθετικών ARF πεπτιδίων που θα περιλάμβαναν τα αμινο-τελικά άκρα του ARF 2-14, τα οποία και μεσολαβούν όλες τις βιολογικές δράσεις της ARF, συμπεριλαμβανομένης και της δράσης κατά της κυτταρικής αύξησης (**Saporita et al. 2007**). Η θεραπευτική εκμετάλλευση του p53-ανεξάρτητου ARF/VEGF άξονα είναι μεγίστης κλινικής σημασίας αφού στο ~50% των ανθρώπινων όγκων η p53 είναι απενεργοποιημένη.

Μία άλλη πτυχή της δράσης της ARF που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης είναι ο ρόλος της στην σπερματογένεση. Η διαλεύκανση του διασταυρούμενου διαλόγου της ARF με συνιστώσες της κυτταρικής μηχανής επιδιόρθωσης ομόλογου ανασυνδιασμού (homologous recombination, HR) σε αυτήν τη διαδικασία θα έριχνε περισσότερο φως στις υποεκτιμημένες δράσεις της ARF. Ειδικότερα, στην περίπτωση γαμετικών κυττάρων των αρσενικών η ARF συνεισφέρει στην διατήρηση της γενωμικής τους ακεραιότητας κατά την ωρίμανσή τους αλλά ο υποκείμενος μηχανισμός δεν είναι ακόμα καλά κατανοητός (**Churchman et al. 2011**). Επιπλέον, καθώς η ATM κι αυτή συμμετέχει σε αυτό το δίκτυο και αλληλεπιδρά με την ARF (**Velimezi et al. 2013**), η επακριβής ρύθμισή τους και ο συντονισμός τους σε αυτήν τη διαδικασία είναι σκόπιμο να μελετηθεί περαιτέρω. Ίσως από την μελέτη αυτή του δικτύου ARF/ATM στη σπερματογένεση να χαρακτηριστεί τελικά ένα νέο ογκοκατασταλτικό μονοπάτι, δεδομένης της δράσης της ATM στα σπερματογόνια (**Takubo et al. 2008**) και της συσχέτισης ογκογένεσης-ανάπτυξης (**Peifer and Polakis, 2000; Beronja et al. 2013**) σύμφωνα με την οποία είναι πιθανό όγκοι γαμετικών κυττάρων να προέρχονται από τα σπερματογόνια.

Συλλογικά, η ARF είναι ένας «πολυπράγμων» ογκοκατασταλτικός παράγοντας στον οποίο ασκείται έλεγχος σε πολλαπλά επίπεδα· όχι μόνο στο επίπεδο της ενδοκυτταρικής εντόπισης (**Korgaonkar et al. 2005**) αλλά τόσο και σε επίπεδο χρονικό. Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι η ARF δεν λαμβάνει μέρος μόνο στην συστροφή του αγγειακού συστήματος του υαλοειδούς (hyaloid vascular system, HVS) κατά την ανάπτυξη του οφθαλμού (**Thornton et al. 2005**) αλλά και στην συστροφή του μαστικού αδένα (**Yi et al. 2004**), είναι πιθανό ότι η ARF παίζει έναν ακόμα ευρύτερο ρόλο απ' ότι απλά ως ρυθμιστής ογκογενετικών και αναπτυξιακών μονοπατιών. Συγκεκριμένα, η εμπλοκή της ARF στον έλεγχο παροδικών ιστολογικών δομών

υποδεικνύει ότι αυτή η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη πιθανό να αποτελεί έναν δεινό «αναδιαμορφωτή ιστών». Συμπερασματικά, η ARF είναι μια ποικιλοπρόσωπη πρωτεΐνη τις οποίας οι δραστηριότητες δεν έχουν όλες «ξετυλιχθεί», και η θεραπευτική τους αξιοποίηση ανοίγει νέους ορίζοντες ιδιαίτερα στην διαχείριση (φαρμακευτική ή βιοτεχνολογική) του καρκίνου.



Εικόνα Δ4. Η ARF ως DDR-σχετιζόμενο αλλά και αγγειορυθμιστικό μόριο είναι κοινός ρυθμιστής και ογκογενετικών και αναπτυξιακών διεργασιών (Kotsinas et al. 2014b).

Βιβλιογραφία

- Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Ala-Opas M, Kosma VM.** Prognostic value and expression of p21^{waf1/cip1} protein in prostate cancer. *Prostate*. 1999;**39**:8–15.
- Abbas T, Dutta A.** p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*. 2009 Jun;**9**(6):400-14.
- Ali HR, Dawson SJ, Blows FM, Provenzano E, et al.** 2011. Cancer stem cell markers in breast cancer: pathological, clinical and prognostic significance. *Breast Cancer Res* **13**: R118.
- Bae I, Fan S, Bhatia K, Kohn KW, Fornace AJ Jr, O'Connor PM.** Relationships between G1 arrest and stability of the p53 and p21Cip1/Waf1 proteins following gamma-irradiation of human lymphoma cells. *Cancer Res*. 1995 Jun 1;**55**(11):2387-93.
- Baretton GB, Klenk U, Diebold J, Schmeller N, Lohrs U.** Proliferation- and apoptosis-associated factors in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy: prognostic significance of p21/WAF1/CIP1 expression. *Br J Cancer*. 1999;**80**:546–555.
- Bartek J, Lukas J.** DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol*. 2007 Apr;**19**(2):238-45.
- Bellido, T., O'Brien, C. A., Roberson, P. K., and Manolagas, S. C.** Transcriptional activation of the p21(WAF1, CIP1, SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.*, **273**:21137 –21144,1998.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L.** Biochemistry 5th edition New York: W H Freeman; 2002.
- Bernard D, Augert A.** NUA1 links genomic instability and senescence. *Aging (Albany NY)*. 2010 Jun;**2**(6):317-9.
- Beronja, S., Janki, P., Heller, E., Lien, W.H., Keyes, B.E., Oshimori, N., Fuchs, E.** (2013). RNAi screens in mice identify physiological regulators of oncogenic growth. *Nature*. 501, 185-90.
- Berry LD, Gould KL.** Regulation of Cdc2 activity by phosphorylation at T14/Y15. *Prog Cell Cycle Res*. 1996;**2**:99-105.
- Bertwistle D, Sugimoto M, Sherr CJ.** Physical and Functional Interactions of the Arf Tumor Suppressor Protein with Nucleophosmin/B23. *Mol Cell Biol*. 2004 Feb;**24**(3):985-96.
- Biankin AV, et al.** Overexpression of p21^{WAF1/CIP1} is an early event in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res*. 2001;**61**:8830–8837.

- Bissonnette N, Hunting DJ.** p21-induced cycle arrest in G1 protects cells from apoptosis induced by UV-irradiation or RNA polymerase II blockage. *Oncogene*. 1998 Jul 2;**16**(26):3461-9.
- Blasina A, de Weyer IV, Laus MC, Luyten WH, Parker AE, McGowan CH.** A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase *Curr Biol*. 1999 Jan 14;**9**(1):1-10.
- Bozza WP, Yang K, Wang J, Zhuang Z.** Developing peptide-based multivalent antagonists of proliferating cell nuclear antigen and a fluorescence-based PCNA binding assay. *Anal Biochem*. 2012 Aug 1;**427**(1):69-78.
- Braig M, Schmitt CA.** Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. *Cancer Res*. 2006 Mar 15;**66**(6):2881-4.
- Brown, J. P., W. Wei, and J. M. Sedivy.** 1997. Bypass of senescence after disruption of p21Cip1/Waf1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* **277**:831–834.
- Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ.** Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature*. 1995 Oct 12;**377**(6549):552-7.
- Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B.** Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*. 1998 Nov 20;**282**(5393):1497-501.
- Bunz, F., Hwang, P. M., Torrance, C., Waldman, T., Zhang, Y., Dillehay, L., Williams, J., Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B.** Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J. Clin. Investig.*, **104**: 263–269, 1999.
- Bustelo, X.R., Sauzeau, V., Berenjeno, I.M.** (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays*. **29**, 356-70.
- Campisi J.** Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 2005 Feb 25;**120**(4):513-22.
- Cao H, Florez S, Amen M, Huynh T, Skobe Z, Baldini A, Amendt BA.** Tbx1 regulates progenitor cell proliferation in the dental epithelium by modulating Pitx2 activation of p21. *Dev Biol*. 2010 Nov 15;**347**(2):289-300.
- Carbone CJ, Graña X, Reddy EP, Haines DS.** p21 loss cooperates with INK4 inactivation facilitating immortalization and Bcl-2-mediated anchorage-independent growth of oncogene-transduced primary mouse fibroblasts. *Cancer Res*. 2007 May 1;**67**(9):4130-7.
- Carlos AR, Escandell JM, Kotsantis P, Suwaki N, Bouwman P, Badie S, Folio C, Benitez J, Gomez-Lopez G, Pisano DG, Jonkers J, Tarsounas M.** ARF triggers

senescence in Brca2-deficient cells by altering the spectrum of p53 transcriptional targets. *Nat Commun.* 2013;**4**:2697.

