



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθηγητής κ. Βασίλειος Γ. Γοργούλης

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Επίδραση μερικής και ολικής καταστολής του
διμερούς ARF-μονοπατιού απόκρισης στις
δικλωνικές θραύσεις του DNA στην εξέλιξη του
καρκίνου. Σημασία στη θεραπευτική προσέγγιση.**

Γεωργία Γ. Βελιμέζη

Μοριακή Βιολόγος

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ : Καθηγητής κ. Βασίλειος Γ. Γοργούλης

ΑΘΗΝΑ 2013

Στην οικογένειά μου

Στοιχεία Διδακτορικής Διατριβής

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Βασίλειος Γοργούλης (Επιβλέπων), Καθηγητής Ιστολογίας-Εμβρυολογίας

Μυρσίνη Κουλούκουσα, Αναπλ. καθηγήτρια Ιστολογίας-Εμβρυολογίας

Αθανάσιος Κοτσίνας, Επίκ. καθηγητής Ιστολογίας-Εμβρυολογίας

Μέλη 7μελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Αθανάσιος Τζιούφας, Καθηγητής Παθολογικής Φυσιολογίας

Βασίλειος Γοργούλης, Καθηγητής Ιστολογίας-Εμβρυολογίας

Μενέλαος Μανουσάκης, Αναπλ. Καθηγητής Παθολογικής Φυσιολογίας

Μυρσίνη Κουλούκουσα, Αναπλ. Καθηγήτρια Ιστολογίας-Εμβρυολογίας

Αθανάσιος Κοτσίνας, Επίκ. Καθηγητής Ιστολογίας-Εμβρυολογίας

Περικλής Φούκας, Επίκ. Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής

Θεόδωρος Τρουπής, Επίκ. Καθηγητής Περιγραφικής Ανατομικής

Ημερομηνία αρχικής αίτησης: 20-06-2007

Ημερομηνία ορισμού 3μελούς συμβουλευτικής επιτροπής: 10-10-2007

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 16-10-2008

Ημερομηνία τροποποίησης θέματος: 04-02-2009

Ημερομηνία κατάθεσης 1^{ης} προόδου: 28-05-2010


Ημερομηνία κατάθεσης 2^{ης} προόδου: 05-09-2011

Ημερομηνία κατάθεσης 3^{ης} προόδου: 24-04-2013

Ημερομηνία κατάθεσης Διατριβής : 24-04-2013

Ὁρκος του Ἱπποκράτη

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΜΛΛΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ· ΗΓΗΣΑΣΘ
ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΥΤΕΡΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
ΕΕΙΝ ΑΡΡΗΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΘΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΝΟ
ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ·
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ὈΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΗ, ΕΙΡΨΕΙΝ· ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ὈΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΪΟΝ ΔΩΣΩ· ΑΓΝΩΣ Δ
Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ· ΟΥ ΤΕΜΕΝ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
ΙΛΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
ΗΨΙΟΣ ΤΗΣΔΕ· ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ,
ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ὈΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ, Τ
ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ· Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ,
Η ΙΔΩ, Η ΔΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΤΗΣ ΚΑΤΑ Β
ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Δ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
ΙΑΥΤΑ· ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
Δ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
ΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ
ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

■

Βιογραφικό Σημείωμα

Προσωπικά Στοιχεία

Όνομα: Γεωργία

Επώνυμο: Βελιμέζη

Ημερομηνία γέννησης: 8 Ιουνίου 1984

Τόπος γέννησης: Χολαργός Αττικής

Υπηκοότητα: Ελληνική

Οικογενειακή κατάσταση: Άγαμη

Διεύθυνση οικίας: Βρυούλων 20

Πόλη: Νέα Ερυθραία, Αττική Τ.Κ. 14671

Χώρα: Ελλάδα

Στοιχεία επικοινωνίας:

Τηλέφωνο οικίας: 2106253958, κινητό: 6947276481

e-mail: giovel_8@hotmail.com

Εκπαίδευση-Σπουδές

- **Ιούλιος 2002:** Απολυτήριο Ενιαίου Λυκείου με βαθμό 19,4.
- **Μάρτιος 2007:** Απόκτηση Πτυχίου από Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης. Βαθμός Πτυχίου 8,08
- **Ιούνιος 2007-σήμερα:** Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στην ερευνητική Ομάδα Μοριακής Καρκινογένεσης (Υπεύθυνος: Βασίλειος Γοργούλης, Καθηγητής), Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Εργαστηριακή-Ερευνητική Εμπειρία

- **Μάρτιος 2006-Ιούλιος 2006:** Εκπόνηση Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας με τίτλο: "Role of nutrient metabolites on the NOS and COX pathways in the colorectal human cell line HT-29" στο Εργαστήριο Αγγειογένεσης του Τμήματος Φαρμακολογίας της Siena στην Ιταλία, στα

πλαίσια του προγράμματος Socrates/ Erasmus (Υπεύθυνη Καθηγήτρια: Professor Marina Ziche, MD, Department of Molecular Biology, University of Siena).

- **Ιούνιος 2007-σήμερα:** Παρακολούθηση, εκπαίδευση και απόκτηση εμπειρίας σε **Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας: Απομόνωση πρωτεϊνών και γενετικού υλικού από κύτταρα και δείγματα ιστού (φρέσκου ή παραφινωποιημένου, κολποτραχηλικό επίχρισμα) και πρωτεϊνών, ηλεκτροφόρηση DNA, RNA και πρωτεϊνών, ανοσοαποτύπωμα κατά Western (Western Blot), PCR, RT-PCR, Ανοσοϊστοχημεία, Ανοσοφθορισμός (Immunofluorescence), Ανοσοκατακρήμιση (Immunoprecipitation), Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (ChIP), κυτταροκαλλιέργειες** στο πλαίσιο εκπόνησης διδακτορικής διατριβής στην ερευνητική Ομάδα Μοριακής Καρκινογένεσης (Υπεύθυνος: Βασίλειος Γοργούλης, Καθηγητής), Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Επαγγελματική Προϋπηρεσία

- **Αύγουστος 2011-Δεκέμβριος 2011 (5 μήνες) και Φεβρουάριος 2012-Ιούνιος 2012 (5 μήνες):** Απασχόληση (σύμβαση εργασίας) ως ερευνήτρια (μέσω ΕΛΚΕ) στο ευρωπαϊκό πρόγραμμα INFLA-CARE (FP7) με επιστημονικό υπεύθυνο τον καθηγητή κ.Βασίλειο Γοργούλη.

Υποτροφίες

- Χορήγηση πεντάμηνης υποτροφίας από το ΙΚΥ (Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών) για την εκπόνηση διπλωματικής εργασίας στο πλαίσιο του προγράμματος Socrates/Erasmus για τη χρονική περίοδο 01-03-2006 έως 31-07-2006.
- Χορήγηση εξάμηνης υποτροφίας από την Ελληνική Εταιρεία Μοριακής Έρευνας του Καρκίνου για τη χρονική περίοδο 01-06-2010 έως 30-11-2010

Ξένες Γλώσσες

- ◆ **ΑΓΓΛΙΚΑ (Άριστα)**
Ιούνιος 2002: Certificate of Proficiency in English Grade A (Cambridge University)
- ◆ **ΓΑΛΛΙΚΑ (Επαρκώς)**
Ιούνιος 2000: Delf A1 (1er degree)
- ◆ **ΙΤΑΛΙΚΑ (Ικανοποιητικά)**
Απόκτηση εμπειρίας έπειτα από μαθήματα και πεντάμηνη παραμονή για σπουδές στη χώρα

Επιστημονικές Δημοσιεύσεις

1. Koutsami M, **Velimezi G**, Kotsinas A, Evangelou K, Papavassiliou AG, Kittas C, Gorgoulis VG. *“Is exclusive Skp2 targeting always beneficial in cancer therapy?”* Blood. 2008 Dec 1;112(12):4777-9.
2. Lontos M, Niforou K, **Velimezi G**, Vougas K, Evangelou K, Apostolopoulou K, Vrtel R, Damalas A, Kontovazenitis P, Kotsinas A, Zoumpourlis V, Tsangaris GT, Kittas C, Ginsberg D, Halazonetis TD, Bartek J, Gorgoulis VG. *“Modulation of the E2F1-driven cancer cell fate by the DNA damage response machinery and potential novel E2F1 targets in osteosarcomas.”* Am J Pathol. 2009 Jul;175(1):376-91.
3. Damalas A, **Velimezi G**, Kalaitzakis A, Lontos M, Papavassiliou AG, Gorgoulis V, Angelidis C. *“Loss of p14(ARF) confers resistance to heat shock- and oxidative stress-mediated cell death by upregulating β -catenin.”* Int J Cancer. 2011 Apr 15;128(8):1989-95. doi: 10.1002/ijc.25510.
4. Lontos M, **Velimezi G**, Pateras IS, Angelopoulou R, Papavassiliou AG, Bartek J, Gorgoulis VG. *“The roles of p27(Kip1) and DNA damage signaling in the chemotherapy-induced delayed cell cycle checkpoint.”* J Cell Mol Med. 2010 Aug 16. [Epub ahead of print].
5. **Velimezi G**, Lontos M, Vougas K, Roumeliotis T, Bartkova J, Sideridou M, Dereli-Oz A, Kocylowski M, Pateras IS, Evangelou K, Kotsinas A, Orsolich I, Bursac S, Cokaric-Brdovcak M, Zoumpourlis V, Kletsas D, Papafotiou G, Klinakis A, Volarevic S, Gu W, Bartek J, HalazonetisTD, Gorgoulis VG. *“Functional interplay between the DNA damage response kinase ATM and ARF tumour suppressor protein in human cancer”*. Accepted for publication in Nature Cell Biology Journal (May 2013).

Ευχαριστίες

Θα ήθελα καταρχάς να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου Καθηγητή κ. Βασίλη Γοργούλη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη την πορεία της διδακτορικής μου διατριβής και για την πολύτιμη στήριξη και καθοδήγησή του, χωρίς την οποία δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τον Επίκουρο καθηγητή κ. Αθανάσιο Κοτσίνα για τις χρήσιμες συμβουλές του και τη συμπαράστασή του και την Αναπληρώτρια καθηγήτρια κα Μυρσίνη Κουλούκουσα για την στήριξή της.

Ευχαριστώ πολύ, επίσης, τους συνεργάτες μου Δρ. Μιχάλη Λιόντο και Δρ. Μαρία Σιδερίδου για την πολύτιμη συνεργασία και στήριξη που μου παρείχαν σε όλη την πορεία εκπόνησης της διατριβής μου και τον καλό μου φίλο και συνάδελφο Παναγιώτη Γαλανό για την συνεργασία και την ηθική συμπαράσταση που μου προσέφερε.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους εκείνους οι οποίοι εργάστηκαν και συνέβαλαν στην πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας και σε όλα τα μέλη της ομάδας Μοριακής Καρκινογένεσης του Εργαστηρίου Ιστολογίας-Εμβρυολογίας για το κλίμα συνεργασίας και την παρέα που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια.

Πάνω από όλα, θα ήθελα να πω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, για την ηθική, ψυχολογική και οικονομική υποστήριξη που μου παρείχε όλο αυτό το διάστημα. Σε αυτούς αφιερώνω και την παρούσα διατριβή.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ τους φίλους μου και όλους τους ανθρώπους που ήταν πραγματικά δίπλα μου όλον αυτόν τον καιρό, σε εύκολες και δύσκολες στιγμές.

Ευχαριστώ επίσης την Ελληνική Εταιρεία Μοριακής Έρευνας του Καρκίνου για τη χορήγηση 6μηνης υποτροφίας.

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	19
ABSTRACT	21
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</u>	23
ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	23
1.1. Ο καρκίνος ως ασθένεια	25
1.1.1. Επιδημιολογικά στοιχεία	25
1.1.2 Φύση του καρκίνου	26
1.1.3. Κατάταξη καρκινικών όγκων με βάση την ιστολογική και εμβρυική προέλευση	27
1.1.4. Σταδιοποίηση καρκινικής εξέλιξης με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά	29
1.1.5. Καρκινογένεση-Αίτια και Μηχανισμός.	31
1.2. Μοριακοί μηχανισμοί του καρκίνου	33
1.2.1 Γονίδια που επηρεάζονται	34
1.2.2. Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων	36
1.3. Μονοπάτι απόκρισης σε βλάβες του DNA (DNA Damage Response, DDR pathway)	42
1.3.1. Ρόλος – Λειτουργία	42
1.3.2. Μονοπάτια απόκρισης σε δικλωνικές θραύσεις (DSB response pathway)	43
1.3.3. ATM κινάση	45
1.4. Ογκοκατασταλτική Πρωτεΐνη p14^{ARF}	49
1.4.1. p14 ^{ARF} : Γονίδιο	49
1.4.2. ARF: Δομή πρωτεΐνης	49
1.4.3. Έκφραση και επαγωγή της ARF	50
1.4.4. Ογκοκατασταλτική δράση και λειτουργία της ARF	51
1.4.5. ARF και NPM	53
1.4.6. Έκφραση της p14 ^{ARF} στον καρκίνο	55
1.5. Σχέση DDR και ARF	56
1.5.1 Ενεργοποίηση από ογκογονίδια (oncogenic stress)	56
1.5.2. Ρόλος της ARF στο DDR-Πιθανές αλληλεπιδράσεις με στοιχεία του μονοπατιού	58
1.6. ΣΤΟΧΟΣ	61
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</u>	63
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	63
2.1. Κύτταρα	65
2.1.1. Καλλιέργεια κυττάρων	65
2.1.2. Επιδράσεις	65

2.1.3. Αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης με CHX.....	66
2.1.4. Μέτρηση ρυθμού κυτταρικής ανάπτυξης.....	66
2.1.5. Δοκιμασία σχηματισμού αποικιών σε μαλακό άγαρ (Soft agar assay)	66
2.1.6. Παροδική Αποσιώπηση γονιδίων με τεχνολογία RNA interference (siRNA)	67
2.1.7. Μόνιμη αποσιώπηση γονιδίων σε σταθερές κυτταρικές σειρές.....	67
2.2. Ανάλυση πρωτεϊνών	68
2.2.1. Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα	68
2.2.2. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από παγωμένο ιστό	68
2.2.3. Απομόνωση ιστονών.....	68
2.2.4. Στύπωμα κατά Western ή Ανοσοαποτύπωση (Western Blot WB ή Immunoblot, IB).....	69
2.2.5. Ανοσοκατακρήμιση πρωτεϊνών (Immunoprecipitation, IP).....	71
2.2.6. Δοκιμασία ουβικιτίνης in vivo (in vivo ubiquitin assay).....	72
2.2.7. Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP).	73
2.2.8. Διαχωρισμός πρωτεϊνικών κλασμάτων πυρηνίσκου και πυρηνοπλάσματος από κύτταρα....	74
2.2.9. Αναλύσεις Πρωτεομικής	75
2.3. Τεχνικές in situ	76
2.3.1. Ανοσοφθορισμός in situ (Immunofluorescence, IF)	76
2.3.2. Ανοσοϊστοχημεία (Immunohistochemistry, IHC).....	76
2.4. Αντισώματα	79
2.4.1. Αντισώματα για Ανοσοαποτύπωση (IB):	79
2.4.2. Αντισώματα για ανοσοκατακρήμιση (IP):.....	80
2.4.3. Αντισώματα για Ανοσοϊστοχημεία (IHC):	81
2.4.4. Αντισώματα για ανοσοφθορισμό (IF):.....	81
2.4.5. Αντίσωμα για Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (ChIP):	82
2.5. Πλασμιδιακοί φορείς και διαμολύνσεις	82
2.5.1. Διαμόλυνση κυττάρων με πλασμίδια	82
2.5.2. Διαμόλυνση κυττάρων Phoenix με ρετροϊικούς φορείς.....	82
2.5.3. Παραγωγή σωματιδίων λεντι-ιού (lentivirus).....	83
2.5.4. Ανάπτυξη και απομόνωση πλασμιδίων	85
2.6. Μεταλλαξιγένεση in vitro (Site-directed Mutagenesis) και αλληλούχιση DNA (Sequencing)....	86
2.7. Ανάλυση RNA.....	88
2.7.1. Απομόνωση RNA από κύτταρα RNeasy Mini Kit (Qiagen)	88
2.7.2. Υπολογισμός Συγκέντρωσης του RNA.....	89
2.7.3. Μέτρηση επιπέδων mRNA.....	89
2.7.4. Δοκιμασία μέτρησης υπομονάδων ριβοσωμικού RNA (Ribosome biogenesis assay).....	95
2.8. Ξενομοσχεύματα κυττάρων H1299 σε ποντίκια	97
2.9. Δείγματα ανθρώπινου ιστού	98
2.10. Στατιστική Ανάλυση	98
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3</u>	99

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... 99

3.1. Η έκφραση της ARF ρυθμίζεται αρνητικά από την ATM 101

- 3.1.1. Η αποσιώπηση της ATM οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης p14^{ARF} 101
- 3.1.2. Η ενεργοποίηση της ATM μέσω DDR προκαλεί μείωση των επιπέδων της p14^{ARF} 105
- 3.1.3. Η ATM ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση της ARF που επάγεται από ογκογονίδια. 107

3.2. Διερεύνηση του μηχανισμού αλληλεπίδρασης της ATM με την ARF 108

- 3.2.1. Μελέτη της επίδρασης της ATM κινάσης στο ρυθμό μεταγραφής του γονιδίου της p14ARF 109
- 3.2.2. Μελέτη της επίδρασης της ATM κινάσης στην σταθερότητα της πρωτεΐνης p14ARF 110
- 3.2.3. Αναζήτηση πιθανών στόχων της ATM που σχετίζονται με την ρύθμιση της σταθερότητας της p14^{ARF} 113
- 3.2.4. Η ATM επηρεάζει τη σταθερότητα της p14ARF μέσω διαταραχής του συμπλόκου NPM-ARF 115
- 3.2.5. Η ATM επηρεάζει την διασύνδεση μεταξύ p14^{ARF} και NPM/B23 μέσω αλλαγής στη φωσφορυλίωση της NPM/B23. 119
- 3.2.6. Η ATM μειώνει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της NPM/B23 και τα επίπεδα της p14^{ARF} μέσω ενεργοποίησης της φωσφατάσης PP1..... 120
- 3.2.7. Η αναστολή της ATM ενισχύει τη σταθερότητα της p14^{ARF} μέσω ενεργοποίησης της κινάσης Nek2. 123
- 3.2.8. Προσδιορισμός των θέσεων φωσφορυλίωσης της NPM/B23 που παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της p14^{ARF} από την ATM..... 124

3.3. Μελέτη της πιθανής λειτουργικής σημασίας της αύξησης της ARF στην καρκινική εξέλιξη 129

- 3.3.1. Επίδραση της αύξησης της p14^{ARF} μέσω της αναστολής της ATM στη σύνθεση πρωτεϊνών. 129
- 3.3.2. Επίδραση της αύξησης της p14ARF μετά από αναστολή της ATM στην ανάπτυξη των κυττάρων..... 134

3.4. Διερεύνηση *in vivo* ενδείξεων που επιβεβαιώνουν την αλληλεπίδραση μεταξύ της ATM και της p14^{ARF} 137

- 3.4.1. Μελέτη του μονοπατιού αλληλεπίδρασης ATM-ARF και της σημασίας του *in vivo* σε καρκινικά δείγματα ασθενών. 138
- 3.4.2. Μελέτη του μονοπατιού αλληλεπίδρασης ATM-ARF και της σημασίας του *in vivo* σε ξενομοσχεύματα καρκινικών κυττάρων σε ποντίκια..... 141

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 145

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... 145

4.1. Καινοτομία της παρούσας έρευνας 147

4.2. Συμβολή στην πρόοδο του διεθνούς σχετικού επιστημονικού πεδίου και στην προϋπάρχουσα βιβλιογραφία 147

4.3. Ρόλος στον ανθρώπινο καρκίνο..... 149

4.4. Ρόλος σε πειραματικά μοντέλα καρκινογένεσης σε ποντίκια 150

4.5. Σημασία στη θεραπευτική προσέγγιση..... 150

4.6. Τελικό Συμπέρασμα 151

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... 153

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μονοπάτι απόκρισης σε βλάβες του DNA (**D**NA **D**amage **R**esponse, **DDR**) και η πρωτεΐνη **ARF** (**C**DKN2A/**A**lternative **R**eading **F**rame) λειτουργούν ανασταλτικά στην ανάπτυξη του καρκίνου. Η δράση του καθενός από τα δύο μοριακά μονοπάτια θεωρείται γενικά ότι είναι ανεξάρτητη από του άλλου. Ωστόσο, ορισμένες επιστημονικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η δράση της ARF ρυθμίζεται θετικά από το μονοπάτι DDR. Για τη διερεύνηση της υπόθεσης αυτής, πραγματοποιήθηκε σειρά πειραμάτων που περιελάμβαναν τη χρήση μοριακών τεχνικών όπως ανοσοαποτύπωσης, ανοσοϊστοχημείας, ανοσοφθορισμού, ανοσοκατακρήμνισης, αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο σε υλικό από κυτταροκαλλιέργειες και ιστολογικά δείγματα καθώς και τεχνητή έκφραση πρωτεϊνών σε κύτταρα με τη μέθοδο της διαμόλυνσης με πλασμιδιακούς φορείς, μέτρηση ωρίμανσης ριβοσωμικού RNA, αναλύσεις πρωτεωμικής και δημιουργία ξενομοσχευμάτων από ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα σε πειραματόζωα. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αποκάλυψαν την ύπαρξη ενός νέου μονοπατιού αλληλεπίδρασης μεταξύ της κινάσης του DDR μονοπατιού ATM και της πρωτεΐνης ARF και τον πιθανό ρόλο του μονοπατιού αυτού στην καρκινική εξέλιξη. Συγκεκριμένα, διαπιστώσαμε με ενδιαφέρον ότι η κινάση ATM του μονοπατιού DDR καταστέλλει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ARF, περιορίζοντας την δράση της, ανεξάρτητα από τα επίπεδα μεταγραφής της ARF. Η ενεργοποίηση της ATM προκαλεί ενεργοποίηση της φωσφατάσης PP1 (**P**rotein **P**hosphatase **1**), η οποία οδηγεί σε αποφωσφορυλίωση της NPM/B23 (**N**ucleo**p**hos**m**in) δρώντας ανταγωνιστικά ως προς τη φωσφορυλίωση της τελευταίας από την κινάση NEK2 (**N**ever in mitosis A-related **K**inase 2). Η αποφωσφορυλίωση της NPM/B23 έχει ως αποτέλεσμα την διάσπαση του συμπλόκου της NPM/B23 με την ARF. Καθώς η NPM/B23 προστατεύει την ARF από αποικοδόμηση, ο διαχωρισμός των δύο πρωτεϊνών και η απελευθέρωση της ARF την καθιστά ευάλωτη στην αποικοδόμηση από την E3 λιγάση ULF (**U**biquitin **L**igase for **ARF**). Σε κλινικά δείγματα ασθενών καρκίνου του πνεύμονα, η απώλεια της ATM εμφανίζει συσχέτιση με αυξημένα επίπεδα της ARF, ενώ και σε μοντέλα ξενομοσχευμάτων σε ποντίκια και σε κυτταρικά μοντέλα, η αναστολή της ATM οδήγησε σε ενίσχυση της

ογκοκατασταλτική δράση της ARF. Η σημασία του μηχανισμού αυτού μπορεί να αξιοποιηθεί στη θεραπευτική προσέγγιση για όγκους στους οποίους η απώλεια της p53 καθιστά την ενεργοποίηση του DDR μονοπατιού ευνοϊκή για την εξέλιξη του καρκίνου, καθώς απουσιάζει ο βασικός τελεστής για την ενεργοποίηση των αντικαρκινικών φραγμών της απόπτωσης και της γήρανσης. Σε ένα τέτοιο περιβάλλον όγκου, η αναστολή του μονοπατιού DDR μέσω αναστολής της ATM μπορεί να προωθήσει, σύμφωνα με τον προαναφερθέντα μηχανισμό, τις ογκοκατασταλτικές δράσεις της ARF συμβάλλοντας στην καταπολέμηση του καρκίνου.

ABSTRACT

The DNA damage response (DDR) pathway and ARF function act as barriers of human cancer development. It has been considered that the DDR and ARF exert this function independently of each other. However, a few studies propose that ARF's activity is positively regulated by the DDR pathway. Examining this hypothesis we performed a series of experiments using molecular techniques such as immunoblotting, immunohistochemistry, immunofluorescence, immunoprecipitation, Real Time Reverse Transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in biological material from cell culture or histological samples, as well as ectopic protein expression through plasmid transfections, proteomic analyses, ribosome RNA biogenesis assay and xenografts of human cancer cells. We surprisingly found that ATM suppressed, in a transcription-independent manner, ARF protein levels and activity. Specifically, ATM activated protein phosphatase 1 (PP1). PP1 antagonized Nek2-dependent phosphorylation of nucleophosmin (NPM), liberating ARF from NPM and rendering it susceptible to degradation by the UBF E3-ubiquitin ligase. In human clinical samples, loss of ATM expression correlated with increased ARF levels and in xenograft and tissue culture models, inhibition of ATM stimulated the tumour-suppressive effects of ARF. The importance of the proposed mechanism can be exploited through a therapeutic approach, especially in cases of tumours bearing loss of p53. In such tumours, DDR may act in favour of the tumour cells, since the major effector of the anti-tumour barriers of apoptosis and senescence is absent, but ATM inhibition could boost ARF's tumour-suppressive function, contributing to an anti-tumour response.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1.1. Ο καρκίνος ως ασθένεια

1.1.1. Επιδημιολογικά στοιχεία

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως, καταλαμβάνοντας την δεύτερη θέση μετά τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Σημαντικές διαφορές ως προς τις σχετικές συχνότητες εμφάνισης και θνησιμότητας διαφορετικών μορφών καρκίνου υπάρχουν μεταξύ διαφορετικών ηπειρών και χωρών. Οι διαφορές αυτές οφείλονται εν μέρει σε γενετικούς παράγοντες, πολύ σημαντικό ρόλο ωστόσο διαδραματίζει ο τρόπος ζωής, το εξωτερικό περιβάλλον καθώς και οι υπάρχουσες δυνατότητες έγκαιρης διάγνωσης και εξελιγμένης θεραπείας που συνδέονται άμεσα με το βαθμό ανάπτυξης κάθε χώρας. Για το λόγο αυτό, παρατηρούμε αύξηση των περιστατικών εμφάνισης συγκεκριμένων μορφών καρκίνου, όπως ο καρκίνος του μαστού ή του πνεύμονα σε υπό ανάπτυξη χώρες οι οποίες σταδιακά υιοθετούν τον δυτικό τρόπο ζωής (κάπνισμα, υπερκατανάλωση αλκοόλ, κακή διατροφή, έλλειψη άσκησης) ενώ από την άλλη μεριά, παρατηρείται μία σχετική μείωση στους δείκτες θνησιμότητας λόγω κάποιων μορφών όπως ο καρκίνος του μαστού ή του παχέος εντέρου, λόγω πιο έγκαιρης διάγνωσης και πιο εξελιγμένης θεραπείας.

Σύμφωνα με τα επίσημα στατιστικά στοιχεία της Διεθνούς Επιτροπής για την έρευνα του καρκίνου (International Agency for Research on Cancer, IARC) ([1]ref Global Cancer Statistics), ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η πιο συχνή μορφή καρκίνου στον αντρικό πληθυσμό και η τέταρτη πιο συχνή στο γυναικείο πληθυσμό, αποτελώντας το 13% των συνολικών περιστατικών καρκίνου παγκοσμίως. Παράλληλα το ποσοστό θνησιμότητας από καρκίνο του πνεύμονα είναι 18% παγκοσμίως, καθιστώντας τον μία από τις πιο σημαντικές αιτίες θανάτου από καρκίνο, πρώτη στον ανδρικό πληθυσμό και δεύτερη στο γυναικείο. Βασικός περιβαλλοντικός παράγοντας που έχει συνδεθεί άμεσα με την δραματική αύξηση των κρουσμάτων καρκίνου του πνεύμονα τις τελευταίες δεκαετίες είναι το κάπνισμα. Το υψηλό ποσοστό θνησιμότητας οφείλεται εν μέρει στην αδυναμία μεθόδων διάγνωσης του καρκίνου του πνεύμονα σε αρχικό στάδιο και στον ασυμπτωματικό χαρακτήρα της νόσου.

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την πιο συχνή μορφή και την κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο στο γυναικείο πληθυσμό με ποσοστά εμφάνισης και θνησιμότητας 23% και 14%. Η αύξηση των κρουσμάτων καρκίνου του μαστού παγκοσμίως και ιδιαίτερα στις αναπτυγμένες χώρες έχει συνδεθεί με την χρήση ορμονικής θεραπείας μετά την εμμηνόπαυση καθώς και με συνήθειες του δυτικού τρόπου ζωής όπως το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, η έλλειψη άσκησης και η μεγάλη ηλικία ή και αποφυγή τεκνοποίησης. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχει υπάρξει μία μικρή μείωση του ποσοστού θνησιμότητας από καρκίνο του μαστού που οφείλεται κυρίως στη δυνατότητα έγκαιρης διάγνωσης που παρέχουν τα διαγνωστικά τεστ και η καθιέρωση τους ως πρακτική πρόληψης καθώς και στην εξέλιξη της εφαρμοζόμενης θεραπείας.

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί την τρίτη πιο συχνή μορφή αιτία καρκίνου παγκοσμίως στον ανδρικό πληθυσμό και δεύτερη στο γυναικείο. Η εμφάνισή του σχετίζεται με την υιοθέτηση δυτικών διατροφικών συνηθειών, παχυσαρκία και κάπνισμα γι' αυτό και η συχνότητα εμφάνισής του αυξάνεται ραγδαία σε λιγότερο αναπτυγμένες χώρες, ενώ στις πιο ανεπτυγμένες η έγκαιρη διάγνωση, η κινητοποίηση για τακτικούς ελέγχους του πληθυσμού και η εφαρμογή βελτιωμένης θεραπείας οδήγησε σε μείωση του ποσοστού θνησιμότητας τα τελευταία χρόνια.

Άλλες μορφές καρκίνου εμφανίζουν μικρότερα ποσοστά εμφάνισης και θνησιμότητας παγκοσμίως, με τάσεις αύξησης ή μείωσης ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος.

Παρ' όλη την πρόοδο που έχει σημειωθεί στον προσδιορισμό των μηχανισμών καρκινογένεσης, την ανάπτυξη νέων φαρμάκων ή βελτιωμένης συνδυαστικής θεραπείας και στις μεθόδους έγκαιρης διάγνωσης η συχνότητα εμφάνισης και θανάτου από καρκίνο παραμένει υψηλή, λόγω και της αύξησης του μέσου όρου ζωής αλλά και της υιοθέτησης του δυτικού τρόπου ζωής και επιβαρυντικών συνηθειών από ολοένα και περισσότερες κοινωνίες του πλανήτη.

1.1.2 Φύση του καρκίνου

Ο καρκίνος είναι μία ασθένεια η παθογένεια της οποίας περιλαμβάνει σαν βασικό χαρακτηριστικό τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων με αποτέλεσμα τη

δημιουργία κυτταρικών μαζών οι οποίες εμφανίζουν ανώμαλη μορφολογία και οργάνωση. Αν και αρχικά επικρατούσε η άποψη ότι οι καρκινικοί όγκοι ήταν το αποτέλεσμα μιας μόλυνσης του οργανισμού με κάποιον άγνωστο, ξένο προς το ανθρώπινο σώμα παράγοντα, στα τέλη του 19^{ου} αιώνα, οπότε έγινε δυνατή η ιστολογική παρατήρηση τομών από ανθρώπινο ιστό με μικροσκόπιο, έγινε κατανοητό ότι οι καρκινικοί όγκοι αποτελούνταν επίσης από κύτταρα όπως και οι φυσιολογικοί ιστοί, εμφάνιζαν όμως αλλοιωμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Αυτή η παρατήρηση, σε συνδυασμό με τη συνειδητοποίηση ότι όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού προέρχονται από το πρώτο εμβρυϊκό κύτταρο, έθεσαν τις βάσεις για την ανάπτυξη μίας νέας θεωρίας σύμφωνα με την οποία τα καρκινικά κύτταρα προέρχονταν από τα φυσιολογικά κύτταρα του πάσχοντος ατόμου. Η οργάνωση και η μορφολογία των καρκινικών όγκων εμφάνιζε αρκετές ομοιότητες με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό και έμοιαζαν περισσότερο με μία μη φυσιολογική οργάνωση και μορφολογία των φυσιολογικών κυττάρων παρά με κάτι ξένο προς αυτά. Η θεωρία αυτή επιβεβαιώθηκε και αργότερα με την χρήση γενετικών μαρτύρων και δεικτών που έδειχναν ότι σε πολλές περιπτώσεις, το γενετικά χαρακτηριστικά των κυττάρων ενός όγκου (π.χ. η κατάσταση ενός αλληλομόρφου για έναν συγκεκριμένο γενετικό τόπο) ήταν ίδια με αυτά των φυσιολογικών κυττάρων του ίδιου οργανισμού [2].

1.1.3. Κατάταξη καρκινικών όγκων με βάση την ιστολογική και εμβρυϊκή προέλευση

Ανάλογα με το εμβρυϊκό δερματικό στρώμα από το οποίο προέρχονται τα κύτταρα που τους απαρτίζουν, οι καρκινικοί όγκοι διακρίνονται σε **ενδοδερμικής** προέλευσης (γαστροεντερικής οδού, πνεύμονα, παγκρέατος, ήπατος, χοληδόχου κύστεως, ουροδόχου κύστεως), **μεσοδερμικής** προέλευσης (αίματος, συνδετικού ιστού, ωθηκών) και **εξωδερμικής** προέλευσης (δέρματος, νευρικού ιστού)[2, 3]

Με βάση τη μορφολογία των κυττάρων που τους απαρτίζουν και τον ιστό από τον οποίο προέρχονται, οι καρκινικοί όγκοι διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

1. Επιθηλιακούς ή **καρκινώματα**, οι οποίοι προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα και διακρίνονται περαιτέρω σε αυτούς που προέρχονται από **πλακώδη κύτταρα**, τα κύτταρα δηλαδή που δημιουργούν το προστατευτικό

στρώμα των κοιλιοτήτων και αυλών του σώματος ή μεταξύ του οργανισμού και του περιβάλλοντος όπως το δέρμα και σε **αδενοκαρκινώματα** που προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα που επιπροσθέτως εκκρίνουν ένα προστατευτικό στρώμα βλέννας (όπως π.χ. το επιθήλιο του στομάχου και του πνεύμονα). Τα καρκινώματα συνολικά αποτελούν την πλειοψηφία των καρκινικών όγκων και περιλαμβάνουν όγκους που προέρχονται από κύτταρα με προέλευση και από τα τρία εμβρυικά στρώματα (ενδόδερμα, μεσόδερμα και εξώδερμα)

2. Οι όγκοι μη-επιθηλιακής προέλευσης που περιλαμβάνουν:

- Τα **σαρκώματα**, που προέρχονται από κύτταρα μεσεγχυματικού τύπου (ινοβλάστες, οστεοβλάστες, μυοκύτταρα, λιποκύτταρα) και μεσοδερματικής προέλευσης που σχηματίζουν διάφορους τύπους συνδετικού και υποστηρικτικού ιστού και περιλαμβάνουν αντίστοιχα ινοβλαστώματα, οστεοσαρκώματα, μυοσαρκώματα και λιποσαρκώματα).
- Τις **κακοήθεις παθήσεις του αιμοποιητικού**, που προέρχονται από κύτταρα του αιμοποιητικού και ανοσοποιητικού συστήματος και διακρίνονται περαιτέρω σε λευχαιμίες που προέρχονται από κύτταρα της κυκλοφορίας του αίματος, πρόδρομα ερυθροκύτταρα, πρόδρομα B- και T-λεμφοκύτταρα, κύτταρα του μυελού των οστών και σε λεμφώματα που προέρχονται από B- και T-λεμφοκύτταρα τα οποία σχηματίζουν συνήθως συμπαγείς μάζες στους λεμφικούς αδένες.
- Τους όγκους **νευροεξωδερμικής** προέλευσης που προέρχονται από κύτταρα του νευρικού συστήματος και περιλαμβάνουν γλοιώματα, γλοιοβλαστώματα, νευροβλαστώματα κ.α.

Υπάρχουν, ωστόσο, και κάποιες μορφές όγκων που δεν εμπίπτουν στις παραπάνω κατηγορίες, όπως το μελάνωμα που προέρχεται από έναν ειδικό τύπο κυττάρων, τα μελανοκύτταρα και ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, που αποτελείται από κύτταρα που παρουσιάζουν ανάμεικτα χαρακτηριστικά επιθηλιακών και ενδοκρινικών κυττάρων.

Μία ιδιαίτερη επίσης κατηγορία όγκων είναι οι **αναπλαστικοί**, των οποίων τα κύτταρα φαίνεται να έχουν αποδιαφοροποιηθεί σε τέτοιο βαθμό, ώστε να είναι αδύνατος ο προσδιορισμός του ιστού προέλευσής τους.

1.1.4. Σταδιοποίηση καρκινικής εξέλιξης με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά

Όπως γίνεται κατανοητό, παρά το μεγάλο εύρος διαφορετικών μορφών καρκίνου, όλοι μοιράζονται ένα κοινό χαρακτηριστικό: όλοι προέρχονται από κύτταρα κάποιου φυσιολογικού ιστού. Εφόσον τα καρκινικά κύτταρα προέρχονται από φυσιολογικά, θα πρέπει να μεσολαβεί μία διαδικασία μετατροπής ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται **καρκινικός μετασχηματισμός** ή **καρκινογένεση**, ενώ διαφορετικά στάδια και βαθμοί επιθετικότητας φαίνεται ότι μεσολαβούν μεταξύ ενός φυσιολογικού και ενός πλήρως καρκινικού ιστού. Επίσης, όλοι οι όγκοι δεν είναι καρκινικοί. Στην πραγματικότητα η πλειοψηφία των όγκων που εντοπίζονται στην κλινική πράξη είναι **καλοήθεις**. Αυτό σημαίνει ότι το μόνο μη φυσιολογικό χαρακτηριστικό είναι ο υπερβολικός πολλαπλασιασμός των κυττάρων με αποτέλεσμα τη δημιουργία μίας μάζας κυττάρων με φυσιολογικά όμως, κατά τα άλλα, μορφολογικά χαρακτηριστικά. Αντίθετα οι όγκοι που χαρακτηρίζονται ως **κακοήθεις** (καρκινικοί) εμφανίζουν και άλλα χαρακτηριστικά, που καθιστούν τα κύτταρα πιο επιθετικά και ικανά για διήθηση της βασικής μεμβράνης και μετάσταση.