Carnero A, Beach DH. Absence of p21WAF1 cooperates with c-myc in bypassing Ras-induced senescence and enhances oncogenic cooperation. *Oncogene.* 2004 Aug 5;**23**(35):6006-11.

Cayrol C, Knibiehler M, Ducommun B. p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene* 16: 311–320, 1998.

Cazzalini O, Perucca P, Savio M, Necchi D, Bianchi L, Stivala LA, Ducommun B, Scovassi AI, Prosperi E. Interaction of p21(CDKN1A) with PCNA regulates the histone acetyltransferase activity of p300 in nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res.* 2008 Mar;**36**(5):1713-22.

Chai, F., Evdokiou, A., Young, G. P., and Zalewski, P. D. Involvement of p21(Waf1/Cip1) and its cleavage by DEVD-caspase during apoptosis of colorectal cancer cells induced by butyrate. *Carcinogenesis (Lond.)*, **21**:7 –14,2000 .

Chan, T. A., Hwang, P. M., Hermeking, H., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Cooperative effects of genes controlling the G(2)/M checkpoint. *Genes Dev.*, **14**: 1584 –1588,2000.

Chang BD, Broude EV, Fang J, Kalinichenko TV, Abdryashitov R, Poole JC, Roninson IB. p21Waf1/Cip1/Sdi1-induced growth arrest is associated with depletion of mitosis-control proteins and leads to abnormal mitosis and endoreduplication in recovering cells. *Oncogene.* 2000a Apr 20;**19**(17):2165-70.

Chang BD, Watanabe K, Broude EV, Fang J, Poole JC, Kalinichenko TV, Roninson IB. Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000b Apr 11;**97**(8):4291-6.

Charrier-Savournin FB, Château MT, Gire V, Sedivy J, Piette J, Dulic V. p21-Mediated nuclear retention of cyclin B1-Cdk1 in response to genotoxic stress. *Mol Biol Cell.* 2004 Sep;**15**(9):3965-76.

Chattopadhyay, D., Ghosh, M. K., Mal, A., and Harter, M. L. Inactivation of p21 by E1A leads to the induction of apoptosis in DNA-damaged cells. *J. Virol.*, **75**: 9844 –9856, 2001.

Chedid M, Michieli P, Lengel C, Huppi K, Givol D. A single nucleotide substitution at codon 31 (Ser/Arg) defines a polymorphism in a highly conserved region of the p53-inducible gene WAF1/CIP1. *Oncogene.* 1994 Oct;**9**(10):3021-4.

Chen J, Saha P, Kornbluth S, Dynlacht BD, Dutta A. Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21^{CIP1}. *Mol Cell Biol.* 1996;**16**:4673–4682.

Chen YQ, Cipriano SC, Arenkiel JM, Miller FR. Tumor suppression by p21WAF1. *Cancer Res.* 1995 Oct 15;**55**(20):4536-9.

Churchman, M.L., Roig, I., Jasin, M., Keeney, S., Sherr, C.J. (2011). Expression of arf tumor suppressor in spermatogonia facilitates meiotic progression in male germ cells. *PLoS Genet.* **7**, e1002157.

Cook JG, Chasse DA, Nevins JR. The regulated association of Cdt1 with minichromosome maintenance proteins and Cdc6 in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2004 Mar 5;**279**(10):9625-33.

Cooke, H.J. and Saunders, P.T. (2002). Mouse models of male infertility. *Nat Rev Genet* **3**, 790-801.

Crinò, L. and Metro, G. (2014). Therapeutic options targeting angiogenesis in nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir Rev.* **23**, 79-91.

Currid CA, O'Connor DP, Chang BD, Gebus C, Harris N, Dawson KA, Dunn MJ, Pennington SR, Roninson IB, Gallagher WM. Proteomic analysis of factors released from p21-overexpressing tumour cells. *Proteomics.* 2006 Jul;**6**(13):3739-53.

Dai W, Wang Q, Liu T, Swamy M, Fang Y, et al. Xie S, Mahmood R, Yang YM, Xu M, Rao CV. Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency. *Cancer Res.* 2004 Jan 15;**64**(2):440-5.

Damalas, A., Velimezi, G., Kalaitzakis, A., Lontos, M., Papavassiliou, A.G., Gorgoulis, V., Angelidis, C. (2011). Loss of p14(ARF) confers resistance to heat shock- and oxidative stress-mediated cell death by upregulating β -catenin. *Int J Cancer.* **128**, 1989-95.

Dash BC, El-Deiry WS. Phosphorylation of p21 in G2/M promotes cyclin B-Cdc2 kinase activity. *Mol Cell Biol.* 2005 Apr;**25**(8):3364-87.

De la Cueva E, et al. Tumorigenic activity of p21^{Waf1/Cip1} in thymic lymphoma. *Oncogene.* 2006;**25**:4128–4132.

de Nooij JC, Hariharan IK. Uncoupling cell fate determination from patterned cell division in the *Drosophila* eye. *Science.* 1995 Nov 10;**270**(5238):983-5.

Deshpande SS, Angkeow P, Huang J, Ozaki M, Irani K. Rac1 inhibits TNF- α -induced endothelial cell apoptosis: dual regulation by reactive oxygen species. *FASEB J* 2000; **14**:1705-14.

De Smedt V, Poulhe R, Cayla X, Dessauge F, Karaïskou A, Jesus C, Ozon R. Thr-161 phosphorylation of monomeric Cdc2. Regulation by protein phosphatase 2C in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem.* 2002 Aug 9;**277**(32):28592-600.

De Souza CP, Ellem KA, Gabrielli BG. Centrosomal and cytoplasmic Cdc2/cyclin B1 activation precedes nuclear mitotic events. *Exp Cell Res.* 2000 May 25;**257**(1):11-21.

de Stanchina, E., McCurrach, M.E., Zindy, F., Shieh, S.Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A.V., Prives, C., Roussel, M.F., Sherr, C.J., Lowe, S.W. (1998). E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev.* **12**, 2434-42.

Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell.* 1995 Aug 25;**82**(4):675-84.

Díaz-Rodríguez E, Álvarez-Fernández S, Chen X, Paiva B, López-Pérez R, García-Hernández JL, San Miguel JF, Pandiella A. Deficient spindle assembly checkpoint in multiple myeloma. *PLoS One.* 2011;**6**(11):e27583.

Dolado I, Swat A, Ajenjo N, De Vita G, Cuadrado A, Nebreda AR. p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell* 2007; **11**:191-205.

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature.* 1992 Mar 19;**356**(6366):215-21.

Dulić V, Kaufmann WK, Wilson SJ, Tlsty TD, Lees E, Harper JW, Elledge SJ, Reed SI. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell.* 1994 Mar 25;**76**(6):1013-23.

Dulić V, Beney GE, Frebourg G, Drullinger LF, Stein GH. Uncoupling between phenotypic senescence and cell cycle arrest in aging p21-deficient fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 2000 Sep;**20**(18):6741-54.

Dunning NL, Laversin SA, Miles AK, Rees RC. 2011. Immunotherapy of prostate cancer: should we be targeting stem cells and EMT? *Cancer Immunol Immunother* **60**: 1181-93.

el-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75: 817-825.

el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 1994 Mar 1;**54**(5):1169-74.

Eliaš J, Dimitrio L, Clairambault J, Natalini R. 2014. The p53 protein and its molecular network: Modelling a missing link between DNA damage and cell fate. *Biochim Biophys Acta.* Jan;**1844**(1 Pt B):232-47.

Evan, G. I., and Vousden, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature (Lond.)*, **411**:342 –348,2001.

Eymin B, Karayan L, Séité P, Brambilla C, Brambilla E, Larsen CJ, Gazzéri S. Human ARF binds E2F1 and inhibits its transcriptional activity. *Oncogene*. 2001 Mar 1;**20**(9):1033-41.

Feng X, Hara Y, Riabowol K. Different HATS of the ING1 gene family. *Trends Cell Biol*. 2002 Nov;**12**(11):532-8.

Ferrandina G, et al. p21^{WAF1/CIP1} protein expression in primary ovarian cancer. *Int J Oncol*. 2000;**17**:1231–1235.

Ferrándiz N, Caraballo JM, García-Gutierrez L, Devgan V, Rodriguez-Paredes M, Lafita MC, Bretones G, Quintanilla A, Muñoz-Alonso MJ, Blanco R, Reyes JC, Agell N, Delgado MD, Dotto GP, León J. p21 as a transcriptional co-repressor of S-phase and mitotic control genes. *PLoS One*. 2012;**7**(5):e37759.

Fischer M, Grundke I, Sohr S, Quaas M, Hoffmann S, Knörck A, Gumhold C, Rother K. p53 and cell cycle dependent transcription of kinesin family member 23 (KIF23) is controlled via a CHR promoter element bound by DREAM and MMB complexes. *PLoS One*. 2013 May 1;**8**(5):e63187.

Flores-Rozas H, Kelman Z, Dean FB, Pan ZQ, Harper JW, Elledge SJ, O'Donnell M, Hurwitz J. Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Aug 30;**91**(18):8655-9.

Forster K, Obermeier A, Mitina O, Simon N, Warmuth M, Krause G, Hallek M. Role of p21(WAF1/CIP1) as an attenuator of both proliferative and drug-induced apoptotic signals in BCR-ABL-transformed hematopoietic cells. *Ann Hematol*. 2008 Mar;**87**(3):183-93.

Fotedar, R., Brickner, H., Saadatmandi, N., Rousselle, T., Diederich, L., Munshi, A., Jung, B., Reed, J. C., and Fotedar, A. Effect of p21waf1/cip1 transgene on radiation induced apoptosis in T cells. *Oncogene*, **18**:3652–3658,1999.

Freeman-Anderson, N.E., Zheng, Y., McCalla-Martin, A.C., Treanor, L.M., Zhao, Y.D., Garfin, P.M., He, T.C., Mary, M.N., Thornton, J.D., Anderson, C., Gibbons, M., Saab, R., Baumer, S.H., Cunningham, J.M., Skapek, S.X. (2009). Expression of the Arf tumor suppressor gene is controlled by Tgfbeta2 during development. *Development*. **136**, 2081-9.

Frick, F., Oscarsson, J., Vikman-Adolfsson, K., Ottosson, M., Yoshida, N., Edén, S. (2000). Different effects of IGF-I on insulin-stimulated glucose uptake in adipose tissue and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **278**, E729-37.

Gao, G.F. and Jakobsen, B.K. (2000). Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with the T-cell receptor. *Immunol Today*. **21**, 630-6.

Gao X, Chen YQ, Wu N, Grignon DJ, Sakr W, Porter AT, Honn KV. Somatic mutations of the WAF1/CIP1 gene in primary prostate cancer. *Oncogene*. 1995 Oct 5;**11**(7):1395-8.

Gao, Y., Cimica, V., Reich, N.C. (2012). Suppressor of cytokine signaling 3 inhibits breast tumor kinase activation of STAT3. *J Biol Chem*. 287, 20904-12.

Gartel AL, Serfas MS, Gartel M, Goufman E, Wu GS, el-Deiry WS, Tyner AL. p21 (WAF1/CIP1) expression is induced in newly nondividing cells in diverse epithelia and during differentiation of the Caco-2 intestinal cell line. *Exp Cell Res*. 1996a Sep 15;**227**(2):171-81.

Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL. p21--negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1996b Nov;**213**(2):138-49.

Gartel, A. L., and Tyner, A. L. Transcriptional regulation of the p21(WAF1/CIP1) gene. *Exp. Cell Res.*, **246**: 280 –289,1999.

Gartel AL, Goufman E, Najmabadi F, Tyner AL. Sp1 and Sp3 activate p21 (WAF1/CIP1) gene transcription in the Caco-2 colon adenocarcinoma cell line. *Oncogene*. 2000 Oct 26;**19**(45):5182-8.

Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther*. 2002 Jun;**1**(8):639-49.

Gartel AL. Is p21 an oncogene? *Mol Cancer Ther*. 2006 Jun;**5**(6):1385-6.

Gartel AL. p21(WAF1/CIP1) and cancer: a shifting paradigm? *Biofactors*. 2009 Mar-Apr;**35**(2):161-4.

Gillis LD, Leidal AM, Hill R, Lee PW. p21(Cip1/WAF1) mediates cyclin B1 degradation in response to DNA damage. *Cell Cycle*. 2009 Jan 4;**8**(2).

Goke, R., Goke, A., Goke, B., El-Deiry, W. S., and Chen, Y. Pioglitazone inhibits growth of carcinoid cells and promotes TRAIL-induced apoptosis by induction of p21waf1/cip1. *Digestion*, **64**:75 –80,2001.

Golding, S.E., Rosenberg, E., Valerie, N., Hussaini, I., Frigerio, M., Cockcroft, X.F., Chong, W.Y., Hummersone, M., Rigoreau, L., Menear, K.A., O'Connor, M.J., Povirk, L.F., van Meter, T., Valerie, K. (2009). Improved ATM kinase inhibitor KU-60019 radiosensitizes glioma cells, compromises insulin, AKT and ERK prosurvival signaling, and inhibits migration and invasion. *Mol Cancer Ther*. 8, 2894-902.

Gonzalez S, Klatt P, Delgado S, Conde E, Lopez-Rios F, Sanchez-Cespedes M, Mendez J, Antequera F, Serrano M. Oncogenic activity of Cdc6 through repression of the INK4/ARF locus. *Nature*. 2006 Mar 30;**440**(7084):702-6.

González-Navarro, H., Abu Nabah, Y.N., Vinué, A., Andrés-Manzano, M.J., Collado, M., Serrano, M., Andrés, V. (2010). p19ARF deficiency reduces

macrophage and vascular smooth muscle cell apoptosis and aggravates atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. **55**, 2258-68.

Gorospe, M., Cirielli, C., Wang, X., Seth, P., Capogrossi, M., and Holbrook, N. P21 (WAF1/CIP1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene*, **14**: 929 –935,1997.

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 1994 Sep 15;**54**(18):4855-78.

Griffin SV, Shankland SJ. Not just an inhibitor: a role for p21 beyond the cell cycle- The truth is rarely pure and never simple. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Mar;**15**(3):825-6.

Gromley A, Churchman ML, Zindy F, Sherr CJ. (2009). Transient expression of the Arf tumor suppressor during male germ cell and eye development in Arf-Cre reporter mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106**, 6285-90.

Grøntved L, Madsen MS, Boergesen M, Roeder RG, Mandrup S. MED14 tethers mediator to the N-terminal domain of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and is required for full transcriptional activity and adipogenesis. *Mol Cell Biol*. 2010 May;**30**(9):2155-69.

Hagstrom KA, Meyer BJ. Condensin and cohesin: more than chromosome compactor and glue. *Nature Reviews Genetics* July 2003; **4**, 520-534.

Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*. 2008 Mar 7;**319**(5868):1352-5.

Halevy O, Novitch BG, Spicer DB, Skapek SX, Rhee J, Hannon GJ, Beach D, Lassar AB. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science*. 1995 Feb 17;**267**(5200):1018-21.

Hao CN, Geng YJ, Li F, Yang T, Su DF, Duan JL, Li Y. Insulin-like growth factor-1 receptor activation prevents hydrogen peroxide-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Apoptosis* 2011; **16**:1118-27.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;**144**(5):646-74.

Hara, E., J. A. Uzman, G. P. Dimri, J. O. Nehlin, A. Testori, and J. Campisi. 1996. The helix-loop-helix protein Id-1 and a retinoblastoma protein binding mutant of SV40 T antigen synergize to reactivate DNA synthesis in senescent human fibroblasts. *Dev. Genet*. **18**:161–172.

Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, and S. J. Elledge. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin- dependent kinases. *Cell* **75**: 805-816.

Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell*. 1995 Apr;**6**(4):387-400.

Harvey M, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A, Donehower LA. Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nat Genet*. 1993 Nov;**5**(3):225-9.

Harvey, K. J., Lukovic, D., and Ucker, D. S. Caspase-dependent Cdk activity is a requisite effector of apoptotic death events. *J. Cell Biol.*, **148**:59–72,2000.

Hasan S, Hassa PO, Imhof R, Hottiger MO. Transcription coactivator p300 binds PCNA and may have a role in DNA repair synthesis. *Nature*. 2001 Mar 15;**410**(6826):387-91.

Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res*. **25**, 585–621.

Heasman, S.J. and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **9**, 690–701.

Hein N, Hannan KM, George AJ, Sanij E, Hannan RD. The nucleolus: an emerging target for cancer therapy. *Trends Mol Med*. 2013 Nov;**19**(11):643-54.

Hellborg F, Wiman KG. The p53-induced Wig-1 zinc finger protein is highly conserved from fish to man. *Int J Oncol*. 2004 Jun;**24**(6):1559-64.