Έτσι, ο πρώτος βαθμός αλλοίωσης περιλαμβάνει τις **υπερπλασίες**, κύριο χαρακτηριστικό των οποίων είναι ο αυξημένος, πέρα από το φυσιολογικό, αριθμός κυττάρων. Πέρα από τον υπερβολικό ρυθμό πολλαπλασιασμού και την αύξηση σε μέγεθος, ο υπερπλαστικός ιστός εμφανίζει φυσιολογική μορφολογία και οργάνωση και γι' αυτό χαρακτηρίζεται καλοήθης αλλοίωση-δεν απειλεί τη ζωή του ασθενούς, παρά μόνο αν είναι πολύ εκτεταμένη και πιέζει ζωτικό όργανο.

Μία ιδιαίτερη μορφή προκαρκινικής αλλοίωσης είναι η **μεταπλασία**, κατά την οποία ένας πληθυσμός κυττάρων αντικαθίσταται τοπικά από έναν πληθυσμό διαφορετικού κυτταρικού τύπου. Παρόλο που ο νέος ιστός εμφανίζει φυσιολογική δομή και οργάνωση η θέση στην οποία αναπτύσσεται δεν είναι φυσιολογική. Μεταπλασίες συνήθως παρατηρούνται σε σημεία εναλλαγής πλακώδους επιθηλίου

με αδενικό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα μεταπλασίας αποτελεί το σύνδρομο του οισοφάγου Barrett, όπου το φυσιολογικό πλακώδες επιθήλιο της κατώτερης περιοχής του οισοφάγου αντικαθίσταται από αδενικά επιθηλιακά κύτταρα που παρατηρούνται φυσιολογικά στο στομάχι.

Επόμενος βαθμός είναι η **δυσπλασία**. Εκτός από τον αυξημένο αριθμό και πολλαπλασιασμό των κυττάρων, οι δυσπλαστικές αλλοιώσεις χαρακτηρίζονται και από αλλοιωμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων, όπως ποικιλομορφία στο σχήμα και μέγεθος του πυρήνα, έντονη πυρηνική χρώση, αυξημένη αναλογία επιφάνειας πυρήνα προς επιφάνεια κυτταροπλάσματος, αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα. Επίσης στη δυσπλασία η αναλογία των διαφορετικών τύπων κυττάρων που απαρτίζουν το φυσιολογικό ιστό έχει διαταραχθεί. Στις δυσπλαστικές αλλοιώσεις περιλαμβάνονται, μεταξύ άλλων, τα αδενώματα και οι πολύποδες που παρατηρούνται π.χ. στο έντερο. Πρόκειται για μη φυσιολογικά αναπτυγμένες μάζες κυττάρων με αυξημένο μέγεθος και ποικιλία κυτταρικών τύπων. Οι δυσπλαστικές αλλοιώσεις, παρ' όλες τις μορφολογικές και ανατομικές διαταραχές, δεν αναπτύσσονται πέρα από τη βασική μεμβράνη που διαχωρίζει το επιθήλιο από το υποκείμενο στρώμα στηρικτικού ιστού και για το λόγο αυτό θεωρούνται καλοήθεις αλλά προκαρκινικές. Ανάλογα με το βαθμό και την έκταση των μορφολογικών αλλοιώσεων αλλά και το βαθμό διαφοροποίησης των κυττάρων, οι δυσπλασίες διακρίνονται σε περαιτέρω στάδια από χαμηλού έως υψηλού βαθμού. Οι πολύ υψηλού βαθμού δυσπλασίες αντιστοιχούν στον όρο **καρκίνωμα *in situ***, που θεωρείται ως το τελευταίο βήμα πριν την διάρρηξη της βασικής μεμβράνης από τον καρκινικό ιστό και επομένως μία μεταβατική κατάσταση μεταξύ καλοήθους και κακοήθους αλλοίωσης.

Το βασικό χαρακτηριστικό το οποίο διακρίνει τις κακοήθεις από τις καλοήθεις αλλοιώσεις είναι η ικανότητα των κυττάρων να περνούν τη βασική μεμβράνη και να εισβάλλουν στους παρακείμενους ιστούς. Έτσι, όταν στα χαρακτηριστικά των δυσπλαστικών κυττάρων προστίθεται η ικανότητα διήθησης της βασικής μεμβράνης και εισβολής στους παρακείμενους ιστούς, το καρκίνωμα ονομάζεται **διηθητικό** και θεωρείται πλέον κακοήθεια.

Το τελικό στάδιο κακοήθειας και πιο απειλητικό για τη ζωή του ασθενούς είναι ο **μεταστατικός** καρκίνος. Στο στάδιο αυτό, τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν τη

δυνατότητα να εισέρχονται στα αγγεία και στην κυκλοφορία του αίματος, να μεταφέρονται σε μακρινά, ως προς τον αρχικό όγκο, ανατομικά μέρη του σώματος, να εγκαθίστανται σε νέους ιστούς και να δημιουργούν εκεί νέους όγκους. Η δυνατότητα μετάστασης είναι μία πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί την απόκτηση πολλών και ιδιαίτερων χαρακτηριστικών από τα καρκινικά κύτταρα με τους σχετικούς μηχανισμούς να παραμένουν σε μεγάλο βαθμό ακόμα άγνωστοι.

Οι διαφορετικές μορφές και βαθμοί κακοήθειας που παρατηρούνται στην κλινική πράξη και διαγιγνώσκονται συνήθως με ιστολογική παρατήρηση και αξιολόγηση τμήματος του ιστού ενδεχομένως αντικατοπτρίζουν διαδοχικά στάδια μιας δυναμικής διαδικασίας εξέλιξης από το φυσιολογικό κύτταρο μέχρι το πλήρως μετασχηματισμένο καρκινικό κύτταρο, γι' αυτό και θεωρούνται συχνά ως προκαρκινικές αλλοιώσεις.

1.1.5. Καρκινογένεση-Αίτια και Μηχανισμός.

Η μελέτη των μηχανισμών που οδηγούν στην καρκινογένεση ξεκινάει φυσικά από την ανάλυση των παραγόντων που την προκαλούν. Ωστόσο, οι αιτιολογικοί παράγοντες του καρκίνου παρέμεναν για πολύ καιρό άγνωστοι.

Σποραδικές αναφορές και παρατηρήσεις, ωστόσο, ήδη από το δεύτερο μισό του 18^{ου} αιώνα οδήγησαν στην εμπειρική συσχέτιση της συχνότητας εμφάνισης συγκεκριμένων μορφών καρκίνου με την έκθεση σε ορισμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως του ρινικού καρκίνου με τον καπνό (1761), του καρκίνου του πνεύμονα με την εργασία σε ορυχεία αργύρου (1850) και αργότερα της εμφάνισης όγκων με την έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία (αρχές 20^{ου} αιώνα) ή με την υιοθέτηση συγκεκριμένου τρόπου ζωής όπως του καρκίνου του μαστού με την αποφυγή τεκνοποίησης σε γυναίκες μοναχές (1839) ή αργότερα του καρκίνου του πνεύμονα με το κάπνισμα (1950). Οι παρατηρήσεις, αυτές σε συνδυασμό με τη συνειδητοποίηση στις αρχές του 20^{ου} αιώνα ότι οι όγκοι αποτελούνται από κύτταρα που προέρχονται από τον ίδιο ιστό με τα φυσιολογικά, οδήγησαν στην άποψη ότι η δημιουργία των καρκινικών κυττάρων ήταν αποτέλεσμα σε μεγάλο βαθμό περιβαλλοντικών παραγόντων (έκθεση σε χημικά συστατικά, ακτίνες Χ, τρόπος ζωής)[2, 4].

Οι επιδημιολογικές μελέτες στα νεότερα χρόνια επιβεβαιώνουν τον πρωταρχικό ρόλο των περιβαλλοντικών παραγόντων και του τρόπου ζωής, αφού παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην εμφάνιση συγκεκριμένων μορφών καρκίνου σε πληθυσμούς που βρίσκονται σε διαφορετικές χώρες. Μάλιστα, σε πολλές περιπτώσεις η μετανάστευση κάποιων πληθυσμών είχε σαν αποτέλεσμα την προσαρμογή των δεικτών εμφάνισης συγκεκριμένων τύπων καρκίνου στις επόμενες γενιές στα ποσοστά που παρατηρούνται στη χώρα υποδοχής, γεγονός που ενισχύει την σημασία της επίδρασης των περιβαλλοντικών παραγόντων σε σχέση με αυτή της κληρονομικότητας. Φυσικά υπάρχουν και κληρονομικές μορφές καρκίνου, οι οποίες όμως αποτελούν μειοψηφία[1, 2].

Τα επόμενα χρόνια η έρευνα επικεντρώθηκε στη διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης των παραγόντων αυτών, οι οποίοι έμοιαζαν αρκετά ετερόκλητοι μεταξύ τους. Σημαντική πληροφορία στην προσπάθεια αυτή παρείχε η ανακάλυψη το 1927 ότι οι ακτίνες Χ προκαλούν μεταλλάξεις στο γονιδίωμα της *Drosophila Melanogaster*. Η ανακάλυψη αυτή σε συνδυασμό με τη μελέτη της μεταλλακτικής ικανότητας πολλών χημικών συστατικών μέχρι το 1950 έθεσε τις βάσεις για την θεώρηση της δημιουργίας μεταλλάξεων ως έναν πιθανό μηχανισμό καρκινογένεσης. Η ιδέα αυτή οδήγησε το 1975 στην δημιουργία του Ames Τεστ από τον Bruce Ames, ο οποίος για πρώτη φορά χρησιμοποίησε ένα τεστ ελέγχου της μεταλλαξιγένου ιδιότητας μιας ποικιλίας χημικών καρκινογόνων, δείχνοντας ότι σε πολλές περιπτώσεις τα καρκινογόνα χημικά είχαν και ικανότητα πρόκλησης μεταλλάξεων. Ωστόσο, όλοι οι καρκινογόνοι παράγοντες δεν είναι μεταλλαξιγόνοι υπονοώντας και άλλους μηχανισμούς καρκινογενετικής δράσης.

Παρόλη την πρόοδο, ωστόσο, μέχρι την ανακάλυψη της τεχνολογίας κλωνοποίησης και αλληλούχισης DNA στα τέλη της δεκαετίας 1970, η πληροφορία αυτή ήταν δύσκολο να αξιοποιηθεί καθώς ήταν αδύνατο να προσδιοριστούν τα γονίδια που τυχόν να μεταλλάσσονται κατά τη δημιουργία καρκίνου. Οι πρώτες πληροφορίες για τα γονίδια αυτά προήλθαν από ένα άλλο μέτωπο ερευνών με φαινομενικά μικρότερη σημασία για τον άνθρωπο: τη μελέτη όγκων που προκαλούνται από μία σειρά ρετροϊών σε ζώα. Οι μελέτες αυτές αποδείχθηκαν πολύ χρήσιμες αφού τα γονίδια των ιών αυτών αποδείχθηκε ότι ήταν, σε πολλές περιπτώσεις, ομόλογα με τα μεταλλαγμένα ανθρώπινα γονίδια που φέρουν ανθρώπινοι καρκινικοί όγκοι.

Στα χρόνια που ακολούθησαν, μελέτες του γενετικού υλικού των όγκων και πειράματα σε καρκινικά κύτταρα και μοντέλα ζώων στο εργαστήριο, οδήγησαν στην ανακάλυψη ενός μεγάλου φάσματος γονιδίων η έκφραση των οποίων εμφανίζεται διαταραγμένη στους όγκους. Με τον προσδιορισμό, μάλιστα των διαδικασιών και λειτουργιών στις οποίες εμπλέκονται τα προϊόντα πολλών από τα γονίδια αυτά, πραγματοποιήθηκε ένα πολύ σημαντικό βήμα στην προσπάθεια προσδιορισμού των καρκινογενετικών μηχανισμών. Ο εντοπισμός πολλών παραγόντων με καρκινογενετική δράση, η ανακάλυψη της μεταλλαξιγόνου ικανότητας πολλών καρκινογενετικών παραγόντων με συνέπεια τη συσχέτιση της καρκινογένεσης με αλλαγές στο γενετικό υλικό (DNA) του κυττάρου και η ανάπτυξη της τεχνολογίας που επέτρεψε την ανίχνευση και ταυτοποίηση πολλών μορίων με σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες και αλλοιωμένη έκφραση στον καρκίνο κατέστησαν δυνατή την περιγραφή σε μοριακό επίπεδο αρκετών μηχανισμών που μπορούν να συμβάλλουν στην καρκινογένεση.

1.2. Μοριακοί μηχανισμοί του καρκίνου

Ένας βασικός αλλά πολύ γενικός μηχανισμός δημιουργίας καρκινικών κυττάρων, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι οι αλλαγές λόγω μεταλλάξεων από εξωτερικούς παράγοντες στο γενετικό υλικό που φέρουν τα καρκινικά κύτταρα. Οι αλλαγές αυτές βέβαια, έστω και αν έχουν προκληθεί τυχαία -ορισμένες τουλάχιστον από αυτές- εμφανίζονται κατ' επανάληψη σε πολλούς όγκους, υποδεικνύοντας ότι οι αλλαγές αυτές είναι καθοριστικές για τον καρκινικό μετασχηματισμό και τη δημιουργία όγκου. Πράγματι, οι έρευνες σε μοριακό και γενετικό επίπεδο έδειξαν ότι η πλειοψηφία των γονιδίων που βρίσκονται αλλοιωμένα στον καρκίνο ελέγχουν και ρυθμίζουν κυτταρικές λειτουργίες που έχουν άμεση σχέση με τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων. Τέτοιες λειτουργίες αποτελούν ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και αύξηση, ο έλεγχος της κυτταρικής διαίρεσης, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (απόπτωση) και η γήρανση, η ανίχνευση και επιδιόρθωση βλαβών του DNA.

1.2.1 Γονίδια που επηρεάζονται

Τα γονίδια που επηρεάζονται περισσότερο από τις αλλοιώσεις του γενετικού υλικού διακρίνονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες [4, 5]:

1. **Ογκογονίδια (oncogenes).** Η αύξηση της έκφρασής τους (ενεργοποίηση) προωθεί την καρκινογένεση μέσω ενίσχυσης σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν σε αυξημένο και ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό ανεξάρτητα από την παρουσία των αντίστοιχων σημάτων. Η ανακάλυψή τους έγινε αρχικά στο γονιδίωμα ιών που είχαν την ικανότητα να προκαλούν όγκους σε ζώα, ενώ στη συνέχεια ομόλογά τους αλλά και νέα ογκογονίδια βρέθηκαν σε καρκίνους του ανθρώπου.

Οι μηχανισμοί ενεργοποίησης των ογκογονιδίων περιλαμβάνουν

- **Σημειακές μεταλλάξεις** (αρκεί η μετάλλαξη σε ένα αλληλόμορφο). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η το ογκογονίδιο Ras το οποίο φέρει μία μετάλλαξη σε μεγάλο ποσοστό καρκίνων παγκρέατος και παχέος εντέρου, η οποία καθιστά το μιτογόνο μονοπάτι στο οποίο συμμετέχει μόνιμα ενεργό, προωθώντας έτσι τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό.
- **Γονιδιακή ενίσχυση.** Αύξηση των αντιγράφων ενός γονιδίου ή μιας χρωμοσωμικής περιοχής που οδηγεί σε υπερέκφραση ογκογονιδίων. Οι περιοχές αυτές εντοπίζονται συνήθως λόγω της εμφάνισης ομοιογενών ζωνών χρώσης των χρωμοσωμάτων (Homogenous Staining Regions). Παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο HER2/neu το οποίο βρίσκεται συχνά ενισχυμένο στον καρκίνο του μαστού και συσχετίζεται με κακή πρόγνωση.
- **Χρωμοσωμική αναδιάταξη.** Περιλαμβάνει αμοιβαίες συνήθως μετατοπίσεις περιοχών μεταξύ διαφορετικών χρωμοσωμάτων μέσω ανασυνδυασμού, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή ακόμα και τη δημιουργία χιμαιρικών πρωτεϊνών με αλλοιωμένα χαρακτηριστικά. Είναι περισσότερο συχνές σε κακοήθειες του αιμοποιητικού, όπως λευχαιμίες και λεμφώματα, πιθανότατα εξαιτίας του αυξημένου ανασυνδυασμού που συμβαίνει στα κύτταρα

αυτά για την αναδιάταξη των αλυσίδων ανοσοσφαιρινών και τη δημιουργία διαφορετικών αντισωμάτων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το χρωμόσωμα της Philadelphia, το οποίο παρατηρήθηκε σε ασθενείς με Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία και προκαλείται από μια μετάθεση μεταξύ του γονιδίου BCR του χρωμοσώματος 22 και της κινάσης ABL του χρωμοσώματος 9. Η μετάθεση αυτή οδηγεί στην παραγωγή μιας χμαιρικής πρωτεΐνης (BCR-ABL) με αυξημένη ενεργότητα κινάσης.

2. ογκοκατασταλτικά γονίδια (tumour suppressor genes). Η έκφραση των γονιδίων αυτών παρατηρείται συχνά μειωμένη ή και εξαφανισμένη στον καρκίνο, επομένως η δράση τους λειτουργεί ως εμπόδιο στην καρκινογένεση. Συμμετέχουν συνήθως στα κυτταρικά μονοπάτια που ελέγχουν και ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και την αύξηση των κυττάρων, την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και την ενεργοποίηση προγραμμάτων απόπτωσης και γήρανσης.

Οι μηχανισμοί απενεργοποίησης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων περιλαμβάνουν:

- Σημειακές μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις αυτές συνήθως οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας της πρωτεΐνης ή σε απώλεια κάποιου τμήματος λόγω πρώιμου τερματισμού της μεταγραφής. Για την απώλεια λειτουργίας ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου απαιτείται συνήθως απώλεια και των δύο αλληλομόρφων. Οι σημειακές μεταλλάξεις είναι συχνότερες ως μηχανισμός απώλειας ογκοκατασταλτικών γονιδίων (απώλεια λειτουργία) παρά ως μηχανισμός ενεργοποίησης ογκογονιδίων (κέρδος λειτουργίας).
- Ελλείψεις (διαγραφή) γονιδίων ή ευρύτερων χρωμοσωμικών περιοχών. Η απώλεια ετεροζυγωτίας (απώλεια του ενός αλληλομόρφου) σε καρκινικά κύτταρα αποτελεί ισχυρή ένδειξη για την παρουσία ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου στην συγκεκριμένη περιοχή και είναι ένας χρήσιμος δείκτης για την ανίχνευση και ταυτοποίηση νέων ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

- Επιγενετική αποσιώπηση. Ορισμένα ογκοκατασταλτικά γονίδια εμφανίζουν αύξηση της μεθυλίωσης του υποκινητή τους στον καρκίνο με αποτέλεσμα την μείωση ή και απώλεια έκφρασής τους. Τέτοια περίπτωση αποτελούν το γονίδιο που κωδικοποιεί για αναστολέα κυτταρικού κύκλου p16INK4.

3. Τα γονίδια ελέγχου (“caretaker” genes). Τα γονίδια αυτά συνήθως συμμετέχουν σε μηχανισμούς που εξασφαλίζουν την ακεραιότητα του γονιδιώματος. Τα γονίδια αυτά συμμετέχουν συνήθως σε έναν από τους παρακάτω μηχανισμούς:

- Ανίχνευση βλαβών του DNA και ενεργοποίηση μονοπατιών επιδιόρθωσης (DNA Damage Response)
- Μηχανισμός επιδιόρθωσης βλαβών του DNA
- Μηχανισμός απενεργοποίησης ή εξουδετέρωσης παραγόντων που προκαλούν αλλοιώσεις του DNA.

Οι διαταραχές στην έκφραση αυτών των γονιδίων ουσιαστικά επιταχύνει τη διαδικασία απόκτησης νέων μεταλλάξεων και συμβάλλει στην ανάπτυξη γενωμικής αστάθειας (genomic instability).

1.2.2. Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων

Με τη διαλεύκανση πολλών μοριακών και γενετικών μηχανισμών που συμβάλλουν στην διαταραγμένη έκφραση γονιδίων και τον προσδιορισμό πολλών από τα γονίδια αυτά και τις λειτουργίες στις οποίες συμμετέχουν, κατέστη δυνατή η πιο λεπτομερής περιγραφή των βασικών χαρακτηριστικών και αλλαγών που αποκτούν τα καρκινικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της πολυσταδιακής διαδικασίας της καρκινογένεσης. Σύμφωνα λοιπόν με την πιο σύγχρονη και ολοκληρωμένη άποψη όπως διατυπώνεται από τους Hanahan και Weinberg με βάση τις ερευνητικές εξελίξεις και ευρήματα μέχρι το 2011 [5] (Σχ. 1), τα χαρακτηριστικά αυτά είναι τα εξής:

1. **Διατήρηση σήματος πολλαπλασιασμού.** Βασικό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων είναι ο απεριόριστος και συνεχής πολλαπλασιασμός.

Για να επιτευχθεί αυτό απαιτείται καταρχάς η απώλεια εξάρτησης από τα φυσιολογικά σήματα που ενεργοποιούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αύξηση υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Ο ένας τρόπος είναι η διαταραχή της παραγωγής των μιτογόνων σημάτων. Οι αντίστοιχοι μηχανισμοί, ωστόσο, είναι δύσκολο να μελετηθούν καθώς συχνά η παραγωγή των σημάτων αυτών γίνεται από παρακείμενα κύτταρα ή από το εξωκυττάριο στρώμα. Ο άλλος τρόπος, και πιο καλά μελετημένος μηχανισμός είναι η διαταραχή στην απόκριση του κυττάρου στο μιτογόνο σήμα, δηλαδή η διαταραχή των ενδοκυττάρων μιτογόνων μονοπατιών. Πολλά από τα ογκογονίδια προέρχονται από αλλοιώσεις των γονιδίων που συμμετέχουν σε αυτά τα μονοπάτια, είτε ως υποδοχείς σημάτων, είτε ως μεταγωγείς του σήματος, όπως το ογκογονίδιο *ras*.

2. Διαφυγή από την ρυθμιστική επίδραση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Εκτός από την συνεχή ενεργοποίηση των μονοπατιών αύξησης και πολλαπλασιασμού, απαιτείται και η απώλεια της ελεγκτικής και ρυθμιστικής λειτουργίας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια *rb* και *p53* τα οποία συμμετέχουν σε διαφορετικά μονοπάτια ελέγχοντας και περιορίζοντας των κυτταρικό πολλαπλασιασμό ανάλογα με την παρουσία ή όχι κατάλληλων σημάτων (Rb) ή ενεργοποιώντας μονοπάτια απόπτωσης και γήρανσης ανάλογα με την παρουσία και το βαθμό κυτταρικού stress (p53).

3. Ανθεκτικότητα στους μηχανισμούς απόπτωσης.

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή αλλιώς απόπτωση είναι ένας πολύ σημαντικός κυτταρικός μηχανισμός που ενεργοποιείται σε περιπτώσεις υπερβολικής αύξησης ορισμένων παραγόντων stress που υποδεικνύουν μη ομαλή λειτουργία του κυττάρου (π.χ. βλάβες του DNA, μειωμένα επίπεδα βασικών μεταβολιτών όπως αμινοξέων και νουκλεοτιδίων, μειωμένα επίπεδα σημάτων επιβίωσης). Η ενεργοποίηση της απόπτωσης εξασφαλίζει την απαλοιφή των κυττάρων με μεγάλο βαθμό αλλοιώσεων και διαταραχών και λειτουργεί, επομένως, ως ένας φραγμός στην καρκινογένεση. Τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται ότι αποφεύγουν την απόπτωση μέσω της απώλειας γονιδίων που ευθύνονται για την ενεργοποίησή της με κύριο

εκπρόσωπο τον μεταγραφικό παράγοντα p53 (απώλεια του οποίου παρατηρείται περίπου στους μισούς καρκίνους), μέσω της αυξημένης έκφρασης αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών (π.χ. Bcl2, Bcl-X_L, Bcl-w) ή της μειωμένης έκφρασης προαποπτωτικών πρωτεϊνών (π.χ. Bak, Bax, Bim, Noxa, Puma).

Σε αντίθεση με την απόπτωση ο **νεκρωτικός θάνατος** προάγει την καρκινογένεση, καθώς προκαλεί συνήθως την έκκληση παραγόντων φλεγμονής και σε ορισμένες φορές παραγόντων επιβίωσης.

Μία παρεμφερής διαδικασία που ενεργοποιείται ως απόκριση σε έλλειψη θρεπτικών συστατικών και οδηγεί σε κατανάλωση οργανιδίων και ανακυκλωση των μεταβολιτών του ίδιου του κυττάρου με σκοπό την επιβίωση αποτελεί η **αυτοφαγία**. Η αυτοφαγία, πιθανόν αποτελεί μία εναλλακτική της απόπτωσης επιλογής για το κύτταρο αφού έχει βρεθεί ότι μπορεί να ενεργοποιηθεί από πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο αποπτωτικό μονοπάτι. Ωστόσο, ο ρόλος της στην καρκινογένεση παραμένει αινιγματικός, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι σε πρώιμα στάδια μπορεί να εμποδίσει την καρκινογένεση θέτοντας τα κύτταρα σε μία κατάσταση ηρεμίας, ενώ σε όψιμα στάδια μπορεί να λειτουργήσει προστατευτικά για τα καρκινικά κύτταρα, επιτρέποντας την επιβίωσή τους.

4. **Αντιγραφική Αθανατοποίηση.** Τα φυσιολογικά κύτταρα υφίστανται έναν ορισμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων πέραν του οποίου σταματούν να διαιρούνται, μπαίνοντας αρχικά σε κατάσταση **γήρανσης (replicative senescence)** και αργότερα πεθαίνουν σε μία διαδικασία που ονομάζεται κρίση (**crisis**). Ένας βασικός λόγος για τον οποίο τα κύτταρα σταματούν να διαιρούνται είναι η ελάττωση του μήκους των τελομερών, των προστατευτικών, δηλαδή, αλληλουχιών DNA στα άκρα των χρωμοσωμάτων που εξασφαλίζουν τη σωστή αντιγραφή και την αποφυγή ανώμαλης συνένωσης των χρωμοσωμικών άκρων. Η **τελομεράση** είναι ένα ένζυμο που μπορεί να αναπληρώνει τα τελομερή εμποδίζοντας τη μείωσή τους, είναι όμως απενεργοποιημένη στα φυσιολογικά κύτταρα. Πολλά καρκινικά κύτταρα, ωστόσο, εμφανίζουν ανάκτηση της ενεργότητας της τελομεράσης γεγονός που τους επιτρέπει απεριόριστο αριθμό διαιρέσεων, μια διαδικασία

που ονομάζεται **αθανατοποίηση**. Παρόλο που η αθανατοποίηση θεωρείται ως ένα πρώτο βήμα για το μετασχηματισμό ενός κυττάρου σε καρκινικό, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η ενεργοποίηση της τελομεράσης είναι ένα μάλλον όψιμο φαινόμενο που δεν παρατηρείται στην πλειοψηφία των προκαρκινικών αλλοιώσεων. Αυτό ίσως σημαίνει ότι η αρχική αθανατοποίηση των κυττάρων μπορεί να συμβεί μέσω απώλειας άλλων ελεγκτικών μηχανισμών (όπως γήρανσης μέσω απώλεια p53), ενώ η ενεργοποίηση της τελομεράσης σε μεταγενέστερο στάδιο συμβάλλει στην αυξημένη γενωμικής και χρωμοσωμικής αστάθειας που εμφανίζουν τα καρκινικά κύτταρα.

Εκτός από τα παραπάνω χαρακτηριστικά που ουσιαστικά ευθύνονται για τον συνεχή και ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και τη δημιουργία του όγκου, υπάρχουν και κάποια επιπρόσθετα τα οποία προσδίδουν στα κύτταρα νέες ιδιότητες, καθιστώντας τον όγκο πιο επιθετικό και χαρακτηρίζουν κυρίως πιο προχωρημένα στάδια της καρκινογενετικής διαδικασίας, όπως το διηθητικό καρκίνωμα και ο μεταστατικός καρκίνος. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι τα εξής:

- **Αγγειογένεση.** Ως αγγειογένεση του όγκου θεωρείται η δημιουργία νέων αγγείων για την καλύτερη αιμάτωσή του, γεγονός που επιτρέπει τη διατήρηση και περαιτέρω αύξηση της καρκινικής μάζας. Οι μηχανισμοί της καρκινικής αγγειογένεσης περιλαμβάνουν συχνά την υπερέκφραση παραγόντων όπως ο VEGF ή των αντίστοιχων υποδοχέων τους με αποτέλεσμα τη συγκρότηση ενδοθηλιακών κυττάρων για το σχηματισμό νέων αγγείων.
- **Διηθητικότητα.** Ένα κρίσιμο βήμα στην εξέλιξη του καρκίνου αποτελεί η διήθηση της βασικής μεμβράνης από τα καρκινικά κύτταρα με αποτέλεσμα την εξάπλωσή τους στον παρακείμενο ιστό. Με τη διήθηση τα καρκινικά κύτταρα σπάνε ουσιαστικά ένα φράγμα, ανοίγοντας δρόμο για την περαιτέρω εξάπλωσή τους. Οι μηχανισμοί που προσδίδουν στα κύτταρα αυτήν την ικανότητα είναι αρκετά δύσκολο να διαλευκανθούν πλήρως καθώς φαίνεται ότι εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το μικροπεριβάλλον του όγκου και τους παρακείμενους ιστούς. Ένα σημαντικό βήμα προς τη

διήθηση είναι η απόκτηση χαρακτηριστικών μεσεγχυματικών κυττάρων, όπως η απώλεια των εξωκυττάρων και διακυτταρικών συνδέσεων μέσω της καταστολής έκφρασης μορίων σύνδεσης όπως η E-καντερίνη, η ατρακτοειδής μορφολογία, η πλαστικότητα και η αυξημένη κινητικότητα. Η απόκτηση αυτών των χαρακτηριστικών γίνεται με την ενεργοποίηση μίας διαδικασίας που ονομάζεται επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση (Epithelial-to-Mesenchymal Transition, EMT) και αποτελεί ταυτόχρονα το πρώτο βήμα για την μετάσταση που αποτελεί το επόμενο και τελευταίο στάδιο της καρκινικής εξέλιξης. Πέρα από αυτήν την «μεσεγχυματικού» τύπου διήθηση, υπάρχουν άλλοι 2 τύποι, λιγότερο συχνοί: η συλλογική (collective) διήθηση, όπου μία ολόκληρη ομάδα κυττάρων μετακινείται ανοίγοντας ένα «μονοπάτι», και η αμοιβαδοειδής όπου τα κύτταρα αποκτούν την ικανότητα αμοιβαδοειδούς κίνησης με την οποία εισχωρούν σταδιακά στον παρακείμενο ιστό.

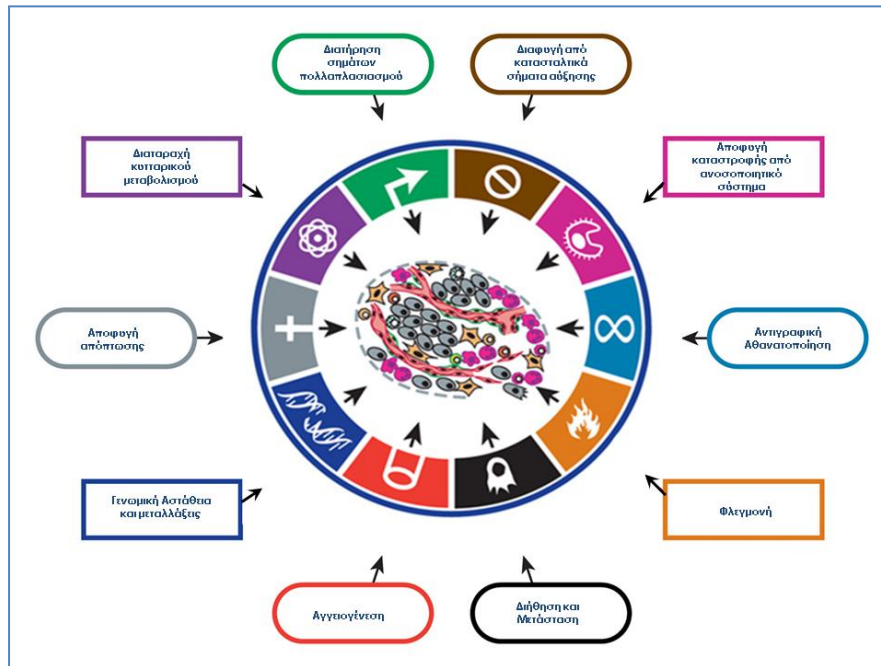
- **Μετάσταση.** Η μετάσταση προϋποθέτει την είσοδο ορισμένων καρκινικών κυττάρων στον αυλό αιμοφόρων και λεμφικών αγγείων, τη μετακίνησή τους μέσω της κυκλοφορίας σε μακρινούς ιστούς, την έξοδο από την κυκλοφορία, την εγκατάσταση στον νέο ιστό και τη δημιουργία μικρομεταστάσεων οι οποίες τελικά θα εξελιχθούν σε νέους καρκινικούς όγκους. Όπως γίνεται κατανοητό, την είσοδο στην αιματική και λεμφική κυκλοφορία διευκολύνει η απόκτηση του μεσεγχυματικού φαινοτύπου με τη διαδικασία της EMT. Η εποίκιση όμως νέων ιστών και η επιτυχής δημιουργία νέου όγκου απαιτεί πιθανώς από τα ίδια κύτταρα να επανακτήσουν ορισμένα από τα επιθηλιακά χαρακτηριστικά τους και η αναπροσαρμογή στο περιβάλλον του νέου ιστού. Στην εξέλιξη αυτή πιθανώς συμβάλλουν μία διαδικασία αντίστροφη της EMT, η μεσεγχυματο-επιθηλιακή μετάπτωση καθώς και τα κύτταρα του στρώματος των νέων ιστών. Αν και οι μηχανισμοί που οδηγούν σε ενεργοποίηση των διαδικασιών EMT και MET παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι, ωστόσο γίνεται όλο και πιο εμφανής η επίδραση των κυττάρων του στρώματος του όγκου, όπως ινοβλάστες, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, μακροφάγα τα οποία συχνά διεγείρονται από τα καρκινικά κύτταρα (παρέγχυμα) και εκκρίνουν παράγοντες επιβίωσης και φλεγμονής

(όπως EGF, κυτοκίνες) συμβάλλοντας έτσι με τη σειρά τους στην εξέλιξη του καρκίνου.

Σημαντικά χαρακτηριστικά τα οποία μπορούμε να πούμε ότι υποβοηθούν την καρκινική εξέλιξη και απαντώνται συχνά στο καρκινικό περιβάλλον αποτελούν επίσης η δυνατότητα διαφυγής από τους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος, η συνύπραξη παραγόντων φλεγμονής οι οποίοι συχνά προωθούν την διατήρηση και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, η αλλαγή στον κυτταρικό μεταβολισμό με προτίμηση προς την αναερόβια γλυκόλυση (φαινόμενο Warburg) η οποία δίνει στο καρκινικό κύτταρο να αντεπεξέλθει στις αναερόβιες συνθήκες που συχνά επικρατούν στο περιβάλλον του καρκινικού όγκου και τέλος η γενωμική αστάθεια, η οποία ευνοεί τη συσσώρευση μεταλλάξεων και στην οποία σημαντικό ρόλο παίζει η διαταραχή της λειτουργίας του μηχανισμού διατήρησης της ακεραιότητας του γενετικού υλικού του κυττάρου και του μονοπατιού απόκρισης σε βλάβες του DNA (DNA DAMAGE Response, DDR).

Οι αλλοιώσεις στο γενετικό υλικό απαιτούν τη συσσώρευση μεταλλάξεων. Ωστόσο, οι φυσιολογικοί μηχανισμοί ελέγχου και επιδιόρθωσης DNA του κυττάρου εξασφαλίζουν ότι ο ρυθμός αυθόρμητων μεταλλάξεων λόγω λαθών στην αντιγραφή παραμένει πολύ χαμηλός. Οι ίδιοι μηχανισμοί ενεργοποιούνται και κατά τη δημιουργία μεταλλάξεων από μεταλλαξιγόνων παραγόντων. Επομένως, για την συσσώρευση των απαιτούμενων μεταλλάξεων χρειάζεται συνήθως από τη μια μεριά χρόνια και παρατεταμένη έκθεση στον μεταλλαξιγόνο παράγοντα ή σε συνδυασμό παραγόντων και από την άλλη, ελαττωματική λειτουργία των μηχανισμών ελέγχου της ακεραιότητας του γενετικού υλικού, η οποία επιτρέπει την επιτάχυνση της απόκτησης μεταλλάξεων και τη δημιουργία γενωμικής αστάθειας. Αυτό πιθανότατα εξηγεί τον επιβαρυντικό ρόλο που παίζει η ηλικία για την ανάπτυξη καρκίνου καθώς και την παρατήρηση αλλοιώσεων στην έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στους μηχανισμούς διατήρησης της ακεραιότητας του γενετικού υλικού (μονοπάτι απόκρισης σε βλάβες του DNA και μονοπάτι επιδιόρθωσης DNA). Έτσι κάποιες τυχαίες μεταλλάξεις κρίσιμων γονιδίων αποκτούνται πιο νωρίς

προσδίδοντας ενδεχομένως ένα πλεονέκτημα επιβίωσης ορισμένων κυττάρων και αποτελώντας το πρώτο βήμα για την έναρξη της καρκινογένεσης, ενώ η απώλεια των μηχανισμών ελέγχου του γενετικού υλικού οδηγεί στην επιτάχυνση του ρυθμού δημιουργίας νέων μεταλλάξεων και στην ανάπτυξη γενωμικής αστάθειας η οποία χαρακτηρίζει μεταγενέστερα καρκινικά στάδια, παίζοντας καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου.



Σχήμα 1: Βιολογικά χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων. Πηγή: Shiloh Y. Hanahan, D. and R. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.