Higashi Y, Sukhanov S, Anwar A, Shai SY, Delafontaine P. Aging, atherosclerosis, and IGF-1. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2012; **67**:626-39

Hill R, Leidal AM, Madureira PA, Gillis LD, Waisman DM, Chiu A, Lee PW. Chromium-mediated apoptosis: involvement of DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) and differential induction of p53 target genes. *DNA Repair (Amst)*. 2008 Sep 1;**7**(9):1484-99.

Hingorani, R., Bi, B., Dao, T., Bae, Y., Matsuzawa, A., and Crispe, I. N. CD95/Fas signaling in T lymphocytes induces the cell cycle control protein p21cip-1/WAF-1, which promotes apoptosis. *J. Immunol.*, **164**:4032 –4036,2000.

Hiyama H, Iavarone A, LaBaer J, Reeves SA. Regulated ectopic expression of cyclin D1 induces transcriptional activation of the cdk inhibitor p21 gene without altering cell cycle progression. *Oncogene*. 1997 May 29;**14**(21):2533-42.

Hiyama H, Iavarone A, Reeves SA. Regulation of the cdk inhibitor p21 gene during cell cycle progression is under the control of the transcription factor E2F. *Oncogene*. 1998 Mar 26;**16**(12):1513-23.

Hobeika, A. C., Etienne, W., Torres, B. A., Johnson, H. M., and Subramaniam, P. S. IFN- γ induction of p21(WAF1) is required for cell cycle inhibition and suppression of apoptosis. *J. Interferon Cytokine Res.*, **19**:1351 –1361,1999.

- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC.** p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991 Jul 5;**253**(5015):49-53.
- Horn HF, Vousden KH.** Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene*. 2007 Feb 26;**26**(9):1306-16.
- Hsu, S. L., Chen, M. C., Chou, Y. H., Hwang, G. Y., and Yin, S. C.** Induction of p21(CIP1/Waf1) and activation of p34(cdc2) involved in retinoic acid-induced apoptosis in human hepatoma Hep3B cells. *Exp. Cell. Res.*, **248**:87–96,1999.
- Huang WC, Zhau HE, Chung LW.** Androgen receptor survival signaling is blocked by anti-beta2-microglobulin monoclonal antibody via a MAPK/lipogenic pathway in human prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 2010 Mar 12;**285**(11):7947-56.
- Huppi K, Siwarski D, Dosik J, Michieli P, Chedid M, Reed S, Mock B, Givol D, Mushinski JF.** Molecular cloning, sequencing, chromosomal localization and expression of mouse p21 (Waf1). *Oncogene*. 1994 Oct;**9**(10):3017-20.
- Hu CK, Coughlin M, Field CM, Mitchison TJ.** KIF4 regulates midzone length during cytokinesis. *Curr Biol*. 2011 May 24;**21**(10):815-24.
- Ihle JN, Kerr IM.** Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet*. 1995 Feb;**11**(2):69-74.
- Ilkhanizadeh S, Weiss WA.** 2013. Starvation favors glioma stem cells. *Nat Neurosci* **16**: 1359-61.
- Inagaki. A, Schoenmakers, S., Baarends, W.M.** (2010). DNA double strand break repair, chromosome synapsis and transcriptional silencing in meiosis. *Epigenetics*. **5**, 255-66.
- Inoue N, Shimano H, Nakakuki M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Yamamoto T, Sato R, Takahashi A, Sone H, Yahagi N, Suzuki H, Toyoshima H, Yamada N.** Lipid synthetic transcription factor SREBP-1a activates p21WAF1/CIP1, a universal cyclin-dependent kinase inhibitor. *Mol Cell Biol*. 2005 Oct;**25**(20):8938-47.
- Inoue N, Yahagi N, Yamamoto T, Ishikawa M, Watanabe K, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Takeuchi Y, Kobayashi K, Takahashi A, Suzuki H, Hasty AH, Toyoshima H, Yamada N, Shimano H.** Cyclin-dependent kinase inhibitor, p21WAF1/CIP1, is involved in adipocyte differentiation and hypertrophy, linking to obesity, and insulin resistance. *J Biol Chem*. 2008 Jul 25;**283**(30):21220-9.
- Insinga A, Cicalese A, Faretta M, Gallo B, Albano L, Ronzoni S, Furia L, Viale A, Pelicci PG.** DNA damage in stem cells activates p21, inhibits p53, and induces symmetric self-renewing divisions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Mar 5;**110**(10):3931-6.
- Jackman M, Lindon C, Nigg EA, Pines J.** Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol*. 2003 Feb;**5**(2):143-8.

Jacks T, Remington L, Williams BO, Schmitt EM, Halachmi S, Bronson RT, Weinberg RA. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol.* 1994 Jan 1;**4**(1):1-7.

Javelaud, D., Wietzerbin, J., Delattre, O., and Besancon, F. Induction of p21Waf1/Cip1 by TNF α requires NF- κ B activity and antagonizes apoptosis in Ewing tumor cells. *Oncogene*, **19**:61–68,2000.

Jazayeri A, Falck J, Lukas C, Bartek J, Smith GC, Lukas J, Jackson SP. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol.* 2006 Jan;**8**(1):37-45.

Jeggo PA, Carr AM, Lehmann AR. Splitting the ATM: distinct repair and checkpoint defects in ataxia-telangiectasia. *Trends Genet.* 1998 Aug;**14**(8):312-6.

Jeremy M Berg, John L Tymoczko, and Lubert Stryer. *Biochemistry*. 5th Edition. New York: W H Freeman; 2002.

Jiang H, Reinhardt HC, Bartkova J, Tommiska J, Blomqvist C, Nevanlinna H, Bartek J, Yaffe MB, Hemann MT. The combined status of ATM and p53 link tumor development with therapeutic response. *Genes Dev.* 2009 Aug 15;**23**(16):1895-909.

Jones JM, Cui XS, Medina D, Donehower LA. Heterozygosity of p21WAF1/CIP1 enhances tumor cell proliferation and cyclin D1-associated kinase activity in a murine mammary cancer model. *Cell Growth Differ.* 1999 Apr;**10**(4):213-22.

Jung JM, Bruner JM, Ruan S, Langford LA, Kyritsis AP, Kobayashi T, Levin VA, Zhang W. Increased levels of p21WAF1/Cip1 in human brain tumors. *Oncogene.* 1995 Nov 16;**11**(10):2021-8.

Kadowaki, Y., Fujiwara, T., Fukazawa, T., Shao, J., Yasuda, T., Itoshima, T., Kagawa, S., Hudson, L. G., Roth, J. A., and Tanaka, N. Induction of differentiation-dependent apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma by adenovirus-mediated p21sdi1 gene transfer. *Clin. Cancer Res.*, **5**:4233–4241,1999.

Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M.F., Quelle, D.E., Downing, J.R., Ashmun, R.A., Grosveld, G., Sherr, C.J. (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell.* **91**, 649–659.

Kamijo T, van de Kamp E, Chong MJ, Zindy F, Diehl JA, Sherr CJ, McKinnon PJ. (1999a). Loss of the ARF tumor suppressor reverses premature replicative arrest but not radiation hypersensitivity arising from disabled atm function. *Cancer Res.* **59**, 2464-9.

Kamijo, T., Bodner, S., van de Kamp, E., Randle, D.H., Sherr, C.J. (1999b). Tumor spectrum in ARF-deficient mice. *Cancer Res.* **59**, 2217-22.