1.3. Μονοπάτι απόκρισης σε βλάβες του DNA (DNA Damage Response, DDR pathway)

1.3.1. Ρόλος - Λειτουργία

Το μονοπάτι απόκρισης σε βλάβες του DNA ενεργοποιείται με σκοπό την επιδιόρθωση της βλάβης ή, σε περίπτωση που αυτή είναι εκτεταμένη και δεν μπορεί να διορθωθεί, σε παρεμπόδιση της επέκτασης και μεταβίβασής της σε άλλα κύτταρα. Αυτό επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση, αφενός, **μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA** και, αφετέρου, την ενεργοποίηση **σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (checkpoints)** που οδηγούν σε προσωρινή ή μόνιμη (γήρανση)

αναστολή του κυτταρικού κύκλου ή σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Οι βλάβες στο DNA μπορεί να είναι διαφόρων τύπων, όπως μονοκλωνικές ή δικλωνικές θραύσεις, αλλαγή ή απώλεια βάσης, λανθασμένο ζευγάρι βάσεων και να προκαλούνται τόσο από εξωγενείς (ιονίζουσα ακτινοβολία, γενοτοξικοί χημικοί παράγοντες όπως ορισμένα χημειοθεραπευτικά φάρμακα) ή ενδογενείς παράγοντες (όπως ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά τη μεταβολική διεργασία της αναπνοής, αντιγραφικό στρες, μείωση μήκους τελομερών). Κάθε τύπος βλάβης ενεργοποιεί και τον αντίστοιχο μηχανισμό επιδιόρθωσης. Ο πιο σημαντικός και τοξικός όμως για το κύτταρο είναι οι δικλωνικές θραύσεις του DNA που προκαλούνται τόσο από εξωγενείς παράγοντες, όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία (ακτίνες Χ, γ-ακτινοβολία), γενοτοξικοί χημικοί παράγοντες όπως ορισμένα χημειοθεραπευτικά φάρμακα όσο και από ενδογενείς παράγοντες όπως ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά τη μεταβολική διεργασία της αναπνοής, αντιγραφικό στρες, μείωση μήκους τελομερών. Επίσης φυσιολογικές δικλωνικές θραύσεις εμφανίζονται κατά τις διαδικασίες ανασυνδυασμού στο πλαίσιο της ωρίμανσης των λεμφοκυττάρων και κατά τον μειωτικό ανασυνδυασμό. [6]

1.3.2. Μονοπάτια απόκρισης σε δικλωνικές θραύσεις (DSB response pathway)

1.3.2.1. Μηχανισμοί επιδιόρθωσης

Οι δικλωνικές θραύσεις, ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου, τη διάρκεια και την έκταση της βλάβης, ενεργοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης και προκαλούν διαφορετικές κυτταρικές αποκρίσεις. Έτσι, για θραύσεις του DNA που συμβαίνουν στις φάσεις πριν την αντιγραφή του DNA, δηλαδή στις φάσεις G1 και G0, χρησιμοποιείται ο **μηχανισμός επιδιόρθωσης συνένωσης μη-ομόλογων άκρων (Non-Homologous End Joining, NHEJ)**, ο οποίος ενεργοποιείται από την κινάση **DNA-PK**. Τα χαρακτηριστικά του μηχανισμού αυτού είναι η ταχύτητα, η απλότητα αλλά και η μεγαλύτερη πιθανότητα για λάθη. Επίσης, ο κύριος στόχος σε αυτήν την περίπτωση είναι η γρήγορη και άμεση επιδιόρθωση της βλάβης χωρίς δυνατότητα ενεργοποίησης σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.

Αντίθετα, όταν οι θραύσεις επιμένουν ή όταν συμβαίνουν κατά τις φάσεις S και G2, όπου το DNA του κυττάρου έχει αντιγραφεί, ενεργοποιείται ένας άλλος μηχανισμός επιδιόρθωσης, ο **ομόλογος ανασυνδυασμός (Homologous Recombination, HR)** μέσω της κινάσης **ATM**. Με τη διαδικασία του ομόλογου ανασυνδυασμού η επιδιόρθωση της βλάβης γίνεται με τη χρήση της αδελφής χρωματίδας ως εκμαγείου, γι' αυτό και ο ομόλογος συνδυασμός είναι πιο αξιόπιστος, αλλά και πολύπλοκος.

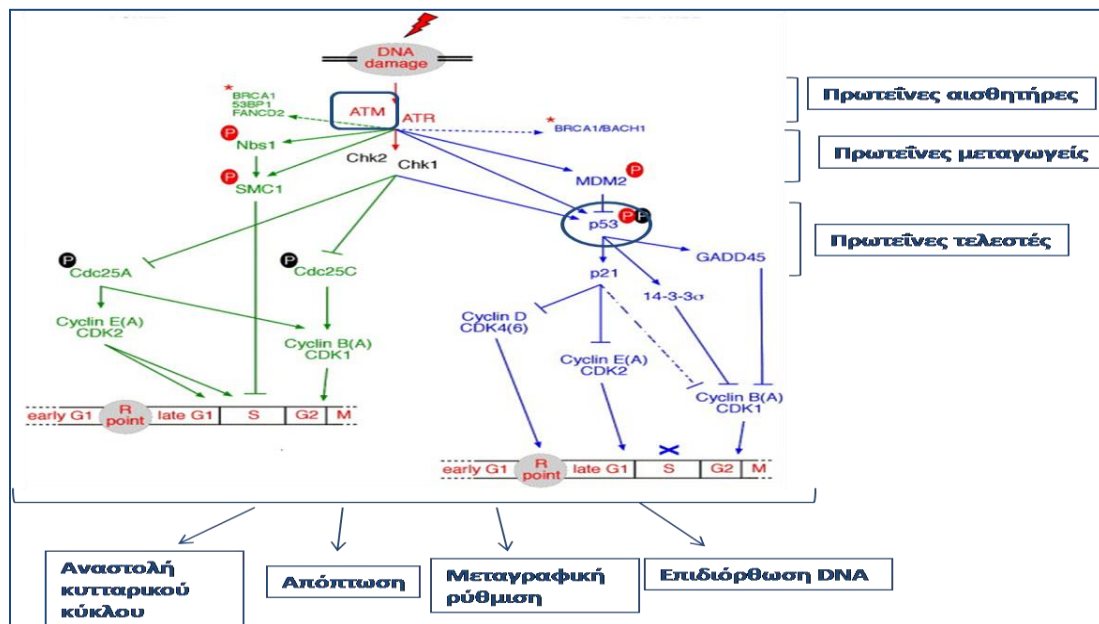
1.3.2.2. Βασική δομή μονοπατιού: Ανοδικές κινάσες-μεταγωγείς-τελεστές

Σε όλα τα μονοπάτια απόκρισης σε θραύσεις του DNA, πρωταρχικό ρόλο παίζουν τρεις κινάσες: η DNA-PK, η ATM και η ATR. Οι τρεις αυτές κινάσες ανήκουν στην οικογένεια των PIKK-κινασών και είναι από τους πρώτους παράγοντες που ενεργοποιούνται και είναι υπεύθυνες και απαραίτητες για την περαιτέρω διάδοση του σήματος και ενεργοποίηση των μορίων που βρίσκονται καθοδικά σε κάθε μονοπάτι.

Η DNA-PK, όπως αναφέρθηκε, ενεργοποιείται τοπικά σε δικλωνικές θραύσεις που συμβαίνουν κυρίως κατά τη διάρκεια των φάσεων G1 και G0 και ενεργοποιεί το μηχανισμό επιδιόρθωσης NHEJ. Η ATM ενεργοποιείται όταν οι βλάβες αυτές επιμένουν ή όταν συμβαίνουν στις φάσεις S και G2 και οδηγεί σε ενεργοποίηση του μηχανισμού επιδιόρθωσης ομόλογου ανασυνδυασμού. Η ATR ενεργοποιείται είτε απευθείας από μονοκλωνικές θραύσεις που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή είτε από μονοκλωνικές θραύσεις που εμφανίζονται κατά την επεξεργασία των δικλωνικών θραύσεων μέσω της ATM.

Όπως γίνεται φανερό, το μονοπάτι απόκρισης σε δικλωνικές θραύσεις που ενεργοποιείται από την ATM κινάση κατέχει κεντρικό ρόλο σε περιπτώσεις εκτεταμένης και παρατεταμένης βλάβης του DNA, όπως συχνά συμβαίνει κατά την συνεχή ή επανειλημμένη έκθεση σε κάποιον εξωγενή γενωτοξικό παράγοντα ή κατά την παρουσία αυξημένου αντιγραφικού στρες και αυξημένης γενωμικής αστάθειας που χαρακτηρίζει τα καρκινικά κύτταρα.

Η στρατολόγηση κάθε κινάσης στην περιοχή της θραύσης και η ενεργοποίησή της γίνεται συνήθως από πρωτεϊνικά σύμπλοκα που ανιχνεύουν τις θραύσεις (**αισθητήρες, sensors**) και προσδένονται στο DNA. Στην περίπτωση της DNA-PK, η ανίχνευση της βλάβης, η στρατολόγηση και ενεργοποίηση της κινάσης γίνεται από το σύμπλοκο Ku70/Ku80, στην περίπτωση της ATM από το σύμπλοκο MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) και της ATR από την πρωτεΐνη RPA (Replication Protein A). Η ενεργοποίηση της αρχικής κινάσης σε κάθε μονοπάτι οδηγεί στη φωσφορυλίωση πλήθους υποστρωμάτων και την ενεργοποίηση πολλών πρωτεϊνών που βρίσκονται καθοδικά και που συνεχίζουν τη μετάδοση του σήματος (**μεταγωγείς,transducers**) μέχρι την τελική ενεργοποίηση των τελικών μορίων του μονοπατιού (**τελεστές, effectors**) που είναι υπεύθυνα για το τελικό αποτέλεσμα (επιδιόρθωση, αναστολή κυτταρικού κύκλου, γήρανση, απόπτωση) (Σχ. 2).

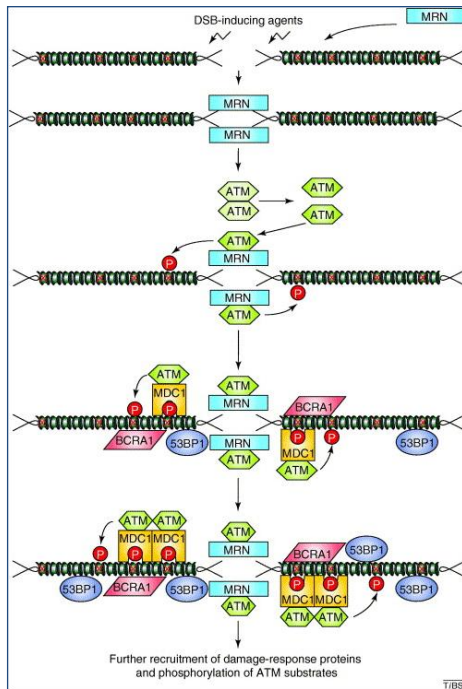


Σχήμα 2: Βασικό σηματοδοτικό μονοπάτι απόκρισης στις βλάβες του DNA (DDR). Πηγή: Lukas J, Lukas C, Bartek J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. DNA Repair (Amst). 2004 Aug-Sep;3(8-9):997-1007.

1.3.3. ATM κινάση

1.3.3.1. Μονοπάτι ATM

Στο μονοπάτι ATM, το οποίο είναι υπεύθυνο όπως είδαμε για την απόκριση σε εκτεταμένου βαθμού δικλωνικές θραύσεις, την ενεργοποίηση της ATM ακολουθεί η φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση πρωτεϊνών που μπορεί να έχουν ρόλο ρυθμιστικό (Nbs1, Mre11), να λειτουργούν στρατολογώντας άλλες πρωτεΐνες ή ως



Σχήμα 3: Αρχικά γεγονότα ενεργοποίησης της ATM Πηγή: Shiloh Y. The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. Trends Biochem Sci. 2006 Jul;31(7):402-10. Epub 2006 Jun.

ικρίωμα για την αλληλεπίδραση άλλων μορίων του μονοπατιού (MDC1, RAP80) ή να παίρνουν μέρος στις διαδικασίες του ομόλογου ανασυνδυασμού (BRCA1, BRCA2, 53BP1, RAD51, CtIP) (Σχ.3).

Εκτός, όμως από την επιδιόρθωση, ανάλογα με την έκταση της βλάβης, το μονοπάτι της ATM μπορεί να ενεργοποιήσει, όπως αναφέρθηκε τις διαδικασίες της αναστολής του κυτταρικού κύκλου, της γήρανσης και της απόπτωσης, εξασφαλίζοντας έτσι ότι η βλάβη που δεν μπορεί να επιδιορθωθεί δεν θα εξαπλωθεί σε νέα κύτταρα. Κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση αυτών των διαδικασιών παίζει η πρωτεΐνη-τελεστής **p53**. Η πρωτεΐνη p53 δρα ως μεταγραφικός παράγοντας

ενεργοποιώντας την μεταγραφή γονιδίων που προωθούν τις διαδικασίες της γήρανσης και της απόπτωσης. Η p53 φωσφορυλιώνεται τόσο άμεσα από την ATM όσο και έμμεσα μέσω της **Chk2**, η οποία αποτελεί υπόστρωμα της ATM. Οι φωσφορυλιώσεις αυτές οδηγούν σε σταθεροποίηση της p53 και αύξηση της μεταγραφικής της ιδιότητας. Η ενεργοποίηση των διαδικασιών της γήρανσης και της απόπτωσης γίνεται μέσω της ενεργοποίησης από την p53 αναστολέων του κυτταρικού κύκλου όπως οι p21 και GADD45 ή προαποπτωτικών πρωτεϊνών όπως οι Puma και Noxa.

1.3.3.2. ATM: Γονίδιο, δομή και λειτουργία

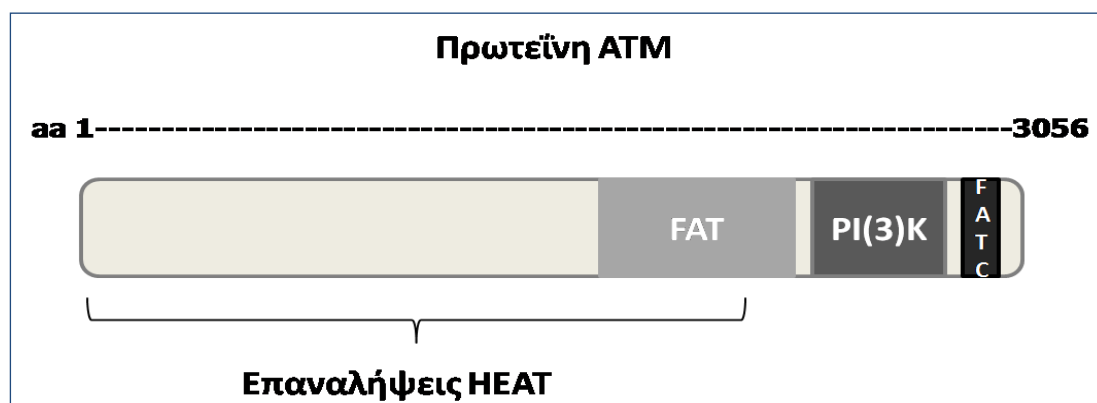
Η ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) είναι μία πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης. Ανήκει, λόγω ομολογίας του καταλυτικού της κέντρου, στην οικογένεια των PI3K κινασών (κινάση της 3-OH φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης), φωσφορυλιώνει ωστόσο κυρίως πρωτεΐνες και όχι λιπίδια. Η κλωνοποίηση του γονιδίου και η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε το 1995 από τους

Savitsky *et al* [7, 8]. Το γονίδιο ATM βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 στη θέση 11q22-23 και αποτελείται από 66 εξόνια, ενώ το RNA μετάγραφο που προκύπτει έχει μήκος περίπου 13kb και κωδικοποιεί για μια μεγάλη πρωτεϊνική αλυσίδα μήκους 3056 αμινοξικών καταλοίπων με μεγάλο μοριακό βάρος (περίπου 350kDa). Η εύρεση του γονιδίου-και η ονομασία του- έγινε αρχικά λόγω της ασθένειας αταξία-τηλεαγγειεκτασία (ataxia-telangiectasia, AT), η οποία προκαλείται λόγω μεταλλάξεων του γονιδίου ATM. Η αταξία-τηλεαγγειεκτασία είναι μία νευροεκφυλιστική ασθένεια που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και είναι αρκετά σπάνια (συχνότητα 1/40000 γεννήσεις). Χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση αταξίας και τηλεαγγειεκτασιών (διεσταλμένα αγγεία), ιδιαίτερα στην περιοχή των οφθαλμών, σε μικρή ηλικία. Σταδιακά, το πάσχον άτομο χάνει την ικανότητα πολλών κινήσεων ενώ παράλληλα εμφανίζονται διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος, στειρότητα, ευαισθησία στην ακτινοβολία και στην ανάπτυξη κακοήθων νεοπλασιών, κυρίως λευχαιμιών και λεμφωμάτων.

Το πλήθος και το εύρος των συμπτωμάτων της ασθένειας είναι ενδεικτικό του σημαντικού ρόλου της κινάσης ATM. Σήμερα γνωρίζουμε ότι ο ρόλος της ATM κινάσης έγκειται στην ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε δικλωνικές θραύσεις, συμβάλλοντας στην επιδιόρθωση του γενετικού υλικού ή στον περιορισμό της βλάβης, βοηθώντας έτσι στην αποτελεσματική αντιμετώπισή της από τον οργανισμό. Η λειτουργία της αυτή δικαιολογεί ορισμένα από τα συμπτώματα της ασθένειας AT, όπως την ευαισθησία στην ακτινοβολία και την ανάπτυξη καρκίνου (λόγω ελλιπούς αντιμετώπισης της βλάβης που προκαλεί στο DNA) αλλά και τις διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος και τη στειρότητα αφού η ATM παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των μηχανισμών ανασυνδυασμού που συμβαίνουν φυσιολογικά κατά την ωρίμανση των λεμφοκυττάρων και κατά τη μείωση. Οι μηχανισμοί που ευθύνονται για τα νευρολογικά συμπτώματα είναι λιγότερο κατανοητοί, υποδεικνύουν όμως τη μεγάλη ποικιλία λειτουργιών στις οποίες είναι πιθανό να εμπλέκεται η ATM, όπως φαίνεται και από πρόσφατη έρευνα που δείχνει έναν τεράστιο αριθμό πρωτεϊνών ως πιθανά υποστρώματα της ATM[9]

1.3.3.3 ATM: Δευτεροταγής δομή και περιοχές πρωτεΐνης

Ως προς τη δευτεροταγή δομή, η πρωτεΐνη ATM αποτελείται στην αμινοτελική της περιοχή (1-2659) από 49 επαναλήψεις της επικράτειας HEAT, οι οποίες επιτρέπουν την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες, ενώ στην περιοχή μεταξύ των καταλοίπων 1966-2565 υπάρχει η επικράτεια FAT (συντηρημένη στις πρωτεΐνες FRAPP/ATM/TRRAP) [10, 11]. Το καρβοξυτελικό της άκρο αποτελείται από το καταλυτικό κέντρο και τη συντηρημένη στις κινάσες της οικογένεια PI(3)K περιοχή (2609-2976) και μία συντηρημένη επικράτεια 35 καταλοίπων, γνωστή με το όνομα FATC (3024-3056), η οποία φαίνεται ότι ενισχύει την καταλυτική δράση της κινάσης και συμβάλλει στην αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες-υποστρώματα [10, 11] (Σχ.4).



Σχήμα 4: Σχηματική αναπαράσταση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της πρωτεΐνης ATM και των επικρατειών της.

1.3.3.4. Συσχέτιση της ATM με καρκίνο

Πέρα από την άμεση συσχέτιση των μεταλλάξεων της ATM με τις λευχαιμίες και λεμφώματα που παρατηρούνται σε ασθενείς με AT, οι μεταλλάξεις της ATM σε άτομα ετεροζυγώτες φαίνεται ότι αποτελούν παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη και άλλων μορφών καρκίνου. Η παρατήρηση ότι συγγενείς ασθενών με AT εμφάνιζαν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού οδήγησε σε μια πρώτη συσχέτιση των μεταλλάξεων της ATM με το συγκεκριμένο τύπο καρκίνου [12] (Swift et al, 1987). Επιδημιολογικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια επιβεβαίωσαν αυτή τη συσχέτιση [11, 13, 14].

1.4. Ογκοκατασταλτική Πρωτεΐνη p14^{ARF}

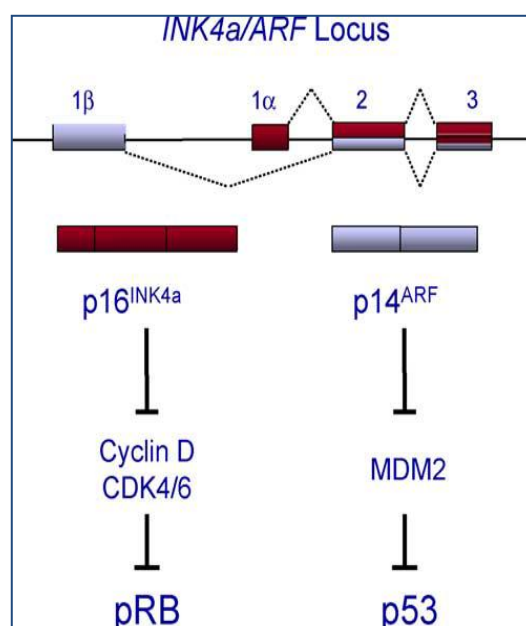
1.4.1. p14^{ARF}: Γονίδιο

Η πρωτεΐνη p14^{ARF} είναι το προϊόν ενός γονιδίου που βρίσκεται στη χρωμοσωμική θέση 9p21 στο γενετικό τόπο CDKN2A (ή αλλιώς γνωστός ως INK4a/ARF), ο οποίος αρχικά είχε βρεθεί ως το γονίδιο της πρωτεΐνης- αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p16^{INK4a} [15]. Η ογκοκατασταλτική ιδιότητα της p16^{INK4a} οφείλεται στην ικανότητά της να αναστέλλει την λειτουργία των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών cdk4 και cdk6, οι οποίες ρυθμίζουν την πρόοδο στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Το 1995, ωστόσο, βρέθηκε ότι ο ίδιος γενετικός τόπος κωδικοποιεί και για μία άλλη πρωτεΐνη,

την p19^{ARF} (η ομόλογη της p14^{ARF} στον ποντικό). Το νέο mRNA μετάγραφο που προκύπτει οφείλεται στην ύπαρξη ενός διαφορετικού πρώτου εξωνίου από αυτό της p16^{INK4a} το οποίο βρίσκεται πιο ανοδικά και υπό τον έλεγχο ενός διαφορετικού υποκινητή. Παρ' όλο που η αλληλουχία του δεύτερου εξωνίου της p14^{ARF} είναι κοινή με τμήματα του δεύτερου και τρίτου εξωνίου της p16^{INK4a}, η αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης κατά τη μεταγραφή οδηγεί στη δημιουργία μίας νέας, εντελώς διαφορετικής, πολυπεπτιδικής αλυσίδας και μίας πρωτεΐνης με διαφορετικές ιδιότητες και λειτουργία [16] (Σχ. 5).

1.4.2. ARF: Δομή πρωτεΐνης

Η πρωτεΐνη ARF που κωδικοποιείται από το γονίδιο CDKN2A αποτελείται από 132 αμινοξέα στον άνθρωπο (p14^{ARF}) και από 169 (p19^{ARF}) στον ποντικό. Οι δύο πρωτεΐνες εμφανίζουν ομολογία κατά 50%, το οποίο υποδεικνύει σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Μία ιδιαιτερότητα της ARF ωστόσο, κοινή και για τις δύο μορφές (p14^{ARF} και p19^{ARF}), είναι το ασυνήθιστα μεγάλο ποσοστό περιεκτικότητας



Σχήμα 5: Δομή γενετικού τόπου CDKN2A και δράση των δύο βασικών προϊόντων του p16^{INK4a} και p14^{ARF}. Πηγή: Sharpless NE *INK4a/ARF: A multifunctional tumor suppressor locus*, Mutation Research 576 (2005) 22–38

σε κατάλοιπα αργινίνης (20%), γεγονός που της προσδίδει ένα υψηλό θετικό φορτίο υπό φυσιολογικές pH συνθήκες και ένα υψηλό ισοηλεκτρικό σημείο ($pI=12$). Τα ασυνήθιστα αυτά χαρακτηριστικά πιθανώς δικαιολογούν και την έλλειψη χαρακτηριστικών δομικών περιοχών και την ανάγκη αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες για την εξουδετέρωση ίσως του φορτίου της ARF και την απόκτηση μιας πιο καλά οργανωμένης τρισδιάστατης αναδίπλωσης [17] (Ο όρος ARF θα χρησιμοποιείται από εδώ και στο εξής όταν γίνεται αναφορά στις γενικές ιδιότητες της πρωτεΐνης που ισχύουν και για τις δύο ομόλογες μορφές).

Ένα άλλο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της $p14^{ARF}$ είναι η απουσία καταλοίπων λυσίνης (η $p19^{ARF}$ έχει μόνο ένα) , τα οποία είναι αναγκαία για την ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Παρ' όλα αυτά, η ARF είναι μία πρωτεΐνη που φαίνεται ότι αποικοδομείται υπό φυσιολογικές συνθήκες με σταθερά αυξημένο ρυθμό με τον χρόνο ημίσειας ζωής της $t_{1/2}$ να κυμαίνεται μεταξύ 1 και 8 ωρών. Μία μελέτη έδειξε ότι η ουβικιτινίωση της ARF μπορεί να γίνει στο αμινοτελικό άκρο της απουσία λυσινών [18] ενώ πρόσφατα αναγνωρίστηκε η E3 λιγάση ουβικιτίνης (ULF/TRIP12) που ευθύνεται για την ουβικιτινίωση και την ακόλουθη στόχευσή της για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα [19].

1.4.3. Έκφραση και επαγωγή της ARF

Τα επίπεδα της πρωτεΐνης ARF σε φυσιολογικά κύτταρα είναι πολύ χαμηλά έως μη ανιχνεύσιμα. Επαγωγή της έκφρασής της έχει παρατηρηθεί σε ινοβλάστες ποντικών και μεταγραφική ενεργοποίηση μετά από την εισαγωγή ογκογονιδίων σε κύτταρα ποντικών όπως το *myc*[20], το *ras* [21, 22], ο *E2F1*[23, 24], το *E1A*[25]. Ωστόσο τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν αργότερα σε ανθρώπινα κύτταρα διέφεραν σημαντικά. Από τη μια μεριά, οι άνθρωπινοι ινοβλάστες δεν δείχνουν αύξηση των επιπέδων της $p14^{ARF}$ [26], ενώ από την άλλη το ογκογονίδιο *ras* δεν φαίνεται να επάγει έκφραση της $p14^{ARF}$ [27, 28] και το *c-myc* ενεργοποιεί την $p14^{ARF}$ επηρεάζοντας κυρίως την σταθερότητά της παρά επάγοντας τη μεταγραφή της [19], αντίθετα με ότι συμβαίνει με την $p19^{ARF}$ στον ποντικό. Παρά τις όποιες διαφορές τους, όμως, και οι δύο πρωτεΐνες ($p14^{ARF}$ και $p19^{ARF}$) έχουν σημαντική ογκοκατασταλτική δράση, καθώς η έκφρασή τους επάγεται από ογκογόνο στρες και η αυξημένη έκφρασή τους μπορεί να ενεργοποιήσει διαδικασίες που οδηγούν σε

αναστολή της αύξησης των κυττάρων και σε ορισμένες περιπτώσεις σε γήρανση [17, 29].

1.4.4. Ογκοκατασταλτική δράση και λειτουργία της ARF

1.4.4.1. Δράσεις εξαρτώμενες της p53

Η βασική λειτουργία της πρωτεΐνης ARF είναι η σταθεροποίηση του μεταγραφικού παράγοντα p53, μέσω της αναστολής της αποικοδόμησής της από την E3 λιγάση ουβικιτίνης Mdm2. Η Mdm2 είναι μία E3 λιγάση ουβικιτίνης που ευθύνεται για την αποικοδόμηση της p53 από το πρωτεάσωμα. Η ARF προσδέεται στην Mdm2 και εμποδίζει τη δράση της, οδηγώντας σε σταθεροποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων και ενίσχυση της δράσης της p53 [30-33]. Στην λειτουργία της αυτή αποδόθηκαν και τα αποτελέσματα των πρώτων πειραμάτων σε ποντίκια που έδειξαν την πιθανή ογκοκατασταλτική δράση της ARF και την πιθανή σχέση της με την p53 [34]. Η δράση της αυτή επιβεβαιώθηκε περαιτέρω και μετά την αποκάλυψη της λειτουργίας της ως προς την αλληλεπίδραση MDM2-p53 από επόμενες μελέτες που σε συνδυασμό με τα πρώτα πειράματα ότι ποντίκια με απώλεια της ARF είχαν αυξημένη προδιάθεση για ανάπτυξη όγκων σε πρώιμο στάδιο της ζωής τους [34, 35]. Επίσης, ινοβλάστες ποντικού (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEFs) οι οποίοι δεν εκφράζουν ARF μπορούν να διαφύγουν της φυσιολογικής διαδικασίας της κρίσης, η οποία όπως αναφέρθηκε πιο πάνω θέτει ένα όριο στον αριθμό των διαιρέσεων ενός κυτταρικού πληθυσμού σε κυτταροκαλλιέργεια. Έτσι η λειτουργία της ARF συνδέθηκε με τις διαδικασίες της κυτταρικής αύξησης και γήρανσης [34, 35].

1.4.4.2. Δράσεις ανεξάρτητες της p53

Εκτός, όμως από τη σταθεροποίηση της p53, πολλές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν τα επόμενα χρόνια έδειξαν ότι η ARF έχει και ανεξάρτητες της p53 ογκοκατασταλτικές δράσεις. Οι πρώτες ενδείξεις ήρθαν από πειράματα σε ποντίκια με απενεργοποιημένα και τα τρία γονίδια του μονοπατιού p53-Mdm2-ARF (Triple KnockOut, p53^{-/-} Mdm2^{-/-} p19^{ARF^{-/-}}), τα οποία εμφάνιζαν μεγαλύτερο εύρος

τύπων καρκίνου και πολλαπλές αρχικές εστίες σε σχέση με τα p53^{-/-} ή p53^{-/-} Mdm2^{-/-} [36] καθώς και αυξημένο ρυθμό αύξησης θηλωμάτων [37]. Παράλληλα μελέτες σε κυτταρικές σειρές σε καλλιέργεια έδειξαν ότι η επανέκφραση p19^{ARF} σε ινοβλάστες ποντικού με απενεργοποιημένα τα p53 και Mdm2 οδηγούσε σε μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού [36, 38] ενώ και σε ανθρώπινα κύτταρα χωρίς ενεργό p53 η έκφραση της p14^{ARF} μπορεί να προκαλέσει αναστολή κυτταρικού κύκλου και απόπτωση [39-43]. Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ARF μπορεί να επηρεάσει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ανεξάρτητα της δράσης της p53. Με την συνέχιση των ερευνών η ARF έχει εμπλακεί σε αρκετές κυτταρικές διεργασίες, οι οποίες μπορούν να συμβάλλουν στην ογκοκατασταλτική της δράση. Κάποιες μελέτες έδειξαν ότι μπορεί να παρεμποδίσει την ενεργοποίηση μεταγραφής γονιδίων από ογκογονίδια όπως ο **E2F1** [39, 44, 45] και το **myc** [46, 47], ενώ κάποιες άλλες έδειξαν την ικανότητα της ARF να προσδένεται στην E2 λιγάση σουμοϋλίωσης **Ubc9** και να επάγει σουμοϋλίωση πολλών πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά [48, 49]. Η σουμοϋλίωση είναι μία διαδικασία κατά την οποία με τη δράση των αντίστοιχων ενζύμων -E1, E2, E3- προστίθενται σε κατάλοιπα λυσίνης της πρωτεΐνης-στόχου ομάδες SUMO, οι οποίες μοιάζουν με τις ομάδες ουβικιτίνης. Η σουμοϋλίωση φαίνεται ότι παίζει ρυθμιστικό ρόλο σε σημαντικές διαδικασίες όπως η μετακίνηση πρωτεϊνών, η αποικοδόμησή τους, η συγκράτηση των αδελφών χρωματίδων, η απόκριση σε βλάβες του DNA και η μεταγραφή γονιδίων [50, 51]. Επομένως, με τη δράση της αυτή η ARF ενδέχεται να παίζει ρόλο στη ρύθμιση και άλλων σημαντικών λειτουργιών του κυττάρου. Επιπλέον, μία ιδιαίτερη μικρότερη μορφή της ARF, η **smARF** (short mitochondrial ARF) η οποία εκφράζεται στα μιτοχόνδρια και προκύπτει από έναρξη της μετάφρασης από μία εσωτερική θέση μεθειονίνης, έχει βρεθεί ότι μπορεί να επάγει τη διαδικασία της αυτοφαγίας [52], η οποία χρησιμοποιείται από τα κύτταρα σε περιπτώσεις στέρησης θρεπτικών συστατικών ώστε να αντλήσουν ενέργεια και βασικούς δομικούς λίθους από τα ίδια τους τα οργανίδια. Η αυτοφαγία στον καρκίνο, έχει αντικρουόμενα αποτελέσματα, αφού φαίνεται ότι σε πρώιμα στάδια λειτουργεί αποτρεπτικά για την ανάπτυξή του, ενώ σε πιο προχωρημένα στάδια φαίνεται ότι λειτουργεί υπέρ της επιβίωσης των

καρκινικών κυττάρων[5]. Εκτός από την **smARF**, όμως, είναι πιθανό και η πλήρης ARF να έχει δυνατότητα επαγωγής αυτοφαγίας[53].

Τέλος, μία ακόμη πολύ σημαντική λειτουργία με την οποία έχει εμπλακεί είναι η σύνθεση και επεξεργασία των ριβοσωμικών υπομονάδων. Ο εντοπισμός της ARF στον πυρηνίσκο οδήγησε στη πιθανή συσχέτιση της με την διαδικασία της **ριβογένεσης (ribosome biogenesis)**, δηλαδή της παραγωγής και ωρίμανσης των ριβοσωμικών υπομονάδων οι οποίες στη συνέχεια μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα για την μετάφραση νέων πρωτεϊνών [54]. Πράγματι, μία μελέτη έδειξε ότι η ARF μπορεί να εμποδίσει την ωρίμανση των ριβοσωμικών υπομονάδων 47/45S και 32S, ανεξάρτητα από την p53[55]. Παράλληλα, η ανακάλυψη της σύνδεσης της ARF με την πυρηνισκική φωσφοπρωτεΐνη **Νουκλεοφοσμίνη (Nucleophosmin/B23)**, η οποία συμμετέχει στη διαδικασία της ριβογένεσης έδωσε μία σημαντική πληροφορία για τον πιθανό εμπλεκόμενο μηχανισμό [56]. Αργότερα, βρέθηκε ότι εκτός από την ωρίμανση των πρόδρομων μορφών των ριβοσωμικών υπομονάδων, η ARF μπορεί να αναστείλει και τη μεταγραφή του ριβοσωμικού RNA (rRNA) μέσω αλληλεπίδρασης με τον παράγοντα UBF[57].

1.4.5. ARF και NPM

Η πρωτεΐνη ARF, όπως αναφέρθηκε, έχει μία ιδιαίτερη αμινοξική σύσταση και ένα ασυνήθιστα υψηλό θετικό φορτίο που καθιστούν αρκετά δύσκολη την αναδίπλωσή της στο χώρο και την απόκτηση μιας σταθερής δομής. Μία από τις απόψεις που έχουν διατυπωθεί είναι ότι η πρόσδεσή της σε άλλες πρωτεΐνες διευκολύνει τη δομική της αναδιάταξη. Η άποψη αυτή ενισχύεται από το πλήθος πρωτεϊνών που έχουν βρεθεί να σχηματίζουν σύμπλοκα με την ARF μέσα στο κύτταρο[17]. Μία από τις πρωτεΐνες που πρώτα βρέθηκε ότι σχηματίζει σύμπλοκο με την ARF είναι η νουκλεοφοσμίνη (NPM). Οι πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι το μεγαλύτερο μέρος της ARF βρίσκεται συνδεδεμένη με την NPM σχηματίζοντας ένα σταθερό σύμπλοκο στον πυρηνίσκο [56, 58]. Η ακριβής σημασία του συμπλόκου δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Από την ανακάλυψή του μέχρι σήμερα, ωστόσο, έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος προς αυτή την κατεύθυνση και ένα μεγάλο μέρος των πιθανών λειτουργιών έχει διαλευκανθεί. Η πρώτη σημαντική παρατήρηση ήταν ότι η NPM

συμβάλλει στη σταθεροποίηση των επιπέδων της ARF προστατεύοντάς την από αποικοδόμηση [18, 59], γεγονός που συνάδει με την μεγαλύτερη σταθερότητα της ARF όταν βρίσκεται στον πυρηνίσκο [60]. Επίσης, μεταλλάξεις της ARF που επηρεάζουν την πρόσδεσή της στην NPM μειώνουν δραματικά το χρόνο ημίσειας ζωής της [18]. Επιπλέον, από τις μελέτες αυτές βρέθηκε, επίσης, ότι η περιοχή της ARF που είναι αναγκαία για την πρόσδεση στην NPM βρίσκεται στο αμινο-τελικό άκρο της που κωδικοποιεί το εξώνιο 1β, μία περιοχή που έχει επίσης βρεθεί ότι είναι απαραίτητη για πολλές από τις ογκοκατασταλτικές δράσεις της ARF [17]. Η περιοχή της NPM που ευθύνεται για την πρόσδεση της ARF αποδείχθηκε πιο δύσκολο να εντοπιστεί και οι πρώτες μελέτες έδιναν αντικρουόμενα αποτελέσματα, τα οποία εν μέρει οφείλονταν στην ικανότητα των μεταλλαγμένων εξωγενών μορφών της NPM να σχηματίζουν ολιγομερή με την ενδογενή NPM [61, 62]. Ωστόσο, μία πιο εκτεταμένη και ολοκληρωμένη διερεύνηση έδειξε ότι το τμήμα της NPM που είναι απαραίτητη για την πρόσδεση της ARF βρίσκεται στο αμινοτελικό της άκρο στην ίδια περιοχή που βρίσκεται το σήμα εξόδου από τον πυρήνα και το τμήμα ολιγομερισμού [63].

Η βιολογική σημασία του συμπλόκου ARF-NPM, πέρα από την άμεση επίδραση στη σταθερότητα της ARF, είναι αρκετά πολύπλοκη όπως φαίνεται από τα εν μέρει αντικρουόμενα αποτελέσματα πολλών μελετών. Η NPM είναι μία πρωτεΐνη-συνοδός η οποία εμπλέκεται σε πλήθος κυτταρικών διεργασιών όπως ο διπλασιασμός των κεντροσωμάτων, η αναδιάταξη της χρωματίνης και η συγκρότηση της μιτωτικής ατράκτου. κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, η μεταφορά των ριβοσωμικών υπομονάδων στο κυτταρόπλασμα για την παραγωγή νέων πρωτεϊνών, και η επεξεργασία του ριβοσωμικού RNA. [64, 65]. Τα ενδοκυττάρια επίπεδά της είναι αρκετά υψηλά, ιδιαίτερα σε κύτταρα με υψηλό ρυθμό διαίρεσης, κάτι που επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι η έκφρασή της έχει βρεθεί αυξημένη σε αρκετούς τύπους καρκίνου, ενώ μία μεταλλαγμένη μορφή της έχει συνδεθεί με έναν τύπο λευχαιμίας [66]. Η μεταλλαγμένη αυτή μορφή οδηγεί στον μόνιμο εντοπισμό της NPM στο κυτταρόπλασμα σε αντίθεση με την φυσιολογική μορφή η οποία μετακινείται μεταξύ πυρηνίσκου και κυτταροπλάσματος, αναδεικνύοντας έτσι τη σημασία του εντοπισμού της NPM για την εκπλήρωση των πολυάριθμων λειτουργιών της.

Η επίδραση της διασύνδεσης ARF-NPM στην NPM φαίνεται ότι είναι αρνητική, με την ARF να εμποδίζει αφενός την έξοδο της NPM στο κυτταρόπλασμα επηρεάζοντας την μετάδοση σημάτων αύξησης και πολλαπλασιασμού[67] και, αφετέρου, να προωθεί ουβικιτινίωση [56] και σουμοϋλίωση της NPM[48]. Δεδομένης της αλληλεπίδρασης της NPM με το ριβοσωμιακό RNA και της λειτουργίας της ως προς τη μεταφορά των ριβοσωμικών υπομονάδων, η επίδραση της ARF θα μπορούσε να αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς της αρνητικής δράσης που έχει η ARF στην σύνθεση και ωρίμανση των ριβοσωμικών υπομονάδων.

Ως προς την επίδραση της NPM στην ARF, το πρώτο συμπέρασμα που βγαίνει λόγω της σταθεροποίησης της ARF, είναι ότι η NPM δρα προστατευτικά για την ARF. Αυτό είναι εμφανές και από το γεγονός ότι η κυτταροπλασματική μεταλλαγμένη μορφή της NPM, η οποία έχει συσχετισθεί με περιπτώσεις Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας (AML), οδηγεί σε μετατόπιση και αποσταθεροποίηση της ARF μέσω αποικοδόμησης από την UFL λιγάση[68, 69]. Ωστόσο, ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι η συγκράτηση της ARF στον πυρηνίσκο από την NPM, μπορεί να εμποδίζει την αναστολή της Mdm2 λιγάσης στο πυρηνόπλασμα, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα της p53[70]. Ωστόσο ακόμα και έτσι, η παρουσία της ARF στον πυρηνίσκο φαίνεται ότι έχει και άλλες ογκοκατασταλτικές δράσεις ανεξάρτητες της p53, με πιο γνωστή την αναστολή της παραγωγής και ωρίμανσης των ριβοσωμικών υπομονάδων.

1.4.6. Έκφραση της p14^{ARF} στον καρκίνο

Η απώλεια του γονιδίου CDKN2A είναι ένα σχετικά συχνό φαινόμενο στον καρκίνο και μάλιστα συχνά η απώλειά του συσχετίζεται με άθικτη p53 και το αντίστροφο [17]. Η συσχέτιση αυτή δεν είναι περίεργη αφού τα προϊόντα των 2 γονιδίων συμμετέχουν σε δύο από τα πιο βασικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και την ενεργοποίηση απόπτωσης και γήρανσης. Ωστόσο, επειδή το ίδιο γονίδιο περιλαμβάνει, εκτός από την p14^{ARF}, και τον αναστολέα κυτταρικού κύκλου p16^{INK4a}, είναι δύσκολο να διαχωριστεί η πίεση για την απώλεια της μίας ή της άλλης πρωτεΐνης. Σχετικές μελέτες έδειξαν ότι η παρουσία μεταλλάξεων στο εξώνιο 1β που επηρεάζουν μόνο την p14^{ARF} στον καρκίνο είναι σπάνιες, ωστόσο ένας συχνός και ειδικός για την p14^{ARF} τρόπος καταστολής της έκφρασής της είναι η

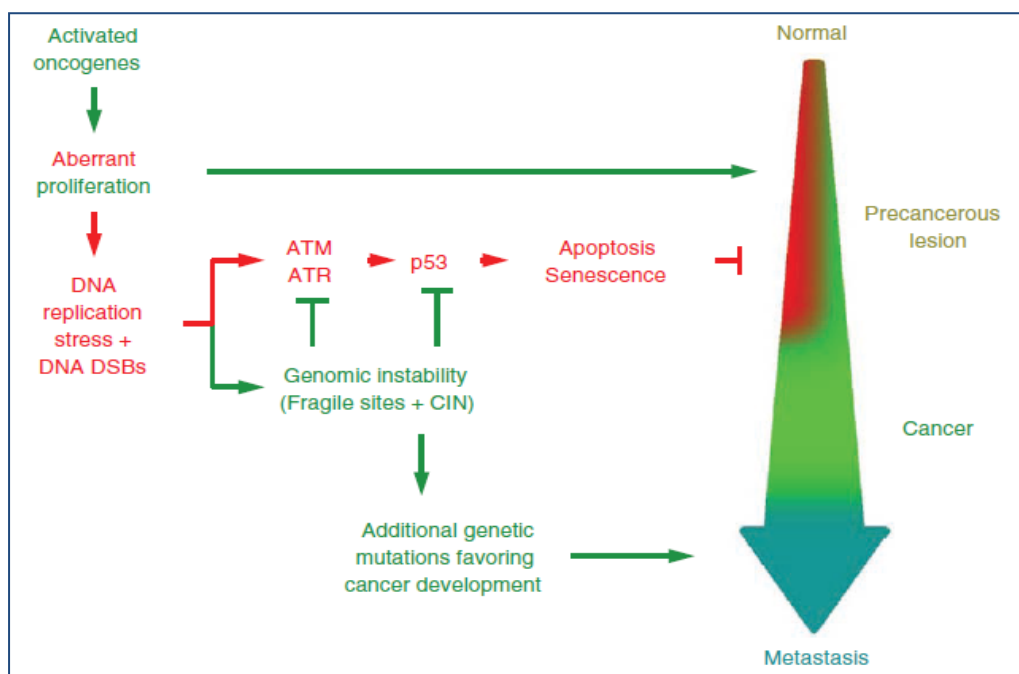
μεθυλίωση του υποκινητή του εξωνίου 1β[71, 72]. Μεθυλίωση του υποκινητή της p14^{ARF} έχει αναφερθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως του παχέος εντέρου [73] του προστάτη[74], του μαστού[75], του στόματος[76] και του πνεύμονα [77, 78]. Παρόλο που ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι η απουσία του γονιδίου ή του mRNA της p14^{ARF} δεν είναι τόσο συχνές στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Non-small Cell Lung Cancer, NSCLC) [79, 80], όλες συμφωνούν στην διαταραχή της έκφρασής της σε ένα μεγάλο ποσοστό των περιπτώσεων NSCLC[29, 81]. Παραδόξως, υπερέκφραση της p14^{ARF} έχει επίσης αναφερθεί σε ορισμένους τύπους καρκίνου όπως του πνεύμονα [82], του τραχήλου της μήτρας[83] και σε λεμφώματα [84, 85], αλλά και σε ορισμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές (π.χ. HeLa, H1299).

1.5. Σχέση DDR και ARF

1.5.1 Ενεργοποίηση από ογκογονίδια (oncogenic stress)

Τα δύο μονοπάτια, αν και μοιράζονται την ενεργοποίηση του πολύ σημαντικού παράγοντα p53, αποκρίνονται φαινομενικά σε διαφορετικά ερεθίσματα και διαδραματίζουν διαφορετικό ρόλο κατά την καρκινογένεση. Το μονοπάτι DDR ανιχνεύει βλάβες στο DNA και ενεργοποιεί τις απαραίτητες διαδικασίες με σκοπό την εξασφάλιση της ακεραιότητας του γονιδιώματος, η οποία είναι απαραίτητη για την προστασία των κυττάρων από την καρκινική εξαλλαγή. Μάλιστα, η ενεργοποίησή του φαίνεται ότι συμβαίνει από τα πρώιμα στάδια κατά την πολυσταδιακή διαδικασία της καρκινογένεσης, αφού τα στοιχεία του μονοπατιού έχουν βρεθεί ενεργοποιημένα σε υπερπλαστικούς και δυσπλαστικούς ιστούς.[86, 87] Η ενεργοποίηση του μονοπατιού DDR σε προκακρινικές αλλοιώσεις συνοδεύεται από αύξηση των επιπέδων απόπτωσης και γήρανσης, γεγονός που υποδεικνύει τον πολύ σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει το DDR για την ενεργοποίηση μηχανισμών που λειτουργούν ως φυσικοί φραγμοί του κυττάρου ενάντια στην καρκινικό μετασχηματισμό[88]. Η ενεργοποίηση DDR και η παρουσία σημείων στο DNA όπου συγκεντρώνονται πρωτεΐνες του μηχανισμού όπως η γH2AX και η 53BP1 (τα σημεία-εστίες ονομάζονται **foci**) στους υπερπλαστικούς ιστούς υποδηλώνει την διαρκή δημιουργία βλαβών του DNA και επαναλαμβανόμενους κύκλους επιδιόρθωσης. Ωστόσο, σε ένα τόσο πρώιμο στάδιο, δεν παρατηρούνται

ακόμα πολλά από τα χαρακτηριστικά του καρκινικού όγκου, όπως η μείωση του μήκους των τελομερών ή οι μεταλλάξεις γονιδίων που ευθύνονται για την διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος[86, 89, 90] και οι προκαρκινικές αλλοιώσεις δεν εμφανίζουν τη γενωμική αστάθεια που χαρακτηρίζει τους καρκινικούς όγκους[91]. Αντιθέτως, αυτό που παρατηρείται ήδη από το προκαρκινικό στάδιο είναι η ενεργοποίηση ογκογονιδίων όπως το *ras*, το *myc*, ο *E2F1*[87, 88, 92-94]. Επομένως, τα ενεργοποιημένα ογκογονίδια μπορούν να προκαλέσουν ενεργοποίηση του DDR μονοπατιού η οποία βρέθηκε ότι μεσολαβεί στην ενεργοποίηση απόπτωσης ή γήρανσης η οποία συχνά παρατηρείται ως αποτέλεσμα της δράσης των ογκογονιδίων [88, 93, 94] (Σχ.6).



Σχήμα 6: Μοντέλο ενεργοποίησης του DDR μονοπατιού από ογκογονίδια και ο ρόλος του στην εξέλιξη της καρκινογένεσης. Πηγή: Halazonetis, T., V. Gorgoulis, and J. Bartek, An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. Science (New York, N.Y.), 2008. 319(5868): p. 1352-1355.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, και η πρωτεΐνη ARF ενεργοποιείται από ογκογονίδια και μπορεί να προκαλέσει αναστολή κυτταρικού κύκλου και γήρανση, μέσω p53-εξαρτώμενων και p53-ανεξάρτητων διαδικασιών[17, 29]. Φαίνεται, λοιπόν, ότι, εκτός από έναν κοινό στόχο (την p53), τα δύο μονοπάτια μοιράζονται και έναν κοινό παράγοντα ενεργοποίησης που είναι το ογκογονικό στρες. Τα κοινά αυτά

χαρακτηριστικά μπορούν να έχουν διαφορετική σημασία: ο συνδυασμός τους μπορεί να συμβάλλει στην επίτευξη ενός μέγιστου προστατευτικού αποτελέσματος ενάντια στην καρκινογένεση ή πιθανόν να ενεργοποιούνται σε διαφορετικά χρονικά σημεία και στάδια με διαφοροποιημένο ρόλο ανάλογα με τις υπάρχουσες συνθήκες. Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση γήρανσης από το DDR ως απόκριση στην έκφραση του ογκογονιδίου *ras* υποδεικνύει έναν εναλλακτικό μηχανισμό που εξηγεί πιθανότατα και την απουσία έκφρασης και συμμετοχής της $p14^{ARF}$ στην επαγωγή γήρανσης από το *ras* σε ανθρώπινα κύτταρα, σε αντίθεση την $p19^{ARF}$ στον ποντικό [27-29].

1.5.2. Ρόλος της ARF στο DDR-Πιθανές αλληλεπιδράσεις με στοιχεία του μονοπατιού

Από την άλλη πλευρά, και η ARF έχει αναφερθεί ότι μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην απόκριση σε βλάβες του DNA. Η πρώτη σχετική παρατήρηση έγινε σε ποντίκια με απενεργοποιημένο $p19^{ARF}$ ($p19^{ARF} -/-$), τα οποία εμφάνιζαν όγκους με μεγαλύτερη συχνότητα σε σχέση με τα wild type (wt) ποντίκια έπειτα από έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία [95]. Μία άλλη μελέτη, ωστόσο, δείχνει ότι η $p19^{ARF}$ δεν παίζει ρόλο στην απόκριση μετά από έκθεση σε ακτινοβολία που ενεργοποιείται από την ATM, ωστόσο τα επίπεδά της σε ινοβλάστες ποντικού με απενεργοποιημένο το *atm* γονίδιο εμφανίζονται αυξημένα πιο πρώιμα [35].

Άλλες μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση της ARF με το DDR ή με αλληλεπιδράσεις με στοιχεία του μονοπατιού. Κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι η ARF συμβάλλει στην φωσφορυλίωση της p53 από την ATM μετά από έκφραση ογκογονιδίων όπως το *myc*, ο *E2F1* και η β-κατενίνη [96, 97]. Ωστόσο, η παρατήρηση αυτή μπορεί να οφείλεται στην απλή αύξηση των επιπέδων της p53 που οδηγεί σε αύξηση και της φωσφορυλιωμένης μορφής λόγω ταυτόχρονης ενεργοποίησης και των δύο μονοπατιών από το ογκογονικό στρες. Επίσης, κάποια ερευνητικά αποτελέσματα δείχνουν ότι η ARF συμβάλλει στα πρώτα στάδια της απόκρισης σε βλάβες του DNA μετά από έκθεση σε ακτινοβολία μέσω αλληλεπίδρασης με την p53 και ενεργοποίησής της μέσα στις πρώτες ώρες από την ακτινοβολία [98, 99]. Ωστόσο, η πρώτη μελέτη που δείχνει ότι η ARF συμβάλλει στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου έπειτα από βλάβες του DNA αφορά μόνο ινοβλάστες ποντικού [98], ενώ

στη δεύτερη μελέτη που μελετά και ανθρώπινους ινοβλάστες δεν εξετάζεται η συνεισφορά της p14^{ARF} στην ρύθμιση της κυτταρικής απόκρισης στα πλαίσια της ακτινοβόλησης, ενώ τα συνολικά επίπεδά της παραμένουν σταθερά με τη δράση της να αποδίδεται σε αυξημένη σύνδεση με την p53 [99]. Παραδόξως, στην ίδια μελέτη, ούτε η αυξημένη πρόσδεση στην Mdm2, η οποία παρατηρείται αργότερα από την αύξηση της p53, φαίνεται να ενισχύει τη δράση της ARF, αντίθετα φαίνεται ότι δρα ανασταλτικά. Επομένως, πέρα από τη συμβολή της ARF στην αύξηση των επιπέδων της p53 έπειτα από ακτινοβόληση των κυττάρων, δεν διευκρινίζεται ο ρόλος της αυξημένης πρόσδεσης στην Mdm2 και της παροδικής μετατόπισης στον πυρηνίσκο που παρατηρείται στο στενό χρονικό παράθυρο των 4-6 ωρών μετά την ακτινοβόληση ενώ μετά τις 10 ώρες η ARF ανακατανέμεται στο πυρηνόπλασμα.

Στον αντίποδα, μία άλλη μελέτη δείχνει ότι η ακτινοβόληση με υπεριώδη ακτινοβολία προκαλεί διάσπαση του συμπλόκου NPM-ARF και ανακατανομή της ARF από τον πυρηνίσκο στο πυρηνόπλασμα ήδη από την πρώτη ώρα μετά την ακτινοβόληση[100]. Ωστόσο η μελέτη αυτή εξετάζει μόνο την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας και όχι της ιονίζουσας ακτινοβολίας που είναι πιο έντονη και προκαλεί δικλωνικές θραύσεις.

Τα πιθανά σημεία διασύνδεσης όμως της ARF με το μονοπάτι DDR δεν σταματούν εδώ, καθώς ορισμένες μελέτες έχουν δείξει αλληλεπίδραση της ARF με τις κινάσες ATM και ATR ανεξάρτητα από τη δράση της στην p53[101]. Τα ευρήματα μίας μελέτης αποκάλυψαν τη δυνατότητα της ARF να αναστέλλει τη φωσφορυλίωση του NF-κB μεταγραφικού παράγοντα μέσω αλληλεπίδρασης με την ATR κινάση, προωθώντας την απόπτωση μέσω TNFα (Tumor Necrosis Factor alpha) [102]. Ωστόσο, η δράση αυτή έχει δειχθεί μόνο έπειτα από τεχνητή υπερέκφραση της ARF και δεν συνοδεύεται από ενδείξεις ενεργοποίησης του DDR μονοπατιού, όπως εστίες γH2AX ή RPA, ενώ η υπεριώδης ακτινοβολία ή πρόκληση γενετοξικού στρες δεν ενεργοποιεί το συγκεκριμένο μονοπάτι, η λειτουργική σημασία του οποίου παραμένει αδιευκρίνιστη[102, 103]. Μία ακόμη μελέτη δείχνει ενεργοποίηση των κινασών ATM και ATR από την ARF μέσω αλληλεπίδρασης και ενεργοποίησης της ακετυλο-τρανσφεράσης Tip60 ως απόκριση σε γενετοξικό στρες [40]. Και σε αυτήν τη μελέτη, όμως, το κυτταρικό σύστημα που χρησιμοποιείται απαιτεί την τεχνητή εξωγενώς επαγόμενη υπερέκφραση της ARF σε αρκετά υψηλά επίπεδα.

Παρά τον ξεκάθαρο ρόλο της ARF ως ογκοκατασταλτικού παράγοντα, πολλά από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις μελέτες διερεύνησης των διαφορετικών λειτουργιών και αλληλεπιδράσεων στις οποίες συμμετέχει παρουσιάζουν δύο σημαντικούς περιορισμούς: 1) σε πολλά από τα ανθρώπινα κυτταρικά συστήματα η υπερέκφραση της ARF επάγεται εξωγενώς σε αρκετά υψηλά επίπεδα που δεν είναι σίγουρο ότι μπορούν να προκύψουν από την παρουσία *in vivo* ερεθισμάτων και 2) πολλά από τα αποτελέσματα, ιδιαίτερα για τον ρόλο της ARF στην ανάπτυξη του όγκου, προέρχονται από πειράματα σε ποντίκια στα οποία όμως η p19^{ARF} φαίνεται ότι έχει έναν διαφοροποιημένο ρόλο σε σχέση με την p14^{ARF} στον άνθρωπο, καθώς πολλά από τα αποτελέσματα αυτά δεν έχουν επαληθευτεί σε ανθρώπινα κυτταρικά συστήματα [17, 29].

Επιπλέον, και η κινάση ATM φαίνεται να παρουσιάζει διαφορές ως προς τη δράση της στην καρκινογένεση μεταξύ ποντικού και ανθρώπου. Παρά την δεδομένη συμβολή της στην παρεμπόδιση κακοηθειών όπως τα λεμφώματα στον άνθρωπο, στο ποντίκι ο ρόλος της στην ανάπτυξη των αντίστοιχων τύπων κακοήθειας είναι πιο περιορισμένος [104, 105]. Οι περιορισμοί αυτοί περιπλέκουν την πλήρη κατανόηση του ρόλου και των αλληλεπιδράσεων των δύο αυτών πρωτεϊνών και των αντίστοιχων μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν, αλλά από την άλλη πλευρά εξηγούν εν μέρει τα φαινομενικά αντικρουόμενα αποτελέσματα που έχουν προκύψει σε ορισμένες περιπτώσεις.

1.6. ΣΤΟΧΟΣ

Όπως γίνεται αντιληπτό από τα παραπάνω, υπάρχουν αρκετές επιστημονικές ενδείξεις, που υποστηρίζουν την ύπαρξη μίας σχέσης μεταξύ του μονοπατιού απόκρισης σε βλάβες του DNA και της ARF. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετοί πειραματικοί περιορισμοί, με σημαντικότερους την στήριξη μεγάλου μέρους των αποτελεσμάτων σε πειράματα που αφορούν μοντέλα ποντικών, στα οποία υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η δράση της ARF αλλά και της ATM είναι διαφοροποιημένη από ότι στους ανθρώπους, καθώς και σε κυτταρικά συστήματα με τεχνητή εξωγενή υπερέκφραση της ARF σε πολύ υψηλά επίπεδα τα οποία είναι δύσκολο να επαχθούν σε *in vivo* κυτταρικές αποκρίσεις σε εξωτερικά ή εσωτερικά ερεθίσματα. Οι περιορισμοί αυτοί καθιστούν αρκετά επισφαλής την εξαγωγή συμπερασμάτων για τον ρόλο της p14^{ARF} και τη σχέση της με το μονοπάτι DDR στα πλαίσια των μηχανισμών καρκινογένεσης στον άνθρωπο.

Οι ενδείξεις αυτές και οι ελλείψεις στα πειραματικά δεδομένα δημιουργούν την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης του μονοπατιού DDR με την ARF και της σημασίας της για την πορεία της καρκινογένεσης. Η ανάγκη αυτή σε συνδυασμό με πρόσφατα ευρήματα της ερευνητικής ομάδας του Καθηγητή Βασίλη Γοργούλη που δείχνουν ότι η έκφραση της ARF σε ανθρώπινους ιστούς παρατηρείται σε πιο προχωρημένο καρκινικό στάδιο σε σχέση με την ενεργοποίηση του DDR, η οποία παρατηρείται ήδη από το στάδιο της υπερπλασίας, οδήγησαν στη διατύπωση ενός βασικού ερωτήματος: Η μεταγενέστερη ενεργοποίηση της ARF σε σχέση με το μονοπάτι DDR αντικατοπτρίζει μία λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο μονοπατιών; Η πιθανότητα ύπαρξης μίας τέτοιας αλληλεπίδρασης δικαιολογείται και υποστηρίζεται στο πλαίσιο μίας συντονισμένης προσπάθειας του κυττάρου να ανταποκριθεί στα ογκογόνα ερεθίσματα, ενεργοποιώντας εναλλακτικούς αντικαρκινικούς φραγμούς σε περίπτωση απώλειας ενός σημαντικού αντικαρκινικού μηχανισμού όπως το μονοπάτι απόκρισης σε βλάβες του DNA.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της σχέσης μεταξύ της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης ARF και του μονοπατιού απόκρισης σε δικλωνικές θραύσεις (DDR) και της σημασίας της σχέσης αυτής για την εξέλιξη του καρκίνου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Κύτταρα

2.1.1. Καλλιέργεια κυττάρων

Οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές H1299 (καρκίνου του πνεύμονα) και HeLa (καρκίνου τραχήλου της μήτρας) NARF2, Saos2-E2F1-ER και η κυτταρική σειρά εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικού MEF NPM/B23-p53 double KO[59] (ευγενική προσφορά του Dr P.G. Pellici) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (GIBCO, Invitrogen, AntiSel Αθήνα, Ελλάδα) συμπληρωμένο με 10% ορό FBS (GIBCO, AntiSel Invitrogen, AntiSel, Αθήνα, Ελλάδα) και αντιβιοτικά πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη 1% (GIBCO, Invitrogen, AntiSel, Αθήνα, Ελλάδα). Τα κύτταρα NARF2 (ευγενική προσφορά από τον Dr G. Peters) προέρχεται από τα U2OS κύτταρα στα οποία έχει εισαχθεί το γονίδιο-cDNA του p14ARF υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης [30]. Το κυτταρικό σύστημα Saos2-E2F1-ER (ευγενική προσφορά από τον Dr D.Ginsberg) εκφράζει τον παράγοντα E2F1 με την προσθήκη 4-υδροξυ-ταμοξιφένης [106]. Τα κύτταρα ανθρώπινου φυσιολογικού βρογχικού επιθηλίου HBEC 3KT (hTert/ck4) και K-Ras [107, 108] καλλιεργήθηκαν σε ειδικό θρεπτικό μέσο για κερατινοκύτταρα συμπληρωμένο με Επιδερμικό Αυξητικό Παράγοντα EGF (5ng/ml) και εκχύλισμα βλεννογόνου μόσχου BPE (Bovine Pituitary Extract) (50μg/ml) (GIBCO, Invitrogen, AntiSel Αθήνα, Ελλάδα) .

2.1.2. Επιδράσεις

Η χημική αναστολή της ATM έγινε επίδραση με τον ειδικό χημικό αναστολέα της ATM κινάσης Ku55933[109] (Calbiochem, MERCK, Αθήνα, Ελλάδα) για 24 ώρες σε τελική συγκέντρωση 10μM σε θρεπτικό μέσο DMEM. Για την ενεργοποίηση DDR έγινε επίδραση με δοξορουβικίνη (Pfizer) σε συγκέντρωση 2μM για 24 ώρες. Η επαγωγή της έκφρασης της p14^{ARF} στα κύτταρα NARF2 γίνεται μέσω της προσθήκης IPTG (Ambion, AntiSel, Αθήνα, Ελλάδα) σε συγκεντρωση 0,1 mM για 48 ώρες. Η επαγωγή E2F1 στα κύτταρα Saos2-E2F1-ER έγινε με την προσθήκη 4-υδροξυ-ταμοξιφένης (Sigma) σε συγκέντρωση 300nM.

2.1.3. Αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης με CHX

Σε κύτταρα H1299 που είχαν υποστεί επίδραση με τον χημικό αναστολέα της ATM κινάσης Ku55933 ή μόνο με τον διαλύτη DMSO (ως αρνητικό μάρτυρα) προστέθηκε κυκλοεξαμίδη (Cycloheximide, CHX, Applichem, BioLine, Αθήνα, Ελλάδα) σε τελική συγκέντρωση 10μg/ml για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα (2, 4, 6 και 8 ώρες). Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν και έγινε απομόνωση πρωτεΐνης και ανοσοαποτύπωση κατά Western για p14ARF. Με ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης p14ARF με το πρόγραμμα ανάλυσης Image J βρέθηκε ο χρόνος ημίσειας ζωής χωρίς και με την επίδραση του αναστολέα ATM και απεικονίστηκαν στο αντίστοιχο γράφημα.

2.1.4. Μέτρηση ρυθμού κυτταρικής ανάπτυξης

Κύτταρα με ή χωρίς αποσιώπηση του p14^{ARF} επιστρώθηκαν σε τρυβλία των 24 πηγαδιών και υπέστησαν επίδραση με DMSO ή αναστολέα της ATM (ATMi) για 4 ημέρες. Ανά μία ημέρα κύτταρα από κάθε ομάδα συλλέγονταν με θρυψίνη και γινόταν μέτρηση του αριθμού ζωντανών κυττάρων σε κυτταρόμετρο Neubauer έπειτα από χρώση με Trypan Blue για διαχωρισμό των νεκρών κυττάρων. Ο αριθμός των κυττάρων ανά ημέρα απεικονίστηκε με γράφημα.

2.1.5. Δοκιμασία σχηματισμού αποικιών σε μαλακό άγαρ (Soft agar assay)

Κύτταρα H1299 με (shp14^{ARF}) ή χωρίς (EV) αποσιώπηση του p14^{ARF} υπέστησαν επίδραση με DMSO ή αναστολέα της ATM (Ku55933). 25×10^3 κύτταρα από κάθε ομάδα αναμείχθηκαν με 1.6 ml διαλύματος άγαρ 0.35% (w/v) σε πλήρες θρεπτικό υλικό θερμοκρασίας 42°C. Το μίγμα των κυττάρων επιστρώθηκε στη συνέχεια σε πιάτα διαμέτρου 60 mm επιστρωμένα με 3ml αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης (SeaPlaque Low Melting Point Agarose, Lonza) πυκνότητας 0.7% (w/v) σε πλήρες θρεπτικό υλικό με ορό. Μετά από περίοδο 17 ημερών, κατά τη διάρκεια της οποίας η προσθήκη νέου άγαρ γινόταν εβδομαδιαία, έγινε μέτρηση των κυτταρικών εστιών. Τα αποτελέσματα προήλθαν από τρεις ανεξάρτητες επαναλήψεις.

2.1.6. Παροδική Αποσιώπηση γονιδίων με τεχνολογία RNA interference (siRNA)

Για την παροδική αποσιώπηση γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν ολιγονουκλεοτίδια siRNA έναντι των γονιδίων *ATM*, *p14ARF*, *PP1*, *NEK2*, *NPM/B23*, *Chk2* και *ULF* (Stealth RNAi™ siRNA, Invitrogen, AntiSel, Αθήνα, Ελλάδα) τα οποία εισήχθησαν στα κύτταρα με τη βοήθεια λιποσωμάτων. Για την εισαγωγή των siRNA ολιγονουκλεοτιδίων στα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, AntiSel, Αθήνα, Ελλάδα) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ολιγονουκλεοτίδιο μη ειδικής αλληλουχίας (Stealth RNAi™ siRNA Negative Control Med GC, Invitrogen, AntiSel, Αθήνα, Ελλάδα).

2.1.7. Μόνιμη αποσιώπηση γονιδίων σε σταθερές κυτταρικές σειρές

Για τη δημιουργία κυτταρικής σειράς H1299 με σταθερή αποσιώπηση της *p14^{ARF}*, έγινε διαμόλυνση κυττάρων H1299 με ρετροϊό short hairpin *p14^{ARF}* (shp14^{ARF}). Για την παραγωγή του ρετροϊού χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Phoenix amphotrophic, η οποία προέρχεται από τα κύτταρα 293T και εκφράζει τις αλληλουχίες πακεταρίσματος των ρετροϊκών φορέων. $1,5 \times 10^6$ κύτταρα Phoenix επιστρώθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 60mm. Την επόμενη μέρα έγινε διαμόλυνση των κυττάρων με τον ρετροϊκό φορέα pRetroSuper-hygro-shp14^{ARF} [27] (αλληλουχία shRNA GAACATGGTGCGCAGGTTC, δωρεά του Dr T.D.Halazonetis) με το αντιδραστήριο Effectene (Qiagen, Bioanalytica, Αθήνα, Ελλάδα). Την επόμενη μέρα έγινε αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού με 3ml κανονικού DMEM (Gibco, AntiSel, Αθήνα, Ελλάδα). 48 ώρες μετά την διαμόλυνση έγινε συλλογή του ιικού υπερκειμένου το οποίο μετά από διήθηση από φίλτρο 0,45μm χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση H1299 κυττάρων σε πυκνότητα 50-60% σε τρυβλία 60mm παρουσία 10μg/ml polybrene (Sigma). Την επόμενη μέρα έγινε αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού με 5ml κανονικού DMEM και 48 ώρες μετά την μεταγωγή του ιού έγινε ανακαλλιέργεια κυττάρων σε τρυβλία 10cm με αραιώση 1:4 και ξεκίνησε η επιλογή με υδρομυκίνη B (Applichem, Bioline, Αθήνα, Ελλάδα) σε συγκέντρωση 400μg/ml για 15 μέρες. Από τα κύτταρα που επέζησαν απομονώθηκαν μονά κύτταρα και μεταφέρθηκαν σε πηγάδια τρυβλίων 96 πηγαδιών (96-well plates) (Corning, AntiSel,

Αθήνα, Ελλάδα) και σταδιακά σε τρυβλία 24 και 12 πηγαδιών πάντα υπό την επίδραση υδρομυκίνης B για την ανάπτυξη κλώνων με σταθερή έκφραση του $shr14^{ARF}$. Οι κλώνοι που αναπτύχθηκαν εξετάστηκαν για την επιτυχή αποσιώπηση της $p14^{ARF}$ με ανοσοαποτύπωση έναντι της $p14^{ARF}$.

2.2. Ανάλυση πρωτεϊνών

2.2.1. Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα

Για την απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα, τα κύτταρα θρυψινοποιούνται, συλλέγονται, φυγοκεντρούνται και στη συνέχεια λύονται με την προσθήκη διαλύματος λύσης παρουσία αναστολέων πρωτεασών (Protease inhibitor cocktail, Thermo Scientific, Bioanalytica) και φωσφατασών (Phosphatase inhibitor cocktail, Thermo Scientific, Bioanalytica). Η ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης στο διάλυμα λύσης έγινε με τη μέθοδο Bradford (BioRad).

2.2.2. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από παγωμένο ιστό

Λαμβάνεται ποσότητας παγωμένου ιστού (φυσιολογικού και νεοπλασίας), και ομογενοποιείται σε υπότονο διάλυμα RIPA σε αναλογία 1:2,5 [0,05M Tris Base pH=8,0, 0,15M NaCl, 0,5% NaDOC (sodium deoxycholate), 1% Nonidet P-40, 0,1% SDS] ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 50-100 mg/ml, ενώ προστίθενται και αναστολείς πρωτεασών - φωσφατασών (1μg/ml aprotinin, 1 μg/ml leupeptin και 1 μg/ml pepstatin A). Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13000rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο συλλέγεται ενώ το ίζημα αποθηκεύεται στους -80°C για να εκχυλιστούν οι ιστόνες από αυτό. Στα δείγματα προσδιορίζεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών με φωτομέτρηση και πρότυπη καμπύλη Bradford. Τα δείγματα φυλάσσονται στους -80°C.

2.2.3. Απομόνωση ιστονών

Τα ιζήματα από τις απομονώσεις πρωτεϊνών διαλυτοποιούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης για ιστόνες (100μl HEPES 1M pH7,4, 30μl $MgCl_2$ 0,5M, 100μl KCl 1M και 250μl HCl 1N) με αναλογία όγκου 1:5. Σε αυτά προστίθενται αντιπρωτεασικοί και αντιφωσφατασικοί και στη συνέχεια επωάζονται για 1-2 ώρες στους 4°C υπό ανάδευση. Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται στις 13500rpm για 20 λεπτά στους 4°C.

Το υπερκείμενο συλλέγεται ενώ το ίζημα αποθηκεύεται στους -80°C για να εκχυλιστούν οι ιστόνες από αυτό. Στα δείγματα προσδιορίζεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών με φωτομέτρηση και πρότυπη καμπύλη Bradford. Τα δείγματα φυλάσσονται στους -80°C . Πριν τη φόρτωση των δειγμάτων ιστονών είναι απαραίτητη η εξουδετέρωση του όξινου χαρακτήρα με 1-5μl Tris-Cl pH9,5.

2.2.4. Στύπωμα κατά Western ή Ανοσοαποτύπωση (Western Blot WB ή Immunoblot, IB)

50 μg πρωτεΐνης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη PVDF (Millipore, LabSupplies, Αθήνα, Ελλάδα). Η κάλυψη των μη ειδικών θέσεων έγινε με επώαση σε διάλυμα TBS-Tween 0,1%-γάλα 5%. Στη συνέχεια έγινε ολονύκτια επώαση της μεμβράνης με αντίσωμα για με πρωτογενές αντίσωμα στους 4° . Η επώαση με δευτερογενές anti-mouse ή anti-rabbit αντίσωμα έγινε για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η εμφάνιση έγινε είτε με χημειοφωταύγεια με διάλυμα ECL (Pierce, Thermo Scientific, Bioanalytica, Αθήνα, Ελλάδα) είτε με αλκαλική φωσφατάση με διάλυμα BCIP/NBT (Invitrogen, AntiSel, Αθήνα, Ελλάδα).

2.2.4.1. Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμίδιου

Αρχικά το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρασκευάζεται με αρχική στρώση το πήκτωμα διαχωρισμού (Separating gel). Για πρωτεΐνες με μοριακό βάρος πάνω από 40kD η συγκέντρωση του πηκτώματος διαχωρισμού είναι 10% (2,85ml dH_2O , 2,5ml 2,25M Tris-Cl, pH8,8, 4,5ml acrylamide/bis 37:1, 100μl 10% SDS, 100μl 10% APS, 10μl TEMED), ενώ για πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους είναι 15% (0m53l dH_2O , 2,5ml 2,25M Tris-Cl, pH8,8, 6,76ml acrylamide/bis 37:1, 100μl 10% SDS, 100μl 10% APS, 10μl TEMED). Πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού προστίθεται μικρότερη ποσότητα πηκτώματος φόρτωσης (Stacking gel) με συγκέντρωση 4% (5,6ml dH_2O , 1,25ml 0,5M Tris-Cl, pH6,8, 2ml acrylamide/bis 37:1, 100μl 10% SDS, 100μl 10% APS, 10μl TEMED). Το πήκτωμα τοποθετείται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x (Running buffer 10x: 900ml dH_2O , 24gr Trizma Base, 115,2gr Glycine, 8gr SDS). Ταυτόχρονα τα δείγματα προετοιμάζονται. Σε 30μg πρωτεΐνης (μέγιστος όγκος 15μl) προσθέτουμε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης 1x (SDS protein loading buffer 2x: 20% Glycerol, 4% SDS, 120mM Tris-Cl

pH6,8, 0,003% Bromophenol blue, 10% β-μερκαπτοαιθανόλης). Θερμαίνουμε το παραπάνω μίγμα επί 10 λεπτά στους 95°C, ώστε να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες. Στη συνέχεια γίνεται φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 125V και 200mA για 3 ώρες περίπου. Μεταξύ των δειγμάτων ηλεκτροφορείται δείκτη (PageRuler Prestained Protein Ladder, SM0671) που περιέχει μίγμα πρωτεϊνών με γνωστό μοριακό βάρος και αποτελεί σημείο αναφοράς για την εκτίμηση του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης που εξετάζουμε.

2.2.4.2. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF

Μετά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη PVDF με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η μεταφορά πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 1x (Transfer Buffer 20x: 500ml dH₂O, 15,5gr Trizma Base, 72gr Glycine) και 20% μεθανόλης. Η μεταφορά γίνεται στα 100V και 200mA επί 45 λεπτά για πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους (έως 30 kD) έως 1,5 ώρες για πρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους (έως 70 kD). Στη συνέχεια η μεμβράνη επώαζεται με διάλυμα κάλυψης με ειδικών θέσεων 5% ημιαποβουτυρωμένο γάλα ή Αλβουμίνη ορού μόσχου (Bovine Serum Albumine) σε περίπτωση χρήσης φωσφο-αντισωμάτων διαλυμένα σε TBS-T 0,1% (20mM TrisCl pH7.6, 0.135M NaCl, 0.1% Tween-20 0,1%) 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

2.2.4.3. Επώαση της μεμβράνης με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα.

Η μεμβράνη επώαζεται με το πρωτογενές αντίσωμα (διαλυμένο σε 0,5% γάλα και TBS-T 0,1%) ολονύκτια στους 4°C. Ακολουθούν τρεις πλύσεις της μεμβράνης 5 λεπτών η κάθε μία σε διάλυμα TBS-T 0,1%. Στη συνέχεια γίνεται η επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα σε συγκεκριμένη αραίωση ανάλογα με το δευτερογενές και τη συγκέντρωσή του για περίπου 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν τρεις πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα TBS-T 0,1%.

2.2.4.4. Εμφάνιση της μεμβράνης με αλκαλική φωσφατάση (AP-Alkaline Phosphatase).

Το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι συνδεδεμένο με AP (AP conjugated). Η μεμβράνη επωάζεται σε αραιώση 1/1000 για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Η μεμβράνη καλύπτεται με 14ml διαλύματος εμφάνισης (14ml AP buffer, 200μl διάλυμα NBT, 100μl BCIP). Κατά την εμφάνιση της μεμβράνης δεν πρέπει να εκτίθεται σε δυνατό φως γιατί το ένζυμο απενεργοποιείται.

Μόλις ολοκληρωθεί η εμφάνιση της πρωτεΐνης, η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε νερό για να σταματήσει η αντίδραση.

2.2.4.5. Εμφάνιση της μεμβράνης με χημειοφωταύγεια

Το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι συνδεδεμένο με HRP (HRP conjugated - Horse Radish Peroxidase). Η μεμβράνη επωάζεται σε αραιώση 1/2500 για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα διαλύματα της χημειοφωταύγειας αναμιγνύονται 5 λεπτά πριν την επώαση της μεμβράνης.