- Kaneuchi M, Yamashita T, Shindoh M, Segawa K, Takahashi S, Furuta I, Fujimoto S, Fujinaga K.** Induction of apoptosis by the p53-273L (Arg --> Leu) mutant in HSC3 cells without transactivation of p21Waf1/Cip1/Sdi1 and bax. *Mol Carcinog.* 1999 Sep;**26**(1):44-52.
- Kang, K. H., Kim, W. H., and Choi, K. H.** p21 promotes ceramide-induced apoptosis and antagonizes the antideath effect of Bcl-2 in human hepatocarcinoma cells. *Exp. Cell Res.*, **253**:403 –412,1999.
- Kawagishi, H., Nakamura, H., Maruyama, M., Mizutani, S., Sugimoto, K., Takagi, M., Sugimoto, M.** (2010). ARF suppresses tumor angiogenesis through translational control of VEGFA mRNA. *Cancer Res.* **70**, 4749-58.
- Katayose D, Wersto R, Cowan K, Seth P.** Consequences of p53 gene expression by adenovirus vector on cell cycle arrest and apoptosis in human aortic vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Oct 13;**215**(2):446-51.
- Kim BC, Lee HC, Lee JJ, Choi CM, Kim DK, Lee JC, Ko YG, Lee JS.** Wig1 prevents cellular senescence by regulating p21 mRNA decay through control of RISC recruitment. *EMBO J.* 2012 Oct 12;**31**(22):4289-303.
- Kawagishi, H., Nakamura, H., Maruyama, M., Mizutani, S., Sugimoto, K., Takagi, M., Sugimoto, M.** (2010). ARF suppresses tumor angiogenesis through translational control of VEGFA mRNA. *Cancer Res.* **70**, 4749-58.
- Kim Y, Starostina NG, Kipreos ET.** The CRL4Cdt2 ubiquitin ligase targets the degradation of p21Cip1 to control replication licensing. *Genes Dev.* 2008 Sep 15;**22**(18):2507-19.
- Kim N, Song K.** KIFC1 is essential for bipolar spindle formation and genomic stability in the primary human fibroblast IMR-90 cell. *Cell Struct Funct.* 2013;**38**(1):21-30.
- Kishi H, Nakagawa K, Matsumoto M, Suga M, Ando M, Taya Y, Yamaizumi M.** Osmotic shock induces G1 arrest through p53 phosphorylation at Ser33 by activated p38 MAPK without phosphorylation at Ser15 and Ser20. *J Biol Chem* 2001; **276**:39115-22.
- Kondo, S., Barna, B. P., Kondo, Y., Tanaka, Y., Casey, G., Liu, J., Morimura, T., Kaakaji, R., Peterson, J. W., Werbel, B., and Barnett, G. H.** WAF1/CIP1 increases the susceptibility of p53 non-functional malignant glioma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Oncogene*, **13**:1279–1285,1996.
- Koopmann J, Maintz D, Schild S, Schramm J, Louis DN, Wiestler OD, von Deimling A.** Multiple polymorphisms, but no mutations, in the WAF1/CIP1 gene in human brain tumours. *Br J Cancer.* 1995 Nov;**72**(5):1230-3.
- Korgaonkar, C., Hagen, J., Tompkins, V., Frazier, A.A., Allamargot, C., Quelle, F.W., Quelle, D.E.** (2005). Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function. *Mol Cell Biol.* **25**, 1258-71.

Korkolopoulou P, Kouzelis K, Christodoulou P, Papanikolaou A, Thomas-Tsagli E. Expression of retinoblastoma gene product and p21^{WAF1/Cip1} protein in gliomas: correlations with proliferation markers, p53 expression and survival. *Acta Neuropathol.* 1998;**95**:617–624.

Korr H, Kurz C, Seidler TO, Sommer D and Schmitz C. Mitochondrial DNA synthesis studied autoradiographically in various cell types *in vivo*. *Braz J Med Biol Res*, February 1998, Volume **31**(2) 289-298.

Kotsinas, A., Papanagnou, P., Galanos, P., Schramek, D., Townsend, P., Penninger, J.M., Bartek, J., Gorgoulis, V.G. (2014a). MKK7 and ARF: New players in the DNA damage response scenery. *Cell Cycle*. **13**, 1227-36.

Kotsinas A, Papanagnou P, Evangelou K, Trigas G.C., Kostourou V, Townsend P, Gorgoulis V.G. (2014b). ARF: a versatile DNA damage response ally at the crossroads of development and tumorigenesis. *Frontiers in Cancer Genetics* [doi: 10.3389/fgene.2014.00236].

Kraljevic S, Sedic M, Scott M, Gehrig P, Schlapbach R, Pavelic K. Casting light on molecular events underlying anti-cancer drug treatment: what can be seen from the proteomics point of view? *Cancer Treat Rev.* 2006 Dec;**32**(8):619-29.

Kruse, J.P. and Gu, W. (2009) Modes of p53 regulation. *Cell*. 137, 609-22.

LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* 1997 Apr 1;**11**(7):847-62.

Lalier, L., Cartron, P.F., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B., Vallette, F.M. (2007). Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis*. **12**, 887-96.

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992 Jul 2; **358**(6381):15-6.

Lapenna S, Giordano A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2009 Jul;**8**(7):547-66.

Laron, Z. (2001). Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Mol Pathol.* **54**, 311-16.

Lavin MF, Birrell G, Chen P, Kozlov S, Scott S, Gueven N. ATM signaling and genomic stability in response to DNA damage. *Mutat. Res.* 2005 Jan 6;**569**(1-2):123-32.

Lee S, Helfman DM. 2004. Cytoplasmic p21Cip1 is involved in Ras-induced inhibition of the ROCK/LIMK/cofilin pathway. *J Biol Chem* **279**:1885-91.

Le Guezennec, X., Bulavin, D.V. (2009). WIP1 phosphatase at the crossroads of cancer and aging. *Trends Biochem Sci.* 35,109-14.

Levine, A.J., Hu, W., Feng, Z. (2006). The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ.* 13, 1027-36

Li R, Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature.* 1994 Oct 6;**371**(6497):534-7.

Li YJ, Laurent-Puig P, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R. Polymorphisms and probable lack of mutation in the WAF1-CIP1 gene in colorectal cancer. *Oncogene.* 1995 Feb 2;**10**(3):599-601.

Li, Y., Upadhyay, S., Bhuiyan, M., and Sarkar, F. H. Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein. *Oncogene*, **18**:3166 –3172,1999.

Lin J, Reichner C, Wu X, Levine AJ. Analysis of wild-type and mutant p21WAF-1 gene activities. *Mol Cell Biol.* 1996 Apr;**16**(4):1786-93.

Lin YC, Sun SH, Wang FF. Suppression of Polo like kinase 1 (PLK1) by p21(Waf1) mediates the p53-dependent prevention of caspase-independent mitotic death. *Cell Signal.* 2011 Nov;**23**(11):1816-23.

Lincet, H., Poulain, L., Remy, J. S., Deslandes, E., Duigou, F., Gauduchon, P., and Staedel, C. The p21(cip1/waf1) cyclin-dependent kinase inhibitor enhances the cytotoxic effect of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett.*, **161**:17–26,2000.

Liontos M, Koutsami M, Sideridou M, Evangelou K, Kletsas D, Levy B, Kotsinas A, Nahum O, Zoumpourlis V, Kouloukoussa M, Lygerou Z, Taraviras S, Kittas C, Bartkova J, Papavassiliou AG, Bartek J, Halazonetis TD, Gorgoulis VG. Deregulated overexpression of hCdt1 and hCdc6 promotes malignant behavior. *Cancer Res.* 2007 Nov 15;**67**(22):10899-909.

Liu B, Chen Y, St Clair DK. ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radic Biol Med* 2008; **44**:1529-35.

Liu Y, Martindale JL, Gorospe M, Holbrook NJ. Regulation of p21WAF1/CIP1 expression through mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res.* 1996 Jan 1;**56**(1):31-5.

Liu, Y. and Kulesz-Martin, M. (2001). p53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence-specific and non-sequence-specific DNA binding. *Carcinogenesis.* 22, 851-860.

Liu Y, Yeh N, Zhu XH, Leversha M, Cordon-Cardo C, Ghossein R, Singh B, Holland E, Koff A. Somatic cell type specific gene transfer reveals a tumor-promoting function for p21(Waf1/Cip1). *EMBO J.* 2007 Nov 14;**26**(22):4683-93.

Liu T, Chen H, Kim H, Huen MS, Chen J, Huang J. RAD18-BRCTx interaction is required for efficient repair of UV-induced DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 2012 Feb 1;**11**(2):131-8.

Lowe, S.W. and Sherr, C.J. (2003). Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev*. **13**, 77-83.

Lu, X., Nguyen, T.A., Moon, S.H., Darlington, Y., Sommer, M., Donehower, L.A. (2008). The type 2C phosphatase Wip1: an oncogenic regulator of tumor suppressor and DNA damage response pathways. *Cancer Metastasis Rev*. **27**, 123–35.

Lu, X. (2010). Tied up in loops: positive and negative autoregulation of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. **2**, a000984.

Luo, Y., J. Hurwitz, and J. Massague. 1995. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* **375**: 159-161

Macleaen KN, Greiner LS, Evans JR, Sood SK, Lhotak S, Markham NE, Stabler SP, Allen RH, Austin RC, Balasubramaniam V, Jiang H. Cystathionine protects against endoplasmic reticulum stress-induced lipid accumulation, tissue injury, and apoptotic cell death. *J Biol Chem*. 2012 Sep 14;**287**(38):31994-2005.

Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, Vogelstein B, Jacks T. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev*. 1995 Apr 15;**9**(8):935-44.

Mahyar-Roemer, M., and Roemer, K. p21 Waf1/Cip1 can protect human colon carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural chemopreventive and therapeutic agents. *Oncogene*, **20**:3387–3398,2001.

Maiguel DA, Jones L, Chakravarty D, Yang C, Carrier F. Nucleophosmin sets a threshold for p53 response to UV radiation. *Mol Cell Biol*. 2004 May;**24**(9):3703-11.

Maiorano D, Moreau J, Méchali M. XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*. *Nature*. 2000 Apr 6;**404**(6778):622-5.

Mansilla SF, Soria G, Vallerger MB, Habif M, Martínez-López W, Prives C, Gottifredi V. UV-triggered p21 degradation facilitates damaged-DNA replication and preserves genomic stability. *Nucleic Acids Res*. 2013 Aug;**41**(14):6942-51.

Manzella L, Conte E, Cocchiario G, Guarniera E, Sciacca B, Bonaiuto C, Stagno F, Messina A. Role of interferon regulatory factor 1 in monocyte/macrophage differentiation. *Eur J Immunol*. 1999 Sep;**29**(9):3009-16.

Marchetti A, Doglioni C, Barbareschi M, Buttitta F, Pellegrini S, Bertacca G, Chella A, Merlo G, Angeletti CA, Dalla Palma P, Bevilacqua G. p21 RNA and protein expression in non-small cell lung carcinomas: evidence of p53-independent

expression and association with tumoral differentiation. *Oncogene*. 1996 Mar 21;12(6):1319-24.

Martín-Caballero J, Flores JM, García-Palencia P, Serrano M. Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res*. 2001 Aug 15;61(16):6234-8.

Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 2007; **316**:1160-6.

Maya R, Balass M, Kim ST, Shkedy D, Leal JF, Shifman O, Moas M, Buschmann T, Ronai Z, Shiloh Y, Kastan MB, Katzir E, Oren M. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev*. 2001 May 1;15(9):1067-77.

McAuliffe SM, Morgan SL, Wyant GA, Tran LT, et al. 2012. Targeting Notch, a key pathway for ovarian cancer stem cells, sensitizes tumors to platinum therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: E2939-48.

McKinnon PJ. (2013). Maintaining genome stability in the nervous system. *Nature Neuroscience* **16**, 1523–1529.

Méndez-Vidal C, Wilhelm MT, Hellborg F, Qian W, Wiman KG. The p53-induced mouse zinc finger protein wig-1 binds double-stranded RNA with high affinity. *Nucleic Acids Res*. 2002 May 1;30(9):1991-6.

Missero C, Calautti E, Eckner R, Chin J, Tsai LH, Livingston DM, Dotto GP. Involvement of the cell-cycle inhibitor Cip1/WAF1 and the E1A-associated p300 protein in terminal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jun 6;92(12):5451-5.

Monasor A, Murga M, Lopez-Contreras AJ, Navas C, Gomez G, Pisano DG, Fernandez-Capetillo O. INK4a/ARF limits the expansion of cells suffering from replication stress. *Cell Cycle*. 2013 Jun 15;12(12):1948-54.

Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature*. 1995 Mar 9;374(6518):131-4.

Mueller S, Cadenas E, Schönthal AH. p21WAF1 regulates anchorage-independent growth of HCT116 colon carcinoma cells via E-cadherin expression. *Cancer Res*. 2000 Jan 1;60(1):156-63.

Mullarky E, Mattaini KR, Vander Heiden MG, Cantley LC, Locasale JW. PHGDH amplification and altered glucose metabolism in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011 Dec;24(6):1112-5.

Murakami M, Ohkuma M, Nakamura M. Molecular mechanism of transforming growth factor-beta-mediated inhibition of growth arrest and differentiation in a myoblast cell line. *Dev Growth Differ.* 2008 Feb;**50**(2):121-30.

Muto A, Kizaki M, Yamato K, Kawai Y, Kamata-Matsushita M, Ueno H, Ohguchi M, Nishihara T, Koeffler HP, Ikeda Y. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces differentiation of a retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia cell line (UF-1) associated with expression of p21(WAF1/CIP1) and p27(KIP1). *Blood.* 1999 Apr 1;**93**(7):2225-33.

Nalabothula N, Indig FE, Carrier F. The Nucleolus Takes Control of Protein Trafficking Under Cellular Stress. *Mol Cell Pharmacol.* 2010;**2**(5):203-212.

Nielsen LB, Christoffersen C, Ahnström J, Dahlbäck B. ApoM: gene regulation and effects on HDL metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2009 Mar;**20**(2):66-71.

Noda, A., Y. Ning, S. F. Venable, O. M. Pereira-Smith, and J. R. Smith. 1994. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp. Cell Res.* 211: 90-98.

Nomura T, Huang WC, Zhau HE, Wu D, Xie Z, Mimata H, Zayzafoon M, Young AN, Marshall FF, Weitzmann MN, Chung LW. Beta2-microglobulin promotes the growth of human renal cell carcinoma through the activation of the protein kinase A, cyclic AMP-responsive element-binding protein, and vascular endothelial growth factor axis. *Clin Cancer Res.* 2006 Dec 15;**12**(24):7294-305.

O'Donohue MF, Choesmel V, Faubladier M, Fichant G, Gleizes PE. Functional dichotomy of ribosomal proteins during the synthesis of mammalian 40S ribosomal subunits. *J Cell Biol.* 2010 Sep 6;**190**(5):853-66.

Ohata M, Nakamura S, Fujita H, Isemura M. Prognostic implications of p21^{Waf1/Cip1} immunolocalization in multiple myeloma. *Biomed Res.* 2005;**26**:91–98.

Okaichi K, Wang LH, Sasaki J, Saya H, Tada M, Okumura Y. A point mutation of human p53, which was not detected as a mutation by a yeast functional assay, led to apoptosis but not p21Waf1/Cip1/Sdi1 expression in response to ionizing radiation in a human osteosarcoma cell line, Saos-2. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999 Nov 1;**45**(4):975-80.

Palmero, I., Pantoja, C., Serrano, M. (1999). p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature.* **395**, 125-6.

Parker SB, Eichele G, Zhang P, Rawls A, Sands AT, Bradley A, Olson EN, Harper JW, Elledge SJ. p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science.* 1995 Feb 17;**267**(5200):1024-7.

Peifer, M. and Polakis, P. (2000). Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis- a look outside the nucleus. *Science.* 287, 1606-9.

Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, Piwnica-Worms H. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*. 1997 Sep 5;**277**(5331):1501-5.

Pennington, K. N., Taylor, J. A., Bren, G. D., and Paya, C. V. I κ B kinase-dependent chronic activation of NF- κ B is necessary for p21(WAF1/Cip1) inhibition of differentiation-induced apoptosis of monocytes. *Mol. Cell. Biol.*, 21: 1930 – 1941,2001.

Pindzola JA, Palazzo JP, Kovatich AJ, Tuma B, Nobel M. Expression of p21^{WAF1/CIP1} in soft tissue sarcomas: a comparative immunohistochemical study with p53 and Ki-67. *Pathol Res Pract*. 1998;**194**:685–691.

Pinney DF, Emerson CP Jr. 10T1/2 cells: an in vitro model for molecular genetic analysis of mesodermal determination and differentiation. *Environ Health Perspect*. 1989 Mar;**80**:221-7.

Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simmon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell*. 1983 **47**: 323–30.

Polyak, K., Waldman, T., He, T. C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes Dev.*, **10**: 1945 – 1952,1996.

Prabhu NS, Somasundaram K, Tian H, Enders GH, Satyamoorthy K, Herlyn M, El-Deiry WS. The administration schedule of cyclin-dependent kinase inhibitor gene therapy and etoposide chemotherapy is a major determinant of cytotoxicity. *Int J Oncol*. 1999 Aug;**15**(2):209-16.

Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., Bar-Sagi, D. (2011). RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer*. **11**, 761-774.

Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A., Sherr, C.J. (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell*. **83**, 993-100.

Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*. 2011 Feb 21;**192**(4):547-56.

Roninson IB. Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett*. 2002 May 8;**179**(1):1-14.

Rosato RR, Almenara JA, Grant S. The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1 1. *Cancer Res*. 2003 Jul 1;**63**(13):3637-45.

Rosenbluth, J.M. and Pietenpol, J.A. (2008). The jury is in: p73 is a tumor suppressor after all. *Genes Dev.* **22**, 2591-5.

Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlet-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin DJ. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics.* 2004 Dec;**3**(12):1154-69.

Sabisz M, Skladanowski A. Modulation of cellular response to anticancer treatment by caffeine: inhibition of cell cycle checkpoints, DNA repair and more. *Curr Pharm Biotechnol.* 2008 Aug;**9**(4):325-36.