Η μεμβράνη καλύπτεται με το διάλυμα της χημειοφωταύγειας (chemiluminescent detection substrate της εταιρίας Pierce) και επωάζεται για 5 λεπτά στο σκοτάδι. Η μεμβράνη καλύπτεται με σελοφάν και τοποθετείται σε κασέτα εμφάνισης. Στη συνέχεια σε σκοτεινό θάλαμο, πάνω στη μεμβράνη τοποθετείται κομμάτι φιλμ αυτοραδιογραφίας (Kodak X-omat). Ο χρόνος έκθεσης καθορίζεται εμπειρικά.

Τα φιλμ αναλύθηκαν σε σαρωτή και εκτιμήθηκαν με το πρόγραμμα Image-Pro, Έκδοση 3.0 των Windows (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

2.2.5. Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών (Immunoprecipitation, IP)

Κύτταρα σε καλλιέργεια υπέστησαν επίδραση με αναστολέα ATM ή δοξορουβικίνη. Στη συνέχεια έγινε λύση των κυττάρων σε διάλυμα λύσης RIPA (Tris-HCl pH 8.0 50mM, NaCl 150mM, SDS 0,1%, Sodium Deoxycholate 1%, Triton X-100 1%) παρουσία αναστολέων πρωτεασών (Protease inhibitor cocktail, Thermo Scientific, Bioanalytica), φωσφατασών (Phosphatase inhibitor cocktail, Thermo Scientific, Bioanalytica). Τα εκχυλίσματα πρωτεϊνών επώαστηκαν με σφαιρίδια αγαρόζης G-πρωτεΐνης για 1 ώρα στους 4°C για καθαρισμό από μη ειδικά προσδεδεμένες πρωτεΐνες και στη συνέχεια με αντίσωμα έναντι της p14^{ARF} ή NPM/B23 ή myc

ολονύκτια στους 4°C . Ακολούθησε επώαση με σφαιρίδια αγαρόζης G-πρωτεΐνης για 2 ώρες στους 4°C. Έγινε πλύση των σφαιριδίων με διάλυμα RIPA τρεις φορές και στη συνέχεια έκλουση της συνδεδεμένης πρωτεΐνης με προσθήκη διαλύματος φόρτωσης πρωτεϊνών με SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη και βράσιμο για 8 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε φόρτωση των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ανοσοπατύπωση κατά Western.

Για ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνικού συμπλόκου (co-Immunoprecipitation, coIP), ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τη χρήση διαφορετικού διαλύματος λύσης και πλύσεων (Tris HCl pH 8.0 20 mM, NaCl 137 mM, Nonidet P-40 1%) .

Για την επίδραση των δειγμάτων με αλκαλική φωσφατάση (Calf Intestinal Phosphatase, CIP) χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα coIP χωρίς αντιφωσφατασικούς παράγοντες και με την προσθήκη MgCl₂ 10mM, DTT 1mM και CIP 1unit/μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.

2.2.6. Δοκιμασία ουβικιτίνης in vivo (in vivo ubiquitin assay)

Κύτταρα σε καλλιέργεια υπέστησαν επίδραση με αναστολέα ATM ή δοξορουβικίνη και στη συνέχεια με αναστολέα πρωτεασώματος (MG132, MERCK, Αθήνα, Ελλάδα) για 3 ώρες σε συγκέντρωση 30μM. Στη συνέχεια έγινε λύση των κυττάρων σε διάλυμα λύσης RIPA (Tris-HCl pH 8.0 50mM, NaCl 150mM, SDS 0,1%, Sodium Deoxycholate 1%, Triton X-100 1%) παρουσία αναστολέων πρωτεασών (Protease inhibitor cocktail, Thermo Scientific, Bioanalytica, Αθήνα, Ελλάδα), φωσφατασών (Phosphatase inhibitor cocktail, Thermo Scientific, Bioanalytica, Αθήνα, Ελλάδα), και αποουβικιτινασών (NEM, Applichem, Bioline, Αθήνα, Ελλάδα) . Τα εκχυλίσματα πρωτεϊνών επώαστηκαν με σφαιρίδια αγαρόζης G-πρωτεΐνης για 1 ώρα στους 4°C για καθαρισμό από μη ειδικά προσδεδεμένες πρωτεΐνες και στη συνέχεια με σφαιρίδια αγαρόζης G-πρωτεΐνης συνδεδεμένα με αντίσωμα για p14^{ARF} για 2 ώρες στους 4°C. Έγινε πλύση των σφαιριδίων με διάλυμα RIPA τρεις φορές και στη συνέχεια έκλουση της συνδεδεμένης πρωτεΐνης με προσθήκη διαλύματος φόρτωσης πρωτεϊνών με SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη και βράσιμο για 8 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε φόρτωση των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ανοσοπατύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι της ουβικιτίνης .

2.2.7.Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP).

Κύτταρα H1299 με ή χωρίς αποσιώπηση της p14^{ARF} (siARF) στα οποία έγινε επίδραση με DMSO ή αναστολέα ATM (Ku55933) μονιμοποιήθηκαν με φορμαλδεύδη 1% για 10 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια προστέθηκε γλυκίνη σε τελική συγκέντρωση 125 mM για 5 λεπτά στους 37°C. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 2 φορές με παγωμένο PBS και συλλέχθηκαν σε 1ml PBS παρουσία αντιπρωτεασικών και αντιφωσφατασικών αναστολέων. Έγινε φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 5 λεπτά και το ίζημα των κυττάρων αναδιαλύθηκε σε 600μl ειδικού διαλύματος(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 85 mM KCl and 0.5% NP40) και επώαστηκαν για 10 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 5000rpm για 5 λεπτά και επαναδιαλυση του ιζήματος σε διάλυμα λύσης (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 1% Triton-X, 0.1% Sodium Deoxycholate and 0.1% SDS) παρουσία αντιπρωτεασικών και αντιφωσφατασικών αναστολέων. Στη συνέχεια έγινε επίδραση με υπερήχους για τη διάσπαση του DNA σε κομμάτια μήκους 500 – 1000 bp. Η απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων έγινε με φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 5 λεπτά στους 4°C και η υπερκείμενη φάση που περιείχε τη διαλυτή χρωματίνη καθαρίστηκε με την προσθήκη σφαιριδίων αγαρόζης πρωτεΐνης A 50% με DNA σπέρματος σολωμού salmon sperm DNA/50% protein A agarose slurry (Millipore). Η ανοσοκατακρήμνιση έγινε με αντίσωμα έναντι ακετυλιωμένης ιστόνης H2B στη λυσίνη 20 (anti-H2B-AcK20 antibody). Έπειτα από ολονύκτια επώαση με το αντίσωμα στους 4°C τα σύμπλοκα χρωματίνης-αντισώματος συλλέχθηκαν με την προσθήκη σφαιριδίων αγαρόζης πρωτεΐνης A 50% με DNA σπέρματος σολωμού salmon sperm DNA/50% protein A agarose slurry (Millipore) και επώαση για 2 ώρες στους 4°C. Στη συνέχεια τα σφαιρίδια πλύθηκαν διαδοχικά για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε 1 ml διαλύματος λύσης χωρίς SDS, σε 1 ml διαλύματος λύσης με 500mM NaCl, σε 1ml διαλύματος σύστασης 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 250 mM LiCl, 1% NP40, 1% sodium deoxycholate και τέλος 2 φορές σε διάλυμα TE (Tris-EDTA). Η έκλουση των ανοσο-σμπλόκων από τα σφαιρίδια αγαρόζης έγινε σε 200μl (2 φορές από 100μl) διαλύματος έκλουσης(1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA) και επώαστηκαν για 5 λεπτά στους 65°C. Ακολούθησε επώαση με RNάση για 1 ώρα στους 37°C και με πρωτεϊνάση K για 4

ώρες στους 65°C. Η απομόνωση και ο καθαρισμός του DNA έγινε με φαινόλη-χλωροφόρμιο και η κατακρήμνιση την προσθήκη 10μg γλυκογόνου και αιθανόλης και ολονύκτια επώαση στους -20°C. Μετά από φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 30 λεπτά το ίζημα (DNA) αναδιαλύθηκε σε 10μl TE. Το DNA από τα ανοσοκατακρημνισμένα σύμπλοκα χρωματίνης ενισχύθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Για την ενίσχυση τμήματος 242bp του υποκινητή του γονιδίου της κυκλίνης E χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι εκκινητές: 5'-GCGCAAAGGGGGAAGGGGTA-3' (forward) και 5'-GCTCCTTCGCATCCCTGTGGA-3' (reverse). Ως αρνητικός έλεγχος χρησιμοποιήθηκε τμήμα 104bp σε θέση >1500bp από τη θέση έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου το οποίο ενισχύθηκε με τους ακόλουθους εκκινητές: 5'-CAGCCTGAGCAACATAGCAA-3' (forward) και 5'-TCCACAGCTCCTCTGTCCTT-3'. Για έλεγχο της συνολικής ποσότητας DNA χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις PCR το 1% του συνολικού εκχυλίσματος χρωματίνης που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοκατακρήμνιση.

2.2.8. Διαχωρισμός πρωτεϊνικών κλασμάτων πυρηνίσκου και πυρηνοπλάσματος από κύτταρα

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν, πλύθηκαν τρεις φορές σε PBS και στη συνέχεια αναδιαλύθηκαν σε 1ml ρυθμιστικού διαλύματος A (10 mM HEPES-KOH [pH 7.9], 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT) ομογενοποιήθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 1000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε ως το κυτταροπλασματικό κλάσμα. Το ίζημα των πυρήνων αναδιαλύθηκε σε 0.6 ml διαλύματος S1 (0.25 M sucrose, 10 mM MgCl₂) και επιστρώθηκε σε 0.6 ml διαλύματος S2 (0.35 M sucrose, 0.5 mM MgCl₂) και φυγοκεντρήθηκε στις 2500 rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Το καθαρισμένο ίζημα πυρήνων αναδιαλύθηκε σε 0.6ml διαλύματος S2 και υπέστη επίδραση με υπερήχους (10x10s). Το δείγμα στη συνέχεια επιστρώθηκε σε 0.6 ml διαλύματος S3 (0.88 M sucrose, 0.5 mM MgCl₂) και φυγοκεντρήθηκε στις 3500 rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα κρατήθηκε ως κλάσμα πυρηνίσκων ενώ η υπερκείμενη φάση ως πυρηνοπλασματικό κλάσμα. Ακολούθησε πλύση του ιζήματος με 0.2ml διαλύματος S2 και φυγοκέντρηση στις 2500 rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Ίσες ποσότητες πρωτεϊνών από τα κλάσματα πυρηνίσκου και πυρηνοπλάσματος αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά

Western. Τα πειράματα διαχωρισμού πυρηνισκικών και πυρηνοπλάσματικών κλασμάτων και η ανάλυσή τους πραγματοποιήθηκε από την ομάδα του Dr Sinisa Volarevic στην Κροατία.

2.2.9. Αναλύσεις Πρωτεομικής

2.2.9.1. Ανάλυση Υγρής Χρωματογραφίας-Φασματομετρίας μάζας (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS) (Φωσφο-πρωτεομική ανάλυση)

Κύτταρα H1299 υπέστησαν τις κατάλληλες επιδράσεις (αναστολή ATM, αποσιώπηση PP1, p14^{ARF} και NEK2 και έγινε απομόνωση πρωτεϊνών και ανοσοκατακρήμνιση της NPM/B23 με το κατάλληλο αντίσωμα. Με την προσθήκη TCA (TetraChloroAcetic Acid) στο διήθημα των δειγμάτων έγινε κατακρήμνιση και καθαρισμός της πρωτεΐνης NPM/B23 από κάθε δείγμα. Στη συνέχεια έγινε αναγωγή και αλκυλίωση της πρωτεΐνης και πέψη με θρυψίνη για 12 ώρες στους 37°C και ανάλυση των πεπτιδίων που προέκυψαν με LC-MS/MS. Ο καθαρισμός, η πέψη και η ανάλυση LC-MS/MS πραγματοποιήθηκε από την ομάδα πρωτεομικής του ΙΙΒΕΑΑ (Δρ Κ. Βουγάς και Δρ Θ. Ρουμελιώτης).

2.2.9.2. Ποσοτική ανάλυση ολικού πρωτεώματος με μέθοδο Υγρής Χρωματογραφίας-Φασματομετρίας μάζας (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS) μετά από σήμανση με iTRAQ (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification, AB Sciex)

H1299 κύτταρα μετά από τις κατάλληλες επιδράσεις (αναστολή ATM, αποσιώπηση PP1 και p14^{ARF}) συλλέχθηκαν και έγινε απομόνωση ολικών πρωτεϊνών σε διάλυμα SDS 0.05%. 100 mg πρωτεΐνης από κάθε δείγμα υπέστη αναγωγή, αλκυλίωση και πέψη με θρυψίνη. Τα πεπτίδια κάθε δείγματος που προέκυψαν σημάνθηκαν με 2 από τα 8 ισοβαρή αντιδραστήρια iTRAQ[110]. Τα διαφορετικά σημασμένα δείγματα συγκεντρώθηκαν και διαχωρίστηκαν με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης σε υψηλό pH και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε ανάλυση LC-MS/MS. Ο καθαρισμός, η πέψη, η σήμανση, ο διαχωρισμός και η ανάλυση LC-MS/MS πραγματοποιήθηκε από την ομάδα πρωτεομικής του ΙΙΒΕΑΑ (Δρ Κ. Βουγάς και Δρ Θ. Ρουμελιώτης).

2.2.9.3. Βιοπληροφορική Ανάλυση

Τα δεδομένα από την πρωτεομική ανάλυση μετατράπηκαν σε μορφή PRIDE XML και υποβλήθηκαν στη βάση δεδομένων PRIDE (<http://www.ebi.ac.uk/pride/>). Για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών από τα δεδομένα των πρωτεομικών αναλύσεων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα AB Sciex ProteinPilot v4.0. Η περαιτέρω επεξεργασία των δεδομένων, το φιλτράρισμα και η οπτικοποίηση σε «θερμοχάρτες» (heatmap visualization) πραγματοποιήθηκαν σε γλώσσα R (R language). Για τις αναλύσεις μονοπατιών (Pathway) και εμπλουτισμού ομάδων γονιδίων (Gene Set Enrichment) χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Ariadne Pathway Studio v9.0. Όλες οι αναλύσεις βιοπληροφορικής πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με την ομάδα πρωτεομικής του IIBEAA (Δρ Κ. Βουγάς και Δρ Θ. Ρουμελιώτης).

2.3. Τεχνικές *in situ*

2.3.1. Ανοσοφθορισμός *in situ* (Immunofluorescence, IF)

Κύτταρα επιστρώθηκαν σε καλυπτρίδες και μετά από τις κατάλληλες επιδράσεις μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα παραφορμαλδεύδης (PFA) 4% σε PBS για 15 λεπτά και επώαση με Triton-X 100 (Sigma) 0,5% για 5 λεπτά. Ακολούθησε ολονύκτια επώαση με το 1γενές αντίσωμα σε PBS στους 4°C και στη συνέχεια με 2γενές αντίσωμα συνδεδεμένο με φθορίζουσα ουσία (αραίωση 1:1000) για 30 λεπτά στους 37 °C στο σκοτάδι. Για την χρώση των πυρήνων χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική DAPI (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml και ακολούθησε κλείσιμο σε PBS με γλυκερόλη 40% και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

2.3.2. Ανοσοϊστοχημεία (Immunohistochemistry, IHC)

Αρχικά τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμαινόμενη πλάκα στους 60°C, για 30 λεπτά. Στη συνέχεια εμβαπτίζονται σε ξυλόλη για 5λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, 3 φορές (ώστε να διαλυθεί η παραφίνη).

Οι τομές ενυδατώνονται με διαδοχική εμβάπτιση σε διαλύματα αιθανόλης ελαττωμένης συγκέντρωσης σε θερμοκρασία δωματίου όπως καταγράφονται παρακάτω για συγκεκριμένους χρόνους

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

Το TBS είναι ρυθμιστικό διάλυμα με pH=7.6 (ρυθμισμένο με HCl) και περιέχει 8.1gr NaCl + 1gr TRIZMA base σε 1lt νερό.

Η ενδογενής υπεροξειδάση αδρανοποιείται της με 3% διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) (Διάλυμα stock 30%, αραιώση 1:10), για 12 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.

Οι τομές ξεπλένονται με TBS, για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Για να γίνει η επίδραση με το αντίσωμα θα πρέπει να αποκαλυφθούν οι αντιγονικές θέσεις. Οι τομές θερμαίνονται σε διάλυμα κιτρικού νατρίου (2.1gr σε 1l dH₂O και ρύθμιση του pH6 με NaOH) ή EDTA (2.2 ml σε 1l dH₂O και ρύθμιση του pH8.0-8.5 με HCl) για 5 λεπτά σε φούρνο μικροκυμάτων, η διαδικασία επαναλαμβάνεται 5 φορές. Το διάλυμα που χρησιμοποιείται εξαρτάται από το αντίσωμα που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί.

Στην συνέχεια οι τομές παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά και ξεπλένονται σε TBS για 5 λεπτά.

Έπειτα επώζονται με το πρωτογενές αντίσωμα διαλυμένο σε φυσιολογικό μη ανοσοποιημένο ορό και TBS. Ο ορός χρησιμοποιείται για την κάλυψη των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων. Η αραιώση του πρωτογενούς αντισώματος είναι ποικίλη, ενώ η αραιώση του ορού είναι σταθερή, 1:20. Η επώαση γίνεται ολονύκτια

στους 4°C. Με την ολοκλήρωση της επώασης οι τομές ξεπλένονται με TBS επί 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί επώαση με δευτερογενές αντίσωμα ιχνηθετημένο με βιοτίνη διαλυμένο σε TBS, σε αραιώση 1:200. Το δευτερογενές αντίσωμα και ο ορός πρέπει να έχουν την ίδια προέλευση με τον ορό. Η επώαση διαρκεί 30 λεπτά, στους 37°C. Οι τομές ξεπλένονται με TBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και επωάζονται με το σύμπλοκο βιοτίνη-στρεπταβιδίνη-υπεροξειδάση (AB complex) για 20 λεπτά στους 37° C. Το σύμπλεγμα στρεπταβιδίνη-υπεροξειδάση (A) και η βιοτίνη (B) φυλάσσονται ξεχωριστά στους 4°C. Για τη δημιουργία του τελικού συμπλόκου AB complex τα συστατικά A και B αναμιγνύονται με αραιώση 1:100 σε TBS και φυλάσσονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Το σύμπλοκο AB complex μέσω της στρεπταβιδίνης προσδένεται στο βιοτινυλιωμένο δευτερογενές αντίσωμα. Ακολουθεί ξέπλυμα των τομών σε TBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και η εμφάνιση σε διάλυμα διαμινοβενζιδίνης (DAB): 1 ml DAB + 16λ H₂O₂ (από το stock 30%) σε 50ml TBS. Ο χρόνος επώασης των τομών με το διάλυμα DAB ελέγχεται με παρατήρηση της χρώσης σε οπτικό μικροσκόπιο. Στην συνέχεια οι τομές ξεπλένονται με άφθονο νερό βρύσης και χρωματίζονται με αιματοξυλίνη. Η αιματοξυλίνη βάφει με κυανό χρώμα το DNA του πυρήνα και όσες δομές είναι όξινες, όπως το RNA στο κυτταρόπλασμα και ο υαλοειδής χόνδρος στη θεμέλια ουσία.

Ακολουθεί ξέπλυμα με άφθονο νερό βρύσης και αφυδάτωση των τομών με εμφάνιση σε διαλύματα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης.

Αιθανόλη 50% για 5 λεπτά

Αιθανόλη 70% για 5 λεπτά

Αιθανόλη 80% για 5 λεπτά

Αιθανόλη 96% 2 φορές για 5 λεπτά

Αιθανόλη 100% για 5 λεπτά

Αιθανόλη 100% 5 λεπτά

Ξυλόλη III για 5 λεπτά

Ξυλόλη II για 5 λεπτά

Ξυλόλη I για 5 λεπτά

Ολοκληρώνοντας, οι τομές καλύπτονται με ειδική ρητίνη (βάλσαμο του Καναδά ή DPX), καλυπτρίδα και παρατηρούνται στο οπτικό μικροσκόπιο.

2.4. Αντισώματα

Τα αντισώματα και οι αντίστοιχες αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ανά μέθοδο είναι οι εξής:

2.4.1. Αντισώματα για Ανοσοαποτύπωση (IB):

i) p19ARF (τάξεως IgG πολυκλωνικό, επίτοπος: πλήρους μήκους πρωτεΐνη ποντικού p19ARF, 1:200, #07-543, Millipore, LabSupplies, Αθήνα, Ελλάδα), ii) p14ARF (DCS-240, τάξεως IgG, mouse μονοκλωνικό, επίτοπος: Ανασυνδυσασμένη, πλήρους μήκους ανθρώπινη πρωτεΐνη, 1:100, #ab49166, abcam, AntiSel, Αθήνα, Ελλάδα), iii) ολική ATM, (τάξεως IgG, rabbit πολυκλωνικό, επίτοπος: κεντρική περιοχή, αραιώση 1:500 (Millipore, LabSupplies, Αθήνα, Ελλάδα), iv) β-ακτίνη (τάξεως IgG rabbit πολυκλωνικό, επίτοπος: αμινο-τελικό άκρο ανθρώπινης β-ακτίνης, αραιώση 1:1000 (Millipore, Lab Supplies, Αθήνα, Ελλάδα) v) TBP1 (PSMC3) τάξεως IgG, rabbit, πολυκλωνικό, επίτοπος: αμινο-τελικό άκρο, (Abcam), αραιώση 1:200, vi) TBPIP (PSMC3IP) τάξεως IgG, mouse, πολυκλωνικό σε ορό, επίτοπος:πλήρους μήκους πρωτεΐνη (Abcam), αραιώση 1:200, vii) TRIP12/ULF, τάξεως IgG, rabbit πολυκλωνικό, επίτοπος: αα 75-125, αραιώση 1:500 (Abcam), viii) H-Ras (F235) τάξεως IgG, mouse μονοκλωνικό, επίτοπος:πλήρους μήκους πρωτεΐνη, αραιώση 1:100 (Santa Cruz Biotech, Bioanalytica, Αθήνα, Ελλάδα), ix) PPP1R2 (I-2 inhibitor) τάξεως IgG, mouse, μονοκλωνικό, επίτοπος: αμινο-τελικό άκρο, (R&D Systems , AntiSel, Αθήνα, Ελλάδα) αραιώση 1:500, x) PP1, τάξεως IgG, rabbit πολυκλωνικό, επίτοπος: καρβοξυ-τελικό άκρο, αραιώση 1:500 (Millipore LabSupplies, Αθήνα, Ελλάδα), xi) κυκλίνη E, τάξεως IgG, mouse μονοκλωνικό, επίτοπος: καρβοξυ-τελικό άκρο, αραιώση 1:200, xii) Nek2, τάξεως IgG2b, mouse μονοκλωνικό, επίτοπος: αα 211-445, αραιώση 1:500 (Santa Cruz Biotech, Bioline, Αθήνα, Ελλάδα), xiii) phospho-Serine, τάξεως IgG1, mouse μονοκλωνικό, (abcam), αραιώση 1:300, xiv) ubiquitin, τάξεως IgG1, mouse μονοκλωνικό, επίτοπος: πλήρους μήκους ομάδα ουβικιτίνης (αα 1-76) (Cell Signaling

Tech, Bioline, Αθήνα, Ελλάδα), αραιώση 1:500, xv) φμπριλλαρίνη (fibrillarín), τάξεως IgG, rabbit πολυκλωνικό, επίτοπος: αα 1-100, αραιώση 1:1000 (abcam), xvi) Chk2, τάξεως IgG, rabbit πολυκλωνικό σε ορό, αραιώση 1:20 (ευγενική δωρεά από τον Dr T.Halazonetis) , xv) β-catenin, mouse μονοκλωνικό, τάξεως IgG1, επίτοπος: καρβοξυ-τελικό άκρο , αραιώση 1:500 (Santa Cruz Biotech, Bioanalytica, Αθήνα, Ελλάδα), xvi) TTF-I, rabbit πολυκλωνικό, τάξεως IgG, επίτοπος: Αμινο-τελικό άκρο, αραιώση 1:500 (Abcam), xvii) UBF τάξεως IgG, mouse μονοκλωνικό, επίτοπος: αα 1-220, αραιώση 1:1000 (Santa Cruz Biotech, Bioline, Αθήνα, Ελλάδα), xviii) Lamin B, τάξεως IgG2b, mouse μονοκλωνικό, επίτοπος: αα 559-584, αραιώση 1:1000 (Santa Cruz Biotech, Bioline, Αθήνα, Ελλάδα) xix) NPM/B23-pT95, rabbit πολυκλωνικό, τάξεως IgG, επίτοπος: αμινοξικά κατάλοιπα γύρω από την θρεονίνη 95 της NPM/B23, αραιώση 1:500 (Cell Signaling Tech, Bioline, Αθήνα, Ελλάδα), xx) NPM/B23-pT199, rabbit πολυκλωνικό, τάξεως IgG, επίτοπος: αμινοξικά κατάλοιπα γύρω από την θρεονίνη 199 της NPM/B23, αραιώση 1:500 (Cell Signaling Tech, Bioline, Αθήνα, Ελλάδα), xxi) NPM/B23-pS4, rabbit πολυκλωνικό, τάξεως IgG, επίτοπος: αμινοξικά κατάλοιπα γύρω από την σερίνη 4 της NPM/B23, αραιώση 1:500 (Cell Signaling Tech, Bioline, Αθήνα, Ελλάδα), xxii) NPM/B23-pS125, rabbit μονοκλωνικό, τάξεως IgG, επίτοπος: αμινοξικά κατάλοιπα γύρω από την σερίνη 125 της NPM/B23, αραιώση 1:500 (Abcam), xxiii) NPM/B23-T234/237, rabbit μονοκλωνικό, τάξεως IgG, επίτοπος: αμινοξικά κατάλοιπα γύρω από τις θρεονίνες 234 και 237 της NPM/B23, αραιώση 1:500 (Abcam).

Δευτερογενή αντισώματα: i)goat anti-mouse IgG-HRP conjugated (#HAF007 R&D Systems, AntiSel, Αθήνα, Ελλάδα), ii)goat anti-rabbit-HRP conjugated (# HAF008 R&D Systems, AntiSel, Αθήνα, Ελλάδα), iii)goat anti-mouse IgG-AP conjugated (#G21060, Invitrogen, AntiSel, Αθήνα, Ελλάδα), iv)goat anti-rabbit IgG-AP conjugated (#G21079 ,Invitrogen, AntiSel, Αθήνα, Ελλάδα).

2.4.2. Αντισώματα για ανοσοκατακρήμνιση (IP):

i) p14ARF (σε ορό, rabbit πολυκλωνικό, επίτοπος: καρβοξυ-τελικό άκρο ανθρώπινης p14ARF), αραιώση 2μl:1μg ολικού εκχυλίσματος (μία ευγενική προσφορά της Dr. K. Vousden) ii) NPM/B23, mouse μονοκλωνικό, επίτοπος: πλήρους μήκους πρωτεΐνη, αραιώση 1μg:1μg ολικού εκχυλίσματος (Santa Cruz Biotech, Bioanalytica, Αθήνα,

Ελλάδα), iv) myc-tag, τάξεως IgG2a, mouse μονοκλωνικό, αραιώση 1μl:1μg ολικού εκχυλίσματος (Cell Signaling Biotech, Biotline, Αθήνα, Ελλάδα).

2.4.3. Αντισώματα για Ανοσοϊστοχημεία (IHC):

i) p14ARF p14ARF (DCS-240, τάξεως IgG μονοκλωνικό, επίτοπος: Ανασυνδυσασμένη, πλήρους μήκους ανθρώπινη πρωτεΐνη, #ab49166, abcam), αραιώση 1:50, ii) κυκλίνη E, τάξεως IgG, mouse μονοκλωνικό, επίτοπος: καρβοξυ-τελικό άκρο, αραιώση 1:100, (Santa Cruz Biotech, Bioanalytica, Αθήνα, Ελλάδα) iii) ATM-pS1981 τάξεως IgG, mouse μονοκλωνικό αραιώση 1:200 (ευγενική δωρεά των C. Bakkenist και M. Kastan), iv) p53 (DO-7), τάξεως IgG2b, mouse μονοκλωνικό, επίτοπος: αμινο-τελικό άκρο (aa 1-45) (Santa Cruz Biotech, Bioanalytica, Αθήνα, Ελλάδα), αραιώση 1:100, iv) p21WAF1 τάξεως IgG2b, mouse μονοκλωνικό, επίτοπος: πλήρους μήκους πρωτεΐνη (Santa Cruz Biotech, Bioanalytica, Αθήνα, Ελλάδα), αραιώση 1:300, v) p16INK4A, τάξεως IgG2a, mouse μονοκλωνικό, επίτοπος: πλήρους μήκους πρωτεΐνη (Santa Cruz Biotech, Bioanalytica, Αθήνα, Ελλάδα), αραιώση 1:100, vi) Ki67, τάξεως IgG1, mouse μονοκλωνικό, αραιώση 1:100 (DAKO).

2.4.4. Αντισώματα για ανοσοφθορισμό (IF):

i) p14ARF (DCS-240, τάξεως IgG μονοκλωνικό, επίτοπος: Ανασυνδυσασμένη, πλήρους μήκους ανθρώπινη πρωτεΐνη, αραιώση 1:50, #ab49166, abcam, AntiSel, Αθήνα, Ελλάδα), ii) p14ARF (σε ορό, rabbit πολυκλωνικό, επίτοπος: καρβοξυ-τελικό άκρο ανθρώπινης p14ARF), αραιώση 1:100 (μία ευγενική προσφορά της Dr. K. Vousden) iii) NPM/B23, mouse μονοκλωνικό, επίτοπος: πλήρους μήκους πρωτεΐνη, αραιώση 1:100) (Santa Cruz Biotech, Bioanalytica, Αθήνα, Ελλάδα), iv) E2F-1 (KH95), τάξεως IgG2a, mouse μονοκλωνικό, επίτοπος: αα 342-386, v) φμπριλλαρίνη (fibrillarlin), τάξεως IgG, rabbit πολυκλωνικό, επίτοπος: αα 1-100, αραιώση 1:250 (abcam) vi) goat anti-mouse IgG FITC-conjugated (Oregon Green 488, #O6380 Mol. Probes, Invitrogen, Antisel, Αθήνα, Ελλάδα) vii) goat anti- rabbit IgG rhodamine-conjugated (Texas Red, Mol. Probes, Invitrogen, Antisel, Αθήνα, Ελλάδα).

2.4.5. Αντίσωμα για Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP):

H2B-AcK20, rabbit μονοκλωνικό, επίτοπος: αμινοξικά κατάλοιπα γύρω από την K20, αραιώση 1/10 εκχυλίσματος χρωματίνης (Santa Cruz Biotech, Bioanalytica, Αθήνα, Ελλάδα)

2.5. Πλασμιδιακοί φορείς και διαμόλυνσεις.

2.5.1. Διαμόλυνση κυττάρων με πλασμίδια

Για την διαμόλυνση κυττάρων με τα πλασμίδια pRK5-Myc-NPM wt, S70D, S70A και S70/88A S70/88D) και pSNV2-GFP-ppp1r2h-wt, pSNV2-GFP-ppp1r2hS43A και pSNV2-GPF-ppp1r2hS43D χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Effectene Transfection Reagent (Qiagen, Bioanalytica, Αθήνα, Ελλάδα). 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε καλυπτρίδες για ανάλυση ανοσοφθορισμού ή συλλέχθηκαν για απομόνωση πρωτεΐνης και ανοσοαποτύπωση.

2.5.2. Διαμόλυνση κυττάρων Phoenix με ρετροϊκούς φορείς

Για τη διαμόλυνση κυττάρων με τους ρετροϊκούς πλασμιδιακούς φορείς pRetroSuper-hygro-shARF και pBabe-hygro-β-catenin χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Phoenix amphotropic[111], η οποία προέρχεται από τα κύτταρα 293T και εκφράζει τα απαραίτητα ιικά γονίδια (gag-pol-env) για το πακετάρισμα των ρετροϊκών σωματιδίων μετά από διαμόλυνση με τους κατάλληλους ρετροϊκούς φορείς. $1,5 \times 10^6$ κύτταρα Phoenix επιστρώθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 60mm. Την επόμενη μέρα έγινε διαμόλυνση των κυττάρων με τον ρετροϊκό φορέα pRetroSuper-hygro-shp14ARF (δωρεά του Dr T.D.Halazonetis) ή pBabe-hygro-b-catenin με το αντιδραστήριο Effectene (Qiagen, Bioanalytica, Αθήνα, Ελλάδα). Την επόμενη μέρα έγινε αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού με 3ml κανονικού DMEM (Gibco, AntiSel, Αθήνα, Ελλάδα). 48 ώρες μετά την διαμόλυνση έγινε συλλογή του ιικού υπερκειμένου το οποίο μετά από διήθηση από φίλτρο 0,45μm χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση H1299 κυττάρων σε πυκνότητα 50-60% σε τρυβλία 60mm παρουσία 10μg/ml polybrene (Sigma), το οποίο διευκολύνει την διαμόλυνση των κυττάρων με τα ιικά σωματίδια. Την επόμενη μέρα έγινε αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού με 5ml κανονικού (ή με χαμηλή συγκέντρωση ορού 0,1% για serum starvation) DMEM και 48 ώρες μετά την μεταγωγή του ιού

έγινε συλλογή των κυττάρων. Το πείραμα διαμόλυνσης με β-κατενίνη και serum starvation πραγματοποιήθηκε με τη συμβολή του Δρ Α. Δαμαλά.

2.5.3. Παραγωγή σωματιδίων λεντι-ιού (lentivirus)

2.5.3.1. Λεντι-υικοί φορείς:

Για την παραγωγή λεντιϊκών σωματιδίων με σκοπό την διαμόλυνση των όγκων από ξενομοσχεύματα για αποσιώπηση της ATM (shATM) χρησιμοποιήθηκε μίγμα 5 διαφορετικής αλληλουχίας φορέων pLKO.1-puro (MISSION® Sigma Aldrich) για μέγιστο αποτέλεσμα. Οι κωδικοί και οι αλληλουχίες shRNA εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: Αλληλουχίες αποσιώπησης (shRNA) για την ATM στους λεντιικούς φορείς pLKO.1

MISSION® shATM από Sigma Aldrich			
TRC Κωδικός	Clone ID	περιοχή	Αλληλουχία αποσιώπησης (shRNA)
TRCN0000039948	NM_000051.2-9380s1c1	3UTR	CCGGCCTTTCATTCAGCCTTTAGAACTCGAGTTCTA AAGGCTGAATGAAAGGTTTTTG
TRCN0000039951	NM_000051.2-1974s1c1	CDS	CCGGGCCTCCAATTCTTCACAGTAACTCGAGTTACT GTGAAGAATTGGAGGCTTTTTG
TRCN0000038655	NM_000051.2-224s1c1	CDS	CCGGGCCGTCAACTAGAACATGATACTCGAGTATCA TGTTCTAGTTGACGGCTTTTTG
TRCN0000010299	NM_000051.x-9530s1c1	3UTR	CCGGTGATGGTCTTAAGGAACATCTCTCGAGAGATG TTCCTTAAGACCATCATTTTTG
TRCN0000194861	NM_000051.3-4332s1c1	CDS	CCGGCCAAGGTCTATGATATGCTTACTCGAGTAAGC ATATCATAGACCTTGGTTTTTTG

Ως αρνητικός έλεγχος και ως έλεγχος αποτελεσματικότητας της διαμόλυνσης και της αποσιώπησης χρησιμοποιήθηκαν οι λεντι-υικοί φορείς pLKO.1-puro-CMV-TurboGFP™ και pLKO.1-puro TurboGFP™ shRNA pLKO.1-puro TurboGFP™ (αλληλουχία shRNA CCGGCGTGATCTTCACCGACAAGATCTCGAGATCTTGTCG GTGAAGATCACGTTTTT) (MISSION®, Sigma Aldrich) αντίστοιχα.

2.5.3.2. Διαμόλυνση κυττάρων με λεντιικούς πλασμιδιακούς φορείς

Για την παραγωγή των σωματιδίων λεντι-ιού, 5 x 10⁶ κύτταρα της κυτταρικής σειράς 293T επιστρώθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 10cm. Την επόμενη μέρα έγινε διαμόλυνση των κυττάρων με 15μg από κάθε φορέα έκφρασης GFP, shGFP και shATM και με τα πλασμίδια πακεταρίσματος τρίτης γενιάς pMDLg/pRRE (15μg) , pRSV-REV(6 μg) και pMD2.G (3 μg) με χρήση του αντιδραστηρίου lipofectamine 2000. Οι πλασμιδιακοί φορείς αναμείχθηκαν με 50 μl lipofectamine μέσα σε

Θρεπτικό υλικό χωρίς ορό optiMEM και στη συνέχεια προστέθηκαν στα κύτταρα. Την επόμενη μέρα έγινε αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού με πλήρες DMEM και 48 ώρες μετά έγινε συλλογή του υπερκειμένου που περιείχε τα ιικά σωματίδια.

2.5.3.3. Απομόνωση ιικού RNA με κιτ

Η απομόνωση του ιικού RNA έγινε με το κιτ NucleoSpin® RNA Virus (cat no 740956, Macherey-Nagel). Σε 150μl ιικού υπερκειμένου προστίθενται 600 μl διαλύματος λύσης RAV1 και γίνεται επώαση για 5 λεπτά ώστε να γίνει λύση των ιικών σωματιδίων. Στη συνέχεια προστίθενται 600μl αιθανόλης η οποία σε συνδυασμό με τα συστατικά του διαλύματος λύσης RAV1 βοηθά στην προετοιμασία του RNA για καλύτερη πρόσδεση στο φίλτρο της στήλης και το μίγμα μεταφέρεται στις ειδικές στήλες διήθησης και φυγοκεντρείται στις 8000 x g για 1 λεπτό. Το προσδεμένο ιικό RNA καθαρίζεται από κυτταρικά υπολείμματα, άλατα και μεταβολίτες με διαδοχικές πλύσεις με τα διαλύματα RAW και RAV3 και φυγοκέντρωση στις 8000 x g για 1 λεπτό και 11000 x g για 5 λεπτά. Η έκλουση του RNA από το φίλτρο γίνεται με 50μl νερού απαλλαγμένου από RNάσες (RNase-Free Water) για 1-2 λεπτά στους 70oC και φυγοκέντρωση στις 11000 x g για 1 λεπτό.