Saha P, Eichbaum Q, Silberman ED, Mayer BJ, Dutta A. p21^{CIP1} and Cdc25A: competition between an inhibitor and an activator of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol.* 1997;**17**:4338–4345.

Saporita, A.J., Maggi, L.B. Jr., Apicelli, A.J., Weber, J.D. (2007). Therapeutic targets in the ARF tumor suppressor pathway. *Curr Med Chem.* **14**, 1815-27.

Saporita AJ, Chang HC, Winkeler CL, Apicelli AJ, Kladney RD, Wang J, Townsend RR, Michel LS, Weber JD. RNA helicase DDX5 is a p53-independent target of ARF that participates in ribosome biogenesis. *Cancer Res.* November 2011, **71**:21 6708-6717.

Sarbia M, et al. Expression of p21^{WAF1} predicts outcome of esophageal cancer patients treated by surgery alone or by combined therapy modalities. *Clin Cancer Res.* 1998;**4**:2615–2623.

Satyanarayana A, Hilton MB, Kaldis P. p21 Inhibits Cdk1 in the absence of Cdk2 to maintain the G1/S phase DNA damage checkpoint. *Mol Biol Cell.* 2008 Jan;**19**(1):65-77.

Savic-Radojevic, A., Mimic-Oka, J., Pljesa-Ercegovac, M., Opacic, M., Dragicevic, D., Kravic, T., Djokic, M., Micic, S., Simic, T. (2007). Glutathione S-transferase-P1 expression correlates with increased antioxidant capacity in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur Urol.* **52**, 470-7.

Schmid P, Lorenz A, Hameister H, Montenarh M. Expression of p53 during mouse embryogenesis. *Development.* 1991 Nov;**113**(3):857-65.

Schramek, D., Kotsinas, A., Meixner, A., Wada, T., Elling, U., Pospisilik, J.A., Neely, G.G., Zwick, R.H., Sigl, V., Forni, G., Serrano, M., Gorgoulis, V.G., Penninger, J.M. (2011). The stress kinase MKK7 couples oncogenic stress to p53 stability and tumor suppression. *Nat Genet.* **43**, 212-9.

Sengupta, S. and Harris, C.C. (2005). p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**, 44-55.

Serrano, M., H. Lee, L. Chin, C. Cordon-Cardo, D. Beach, and R. A. De-

Pinho. 1996. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* **85**:27–37.

Shaulian, E., Schreiber, M., Piu, F., Beeche, M., Wagner, E. F., and Karin, M. The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell*, **103**: 897 –907, 2000.

Shen, K.C., Heng, H., Wang, Y., Lu, S., Liu, G., Deng, C.X., Brooks, S.C., Wang, Y.A. (2005). ATM and p21 cooperate to suppress aneuploidy and subsequent tumor development. *Cancer Res.* **65**, 8747–8753.

Sherr, C.J. (2000). The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* **60**, 3689-95.

Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*. 2002 Aug;**2**(2):103-12.

Sherr, C.J. (2006). Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat Rev Cancer.* **6**, 663-73.

Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer.* 2003 Mar;**3**(3):155-68.

Shin, B. A., Ahn, K. Y., Kook, H., Koh, J. T., Kang, I. C., Lee, H. C., and Kim, K. K. Overexpressed human RAD50 exhibits cell death in a p21(WAF1/CIP1)-dependent manner: its potential utility in local gene therapy of tumor. *Cell Growth Differ.*, **12**:243–254,2001.

Shiohara M, el-Deiry WS, Wada M, Nakamaki T, Takeuchi S, Yang R, Chen DL, Vogelstein B, Koeffler HP. Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood*. 1994 Dec 1;**84**(11):3781-4.

Shiyanov P, et al. p21 disrupts the interaction between cdk2 and the E2F–p130 complex. *Mol Cell Biol*. 1996;**16**:737–744.

Sideridou, M. et al. Cdc6 expression represses E-cadherin transcription and activates adjacent replication origins. *J Cell Biol*. 195, 1123-1140 (2011).

Smits VA, Klompaker R, Vallenius T, Rijksen G, Mäkela TP, Medema RH. p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. *J Biol Chem*. 2000a Sep 29;**275**(39):30638-43.

Smits VA, Klompaker R, Arnaud L, Rijksen G, Nigg EA, Medema RH. Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nat Cell Biol*. 2000b Sep;**2**(9):672-6.

Sowa Y, Orita T, Hiranabe-Minamikawa S, Nakano K, Mizuno T, Nomura H, Sakai T. Histone deacetylase inhibitor activates the p21/WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;**886**:195-9.

- Stein, G. H., L. F. Drullinger, A. Soulard, and V. Dulic.** 1999. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 2109–2117.
- Steinman RA, Hoffman B, Iro A, Guillouf C, Liebermann DA, el-Houseini ME.** Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. *Oncogene*. 1994 Nov;**9**(11):3389-96.
- Steinman RA, Johnson DE.** p21WAF1 prevents down-modulation of the apoptotic inhibitor protein c-IAP1 and inhibits leukemic apoptosis. *Mol Med*. 2000 Sep;**6**(9):736-49.
- Stengel, K. and Zheng, Y.** (2011). Cdc42 in oncogenic transformation, invasion, and tumorigenesis. *Cell Signal*. **23**, 1415-23.
- Sugimoto, M., Kuo, M.L., Roussel, M.F., Sherr, C.J.** (2003). Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing. *Mol Cell*. **11**, 415-24.
- Tago, K., Chiocca, S., Sherr, C.J.** (2005). Sumoylation induced by the Arf tumor suppressor: a p53-independent function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**, 7689-94.
- Takahashi S, Fusaki N, Ohta S, Iwahori Y, Iizuka Y, Inagawa K, Kawakami Y, Yoshida K, Toda M.** Downregulation of KIF23 suppresses glioma proliferation. *J Neurooncol*. 2012 Feb;**106**(3):519-29.
- Takeda, K. and Akira, S.** (2000). STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev*. **11**, 199-207.
- Takubo K, Ohmura M, Azuma M, Nagamatsu G, Yamada W, Arai F, Hirao A, Suda T.** (2008). Stem cell defects in ATM-deficient undifferentiated spermatogonia through DNA damage-induced cell-cycle arrest. *Cell Stem Cell*. **2**, 170-82.
- Tanaka H, Matsumura I, Ezoe S, Satoh Y, Sakamaki T, Albanese C, Machii T, Pestell RG, Kanakura Y.** E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF-kappaB activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination. *Mol Cell*. 2002 May;**9**(5):1017-29.
- Thornton, J.D., Silva, R.L., Martin, A.C., Skapek, S.X.** (2005). The Arf tumor suppressor regulates platelet-derived growth factor receptor beta signaling: a new view through the eyes of Arf(-/-) mice. *Cell Cycle*. **4**, 1316.
- Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Nishida E.** Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep*. 2002 Apr;**3**(4):341-8.
- Través, P.G., Luque, A., Hortelano, S.** (2012). Macrophages, inflammation, and tumor suppressors: ARF, a new player in the game. *Mediators Inflamm*. **2012**:568783.

Tsao, Y. P., Huang, S. J., Chang, J. L., Hsieh, J. T., Pong, R. C., and Chen, S. L. Adenovirus-mediated p21(WAF1/SDII/CIP1) gene transfer induces apoptosis of human cervical cancer cell lines. *J. Virol.*, **73**:4983–4990,1999.

Ueki T, Park JH, Nishidate T, Kijima K, Hirata K, Nakamura Y, Katagiri T. Ubiquitination and downregulation of BRCA1 by ubiquitin-conjugating enzyme E2T overexpression in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2009 Nov 15;**69**(22):8752-60.

Uhrbom L, Nistér M, Westermarck B. Induction of senescence in human malignant glioma cells by p16INK4A. *Oncogene.* 1997 Jul 31;**15**(5):505-14.

Ulanet, D.B. and Hanahan, D. (2010). Loss of p19(Arf) facilitates the angiogenic switch and tumor initiation in a multi-stage cancer model via p53-dependent and independent mechanisms. *PLoS One.* **5**(8):e12454.

Viale A, De Franco F, Orleth A, Cambiaghi V, Giuliani V, Bossi D, Ronchini C, Ronzoni S, Muradore I, Monestiroli S, Gobbi A, Alcalay M, Minucci S, Pelicci PG. Cell-cycle restriction limits DNA damage and maintains self-renewal of leukaemia stem cells. *Nature.* 2009 Jan 1;**457**(7225):51-6.

von Zglinicki T, Saretzki G, Ladhoff J, d'Adda di Fagagna F, Jackson SP. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev.* 2005 Jan;**126**(1):111-7.