2.5.3.4. Μέτρηση τίτλου ιού

Για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας του ιικού υπερκειμένου σε λεντι-ϊικά σωματίδια (τίτλος ιού), χρησιμοποιήθηκε το κιτ LentiX qRT-PCR Titration Kit (cat no: 631235, Clontech). 15μl από το διάλυμα ιικού RNA επώαστηκαν με DNάση I για 30 λεπτά και στη συνέχεια ακολούθησε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής και ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) με τη χρήση των αντιδραστηρίων του κιτ και των ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών που αναγνωρίζουν αλληλουχίες του λεντικού RNA-γονιδιώματος. Για τις αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες που συνιστά το εγχειρίδιο του κατασκευαστή και οι αντίστοιχες διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού δείγματος. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των λεντικών σωματιδίων γίνεται εμμέσως μέσω της μέτρησης της ποσότητας των δειγμάτων σε λεντικό RNA.

2.5.4. Ανάπτυξη και απομόνωση πλασμιδίων

Για την ανάπτυξη όλων των πλασμιδιακών φορέων χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια *E.coli* στελέχους DH5a σε θρεπτικό υλικό Luria Bertani (LB) με επιλογή αμπικιλίνης 100μg/ml. Για το μετασχηματισμό των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν χημειοδεκτικά βακτήρια στα οποία εισήχθη μικρή ποσότητα του κατάλληλου πλασμιδίου. Ακλουθεί επώαση στον πάγο για 20 λεπτά, θερμικό σοκ για 2 λεπτά στους 42°C, επώαση στον πάγο για 3 λεπτά, επώαση σε LB στους 37°C για 45 λεπτά και επίστρωση σε τρυβλία αγαρ/LB παρουσία αμπικιλίνης 100μg/ml για ανάπτυξη αποικιών ολονύκτια στους 37°C. Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν έγινε επιλογή και μεταφορά σε υγρή καλλιέργεια με 5ml LB παρουσία αμπικιλίνης 100μg/ml ολονύκτια στους 37°C υπό ανάδευση. Την επόμενη μέρα κρατήθηκε στοκ γλυκερόλης 30% σε LB στους -80°C και έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA από την υπόλοιπη καλλιέργεια.

2.5.4.1. Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA έγινε με το κιτ QIAGEN plasmid mini prep (Qiagen, Bioanalytica, Αθήνα, Ελλάδα) . Ολονύκτια βακτηριακή καλλιέργεια των 5ml κατακρημνίστηκε στις 3000rpm για 5min και το ίζημα κυττάρων αναδιαλύθηκε σε 250μl P1 διαλύματος. Προστέθηκαν 250μl P2 διαλύματος λύσης και πραγματοποιήθηκε ήπια ανακίνηση 4 με 5 φορές ώστε το διάλυμα να ομογενοποιηθεί. Μετά από ακριβώς 5min προστέθηκαν 350μl N3 διαλύματος εξουδετέρωσης, έγινε ήπια ανακίνηση 4 με 5 φορές και φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 13000 rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε κολόνα απομόνωσης (QIAprep spin column) και φυγοκεντρήθηκε για 1 min στις 13000 rpm. Η κολόνα ξεπλύθηκε αρχικά με 500μl PB διάλυμα και στη συνέχεια με 750μl PE διάλυμα και φυγοκεντρήθηκε για 1 min στις 13000 rpm. Η φυγοκέντρηση επαναλήφθηκε ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείματα της αιθανόλης από το PE διάλυμα. Η κολόνα τοποθετήθηκε σε καινούριο σωληνάκι φυγοκέντρησης και προστέθηκαν 50 μl EB (10Mm Tris-Cl, pH 8,5).Παρέμεινε για 1 min και φυγοκεντρήθηκε για 1 min στις 13000 rpm.

2.5.4.2 Υπολογισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας πλασμιδίων

Η ποσότητα του πλασμιδίου υπολογίστηκε με φωτομέτρηση και σε πήκτωμα αγαρόζης.

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα πηκτώματα παρασκευάστηκαν με διάλυση κατάλληλης ποσότητας αγαρόζης σε 1 x ρυθμιστικό διάλυμα TAE (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA) και θέρμανση. Προστέθηκε 0.5μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο και τοποθετήθηκε σε κατάλληλο δοχείο για να πήξει. Αφού τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης σε 1 x ρυθμιστικό διάλυμα TAE. Στα δείγματα DNA προστέθηκε LB (Loading buffer: 0,04% Bromophenol Blue, 5% glycerol) και φορτώθηκαν στο πήκτωμα. Για την ηλεκτροφόρηση εφαρμόστηκε 50-80V τάση. Το DNA ελέγχθηκε σε πλάκα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Υπολογισμός Συγκέντρωσης του DNA

Ο υπολογισμός της ποσότητας του DNA υπολογίζεται με φωτομέτρηση βάση της απορρόφησης στα 260nm. Η τιμή απορρόφησης πρέπει να βρίσκεται μεταξύ 0.1 με 1.0 για να είναι ακριβής. Αρχικά φτιάχνονται αραιωμένα δείγματα 1: 100 και αφού μετρηθεί η απορρόφηση η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται βάση του τύπου $[DNA] = OD_{260} \times 1/\text{αραιώση} \times 50(\mu\text{g}/\text{ml})$, όπου OD_{260} είναι η οπτική πυκνότητα στα 260nm. Ο υπολογισμός της καθαρότητας του κάθε δείγματος έγινε με βάση τον λόγο OD_{260}/OD_{280} . Όταν αυτός βρίσκεται μεταξύ των τιμών 1.8 - 2, συνεπάγεται δείγμα υψηλής καθαρότητας σε RNA). Στην συνέχεια τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C .

2.6. Μεταλλαξιγένεση in vitro (Site-directed Mutagenesis) και αλληλούχιση DNA (Sequencing)

Για την κατασκευή των μεταλλαγμένων μορφών της NPM/B23 χρησιμοποιήθηκε το πλσμίδιο pRK5-Myc με την πλήρους μήκους cDNA αλληλουχία της NPM/B23 ως πρότυπο για την μεταλλαξιγένεση. Για την κατασκευή των μεταλλαγμένων μορφών του αναστολέα I-2 inhibitor(PPP1R2) χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pSNV2-GFP με

την πλήρους μήκους cDNA αλληλουχία του PPP1R2ως πρότυπο για την μεταλλαξιγένεση. Η μεταλλαξιγένεση κατευθυνόμενη σε θέση (site-directed mutagenesis) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του κιτ Change-IT Multiple Mutation Site Directed Mutagenesis Kit (Affymetrix, USB Products) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και με τη χρήση κατάλληλα σχεδιασμένων εκκινητών για την εισαγωγή των επιθυμητών μεταλλάξεων. Μετά από την αντίδραση PCR, τα προϊόντα επωάστηκαν 2 φορές με το ένζυμο DpnI και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό βακτηρίων E.coli. Για κάθε μετάλλαξη επιλέχθηκαν τυχαία 4 κλώνοι και αναπτύχθηκαν ολονύκτια σε 3ml θρεπτικού υλικού Luria Bertani (LB) στους 37°C υπό ανάδευση στις 250rpm παρουσία αμπικιλίνης σε συγκέντρωση 100μg/ml. Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA έγινε με το κιτ PrepEase Mini Spin Plasmid Kit (Affymetrix, USB Products). Η αλληλούχιση του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA έγινε με ABI BigDye Terminator ready reaction cycle sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems) με τη χρήση εκκινητών για CMV-F και SV40pA-R σε συσκευή Applied Biosystems 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Τα δεδομένα της αλληλούχισης του DNA αναλύθηκαν με το λογισμικό Sequencer 5 DNA sequence analysis (Gene Codes Corporation). Ευχαριστούμε τα εργαστήρια των Dr Sinisa Volarevic και Dr T.D.Halazonetis για την πολύτιμη συμβολή τους στην παραγωγή των μεταλλαγμένων πλασμιδιακών φορέων pRK5-myc-NPM και PSNV2-GFP-PPP1R2 αντίστοιχα.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία μεταλλαξιγένεσης και αλληλούχισης των πλασμιδίων pRK5-myc-NPM παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για μεταλλαξιγένεση και αλληλούχιση των πλασμιδίων των μεταλλαγμένων μορφών της NPM/B23.

Εκκινητές για μεταλλαξιγένεση	
NPM/B23 Ser70Ala	5'- Phospho- CAATGAATTACGAAGGCGCTCCAATTAAAGTAACA 3'
NPM/B23 Ser70Asp	5' - Phospho- CAATGAATTACGAAGGCGATCCAATTAAAGTAACA 3'
NPM/B23 Thr95Ala*	5' -Phospho- GGGGGCTTTGAAATAGCACCACCAGTGGT CTTA 3'
NPM/B23 Thr95Asp*	5' - Phospho- TTGGGGGCTTTGAAATAGATCCACCAGTGG TCTTA 3'
NPM/B23 Ser88Ala	5' - Phospho- TACAGCCAACGGTTGCCCTTGGGGGCTTT 3'
NPM/B23 Ser88Asp	5' -Phospho-TACAGCCAACGGTTGACCTTGGGGGCTTT 3'
NPM/B23* Thr234Ala+Thr237Ala	5' -Phospho- AAGAAACAGGAAAAAGCTCCTAAAGCACC AAAAGGACCTA 3'
NPM/B23* Thr234Asp+Thr237Asp	5' -Phospho-AAGAAACAGGAAAAAGATCCTAAAGATCC AAAAGGACCTAGT 3'
AmpREV	5' -Phospho-GTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCA CTCATG 3'
Εκκινητές για αλληλούχιση	
CMV-F	5' CGCAAATGGGCGGTAGGCGT 3'
SV40pA-R	5' GAAATTTGTGATGCTATTGC 3'

2.7. Ανάλυση RNA

2.7.1. Απομόνωση RNA από κύτταρα RNeasy Mini Kit (Qiagen)

Συλλέγονται 3×10^6 κύτταρα με θρυψινοποίηση, φυγοκεντρώνται για 5 λεπτά στις 1500rpm, σε θερμοκρασία δωματίου και ξεπλένονται με PBS. Με φυγοκέντρηση

στις ίδιες συνθήκες απομακρύνεται το PBS και αναδιαλύονται σε 350μl ρυθμιστικό διάλυμα RLT. Τα δείγματα ομογενοποιούνται με τη διήθηση τους σε στήλες QIAshredder και φυγοκεντρώνται στις 13000rpm για 2 λεπτά. Στο διήθημα προστίθενται 1 όγκος αιθανόλης 70%. Το μίγμα διηθείται σε στήλες RNeasy spin με φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στις 12000rpm. Οι στήλες ξεπλένονται με 700μl ρυθμιστικό διάλυμα RW1 και φυγοκεντρώνται στις ίδιες συνθήκες. Στην συνέχεια στη κάθε στήλη προστίθενται 500μl ρυθμιστικό διάλυμα RRE και φυγοκεντρώνται στις 12000rpm για 2 λεπτά και επαναφυγοκεντρώνται για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιθανόλης του διαλύματος RRE από τη στήλη. Για να απομονωθεί το RNA που βρίσκεται προσδεμένο στην στήλη, η τελευταία επώαζεται με 30 μl νερού απαλλαγμένου από RNases (RNase-free water) για 2 λεπτά και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 12000rpm. Η επώαση επαναλαμβάνεται ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη απομάκρυνση του RNA από την στήλη.

2.7.2. Υπολογισμός Συγκέντρωσης του RNA

Ο υπολογισμός της ποσότητας του RNA υπολογίζεται με φωτομέτρηση βάση της απορρόφησης στα 260nm. Η τιμή απορρόφησης πρέπει να βρίσκεται μεταξύ 0.1 με 1.0 για να είναι ακριβής. Αρχικά φτιάχνονται αραιωμένα δείγματα 1: 100 και αφού μετρηθεί η απορρόφηση η συγκέντρωση του RNA υπολογίζεται βάση του τύπου $[RNA] = OD_{260} \times 1/\text{αραιώση} \times 44(\mu\text{g/ml})$, όπου OD_{260} είναι η οπτική πυκνότητα στα 260nm.

Ο υπολογισμός της καθαρότητας του κάθε δείγματος έγινε με βάση τον λόγο OD_{260}/OD_{280} . Όταν αυτός βρίσκεται μεταξύ των τιμών 1.8 – 2.1, συνεπάγεται δείγμα υψηλής καθαρότητας σε RNA). Στην συνέχεια τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80°C .

2.7.3. Μέτρηση επιπέδων mRNA

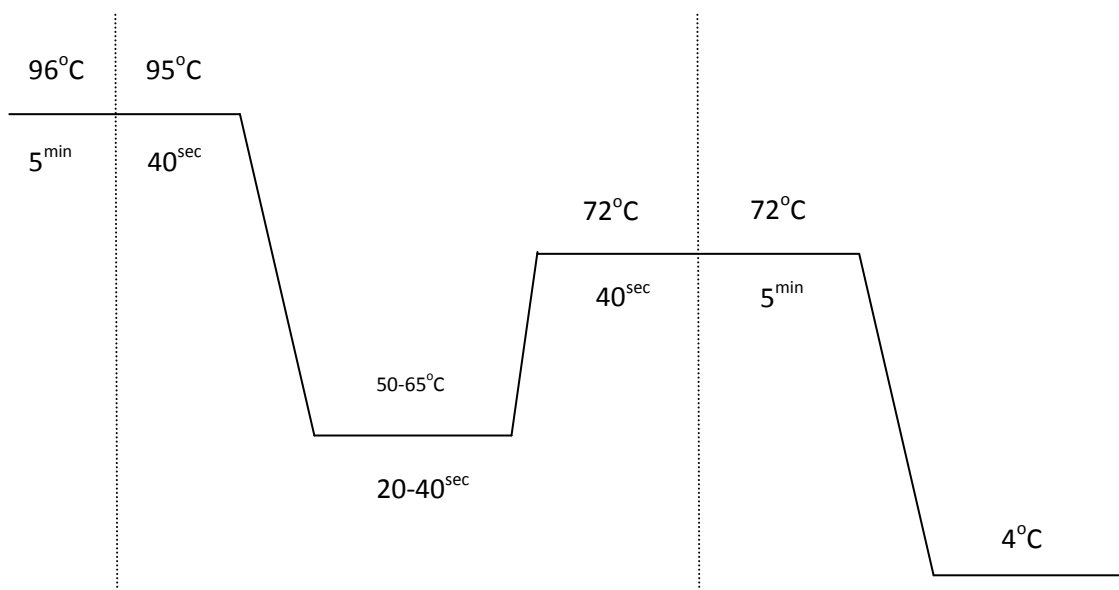
2.7.3.1. Σύνθεση cDNA

Το RNA χρησιμοποιείται ως καλούπι για την σύνθεση DNA (cDNA) με μια διαδικασία που ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφή. Αρχικά το κάθε δείγμα επώαζεται με το ένζυμο DNAάση ώστε να αποικοδομηθούν υπολείμματα DNA που ενδεχομένως να βρίσκονται στα δείγματα. Από κάθε δείγμα λαμβάνεται 1μg RNA και προστίθενται

1μl από 10x ρυθμιστικό διάλυμα DNAάσης (Invitrogen, AntiSel), 1μl DNAάσης (Invitrogen, Antisel) και δις απιονισμένο νερό με τελικό όγκο 10μl. Επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και προστίθεται 1μl EDTA 25mM ανά δείγμα και τοποθετούνται στους 65°C για 10 λεπτά ώστε να τερματιστεί η αντίδραση. Στη συνέχεια σε κάθε δείγμα προστίθενται 1μl oligodT20 (Invitrogen, AntiSel, 500μg/ml) και 1μl dNTPs (Invitrogen, AntiSel, 10mM) και επωάζονται για 10 λεπτά στους 70°C. Ακολουθεί ακαριαία ψύξη των δειγμάτων σε πάγο για 1 λεπτό και σύντομη φυγοκέντρηση. Έπειτα σε κάθε δείγμα προστίθενται 4μl από 5x ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης (First strand buffer, Invitrogen, AntiSel), 2μl DTT (0,1M, Invitrogen, AntiSel), 1μl ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση - Superscript II RT (200 u/μl, Invitrogen, AntiSel) και αναδεύονται ήπια. Τα δείγματα επωάζονται για 52 λεπτά στους 42oC η αντίδραση τερματίζεται με 15 λεπτών επώαση τους στους 70°C. Τα cDNAs φυλάσσονται στους -20°C.

2.7.3.2. Συγκριτική Αντίστροφη Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Comparative RT-PCR)

Η PCR αποτελεί μία μέθοδο επιλεκτικής in vitro αντιγραφής συγκεκριμένου τμήματος DNA από ένα μίγμα μορίων DNA. Η επιλογή γίνεται με πρωταρχικά τμήματα συμπληρωματικά ως την αρχή και το τέλος του τμήματος που επιθυμείται η αντιγραφή του. Η επιλεκτική αντιγραφή δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης συγκεκριμένου γονιδίου και την απομόνωση του σε μεγάλες ποσότητες. Ο σχεδιασμός των πρωταρχικών τμημάτων πρέπει να ακολουθεί κάποιους κανόνες όπως να υβριδίζονται μόνο στην περιοχή για την οποία σχεδιάστηκαν, να μην δημιουργούν αυθόρμητα εσωτερικούς βρόχους, να υπάρχει χαμηλή ικανότητα σύνδεσης μεταξύ τους και να διαθέτουν μήκος από 18 έως 30 βάσεις. Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει μία σειρά επαναλαμβανόμενων βημάτων (όπως αποτυπώνονται στο παρακάτω σχεδιάγραμμα).



Στο πρώτο βήμα, το δείγμα θερμαίνεται (95oC) για 40 δευτερόλεπτα ώστε οι δύο κλώνοι του DNA να αποδιαταχθούν. Στο τρίτο βήμα τα πρωταρχικά τμήματα υβριδίζουν στους συμπληρωματικούς κλώνους του τμήματος DNA. Η θερμοκρασία και ο χρόνος εξαρτάται από τα πρωταρχικά τμήματα που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση, συνήθως η θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ των 50 με 65oC για 20 με 40 δευτερόλεπτα. Στο τέταρτο βήμα, τα πρωταρχικά τμήματα επιμηκύνονται με κατεύθυνση 5'→3' από την DNA πολυμεράση στους 72°C για χρονικό διάστημα που εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος που επιμηκύνεται και την απόδοση του ενζύμου (π.χ. για μήκος μέχρι 400 ζεύγη βάσεων, 40 δευτερόλεπτα). Τα βήματα επαναλαμβάνονται για 25-35 φορές. Επίσης, πριν την έναρξη του πρώτου κύκλου της αντίδρασης το δείγμα αποδιατάσσεται στους 95oC για 5 λεπτά. Επιπλέον, με τη λήξη του τελευταίου κύκλου ακολουθεί ένα στάδιο ολοκλήρωσης της επιμήκυνσης του DNA στους 72°C για 5 λεπτά.

Σε κάθε αντίδραση προστίθενται 100ng DNA, 1x ρυθμιστικό διάλυμα PCR, 0,2mM dNTPs, 2,5mM MgCl₂, 0,5μM πρωταρχικών τμημάτων, 2,5units Taq DNA πολυμεράση και δις απιονισμένο H₂O σε τελικό όγκο 30μl. Λόγω της υψηλής ευαισθησίας της μεθόδου η ενδεχόμενη επιμόλυνση της αντίδρασης από ξένο γενετικό υλικό είναι πιθανή με αποτέλεσμα και ο πολλαπλασιασμός της ειδικής αλληλουχίας τόσο από το υπό εξέταση δείγμα όσο και από το ξένο δείγμα. Για να υπάρχει ακρίβεια στα αποτελέσματα σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιείται ένα

δείγμα ως αρνητικός μάρτυρας το οποίο περιέχει όλα τα συστατικά εκτός από DNA έτσι ώστε εάν υπάρχει επιμόλυνση των υλικών με ξένο γενετικό υλικό αυτό να εντοπισθεί και να μην ληφθούν υπόψη τα αποτελέσματα.

Η RT-PCR αποτελεί μία παραλλαγή της κλασσικής PCR με την οποία μελετάται η διακύμανση των μεταγραφικών επιπέδων ενός γονιδίου. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται είναι το συμπληρωματικό DNA (cDNA), το οποίο έχει προέλθει από RNA με τη διαδικασία της ανάστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription, RT). Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιούνται δύο ζευγάρια εκκινητών. Το πρώτο υβριδίζεται στην cDNA αλληλουχία του υπό μελέτη γονιδίου και το δεύτερο στην cDNA αλληλουχία ενός γονιδίου αναφοράς του οποίου τα μεταγραφικά επίπεδα σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία δεν μεταβάλλονται. Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιούνται ως γονίδια αναφοράς το GAPDH και το PBGD (porphobilinogen deaminase). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης PCR, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (w/v). Στην συνέχεια χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό σύστημα ανάλυσης με επεξεργασία εικόνας Kodak DC 120 (AntiSel), μετράται σε κάθε δείγμα η ένταση της ζώνης που αντιστοιχούσε στην αλληλουχία του επιθυμητού γονιδίου και του γονιδίου αναφοράς. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται ως αναλογία της ποσότητας του γονιδίου προς τη ποσότητα του γονιδίου αναφοράς. Για την μελέτη των μεταγραφικών επιπέδων (επίπεδα mRNA) των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε αρχικά συγκριτική RT-PCR και στη συνέχεια τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και με Real Time PCR (MJ-Research DNA-Engine-Opticon) με τη χρήση της φθοροχρωστικής SYBR Green (Platinum SYBR Green qPCR, Invitrogen).

2.7.3.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε Πραγματικό χρόνο (Real Time PCR) με τη χρήση της φθοροχρωστικής SYBR Green

Η τεχνική στηρίζεται σε PCR όπου γίνεται αντιγραφή και ταυτόχρονα ποσοτικοποίηση αυτής ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA ή cDNA. Χρησιμοποιείται είτε για συνολικό γονιδίωμα είτε για μίγμα cDNA που έχει προέλθει από RNA. Κατά την διαδικασία με την ολοκλήρωση κάθε κύκλου καταγράφεται η ποσότητα του προϊόντος, κάτι που την διαφοροποιεί από την κλασική PCR όπου το προϊόν ανιχνεύεται μόνο με την ολοκλήρωση της διαδικασίας. Αυτό σημαίνει ότι σε

πραγματικό χρόνο δίνεται η δυνατότητα παρακολούθησης όλης της διαδικασίας. Η ενσωμάτωση της φθοροχρωστικής SYBR Green σε δίκλωνο DNA είναι αυτή που ανιχνεύεται αλλά προσδένεται σε κάθε παραγόμενο προϊόν άρα και μη ειδικό. Για να υπάρχει ακρίβεια και μοναδικότητα προϊόντος στην αντίδραση, οι συνθήκες ρυθμίζονται αρχικά με την κλασική PCR ώστε κατά την ενίχυση να δίνεται ένα και μοναδικό προϊόν. Για την αντίδραση προετοιμάζεται συνολικό μίγμα με πρωταρχικά τμήματα 10μM, 12,5μl Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG, και συμπληρώνεται με δις απιονισμένο νερό για συνολικό όγκο αντίδρασης 25μl. Το μίγμα μοιράζεται ισόποσα και στην συνέχεια σε καθένα από αυτά προστίθεται δείγμα 100pg με 1μg DNA. Το κάθε δείγμα επαναλαμβάνεται 3 φορές. Οι συνθήκες αντίδρασης είναι παρόμοιες με αυτές που αναφέρθηκαν στο 2.11 με τη διαφορά ότι οι κύκλοι αυξάνονται στους 40. Οι σχετικές συγκεντρώσεις του DNA απεικονίζονται σε διάγραμμα λογαριθμικής κλίμακας όταν τοποθετούνται σε x και y άξονες ο αριθμός κύκλων και ένταση της φθοροχρωστικής. Υπάρχει ένα κατώφλι κάτω από το οποίο θεωρείται θόρυβος στην αντίδραση και όταν ένα δείγμα περάσει από αυτό τότε τον κύκλο αυτόν τον ονομάζουμε Ct. Θεωρητικά σε κάθε κύκλο το DNA διπλασιάζεται άρα αν ένα δείγμα έχει Ct κατά τρεις κύκλους νωρίτερα σε σχέση με ένα άλλο τότε θα έχει $2^3=8$ φορές περισσότερο δείγμα.

Real Time RT-PCR για ποσοτικοποίηση cDNA των p14ARF και κυκλίνης E.

Τα cDNAs επιλεκτικά ενισχύθηκαν για τα γονίδια p14ARF και αναφοράς PBGD (απαμινάση του πορφομπιλινογόνου) με κατάλληλους εκκινητές και σήμανση των προϊόντων με τη φθοροχρωστική Sybr Green. Για την αντίδραση ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιήθηκε το kit Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, AntiSel, Αθήνα, Ελλάδα) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή σε ειδική συσκευή-κυκλοποιητή DNA-Engine-Opticon (MJ-Research) ή ABI Prism 7300 (Applied Biosystems). Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια GAPDH και PBGD (cDNA αλληλουχίες). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: για p14ARF 1ο σετ: 5'-ATGGTGCGCAGGTTCTTGGTGA-3'; 5'-GGGGTTCGGCGCAGTTGGGCTCA-3' 35, 2ο σετ: 5'-CTACTGAGGAGCCAGCGTCTA-3'; 5'-CTGCCATCATCATGACCT-3', Κυκλίνη E: 5'-GCGCAAAGGGGAAGGGGTA-3'; 5'-GCTCCTTCGCATCCCTGTGGA-3', GAPDH: 5'- AGCCACATCGCTCAGACAC-3'; 5'-

GCCCAATACGACCAAATCC-3' και PBGD: 5'- TGCAACGGCGGAAGAAAACA -3'; 5'- GCAGATGGCTCCGATGGTG -3'. Όλες οι αντιδράσεις RT-PCR πραγματοποιήθηκαν υπό τις ακόλουθες συνθήκες: αρχικό βήμα αποδιάταξης 10 λεπτών στους 95°C, ακολουθούμενο από 40 κύκλους των 95°C για 25 δευτερόλεπτα, 62°C για 20 δευτερόλεπτα και 70°C για 20 δευτερόλεπτα.

Real Time RT-PCR για ριβοσωμικό RNA της πρώιμης υπομονάδας 47S

Για την υπομονάδα 47S, έγινε απομόνωση πυρηνισκικού RNA από H1299 κύτταρα με TriReagent (Applied Biosystems). 2 μg χρησιμοποιήθηκαν για αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής και στη συνέχεια ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) με τη χρήση Power SYBR Green σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Applied Biosystems) σε συσκευή-κυκλοποιητή ABI Prism 7300 (Applied Biosystems). Όλες οι αντιδράσεις RT-PCR πραγματοποιήθηκαν υπό τις ακόλουθες συνθήκες: αρχικό βήμα αποδιάταξης 10 λεπτών στους 95°C, ακολουθούμενο από 40 κύκλους των 95°C για 15 δευτερόλεπτα και 60°C για 1 λεπτό. Το φθορίζον σήμα SYBR Green ήταν ανιχνεύσιμο αμέσως μετά το βήμα επιμήκυνσης κάθε κύκλου και ο κύκλος στον οποίο το προϊόν γινόταν για πρώτη φορά ανιχνεύσιμο ορίστηκε ως όριο κύκλου. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του 47S pre-rRNA είναι οι εξής: 5'- CCTGCTGTTCTCTCGCGTCCGAA-3' (forward) και 5' AACGCCTGACACGCACGGCACGGA-3' (reverse). Ως εσωτερικός έλεγχος, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για το 18S rRNA: 5'- AAACGGCTACCACATCCA-3' (forward) και 5'-CCTCCAATGGATCCTCGT-3' (reverse). Τα δεδομένα εισήχθησαν σε excel αρχείο και αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τη συγκριτική μέθοδο ορίου κύκλου (comparative cycle threshold method) με κανονικοποίηση των δεδομένων ως προς το 18S rRNA. Τα ποτελέσματα παρουσιάζονται ως ν-φορές μεταβολές σε σχέση με τα δείγματα που δεν υπέστησαν επίδραση. Ο μέσος όρος υπολογίστηκε από 3 ανεξάρτητες μετρήσεις.

2.7.4. Δοκιμασία μέτρησης υπομονάδων ριβοσωμικού RNA (Ribosome biogenesis assay)

2.7.4.1. Σήμανση ριβοσωμικού RNA σε κυτταροκαλλιέργεια (pulse-chase)

Κύτταρα H1299 επιστρώθηκαν σε τρυβλία 35mm. Την επόμενη ημέρα έγινε αποσιώπηση της p14^{ARF} με siRNA. Την δεύτερη ημέρα έγινε επίδραση με αναστολέα ATM (Ku55933) για 24 ώρες. Στη συνέχεια έγινε επώαση με 2ml θρεπτικού υλικού χωρίς μεθειονίνη για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, έγινε επώαση με τριτιωμένη μεθειονίνη (L-[methyl-³H]-methionine) (Perkin Elmer) σε συγκέντρωση 25μCi/ml για 30 λεπτά για τη σήμανση του rRNA. Ακολούθησε αντικατάσταση του θρεπτικού με κανονικό θρεπτικό (2ml) και αυξημένη συγκέντρωση μη ραδιενεργού μεθειονίνης (Cfinal=0,3 mg/ml) για τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα που αναφέρονται (0, 30 και 60 λεπτά), πλύση με PBS και συλλογή των κυττάρων.

2.7.4.2. Απομόνωση RNA με τη χρήση Trizol®

Μετά την πλύση με PBS, προστίθεται 1ml διαλύματος Trizol (φαινόλη και ισοθειοκυανική γουανιδίνη σε όξινο pH, Life Technologies, AntiSel) μέσα στο τρυβλίο. Το αντιδραστήριο Trizol διαρρηγνύει τα κύτταρα και διαλυτοποιεί τα υποκυτταρικά συστατικά. Η συλλογή και ομογενοποίηση των κυττάρων γίνεται με την πιπέττα. Στο διάστημα αυτό τα δείγματα πρέπει να διατηρούνται στον πάγο. Τα δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά ώστε να επιβληθεί η δράση του δραστικού Trizol. Έπειτα προστίθενται 200μl χλωροφορμίου, αναδεύονται με το χέρι για 15 δευτερόλεπτα και επώάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Με την ολοκλήρωση της επώασης, φυγοκεντρώνονται για 15 λεπτά στις 12000rpm, στους 4°C. Συλλέγεται η πάνω φάση όπου βρίσκεται το RNA, προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης και αφήνεται για 16 ώρες στους -20 °C. Το διάλυμα φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις 12000rpm, στους 4 °C ώστε να απομακρυνθεί η ισοπροπανόλη. Σε κάθε δείγμα προστίθεται 1 ml αιθανόλης 70% ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα ισοπροπανόλης και φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά στις 10000rpm, στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα δείγματα αφήνονται στον αέρα για να στεγνώσουν. Έπειτα σε κάθε ένα από αυτά προστίθενται 100μl νερού απαλλαγμένου από RNases και τοποθετούνται στους 55-60 °C για 10 λεπτά ώστε να διαλυτοποιηθεί το RNA.

2.7.4.3. Ποσοτικοποίηση rRNA με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου σε πήκτωμα αγαρόζης

Για την ποσοτικοποίηση του σεσημασμένου rRNA έγινε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης πυκνότητας 1.2% που περιείχε TBE και φορμαλδεύδη 0.55M για την αποφυγή σχηματισμού σταθερών δευτεροταγών δομών μεταξύ των μορίων rRNA. Στη συνέχεια η χρώση με Βρωμιούχο Αιθίδιο (Ethidium Bromide) επέτρεψε την οπτικοποίηση και ποσοτικοποίηση των ριβοσωμικών υπομονάδων (28S και 18S) και τον υπολογισμό της κατάλληλης ποσότητας για τη συνέχεια του πειράματος.

2.7.4.4. Ηλεκτροφόρηση rRNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Στη συνέχεια ίσες ποσότητες (10μg) rRNA προετοιμάστηκαν για φόρτωση με ανάμειξή τους με διάλυμα 10x running buffe (MOPS buffer) (0.2M MOPS, pH 7.0, 50mM sodium acetate, 10mM EDTA), φορμαμίδιο και φορμαλδεύδη και διάλυμα φόρτωσης (40% γλυκερόλη, 1mM EDTA, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol) και επώστηκαν στους 65°C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια φορτώθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% σε 1x MOPS υπό αποδιατακτικές συνθήκες με τη χρήση 0.55M φορμαλδεύδης. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε διάλυμα 1x MOPS στα 100mA για τα πρώτα 5 λεπτά μέχρι τα δείγματα να εισέλθουν στο πήκτωμα. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε τάση 7.5V/cm για 4 ώρες. Μετά την ηλεκτροφόρηση έγινε πλύση του πηκτώματος σε DEPC H₂O 2 φορές και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο για 15 λεπτά ακολουθούμενη από 2 πλύσεις των 15 λεπτών. Η παρατήρηση έγινε σε υπεριώδη ακτινοβολία για έλεγχο της ισοφόρτωσης.

2.7.4.5. Μεταφορά σε μεμβράνη

Μετά τη χρώση, το rRNA του πηκτώματος μεταφέρθηκε σε νάυλον μεμβράνη θετικά φορτισμένη Porablot N+ (Macherey-Nagel). Το πήκτωμα και η μεμβράνη τοποθετήθηκαν ανάμεσα σε απορροφητικά χαρτιά τύπου Whatmann ενυδατωμένα σε διάλυμα μεταφοράς SSC 20X (3M NaCl, 0.3M sodium citrate pH 7.6). Η μεταφορά του RNA έγινε ολονύκτια με τη μέθοδο τριχοειδούς έκλουσης (capillary elution) στη θετικά φορτισμένη μεμβράνη σε διάλυμα SSC 20X.

2.7.4.6. Έκθεση και εμφάνιση φωτογραφικής πλάκας (film)

Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς, έγινε ξήρανση της μεμβράνης και ψεκασμός με ενισχυτικό σπρέι EN3HANCE (Perkin elmer) και ακολούθησε έκθεση σε ειδικής ευασθησίας φωτογραφική πλάκα (film) για 10 μέρες στους -80 °C στο σκοτάδι.

Ακολούθησε επαναφορά της πλάκας σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και εμφάνιση σε κατάλληλη συσκευή.

Για όλα τα διαλύματα και καθ'όλη τη διάρκεια της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε νερό με DEPC (Sigma) το οποίο εξουδετερώνει τις RNάσες, ενώ όλες οι συσκευές ξεπλένονταν με διάλυμα NaOH για την εξουδετέρωση των RNασών.

2.8. Ξενομοσχεύματα κυττάρων H1299 σε ποντίκια.

Για τη δημιουργία όγκων σε ποντίκια, 5×10^6 κύτταρα H1299 (με ή χωρίς μόνιμη αποσιώπηση της p14^{ARF} ενέθηκαν σε κάθε πλευρά ανοσοκατεσταλμένων ποντικών (NOD/SCID mice) 8-12 εβδομάδων. Τα ποντίκια κατατάχθηκαν τυχαία σε τρεις ομάδες των 4 ατόμων. Στα ποντίκια των 2 ομάδων ενέθηκαν κύτταρα H1299 με τον άδειο φορέα ελέγχου (Empty Vector, EV) ενώ στα ποντίκια της τρίτης ομάδας ενέθηκαν κύτταρα H1299 που έφεραν τον φορέα αποσιώπησης για την p14^{ARF} (si p14^{ARF}).

Για το πείραμα με την καφεΐνη, μετά από παρακολούθηση 10 ημερών και όταν εμφανίστηκαν ψηλαφητοί όγκοι, έγινε χορήγηση από στόματος νερού (αρνητικός μάρτυρας) ή διαλύματος καφεΐνης σε νερό σε συγκέντρωση 0,4 mg/ml. 2 εβδομάδες αργότερα όταν οι όγκοι ήταν ορατοί τα ποντίκια θυσιάστηκαν.

Για τα πειράματα με λεντι-ικούς φορείς, η διαμόλυνση των όγκων με τα ιικά σωματίδια έγινε με υποδόρια ένεση εντός του όγκου καθημερινά για περίοδο 5 ημερών και στη συνέχεια κάθε 2 ημέρες για επιπλέον περίοδο 2 ή 3 εβδομάδων μετά την εμφάνιση των όγκων. Κάθε ένεση περιείχε ιικά σωματίδια των φορέων GFP(για έλεγχο της αποδοτικότητας της διαμόλυνσης και ως αρνητικός μάρτυρας), shGFP (για έλεγχο της αποδοτικότητας της αποσιώπησης) και shATM με τίτλο ιού (περιεκτικότητα σε ιικά σωματίδια) 6.2×10^{11} /mL λεντι-ικά σωματίδια ανά ένεση. Όλα τα πειράματα που περιελάμβαναν πειραματόζωα πραγματοποιήθηκαν σε κατάλληλα εξοπλισμένα εργαστήρια του Ινστιτούτου Δημόκριτος (ομάδα Δρ Δ. Κλέτσα) και του ΙΙΒΕΑΑ (ομάδα Δρ Α. Κλινάκη) από εξειδικευμένο προσωπικό και σύμφωνα με τον ισχύοντα κανονισμό.

2.9. Δείγματα ανθρώπινου ιστού

Τμήματα ιστού από 158 δείγματα μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLCs) μαζί με παρακείμενο φυσιολογικό ιστό μονιμοποιήθηκαν σε φορμόλη και εγκλείστηκαν σε παραφίνη. Η επιλογή των δειγμάτων έγινε μετά από έγκριση της επιτροπής Βιοηθικής. Κανένας από τους ασθενείς δεν είχε υποβληθεί σε οποιοδήποτε τύπου αντικαρκινική θεραπεία πριν από τη χειρουργική αφαίρεση των ιστολογικών αλλοιώσεων.

2.10. Στατιστική Ανάλυση

Για τις αναλύσεις πρωτεωμικής, τις οπτικοποιήσεις θερμικών χαρτών, την ταξινόμηση των πρωτεϊνών σε ομάδες, βασισμένη στις τιμές \log_2 Ευκλείδειας απόστασης χρησιμοποιήθηκε η R γλώσσα (R-language g-plots).

Όλες οι υπόλοιπες στατιστικές δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των τεστ ANOVA ή Mann-Whitney με το πρόγραμμα SPSS v17.0.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

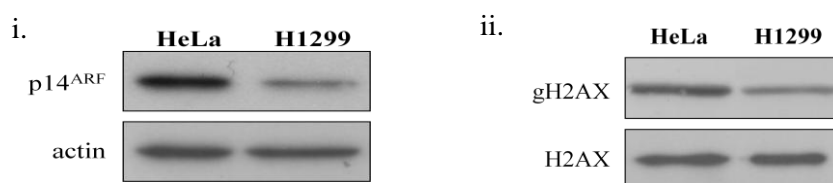
3.1. Η έκφραση της ARF ρυθμίζεται αρνητικά από την ATM

3.1.1. Η αποσιώπηση της ATM οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης p14^{ARF}

Για τη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ του μονοπατιού DDR και της ARF ξεκινήσαμε από την αξιολόγηση του ρόλου της ATM κινάσης, η οποία αποτελεί βασικό ρυθμιστή της απόκρισης σε δικλωνικές θραύσεις και ελέγχει τη φωσφορυλίωση ενός μεγάλου εύρους υποστρωμάτων που συμμετέχουν σε πλήθος σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών. Προχωρήσαμε, λοιπόν, πρώτα σε αποσιώπηση της έκφρασης της ATM με τη χρήση siRNA στις καρκινικές κυτταρικές σειρές H1299, HeLa, Saos2-ER-E2F1, NARF2 και στην αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά HBEC. Η αποσιώπηση της ATM στις σειρές αυτές οδήγησε σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της p14^{ARF} όπως έδειξαν τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης και ανοσοφθορισμού για p14^{ARF}.

3.1.1.1. Η αποσιώπηση της ATM με siRNA προκαλεί αύξηση των επιπέδων της p14^{ARF} στις καρκινικές κυτταρικές σειρές H1299 και HeLa

Οι κυτταρικές σειρές H1299 (καρκίνος πνεύμονα) και HeLa (καρκίνος τραχήλου της μήτρας) επιλέχθηκαν γιατί εκφράζουν υψηλά επίπεδα p14^{ARF} (Εικ.1i) λόγω απενεργοποίησης της p53, καθώς η ύπαρξη ενεργής p53 ρυθμίζει τα επίπεδα της p14^{ARF} διατηρώντας τα χαμηλά [30] και επίσης επειδή ως καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν μία συνεχή ενεργοποίηση του μονοπάτι DDR [112] (Εικ.1ii).



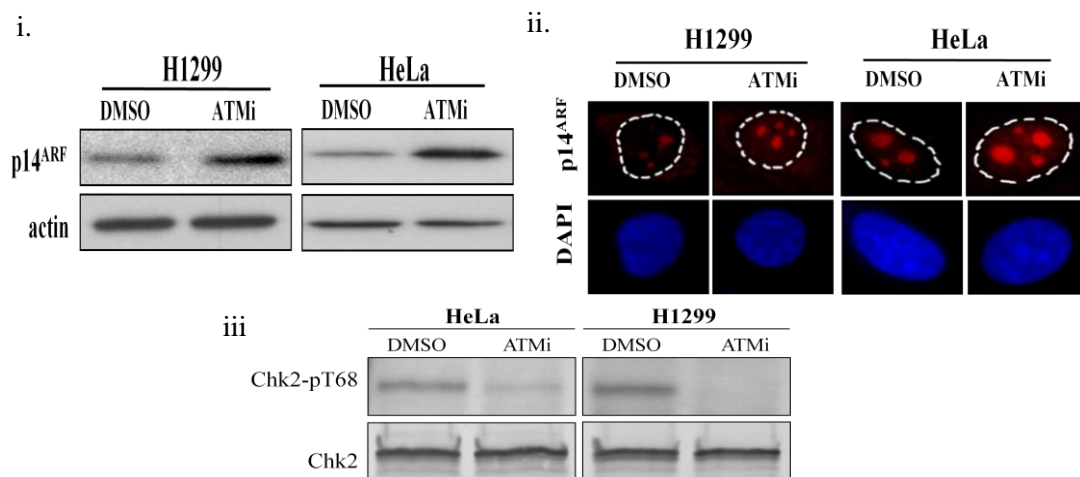
Εικόνα 1: i. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα H1299 και HeLa έναντι της p14^{ARF}. Τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ii. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα H1299 και HeLa έναντι φωσφορυλιωμένης H2AX (gH2AX). Τα επίπεδα της ολικής H2AX χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των εκχυλισμάτων ιστονών.

Η αποσιώπηση της ATM με siRNA στα κύτταρα αυτά οδήγησε σε περαιτέρω αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της p14^{ARF} (Εικ. 2)



3.1.1.2. Η αναστολή της δράσης της ATM προκαλεί αύξηση των επιπέδων της p14^{ARF} στις καρκινικές κυτταρικές σειρές H1299 και HeLa

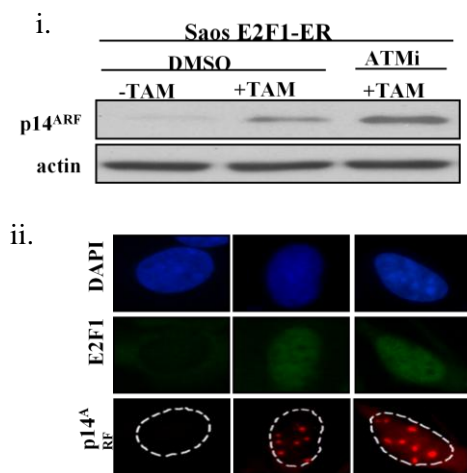
Η αναστολή της ενεργότητας της ATM με τη χρήση του ειδικού χημικού αναστολέα Ku55933 προκαλεί επίσης την αύξηση των επιπέδων της p14^{ARF} στα κύτταρα H1299 και HeLa, υποδεικνύοντας ότι η παρατηρούμενη μεταβολή των επιπέδων της p14^{ARF} εξαρτάται από την ενεργότητα κινάσης της ATM (Εικ.3).



Εικόνα 3: i. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα H1299 και HeLa με αντίσωμα έναντι της p14^{ARF} πριν (DMSO, ο διαλύτης του αναστολέα χρησιμοποιείται ως αρνητικός έλεγχος) και μετά (ATMi) την χημική αναστολή της ATM. Τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων, ii. Ανοσοφθορισμός σε μονιμοποιημένα κύτταρα H1299 και HeLa πριν και μετά την χημική αναστολή της ATM με αντίσωμα έναντι της p14^{ARF} (κόκκινο χρώμα). Η χρώση με DAPI (μπλε χρώμα) δείχνει την περιοχή του πυρήνα των κυττάρων. iii. Ανοσοαποτύπωση για φωσφορυλιωμένα και ολικά επίπεδα της Chk2 ως θετικού μάρτυρα ελέγχου για την ενεργότητα κινάσης της ATM και την αποτελεσματική αναστολή της από τον χημικό αναστολέα Ku55933 (ATMi)

3.1.1.3. Η αναστολή της δράσης της ATM προκαλεί αύξηση των επιπέδων της p14^{ARF} στις επαγόμενο κυτταρικό σύστημα Saos2-ER-E2F1

Το κυτταρικό σύστημα Saos2-ER-E2F1 προέρχεται από την κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος Saos2. Στο σύστημα αυτό η προσθήκη 4-OH-Ταμοξιφένης προκαλεί την μετατόπιση του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 στον πυρήνα με αποτέλεσμα την μετατόπισή του. Η ενεργοποίηση του E2F1 οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της p14^{ARF} μέσω μεταγραφικής ενεργοποίησης. Η χημική αναστολή της ATM παρουσία επαγωγής E2F1 με ταμοξιφένη προκαλεί περαιτέρω αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της p14^{ARF} (Εικ. 4)



Εικόνα 4: i. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα Saos2-ER-E2F1 με αντίσωμα έναντι της p14^{ARF} πριν (DMSO, ο διαλύτης του αναστολέα χρησιμοποιείται ως αρνητικός έλεγχος) και μετά (ATMi) την χημική αναστολή της ATM και με ή χωρίς επίδραση με ταμοξιφένη (TAM). Τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων, ii. Ανοσοφθορισμός σε μονιμοποιημένα κύτταρα Saos2-ER-E2F1 πριν και μετά την χημική αναστολή της ATM με αντίσωμα έναντι της p14^{ARF} (κόκκινο χρώμα). Η χρώση για E2F1 (πράσινο χρώμα) δείχνει τη μετατόπισή του στον πυρήνα έπειτα από επαγωγή με 4-OH-ταμοξιφένη (TAM). Η χρώση με DAPI (μπλε χρώμα) δείχνει την περιοχή του πυρήνα των κυττάρων.

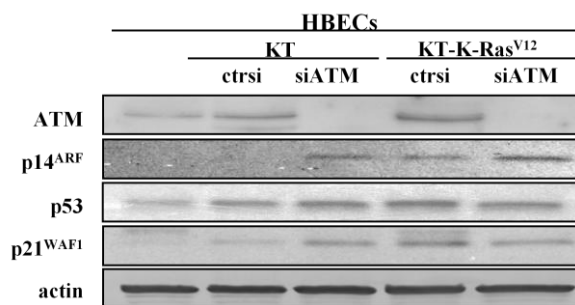
3.1.1.4. Η αποσιώπηση της ATM με siRNA προκαλεί αύξηση των επιπέδων της p14^{ARF} στην αθανатоποιημένα κύτταρα HBEC.

Η κυτταρική σειρά HBEC (Human Bronchial Epithelial Cells) ΚΤ προέρχεται από ανθρώπινα φυσιολογικά κύτταρα βρογχικού επιθηλίου στα οποία έχουν εισαχθεί τα γονίδια της τελομεράσης H-Tert και της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης cdk4 με αποτέλεσμα την αθανατοποίησή τους [107]. Τα κύτταρα αυτά διατηρούν ενεργότητα p53 και δεν εκφράζουν ανιχνεύσιμα πρωτεϊνικά επίπεδα p14^{ARF}. Τα επίπεδά της ωστόσο αυξάνονται όταν γίνεται αποσιώπηση της ATM αλλά και όταν εισάγεται το ενεργοποιημένο ογκογονίδιο K-Ras [108] (Εικ.4). Η αποσιώπηση της ATM στα κύτταρα HBEC ΚΤ/K-Ras προκαλεί περαιτέρω αύξηση της p14^{ARF} (Εικ.4). Το αποτέλεσμα αυτό σε συνδυασμό με την αύξηση της p14^{ARF} και με ταυτόχρονη

επαγωγή του E2F1 υποδεικνύει ότι η αύξηση της p14^{ARF} μέσω ATM και μέσω ογκογονιδίων γίνεται μέσω διαφορετικών μηχανισμών.

Η ύπαρξη ενεργής p53 στα κύτταρα αυτά μας επιτρέπει να εξετάσουμε την επίδραση των δύο μονοπατιών στην ενεργοποίησή της. Ανοσοαποτύπωση για p53 και για την πρωτεΐνη-στόχο της p21 έδειξε ότι η αύξηση της p14^{ARF} λόγω αναστολής της ATM στα KT κύτταρα και λόγω της ογκογόνου δράσης του K-Ras στα KT-K-Ras κύτταρα προκαλεί μία μικρή αύξηση των επιπέδων της p53 και της p21 (Εικ. 5i). Η αύξηση, ωστόσο, λόγω αναστολής της ATM στα κύτταρα KT-K-Ras, τα οποία έχουν ήδη αυξημένα επίπεδα p14^{ARF}, δεν συνοδεύεται από αντίστοιχη αύξηση των p53 και p21, υποδεικνύοντας ίσως έναν βαρύνοντα ρόλο του DDR μονοπατιού έναντι της p14^{ARF} ως προς τη ρύθμιση της p53 υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες.

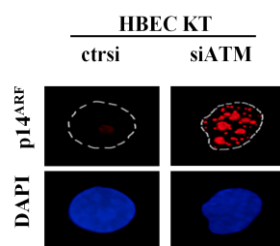
i.



Εικόνα 5: i. Ανοσοαποτύπωση για p14^{ARF}, p53 και p21 πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα HBEC KT και KT-K-Ras πριν και μετά από αποσιώπηση της ATM

ii. Ανοσοφθορισμός σε μονιμοποιημένα κύτταρα HBEC KT πριν και μετά από αποσιώπηση της ATM με αντίσωμα έναντι της p14^{ARF} (κόκκινο χρώμα). Η χρώση με DAPI (μπλε χρώμα) δείχνει την περιοχή του πυρήνα των κυττάρων.

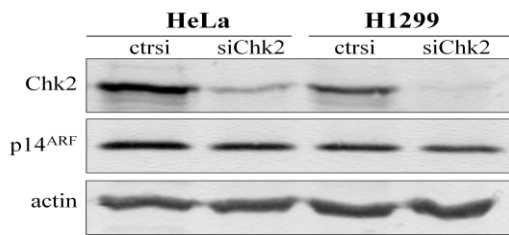
ii.



3.1.1.5. Η αποσιώπηση της Chk2 δεν έχει καμία επίδραση στα επίπεδα της p14^{ARF}

Προκειμένου να διαπιστώσουμε ο μηχανισμός μέσω του οποίου η ATM ρυθμίζει τα επίπεδα της ATM μεσολαβείται από την κινάση Chk2 η οποία αποτελεί τον βασικό στόχο-μεταγωγό σήματος από την ATM στο κλασικό μονοπάτι DDR, προχωρήσαμε σε αποσιώπηση με siRNA της Chk2 και ελέγξαμε τα επίπεδα της p14^{ARF} με ανοσοαποτύπωση. Το αποτέλεσμα έδειξε ότι η Chk2 δεν προκαλεί καμία μεταβολή

στα επίπεδα της $p14^{ARF}$ (Εικ. 6), γεγονός που δείχνει ότι ο μηχανισμός που συνδέει την ATM με την $p14^{ARF}$ διαφορετικός από το κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης DDR.



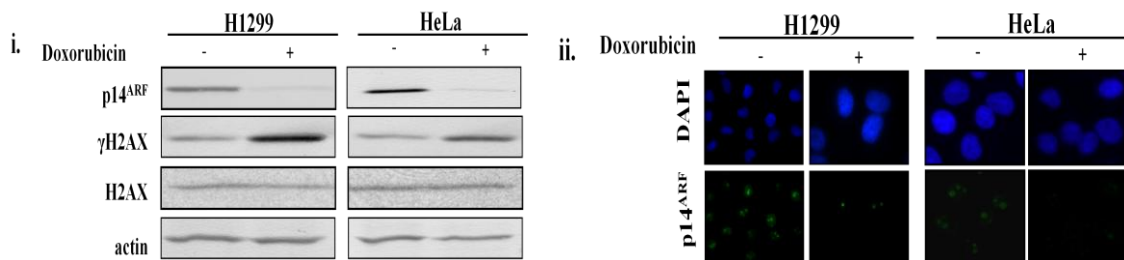
Εικόνα 6: Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα H1299 και HeLa πριν και μετά την αποσιώπηση της Chk2 με αντίσωμα έναντι της $p14^{ARF}$. Τα επίπεδα της Chk2 δείχνουν το ποσοστό επιτυχίας της αποσιώπησης ενώ τα επίπεδα της β -ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.

3.1.2. Η ενεργοποίηση της ATM μέσω DDR προκαλεί μείωση των επιπέδων της $p14^{ARF}$

Αφού διαπιστώσαμε ότι η απενεργοποίηση της ATM αυξάνει τα επίπεδα της $p14^{ARF}$, θελήσαμε να ελέγξουμε αν αντίστροφα η ενεργοποίηση της ATM μπορεί να καταστείλει τα επίπεδα της $p14^{ARF}$. Για το σκοπό αυτό προχωρήσαμε σε ενεργοποίηση του DDR μονοπατιού μέσω επίδρασης με τον γενετοξικό παραγόντα δοξορουβικίνη, η οποία ως γνωστόν οδηγεί σε ενεργοποίηση της ATM[113] και ελέγξαμε την επίδραση στα επίπεδα της $p14^{ARF}$.

3.1.2.1. Η επίδραση με δοξορουβικίνη οδηγεί σε πτώση των επιπέδων της $p14^{ARF}$ σε κύτταρα H1299 και HeLa.

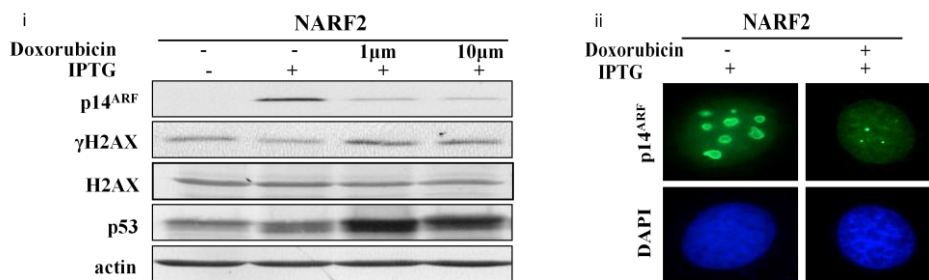
Η επίδραση με δοξορουβικίνη σε κύτταρα HeLa και H1299 προκαλεί ενεργοποίηση του μονοπατιού απόκρισης σε βλάβες του DNA όπως φαίνεται από τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της H2AX η οποία συνοδεύεται από πτώση των επιπέδων της $p14^{ARF}$ (Εικ.7)



ΕΙΚΟΝΑ 7: i. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων και εκχυλισμάτων ιστονών από κύτταρα H1299 και HeLa πριν και μετά από επίδραση με δοξορουβικίνη με αντίσωμα έναντι της $p14^{ARF}$ και φωσφορυλιωμένης H2AX (γ H2AX). Τα επίπεδα της ολικής H2AX χρησιμεύουν για τον προσδιορισμό του ποσοστού φωσφορυλίωσης, ενώ τα επίπεδα της β -ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. ii. Ανοσοφθορισμός σε μονιμοποιημένα κύτταρα H1299 και HeLa πριν και μετά από επίδραση με δοξορουβικίνη με αντίσωμα έναντι της $p14^{ARF}$ (πράσινο χρώμα). Η χρώση με DAPI (μπλε χρώμα) δείχνει την περιοχή του πυρήνα των κυττάρων.

3.1.2.2. Η επίδραση με δοξορουβικίνη οδηγεί σε πτώση των επιπέδων της p14^{ARF} σε κύτταρα NARF2.

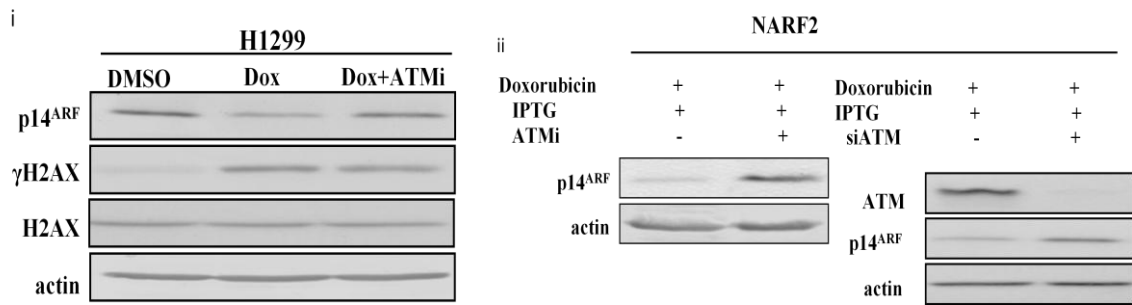
Η κυτταρική σειρά NARF2 προέρχεται από τα U2OS κύτταρα στα οποία έχει εισαχθεί το cDNA της p14^{ARF} υπό τον έλεγχο εξωτερικού υποκινητή της β-γαλακτοσιδάσης με αποτέλεσμα η προσθήκη IPTG να προκαλεί εκτοπική έκφραση της p14^{ARF} [30]. Η ενεργοποίηση του DDR μέσω δοξορουβικίνης προκαλεί και σε αυτά τα κύτταρα παρά την ταυτόχρονη επαγωγή της p14^{ARF} με IPTG (Εικ. 8). Παρατηρούμε επίσης ότι τα επίπεδα της p53 αυξάνονται με την προσθήκη δοξορουβικίνης παρά την πτώση της p14^{ARF} λόγω ενεργοποίησης του μονοπατιού DDR, όπως επιβεβαιώνει και ο αυξημένος βαθμός φωσφορυλίωσης της H2AX (Εικ. 8i).



ΕΙΚΟΝΑ 8: i. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων για p14^{ARF} και p53 και εκχυλισμάτων ιστών για γH2AX από κύτταρα NARF2 πριν και μετά από επίδραση με δοξορουβικίνη υπό συνθήκες επαγωγής της p14^{ARF} με προσθήκη IPTG. Τα επίπεδα της ολικής H2AX χρησιμεύουν για τον προσδιορισμό του ποσοστού φωσφορυλίωσης, ενώ τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. ii. Ανοσοφθορισμός σε μονιμοποιημένα κύτταρα NARF2 πριν και μετά από επίδραση με δοξορουβικίνη υπό συνθήκες επαγωγής της p14^{ARF} με προσθήκη IPTG με αντίσωμα έναντι της p14^{ARF} (πράσινο χρώμα). Η χρώση με DAPI (μπλε χρώμα) δείχνει την περιοχή του πυρήνα των κυττάρων.

3.1.2.3. Η πτώση της ARF λόγω επίδρασης με δοξορουβικίνη εξαρτάται από την δράση της ATM.

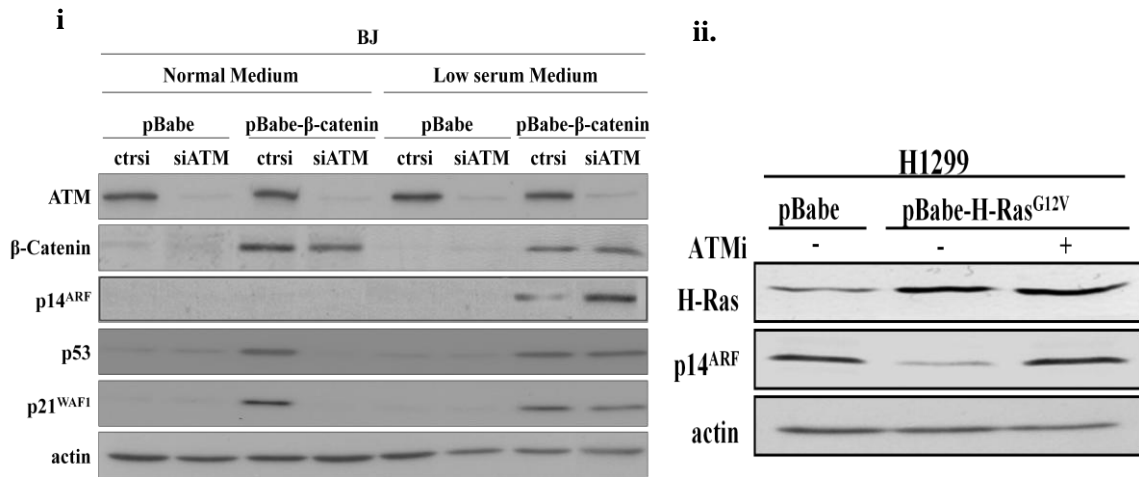
Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι η δράση της δοξορουβικίνης μεσολαβείται από την ATM κινάση προχωρήσαμε σε σύγκριση των επιπέδων της p14^{ARF} μετά από προσθήκη δοξορουβικίνης με ή χωρίς ταυτόχρονη αποσιώπηση ή αναστολή της ATM σε κύτταρα H1299 και NARF2. Το αποτέλεσμα δείχνει ότι τα επίπεδα της p14^{ARF} επανέρχονται στα αρχικά όταν η δοξορουβικίνη προστίθεται με παράλληλη απενεργοποίηση της ATM (Εικ.9)



Εικόνα 9: i. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων και εκχυλισμάτων ιστονών από κύτταρα H1299 πριν και μετά από επίδραση με δοξορουβικίνη και με ή χωρίς ταυτόχρονη αναστολή της ATM (ATMi) με αντίσωμα έναντι της p14^{ARF} και φωσφορυλιωμένης H2AX (γH2AX). Τα επίπεδα της ολικής H2AX χρησιμεύουν για τον προσδιορισμό του ποσοστού φωσφορυλίωσης, ενώ τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. ii. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα NARF2 πριν και μετά από επίδραση με δοξορουβικίνη και με ή χωρίς ταυτόχρονη αναστολή (ATMi) ή αποσίωψη (siATM) της ATM με αντίσωμα έναντι της p14^{ARF}. Τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.

3.1.3. Η ATM ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση της ARF που επάγεται από ογκογονίδια.

Η εισαγωγή του ογκογονιδίου β-κατενίνης (β-catenin) σε ανθρώπινα φυσιολογικά κύτταρα (ινοβλάστες BJ), τα οποία δεν εκφράζουν την p14^{ARF} σε φυσιολογικές συνθήκες, οδηγεί σε ενεργοποίηση του DDR όπως φαίνεται από την αύξηση των p53 και p21 σε συνθήκες φυσιολογικής συγκέντρωσης ορού και σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης ορού (στέρση θρεπτικών συστατικών). Η αύξηση της p14^{ARF} παρατηρείται μόνο σε συνθήκες στρες (χαμηλή συγκέντρωση ορού) και ενισχύεται μετά από αναστολή της ATM (Εικ 10i). Σε καρκινικά κύτταρα H1299, η εισαγωγή του ογκογονιδίου H-Ras οδηγεί σε πτώση της p14^{ARF}. Η πτώση αυτή εξαρτάται από τη δράση της ATM, όπως φαίνεται από την επαναφορά των επιπέδων της p14^{ARF} έπειτα από αναστολή της ATM (Εικ.10ii).



Εικόνα 10: i) Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα H1299 πριν και μετά την εισαγωγή του ογκογονιδίου β-catenin με παροδική διαμόλυνση και με ή χωρίς ταυτόχρονη αναστολή της ATM (ATMi) με αντίσωμα έναντι της β-catenin, της p14^{ARF}, της p53 και της p21. Τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. ii) Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα H1299 πριν και μετά την εισαγωγή του ογκογονιδίου H-RAS με παροδική διαμόλυνση και με ή χωρίς ταυτόχρονη αναστολή της ATM (ATMi) με αντίσωμα έναντι της p14^{ARF}. Τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.

Ο λόγος για τον οποίο σε αυτά τα κύτταρα το ογκογονίδιο H-Ras δεν μπορεί να επάγει την αύξηση της p14^{ARF} είναι πιθανότατα ότι σε αυτά τα κύτταρα η ύπαρξη ήδη του ενεργοποιημένου ογκογονιδίου K-Ras και η απώλεια της p53 έχει οδηγήσει τα επίπεδα της p14^{ARF} στα ανώτατα οριακά επίπεδα πέρα από τα οποία δεν μπορεί να αυξηθεί, με αποτέλεσμα στο συγκεκριμένο κυτταρικό περιβάλλον να υπερισχύει η αρνητική ρύθμιση της p14^{ARF} από την ATM λόγω ενεργοποίησης του DDR από το ογκογονίδιο.

3.2. Διερεύνηση του μηχανισμού αλληλεπίδρασης της ATM με την ARF

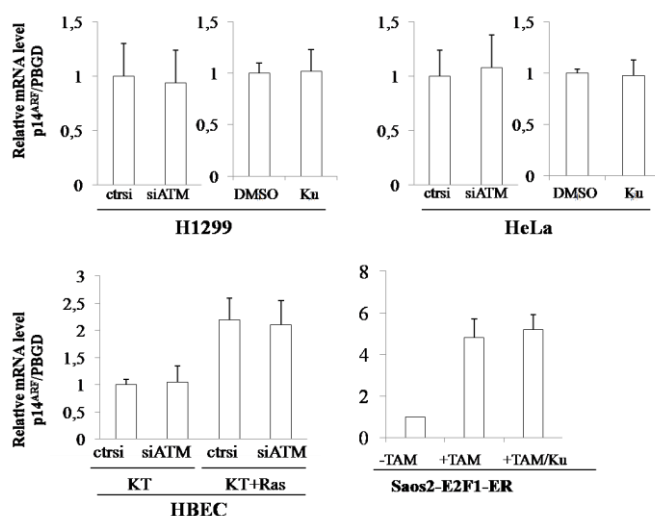
Σκοπός της συνέχειας της έρευνας ήταν να εξεταστούν οι πιθανοί μεσολαβητές και τα μονοπάτια που μπορεί να εμπλέκονται στο μηχανισμό ρύθμισης της ARF από την ATM. Για το σκοπό αυτό, εξετάστηκε το επίπεδο ρύθμισης της ARF καθώς και η συμμετοχή πιθανών πρωτεϊνών-υποστρωμάτων της ATM σε μια προσπάθεια σύνδεσής τους με πρωτεΐνες που ρυθμίζουν και αλληλεπιδρούν με την ARF.

3.2.1. Μελέτη της επίδρασης της ATM κινάσης στο ρυθμό μεταγραφής του γονιδίου της p14ARF

Το πρώτο βήμα για τη διαλεύκανση του μηχανισμού ήταν να διαπιστώσουμε σε ποιο επίπεδο γίνεται η ρύθμιση της p14^{ARF} από την ATM. Αν γίνεται σε μεταγραφικό επίπεδο θα πρέπει να επηρεάζονται τα επίπεδα mRNA της p14^{ARF} ενώ αν γίνεται σε μετα-μεταγραφικό ή μετα-μεταφραστικό επίπεδο θα πρέπει να επηρεάζεται η σταθερότητα της πρωτεΐνης p14^{ARF}. Για το σκοπό αυτό, προχωρήσαμε πρώτα σε ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA της p14^{ARF} μετά από αναστολή ή ενεργοποίηση της ATM με τη μέθοδο της ποσοτικής αντίστροφης μεταγραφής-PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time- RT PCR).

3.2.1.1. Η αναστολή της ATM δεν αυξάνει τα επίπεδα μεταγραφής της p14ARF

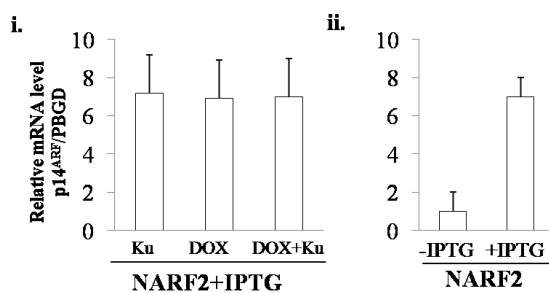
Για τη μελέτη της επίδρασης της αναστολής της ATM στα επίπεδα mRNA της p14^{ARF}, πραγματοποιήσαμε ποσοτική αντίστροφη μεταγραφή-PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time- RT PCR) για ποσοτικοποίηση mRNA κυττάρων H1299, HeLa, Saos2-ER-E2F1, HBEC KT και HBECKT-KRas πριν και μετά την αναστολή ή αποσιώπηση της ATM. Τα αποτελέσματα σε όλες τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν έδειξαν ότι η απενεργοποίηση της ATM δεν επηρεάζει τα επίπεδα της p14^{ARF} (Εικ.11), υποδηλώνοντας ότι η αύξηση της p14^{ARF} μετά από απενεργοποίηση της ATM συμβαίνει σε επίπεδο πρωτεΐνης.



Εικόνα 11: Διαγράμματα ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων Real-Time RT-PCR πριν και μετά την αναστολή (Ku) ή την αποσιώπηση (siATM) της ATM σε κύτταρα H1299, HeLa, HBEC και Saos2-ER-E2F1 υπό την επίδραση ταμοξιφένης. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο PBGD. Ως αρνητικός έλεγχος για την αποσιώπηση χρησιμοποιήθηκε μη ειδικό siRNA (ctrlsi) και για την αναστολή ο διαλύτης του αναστολέα (DMSO). Η αύξηση των επιπέδων mRNA της P14^{ARF} στα κύτταρα HBEC-KT-KRas και έπειτα από επαγωγή του E2F1 με ταμοξιφέν στα κύτταρα Saos2-ER-E2F1 αποτελεί εσωτερικό θετικό έλεγχο της διαδικασίας

3.2.1.2. Η ενεργοποίηση της ATM δεν αυξάνει τα επίπεδα μεταγραφής της p14^{ARF}

Για να επιβεβαιώσουμε την μη επίδραση της ATM στη μεταγραφή της p14^{ARF} προχωρήσαμε σε ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA και μετά από επίδραση με δοξορουβικίνη σε κύτταρα NARF2 υπό συνθήκες επαγωγής της p14^{ARF}. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η επίδραση με δοξορουβικίνη δεν επηρεάζει τα επίπεδα mRNA της p14^{ARF} ενώ ούτε η ταυτόχρονη αναστολή της ATM έχει κάποια επίδραση (Εικ.12).



Εικόνα 12: i. Διαγράμματα ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων Real-Time RT-PCR πριν και μετά επίδραση με δοξορουβικίνη με ή χωρίς ταυτόχρονη αναστολή της ATM (Ku) σε κύτταρα NARF2 υπό την επίδραση IPTG και επαγωγής της p14^{ARF}. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο PBGD. ii. Η αύξηση των επιπέδων mRNA της p14^{ARF} υπό την επίδραση IPTG αποτελεί εσωτερικό θετικό έλεγχο της διαδικασίας

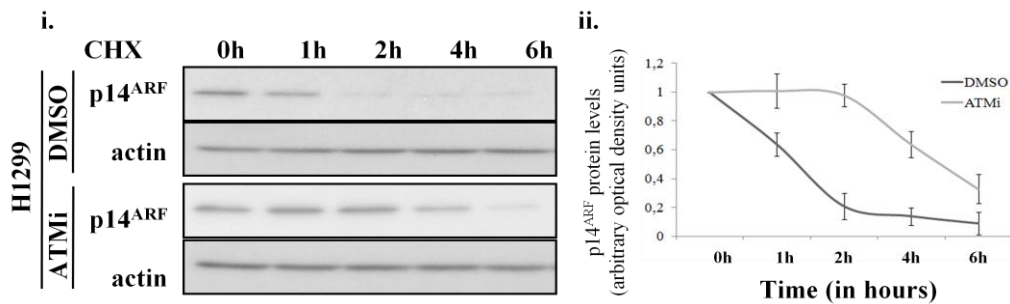
3.2.2. Μελέτη της επίδρασης της ATM κινάσης στην σταθερότητα της πρωτεΐνης p14^{ARF}

Εφόσον επιβεβαιώσαμε ότι η ρύθμιση της ARF από την ATM δεν συμβαίνει σε μεταγραφικό επίπεδο, καθώς τα επίπεδα της ARF παραμένουν αμετάβλητα ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση της ATM, το επόμενο βήμα ήταν να ελέγξουμε εάν η δράση της ATM επηρεάζει την σταθερότητα της ARF.

3.2.2.1. Η αναστολή της ATM αυξάνει το χρόνο ημίσειας ζωής της πρωτεΐνης p14^{ARF}

Για να ελέγξουμε την επίδραση της ATM στην σταθερότητα της p14^{ARF}, χρησιμοποιήσαμε τον χημικό παράγοντα κυκλοεξαμίδιο (cycloheximide, CHX) ο οποίος δρα ως αναστολέας της πρωτεϊνοσύνθεσης για να υπολογίσουμε το ρυθμό αποικοδόμησης της πρωτεΐνης p14^{ARF}. Σε κύτταρα H1299 έγινε επίδραση με τον χημικό αναστολέα της ATM κινάσης με παράλληλη αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης με επίδραση CHX για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα ώστε να προσδιορίσουμε το χρόνο ημίσειας ζωής της πρωτεΐνης p14^{ARF} πριν και μετά την αναστολή της ATM. Όπως φαίνεται στο αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης για

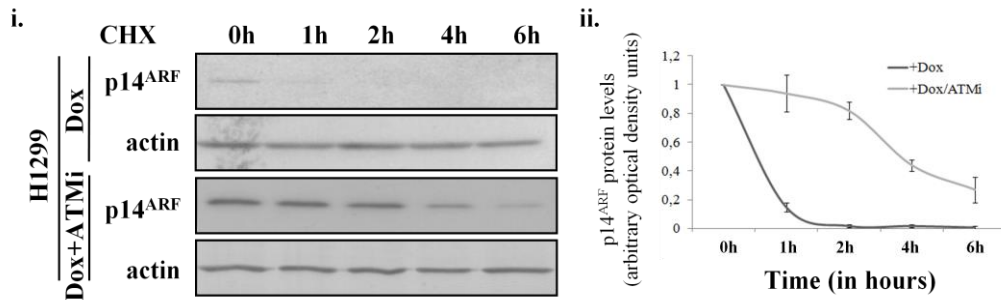
p14^{ARF} (Εικ. 13i) και στα αντίστοιχα γραφήματα που προκύπτουν έπειτα από ποσοτικοποίηση των επιπέδων (Εικ. 13ii), ο χρόνος ημίσειας ζωής της p14^{ARF} παρουσιάζει σημαντική αύξηση (περίπου 75%) έπειτα από επίδραση με τον αναστολέα σε σχέση με κύτταρα που δεν έχουν υποστεί αναστολή (DMSO). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει ότι η αναστολή της δράσης της κινάσης ATM προκαλεί σταθεροποίηση της p14^{ARF} και αύξηση των επιπέδων της.



Εικόνα 13: i. Ανοσοαποτύπωση για p14^{ARF} σε εκχυλίσματα πρωτεϊνών από κύτταρα H1299 μετά από επίδραση με CHX με ή χωρίς ταυτόχρονη αναστολή της ATM. Η επίδραση με τον χημικό αναστολέα της ATM Ku55933 (ATMi) ή με το διαλύτη (DMSO) ως αρνητικό έλεγχο έγινε για 24 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκε CHX για τα αναφερόμενα χρονικά διαστήματα παρουσία DMSO ή αναστολέα. Τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. ii. Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης για τον υπολογισμό του χρόνου ημίσειας ζωής της p14^{ARF} υπό την επίδραση του αναστολέα (ATMi) ή DMSO.

3.2.2.1. Η αναστολή της ATM αυξάνει το χρόνο ημίσειας ζωής της πρωτεΐνης p14^{ARF} υπό την επίδραση δοξορουβικίνης.

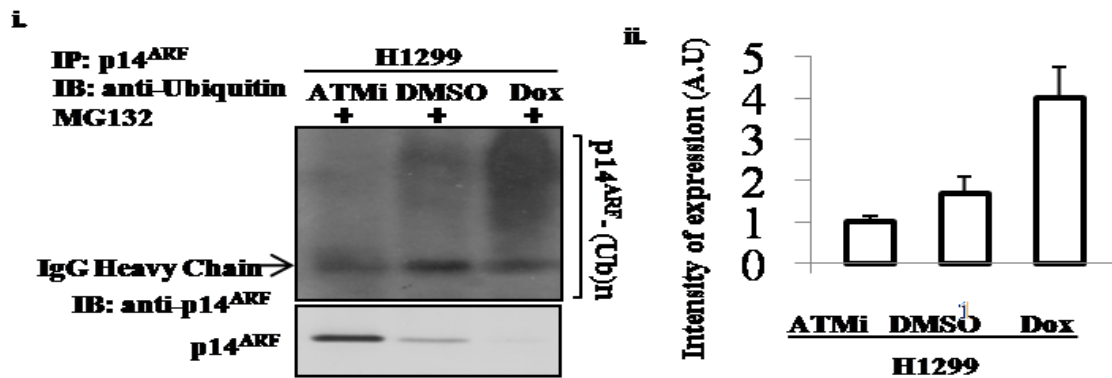
Η ενεργοποίηση του DDR μέσω δοξορουβικίνης, όπως είναι αναμενόμενο, αποσταθεροποιεί την πρωτεΐνη p14^{ARF} όπως φαίνεται από το πείραμα με επίδραση CHX σε κύτταρα H1299 (Εικ. 14). Παρουσία όμως ταυτόχρονης αναστολής της ATM, ο χρόνος ημίσειας ζωής της p14^{ARF} επανέρχεται και η πρωτεΐνη σταθεροποιείται. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει το ρόλο της ATM στην αρνητική ρύθμιση της σταθερότητας της p14^{ARF} μετά από ενεργοποίηση του DDR.