Vrana, J. A., Decker, R. H., Johnson, C. R., Wang, Z., Jarvis, W. D., Richon, V. M., Ehinger, M., Fisher, P. B., and Grant, S. Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-XL, c-Jun, and p21CIP1, but independent of p53. *Oncogene*, **18**: 7016 –7025,1999.

Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature.* 1994 Jun 16;**369**(6481):574-8.

Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res.* 1995 Nov 15;**55**(22):5187-90.

Wang B, Elledge SJ. Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brca1/Brcc36 complex in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Dec 26;**104**(52):20759-63.

Wang Y, Blandino G, Givol D. Induced p21waf expression in H1299 cell line promotes cell senescence and protects against cytotoxic effect of radiation and doxorubicin. *Oncogene.* 1999 Apr 22;**18**(16):2643-9.

Wang, Y. A., Elson, A., and Leder, P. Loss of p21 increases sensitivity to ionizing radiation and delays the onset of lymphoma in ATM-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**:14590 –14595,1997.

- Warbrick E, Lane DP, Glover DM, Cox LS.** A small peptide inhibitor of DNA replication defines the site of interaction between the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1 and proliferating cell nuclear antigen. *Curr Biol.* 1995 Mar 1;**5**(3):275-82.
- Ward PS, Thompson CB.** Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell.* 2012 Mar 20;**21**(3):297-308.
- Warfel NA, El-Deiry WS.** 2013. p21WAF1 and tumorigenesis: 20 years after. *Curr Opin Oncol* **25**: 52-8.
- Weber, J.D., Jeffers, J.R., Reh, J.E., Randle, D.H., Lozano, G., Roussel, M.F., Sherr, C.J., Zambetti, G.P.** (2000). p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev.* 14, 2358-65.
- Wessely R.** Atherosclerosis and cell cycle: put the brakes on! critical role for cyclin-dependent kinase inhibitors. *JACC*, May 2010. **Vol. 55** (20).
- Wilhelm MT, Méndez-Vidal C, Wiman KG.** Identification of functional p53-binding motifs in the mouse wig-1 promoter. *FEBS Lett.* 2002 Jul 31;**524**(1-3):69-72.
- Winters ZE, et al.** Subcellular localisation of cyclin B, Cdc2 and p21^{WAF1/CIP1} in breast cancer. association with prognosis. *Eur J Cancer.* 2001;**37**:2405–2412.
- Winters ZE, Leek RD, Bradburn MJ, Norbury CJ, Harris AL.** Cytoplasmic p21^{WAF1/CIP1} expression is correlated with HER-2/neu in breast cancer and is an independent predictor of prognosis. *Breast Cancer Res.* 2003;**5**:R242–249.
- Xia W, Chen JS, Zhou X, Sun PR, Lee DF, Liao Y, Zhou BP, Hung MC.** Phosphorylation/cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 is associated with HER2/neu overexpression and provides a novel combination predictor for poor prognosis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2004 Jun 1;**10**(11):3815-24.
- Xiao H, Hasegawa T, Isobe K.** p300 collaborates with Sp1 and Sp3 in p21(waf1/cip1) promoter activation induced by histone deacetylase inhibitor. *J Biol Chem.* 2000 Jan 14;**275**(2):1371-6.
- Xiong Y, Zhang H, Beach D.** D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell.* 1992 Oct 30;**71**(3):505-14.
- Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D.** p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature.* 1993 Dec 16;**366**(6456):701-4.
- Xu, G. W., Nutt, C. L., Zlatescu, M. C., Keeney, M., Chin-Yee, I., and Cairncross, J. G.** Inactivation of p53 sensitizes U87MG glioma cells to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Cancer Res.*, **61**:4155–4159,2001.

Yan, Q., and Sage, E. H. Transforming growth factor- β 1 induces apoptotic cell death in cultured retinal endothelial cells but not pericytes: association with decreased expression of p21waf1/cip1. *J. Cell. Biochem.*, **70**:70–83,1998.

Yang, Z. Y., Perkins, N. D., Ohno, T., Nabel, E. G., and Nabel, G. J. The p21 cyclin-dependent kinase inhibitor suppresses tumorigenicity in vivo. *Nat. Med.*, **1**:1052–1056,1995.

Yang H, Ye D, Guan KL, Xiong Y. IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives. *Clin Cancer Res.* 2012 Oct 15;**18**(20):5562-71.

Yi, Y., Shepard, A., Kittrell, F., Mulac-Jericevic, B., Medina, D., Said, T.K. (2004). p19ARF determines the balance between normal cell proliferation rate and apoptosis during mammary gland development. *Mol Biol Cell.* 15, 2302-11.

Yim H, Erikson RL. Cell division cycle 6, a mitotic substrate of polo-like kinase 1, regulates chromosomal segregation mediated by cyclin-dependent kinase 1 and separase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Nov 16;**107**(46):19742-7.

Yu, D., Jing, T., Liu, B., Yao, J., Tan, M., McDonnell, T. J., and Hung, M. C. Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase. *Mol. Cell*, **2**:581–591,1998.

Yucesoy, B., Johnson, V.J., Lummus, Z.L., Kissling, G.E., Fluharty, K., Gautrin, D., Malo, J.L., Cartier, A., Boulet, L.P., Sastre, J., Quirce, S., Germolec, D.R., Tarlo, S.M., Cruz, M.J., Munoz, X., Luster, M.I., Bernstein, D.I. (2012). Genetic variants in antioxidant genes are associated with diisocyanate-induced asthma. *Toxicol Sci.* **129**, 166-73.

Zhang H, Hannon GJ, Beach D. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev.* 1994 Aug 1;**8**(15):1750-8.

Zhang H, Xiong Y, Beach D. Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Biol Cell.* 1993 Sep;**4**(9):897-906.

Zhang W, et al. High levels of constitutive WAF1/Cip1 protein are associated with chemoresistance in acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res.* 1995a;**1**:1051–1057.

Zhang W, Grasso L, McClain CD, Gambel AM, Cha Y, Travali S, Deisseroth AB, Mercer WE. p53-independent induction of WAF1/CIP1 in human leukemia cells is correlated with growth arrest accompanying monocyte/macrophage differentiation. *Cancer Res.* 1995b Feb 1;**55**(3):668-74.

Zhang, W. and Liu, H.T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* **12**, 9–18.

Zhang Y, Fujita N, Tsuruo T. Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene*. 1999 Feb 4;**18**(5):1131-8.

Zhang H, Liao LH, Liu SM, Lau KW, Lai AK, Zhang JH, Wang Q, Chen XQ, Wei W, Liu H, Cai JH, Lung ML, Tai SS, Wu M. Microsomal glutathione S-transferase gene polymorphisms and colorectal cancer risk in a Han Chinese population. *Int J Colorectal Dis*. 2007a Oct;**22**(10):1185-94.

Zhang J, Wang S, Kern S, Cui X, Danner RL. Nitric oxide down-regulates polo-like kinase 1 through a proximal promoter cell cycle gene homology region. *J Biol Chem*. 2007b Jan 12;**282**(2):1003-9.

Zhao X, Jin S, Song Y, Zhan Q. Cdc2/cyclin B1 regulates centrosomal Nlp proteolysis and subcellular localization. *Cancer Biol Ther*. 2010 Nov 23;**10**(9):945-52.

Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol*. 2001 Mar;**3**(3):245-52.

Zhu L, Harlow E, Dynlacht B. D. p107 uses a p21^{CIP1}-related domain to bind cyclin/cdk2 and regulate interactions with E2F. *Genes Dev*. 1995;**9**:1740–1752.

Zhu H, Chang BD, Uchiumi T, Roninson IB. Identification of promoter elements responsible for transcriptional inhibition of polo-like kinase 1 and topoisomerase IIalpha genes by p21(WAF1/CIP1/SDI1). *Cell Cycle*. 2002 Jan;**1**(1):59-66.

Zindy, F., Quelle, D.E., Roussel, M.F., Sherr, C.J. (1997). Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene*. **15**, 203-11.

Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J., Roussel, M.F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev*. **12**, 2424-33.

Zindy, F., Williams, R.T., Baudino, T.A., Rehg, J.E., Skapek, S.X., Cleveland, J.L., Roussel, M.F., Sherr, C.J. (2003). Arf tumor suppressor promoter monitors latent oncogenic signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**, 15930-5.

Oulu University Library. Human DNA polymerase ϵ : Expression, phosphorylation and proteinproteininteractions> Chapter 2. Review of literature.

<http://herkules oulu.fi/isbn9514265815/html/i275971.html>

<http://www.heribert-hirt.info/publications.htm>

<http://www.dshs.state.tx.us>

<http://www.sigmaaldrich.com>

www.clontech.com

www.piercenet.com