Εικόνα 14: i. Ανοσοαποτύπωση για p14^{ARF} σε εκχυλίσματα πρωτεϊνών από κύτταρα H1299 μετά από επίδραση με CHX και δοξορουβικίνη με ή χωρίς ταυτόχρονη αναστολή της ATM. Η επίδραση με την δοξορουβικίνη και τον χημικό αναστολέα της ATM Ku55933 (Dox και Dox+ATMi) έγινε για 24 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκε CHX για τα αναφερόμενα χρονικά διαστήματα. Τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. ii. Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης για τον υπολογισμό του χρόνου ημίσειας ζωής της p14^{ARF} υπό την επίδραση δοξορουβικίνης και αναστολέα.

3.2.2.2 Η ενεργοποίηση ή αναστολή της ATM επηρεάζει το βαθμό ουβικιτινίωσης της ARF.

Για να διαπιστώσουμε αν η κατάσταση της ATM μπορεί να επιφέρει αλλαγές στα επίπεδα ουβικιτινίωσης της ARF πραγματοποιήσαμε δοκιμασία ουβικιτίνης (ubiquitin assay). Με τη διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης (Immunoprecipitation, IP) έγινε απομόνωση της πρωτεΐνης p14^{ARF} από κύτταρα H1299 μετά από επίδραση με DMSO (ως αρνητικό έλεγχο) ή αναστολέα ATM ή δοξορουβικίνης. Πράγματι, η αναστολή της ATM επιφέρει μία μικρή μείωση των επιπέδων ουβικιτινίωσης της ARF, γεγονός που συμφωνεί με τη σταθεροποίηση της ARF που παρατηρούμε σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Αντιστρόφως, η επίδραση με δοξορουβικίνη έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του βαθμού ουβικιτινίωσης της ARF όπως ήταν αναμενόμενο (Εικ. 15).



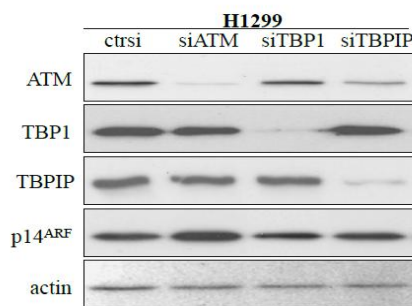
Εικόνα 15: i. Ανοσοαπύκνωση έναντι αντισώματος ουβικιτίνης σε ανοσοκατακρημνισμένη πρωτεΐνη p14^{ARF} (IP) από κύτταρα H1299 μετά από επίδραση με ATM αναστολέα (ATMi) ή δοξορουβικίνη (Dox). Η ανοσοαπύκνωση για p14^{ARF} (κάτω) δείχνει τα ολικά επίπεδα της πρωτεΐνης. ii. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων της p14^{ARF} υπό την επίδραση DMSO, αναστολέα ATM (ATMi) και δοξορουβικίνης (Dox)

3.2.3. Αναζήτηση πιθανών στόχων της ATM που σχετίζονται με την ρύθμιση της σταθερότητας της p14^{ARF}

Εφόσον η ATM είναι μία κινάση με μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, ο μηχανισμός που οδηγεί από την ενεργοποίησή της στην αποικοδόμηση της p14^{ARF} θα πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον μία πρωτεΐνη-στόχο της. Η άμεση φωσφορυλίωση της p14^{ARF} από την ATM δεν είναι πιθανή λόγω της απουσίας θέσεων αναγνώρισης υποστρώματος τυπικές για την ATM (SQ) στην αλληλουχία της p14^{ARF} [30]. Έτσι, στραφήκαμε στην εξέταση πιθανών υποστρωμάτων της ATM, με βάση την ευρείας κλίμακας ανάλυση των *Matsuoka et al.* [9]. Στην ανάλυση αυτή βρέθηκαν δύο πρωτεΐνες που έχουν συνδεθεί με την αποικοδόμηση της p14^{ARF}: η **TBPIP (Tat-Binding Protein-Interacting Protein)**, η οποία αλληλεπιδρά με την **TBP1 (Tat-Binding protein 1)**, μία πρωτεΐνη που σχετίζεται με την υπομονάδα 19S του πρωτεασώματος και έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με την p14^{ARF}, συμβάλλοντας στη σταθεροποίησή της [114] και η **ULF/TRIP12 (Ubiquitin Ligase of ARF)**, η οποία είναι μία E3 λιγάση ουβικιτίνης που πρόσφατα βρέθηκε ότι ευθύνεται για την ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση της p14^{ARF} [19].

3.2.3.1. Η TBPIP ή η TBP1 δεν παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της αποικοδόμησης της p14^{ARF} από την ATM

Προκειμένου να εξετάσουμε το ρόλο του διμερούς TBPIP-TBP1 στο μηχανισμό, προχωρήσαμε σε αποσιώπηση και των δύο πρωτεϊνών με siRNA, ενώ ελέγξαμε και τα επίπεδα των δύο πρωτεϊνών μετά από αποσιώπηση της ATM. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης έδειξαν ότι ούτε η αποσιώπηση της TBP1 ούτε της TBPIP είχε κάποια επίδραση στα επίπεδα της p14^{ARF}, ενώ η αποσιώπηση της ATM δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα των δύο πρωτεϊνών (Εικ. 16).

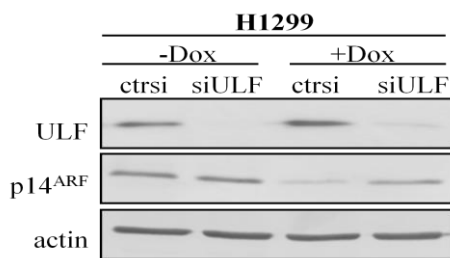


Εικόνα 16: Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα H1299 για ATM, TBP1, TBPIP και p14^{ARF}, έπειτα από αποσιώπηση των ATM, TBP1 και TBPIP. Τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.

3.2.3.2. Η E3 λιγάση ουβικιτίνης ULF ευθύνεται για τη μεταβολή των επιπέδων ουβικιτινίωσης της p14^{ARF} από την ATM

Πρόσφατα βρέθηκε ότι η E3 λιγάση ουβικιτίνης που είναι υπεύθυνη για την ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση της p14^{ARF} η ULF (ή αλλιώς TRIP12)[19]. Για να ελέγξουμε αν η ουβικιτινίωση της p14^{ARF} από την ATM είναι αποτέλεσμα της δράσης της ULF, προχωρήσαμε σε επίδραση με δοξοουβικίνη ταυτόχρονα με αποσιώπηση της ULF σε κύτταρα H1299. Η αποσιώπηση της ULF επαναφέρει τα επίπεδα της p14^{ARF} παρά την ενεργοποίηση του DDR και της ATM από δοξοουβικίνη (Εικ. 16). Αυτό σημαίνει ότι η ULF ευθύνεται για την αυξημένη

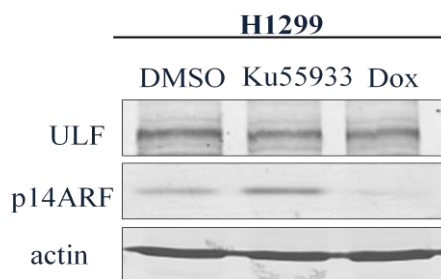
ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση της p14^{ARF} από την ενεργοποίηση της ATM.



Εικόνα 17: Ανοσοαποτύπωση για p14^{ARF} σε κύτταρα H1299 μετά από επίδραση με δοξοουβικίνη (Dox) και με ή χωρίς ταυτόχρονη αποσιώπηση της ULF (siULF). Ως αρνητικός έλεγχος για την αποσιώπηση χρησιμοποιήθηκε μη ειδικό siRNA (ctrsi). Τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.

3.2.3.3. Η ULF δεν είναι άμεσος στόχος της ATM

Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν η ULF αποτελεί άμεσο στόχο της ATM, ελέγξαμε την επίδραση της αναστολής της δράσης της ATM στα επίπεδα της ULF. Όπως φαίνεται στο αποτέλεσμα της ανοσοαπύπωσης τα επίπεδα της ULF παραμένουν αμετάβλητα είτε μετά από επίδραση με αναστολέα της ATM είτε μετά από επίδραση με δοξορουβικίνη σε H1299 κύτταρα, παρά την μεταβολή των επιπέδων της p14^{ARF} (Εικ. 17). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι η μεταβολή των επιπέδων της p14^{ARF} μετά από ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση της ATM δεν συμβαίνει λόγω αλλαγής των επιπέδων της λιγάσης ουβικιτίνης ULF, υποδεικνύοντας έναν έμμεσο τρόπο ρύθμισης ως πιο πιθανό ενδεχόμενο.



Εικόνα 18: Ανοσοαπύπωση για ULF και p14^{ARF} πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα H1299 μετά από επίδραση με αναστολέα ATM (Ku55933) ή δοξορουβικίνης (Dox). Τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.

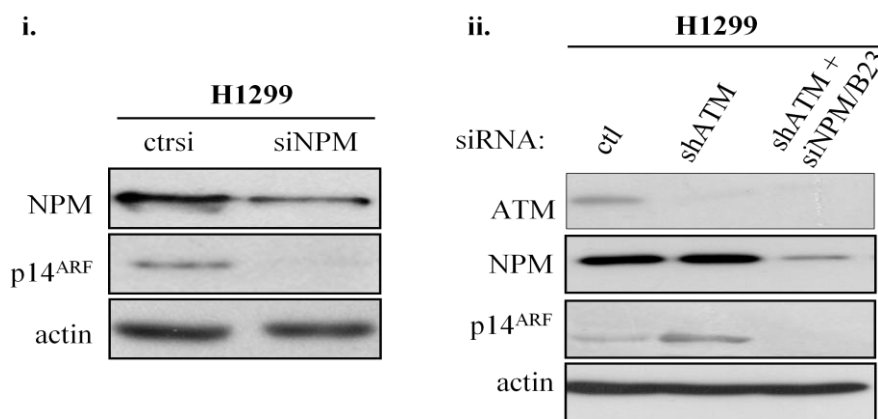
3.2.4. Η ATM επηρεάζει τη σταθερότητα της p14ARF μέσω διαταραχής του συμπλόκου NPM-ARF

Για την αποικοδόμηση της ARF από την ULF απαιτείται η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών στο πυρηνόπλασμα, όπου βρίσκεται η ULF [19] δικαιολογώντας έτσι τη σταθερότητα της ARF στον πυρηνίσκο, όπου όπως είδαμε βρίσκεται σε σύμπλοκο με την νουκλεοφοσμίνη (NPM)[17, 18, 59]. Επιπλέον, ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι η ενεργοποίηση του DDR μπορεί να προκαλέσει την διάσπαση του συμπλόκου ARF-NPM/B23 και την ανακατανομή τους από τον πυρηνίσκο στο πυρηνόπλασμα [100, 115]. Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με την εμπλοκή της ULF, χωρίς άμεση ρύθμιση από την ATM, και τον κρίσιμο ρόλο του εντοπισμού της ARF και της αλληλεπίδρασής της με την NPM/B23 για την σταθερότητά της, οδήγησαν στο ερώτημα αν η ATM μπορεί να προωθήσει την αποικοδόμηση της ARF προωθώντας την αλληλεπίδρασή της με την ULF μέσω αλλαγής του εντοπισμού της ή επίδρασης στην ικανότητα αλληλεπίδρασης με την NPM/B23. Για να απαντήσουμε στο

ερώτημα αυτό, διερευνήσαμε τη συμμετοχή της NPM/B23 στον μηχανισμό, την ικανότητα πρόσδεσης της ARF στην NPM/B23, και τον εντοπισμός του συμπλόκου με πειράματα ανοσοαποτύπωσης, ανοσοκατακρήμνισης και ανοσοφθορισμού έπειτα από απενεργοποίηση ή απενεργοποίηση της ATM.

3.2.4.1. Η NPM/B23 είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση των επιπέδων της p14^{ARF} μετά από αποσιώπηση της ATM.

Για να διερευνήσουμε το ρόλο της NPM στη ρύθμιση της σταθερότητας της p14^{ARF} προχωρήσαμε σε αποσιώπηση της NPM σε κύτταρα H1299 σε συνδυασμό με αποσιώπηση της ATM. Η αποσιώπηση της NPM, όπως ήταν αναμενόμενο, είχε άμεση επίδραση στη σταθερότητα της p14^{ARF} όπως φαίνεται από το αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης (Εικ 19i).

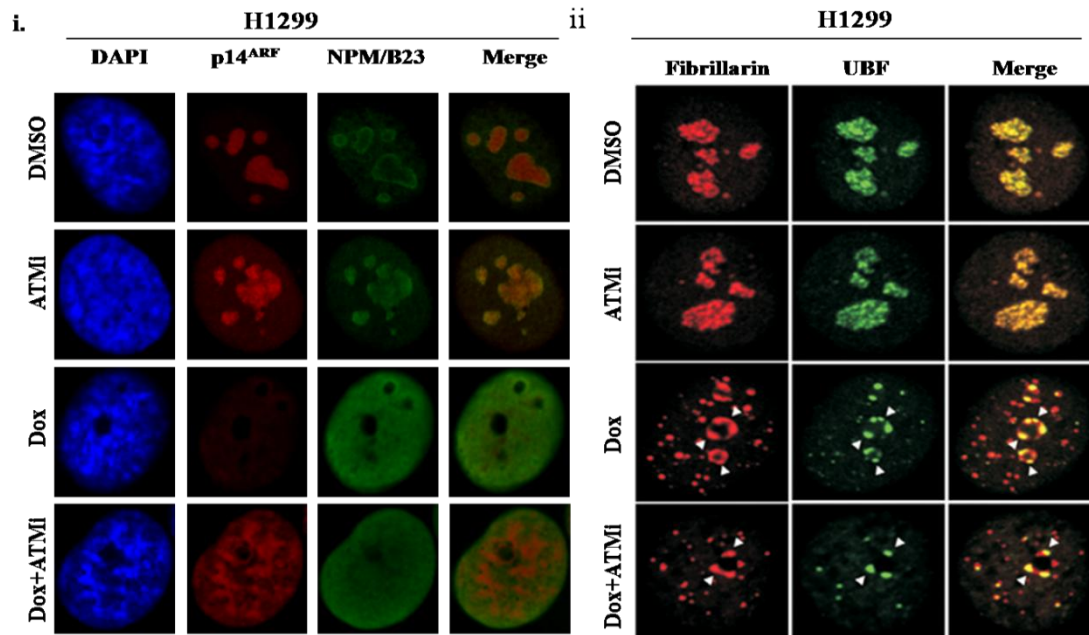


Εικόνα 19: i. Ανοσοαπτύπωση για NPM και p14^{ARF} πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα H1299 μετά από αποσιώπηση της NPM. Τα επίπεδα της NPM δείχνουν το ποσοστό επιτυχίας της αποσιώπησης. Τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. ii. Ανοσοαπτύπωση για ATM, NPM και p14^{ARF} πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα H1299 μετά από αποσιώπηση της NPM και ταυτόχρονη αποσιώπηση της ATM. Τα επίπεδα της ATM και της NPM δείχνουν το ποσοστό επιτυχίας της αποσιώπησης. Τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.

3.2.4.2. Η αναστολή της ATM δεν εμποδίζει την έξοδο της ARF στον πυρήνα αλλά την προστατεύει στο πυρηνόπλασμα.

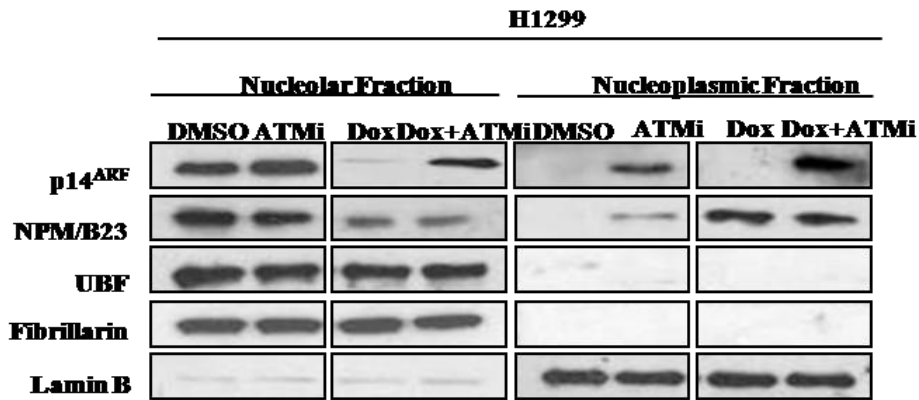
Για τη μελέτη της επίδρασης της ATM και του DDR στον εντοπισμό της p14^{ARF} πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός για p14^{ARF} και NPM πριν και μετά από επίδραση με δοξορουβικίνη με ή χωρίς ταυτόχρονη αναστολή της ATM. Το αποτέλεσμα του ανοσοφθορισμού έδειξε ότι πράγματι, η ενεργοποίηση του DDR οδηγεί σε έξοδο και ανακατανομή των NPM και p14^{ARF} στο πυρηνόπλασμα με

ταυτόχρονη μείωση της έντασης του σήματος της $p14^{ARF}$, επιβεβαιώνοντας και τα αποτελέσματα και άλλων μελετών [100, 116]. Το σημαντικότερο εύρημα, ωστόσο, ήταν ότι η ταυτόχρονη αναστολή της ATM υπό την επίδραση δοξορουβικίνης δεν απέτρεψε την έξοδο της $p14^{ARF}$ στο πυρηνόπλασμα, αλλά αντίθετα ενίσχυσε την έκφραση της πρωτεΐνης $p14^{ARF}$ στο πυρηνόπλασμα (Εικ. 20).



Εικόνα 20: i. Ανοσοφθορισμός για $p14^{ARF}$, NPM και ATM σε πυρήνες κυττάρων H1299 υπό την επίδραση αναστολής της ATM (ATMi), δοξορουβικίνης (dox) ή και των δύο (Dox+ATMi). Η χρώση με DAPI δείχνει την περιοχή του πυρήνα, Η περιοχή του πυρηνίσκου διακρίνεται με βάση τον εντοπισμό των $p14^{ARF}$ και NPM, οι οποίες υπό φυσιολογικές συνθήκες (DMSO) εμφανίζονται στον πυρηνίσκο. ii. Ανοσοφθορισμός για τον πυρηνισκικό μεταγραφικό παράγοντα UBF και για την πυρηνισκική πρωτεΐνη φμπριλλαρίνη (fibrillarin) σε κύτταρα H1299, που δείχνει τον συνεντοπισμό τους στις δομές του πυρηνίσκου.

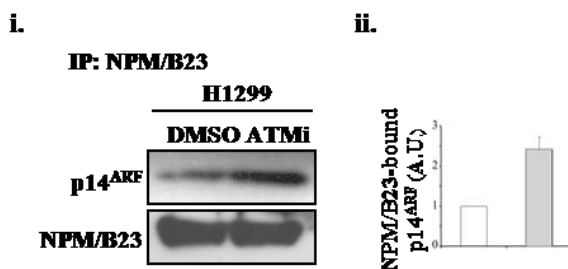
Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει και η ανοσοαποτύπωση σε πυρηνοπλασματικά και πυρηνισκικά κλάσματα πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα H1299. Όπως φαίνεται στην εικόνα 21, η αναστολή της ATM έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της $p14^{ARF}$ κυρίως στην περιοχή του πυρηνοπλάσματος, ακόμα και υπό την επίδραση δοξορουβικίνης. Τα επίπεδα της NPM/B23 μένουν σχετικά σταθερά και εμφανίζουν μια μικρή αύξηση στο πυρηνόπλασμα μετά από την αναστολή της ATM. (Τα πειράματα διαχωρισμού πυρηνισκικών και πυρηνοπλασματικών κλασμάτων και η ανάλυσή τους πραγματοποιήθηκε από την ομάδα του Dr Sinisa Volarevic στην Κροατία)



Εικόνα 21: Ανοσοαπτύπωση για p14^{ARF} και NPM σε κλάσματα πυρηνίσκου και πυρηνοπλάσματος από κύτταρα H1299 πριν ή μετά από επίδραση με αναστολέα της ATM και πριν ή μετά από επίδραση με δοξορουβικίνη παρουσία ή απουσία αναστολής της ATM. Τα επίπεδα των UBF και fibrillarin χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των δειγμάτων για το πυρηνισκικό κλάσμα ενώ τα επίπεδα της λαμίνης B για το πυρηνοπλάσματικό.

3.2.4.3. Η αναστολή της ATM ενισχύει την πρόσδεση μεταξύ NPM και ARF.

Εφόσον διαπιστώσαμε ότι η αναστολή της ATM προστατεύει την p14^{ARF} στο πυρηνόπλασμα, όπου παρατηρείται παράλληλα και μία μικρή αύξηση της NPM (Εικ. 21), και εφόσον η πρόσδεση της p14^{ARF} στην NPM/B23 είναι γνωστό ότι προστατεύει την p14^{ARF} από αποικοδόμηση [18, 59], ελέγξαμε την επίδραση της ATM στην ικανότητα πρόσδεσης μεταξύ της p14^{ARF} και της NPM/B23. Ανοσοκατακρήμνιση της p14^{ARF} από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων H1299 πριν (DMSO) και μετά την αναστολή της ATM (ATMi) και επακόλουθη ανοσοπατύπωση για την NPM/B23 έδειξε ότι, πράγματι, η αναστολή της ATM αυξάνει την ποσότητα της NPM/B23 που είναι προσδεσμένη στην p14^{ARF} και άρα την πρόσδεση της p14^{ARF} στην NPM/B23 (Εικ. 22).



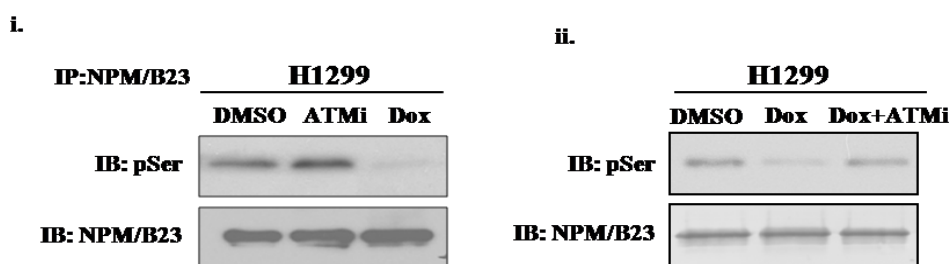
Εικόνα 22: i. Ανοσοαποτύπωση για NPM/B23 σε ανοσοκατακρημνισμένη πρωτεΐνη p14^{ARF} (IP) από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων H1299 πριν (DMSO) και μετά (ATMi) από επίδραση με ATM αναστολέα. ii. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων της p14^{ARF} σε σύμπλοκο με την NPM/B23 υπό την επίδραση DMSO και αναστολέα ATM (ATMi).

3.2.5. Η ATM επηρεάζει την διασύνδεση μεταξύ p14^{ARF} και NPM/B23 μέσω αλλαγής στη φωσφορυλίωση της NPM/B23.

Εφόσον η ATM είναι μία κινάση και η NPM/B23 μία φωσφοπρωτεΐνη με πολλές λειτουργικές θέσεις φωσφορυλίωσης[62], ελέγξαμε την πιθανότητα τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της NPM/B23 να μεταβάλλονται ανάλογα με τη δράση της ATM, επηρεάζοντας την πρόσδεση της p14^{ARF} στην NPM/B23.

3.2.5.1. Ο βαθμός φωσφορυλίωσης της NPM/B23 επηρεάζεται αρνητικά από την ATM.

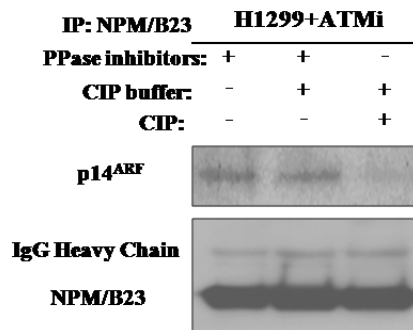
Για να ελέγξουμε τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της NPM/B23 ως προς τη δράση της ATM, προχωρήσαμε σε ανοσοκατακρήμνιση της NPM/B23 από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων H1299 πριν και μετά από αναστολή ή ενεργοποίηση της ATM μέσω δοξορουβικίνης και στη συνέχεια ανοσοαποτύπωση για φωσφορυλιωμένες σερίνες. Το αποτέλεσμα έδειξε ότι τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης σερίνης στην ανοσοκατακρημνισμένη NPM/B23 είναι υψηλότερα μετά από αναστολή της ATM και χαμηλότερα μετά από ενεργοποίησή της μέσω δοξορουβικίνης (Εικ. 23i) ενώ η αναστολή της ATM εμποδίζει την πτώση των επιπέδων φωσφορυλίωσης μετά από επίδραση με δοξορουβικίνη (Εικ. 23ii), γεγονός που υποδεικνύει ότι το αποτέλεσμα από την δοξορουβικίνη οφείλεται στη δράση της ATM.



Εικόνα 23: i. Ανοσοαποτύπωση για phosphoSerine (pSer) σε ανοσοκατακρημνισμένη πρωτεΐνη NPM/B23 (IP) από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων H1299 πριν (DMSO) και μετά (ATMi) από επίδραση με ATM αναστολέα ή δοξορουβικίνη (Dox). Η ανοσοαποτύπωση (IB) για NPM/B23 δείχνει τα ολικά επίπεδα της πρωτεΐνης ii. Ανοσοαποτύπωση για phosphoSerine (pSer) σε ανοσοκατακρημνισμένη πρωτεΐνη NPM/B23 (IP) από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων H1299 πριν (DMSO) και μετά από επίδραση με δοξορουβικίνη (Dox) ή δοξορουβικίνη με ταυτόχρονη αναστολή της ATM (Dox+ATMi). Η ανοσοαποτύπωση (IB) για NPM/B23 δείχνει τα ολικά επίπεδα της πρωτεΐνης

3.2.5.2. Η φωσφορυλίωση της NPM/B23 είναι απαραίτητη για την αύξηση της πρόσδεσης της p14^{ARF} στην NPM/B23 έπειτα από αναστολή της ATM.

Δεδομένου ότι η ATM είναι μία κινάση, η πτώση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της NPM/B23 έπειτα από αναστολή της ATM αποκλείει την άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών και την πιθανότητα η NPM/B23 να αποτελεί άμεσο στόχο-υπόστρωμα της ATM κινάσης, κάτι που ενισχύεται άλλωστε και από την απουσία στην αλληλουχία της NPM/B23 τυπικών μοτίβων φωσφορυλίωσης από την ATM, δηλαδή SQ ή TQ (Σερίνη-Γλουταμίνη ή Θρεονίνη-Γλουταμίνη) [9]. Επιπλέον, η σύνδεση της NPM/B23 με την p14^{ARF} είναι πιο πιθανό να ενισχύεται από την αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της NPM/B23, αφού η p14^{ARF} είναι μία θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη, ενώ από την άλλη η προσθήκη ομάδων φωσφόρου οδηγεί σε αύξηση του αρνητικού φορτίου της NPM/B23. Πράγματι, η φωσφορυλίωση της NPM/B23 είναι απαραίτητη για την αύξηση της πρόσδεσης της p14^{ARF} στην NPM/B23, όπως έδειξε η ανοσοκατακρήμνιση του συμπλόκου p14^{ARF}-NPM/B23 υπό την επίδραση αναστολέα της ATM πριν και μετά από επίδραση με αλκαλική φωσφατάση στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (Εικ. 24).



Εικόνα 24: Ανοσοαποτύπωση για p14^{ARF} σε ανοσοκατακρημνισμένη πρωτεΐνη NPM/B23 (IP) από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων H1299 με επίδραση αναστολέα ATM (ATMi) πριν και μετά από επίδραση με αλκαλική φωσφατάση (Calf Intestinal Phosphatase, CIP). Η ανοσοαποτύπωση (IB) για NPM/B23 δείχνει τα ολικά επίπεδα της πρωτεΐνης.

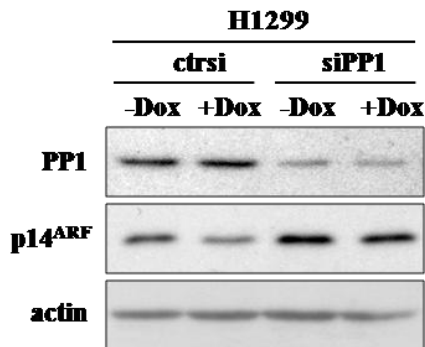
3.2.6. Η ATM μειώνει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της NPM/B23 και τα επίπεδα της p14^{ARF} μέσω ενεργοποίησης της φωσφατάσης PP1

Δεδομένου ότι η ενεργοποίηση της ATM κινάσης μέσω DDR οδηγεί σε μείωση του βαθμού φωσφορυλίωσης της NPM/B23, θα πρέπει στη δράση αυτή να εμπλέκεται μία **φωσφατάση** η οποία να ρυθμίζεται από την ATM ώστε να αποφωσφορυλιώνει την NPM/B23. Ένας ιδανικός πιθανός στόχος για τη λειτουργία αυτή είναι η φωσφατάση **PP1 (Protein Phosphatase 1)**, η οποία είναι η μοναδική φωσφατάση σερίνης/θρεονίνης που ενεργοποιείται από την ATM μέσω φωσφορυλίωσης του

αναστολέα της I-2 (**Inhibitor-2**) από την ATM [117] , ενώ παράλληλα έχει βρεθεί ότι αποφωσφορυλιώνει την NPM/B23 [118, 119].

3.2.6.1. Η δράση της PP1 είναι απαραίτητη για την μείωση των επιπέδων της p14^{ARF} λόγω ενεργοποίησης της ATM μέσω δοξορουβικίνης

Για να ελέγξουμε τον ρόλο της φωσφατάσης PP1 στη ρύθμιση των επιπέδων της p14^{ARF} από την ATM, προχωρήσαμε σε αποσιώπηση της PP1 (και των τριών ισομορφών της α,β και γ) με τη χρήση siRNA υπό την επίδραση δοξορουβικίνης. Το αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης έδειξε ότι η πτώση στα επίπεδα της p14^{ARF} που παρατηρείται λόγω της δράσης της δοξορουβικίνης αναιρείται όταν συνυπάρχει αποσιώπηση της PP1 (Εικ. 25). Αυτό σημαίνει ότι η δράση της φωσφατάσης PP1 είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση των επιπέδων της p14^{ARF} από το DDR και την ATM.

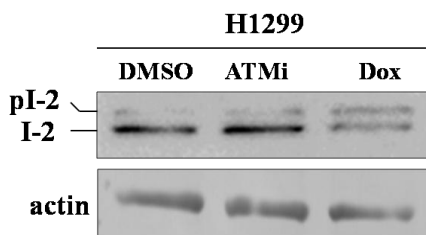


Εικόνα 25: Ανοσοαπτύπωση για PP1 και p14^{ARF} πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα H1299 πριν και μετά από αποσιώπηση της PP1 υπό την επίδραση ή όχι δοξορουβικίνης(Dox). Τα επίπεδα της PP1 δείχνουν το ποσοστό επιτυχίας της αποσιώπησης. Ως αρνητικός έλεγχος για την αποσιώπηση χρησιμοποιήθηκε μη ειδικό siRNA (ctrlsi) . Τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.

3.2.6.2. Η ενεργοποίηση της ATM μέσω δοξορουβικίνης οδηγεί σε αύξηση της φωσφορυλίωσης του αναστολέα της PP1 I-2.

Όπως έχει δείξει προηγούμενη μελέτη [117] , η ενεργοποίηση της PP1 από την ATM συμβαίνει μέσω φωσφορυλίωσης του ειδικού αναστολέα της PP1 φωσφατάσης I-2. Η φωσφορυλίωση του I-2 στη θέση Σερίνη 43 από την ATM οδηγεί σε διαχωρισμό του συμπλόκου PP1-I-2 με αποτέλεσμα την διακοπή της ανασταλτικής δράσης του I-2 και την ενεργοποίηση της PP1. Προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν η PP1 ενεργοποιείται από την ATM με τον ίδιο τρόπο στο μονοπάτι που οδηγεί στη μείωση των επιπέδων της p14^{ARF}, προχωρήσαμε αρχικά σε ανοσοαποτύπωση για τον αναστολέα I-2 σε κύτταρα H1299 μετά από αναστολή της ATM ή επίδραση με δοξορουβικίνη. Η διπλή ζώνη που εμφανίζεται φαίνεται ότι αντιστοιχεί στη φωσφορυλιωμένη και στη μη-φωσφορυλιωμένη μορφή του αναστολέα I-2, αφού η φωσφορυλίωση επηρεάζει την κινητική ικανότητα της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια

της ηλεκτροφόρησης με αποτέλεσμα η φωσφορυλιωμένη μορφή να εμφανίζεται υψηλότερα σε σχέση με την μη φωσφορυλιωμένη [120]. Με βάση αυτή τη συσχέτιση, η μη φωσφορυλιωμένη μορφή του I-2 αναστολέα (κάτω ζώνη) εμφανίζεται αυξημένη μετά από αναστολή της ATM. Αντίθετα, έπειτα από επίδραση με δοξορουβικίνη παρατηρούμε μείωση της μη φωσφορυλιωμένης μορφής με παράλληλη αύξηση της φωσφορυλιωμένης μορφής (πάνω ζώνη) (Εικ. 26).

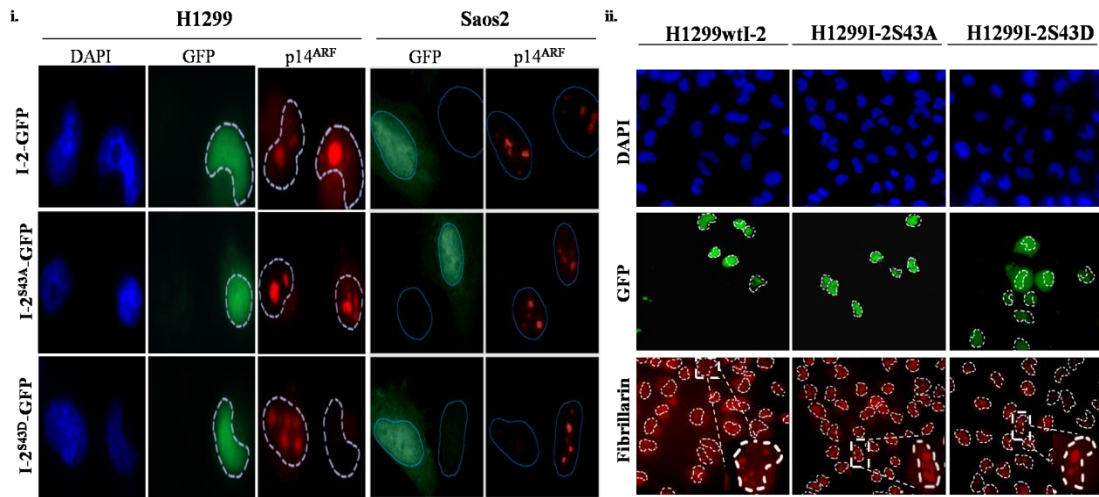


Εικόνα 26: Ανοσοαποτύπωση για τον αναστολέα I-2 σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα H1299 μετά από επίδραση με αναστολέα ATM (ATMi) ή δοξορουβικίνης (Dox). Η δύο ζώνες αντιστοιχούν στη φωσφορυλιωμένη (pI-2) και στη μη φωσφορυλιωμένη (I-2) μορφή της πρωτεΐνης. Τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.

3.2.6.3. Η αρνητική ρύθμιση της $p14^{ARF}$ από την ATM απαιτεί την ενεργοποίηση της PP1 μέσω φωσφορυλίωσης του αναστολέα I-2.

Για να διαπιστώσουμε εάν η ενεργοποίηση της PP1 μέσω φωσφορυλίωσης του αναστολέα I-2 είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση της $p14^{ARF}$, κατασκευάσαμε μεταλλαγμένες μορφές του αναστολέα I-2: μία με μετάλλαξη της σερίνης 43 σε αλανίνη (S43A), η οποία έχει φωσφο-αδρανοποιητική δράση και μία με μετάλλαξη της σερίνης 43 σε ασπαρτικό (S43D), η οποία έχει φωσφο-μιμητική δράση[117]. Στη συνέχεια οι μεταλλαγμένες μορφές μαζί με την φυσιολογική εισήχθησαν σε κύτταρα H1299 και Saos2 και με ανοσοφθορισμό έγινε ανίχνευση της $p14^{ARF}$ στα κύτταρα όπου είχε εισαχθεί η κάθε μορφή. Η επιβεβαίωση της εισαγωγής και έκφρασης των εξωγενών μορφών I-2 στα κύτταρα έγινε με την ανίχνευση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (Green Fluorescent Protein, GFP) με την οποία είχαν σημειωθεί οι εξωγενείς μορφές του I-2. Το αποτέλεσμα έδειξε ότι ενώ η φυσιολογική και η φωσφοαδρανοποιητική (S43A) μορφή δεν επηρέασε τα επίπεδα της $p14^{ARF}$, η μορφή με την φωσφομιμητική μετάλλαξη, η οποία θεωρητικά ισοδυναμεί με ενεργοποίηση της ATM και της PP1, προκαλεί μείωση των επιπέδων

της p14^{ARF} (Εικ. 27i), χωρίς να επηρεάζει την δομή του πυρηνίσκου, όπως δείχνει η χρώση για τον πυρηνισκικό δείκτη φιμπριλλαρίνη (Εικ. 27ii).



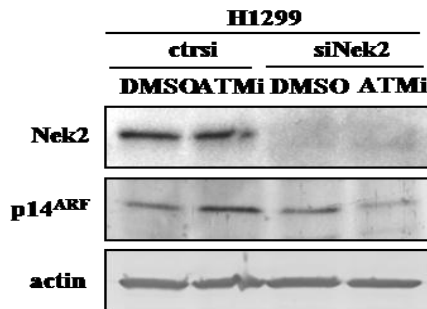
Εικόνα 27: i. Ανοσοφθορισμός για p14^{ARF} και GFP σε πυρήνες κυττάρων H1299 έπειτα από την εισαγωγή φυσιολογικής (wt I-2), της μεταλλαγμένης φωσφο-αδρανοποιητικής μορφής (I-2 S43A) ή της φωσφο-μμητικής μορφής (I-2 S43D) του αναστολέα I-2. Ο φθορισμός για GFP δείχνει την έκφραση της εξωγενούς μορφής του I-2 σε κάθε κύτταρο. Η χρώση με DAPI δείχνει την περιοχή του πυρήνα. ii. Ανοσοφθορισμός για την πυρηνισκική πρωτεΐνη φιμπριλλαρίνη (fibrillarlin) σε κύτταρα H1299, που δείχνει την διατήρηση της δομής του πυρηνίσκου έπειτα από την εισαγωγή φυσιολογικής (wt I-2), της μεταλλαγμένης φωσφο-αδρανοποιητικής μορφής (I-2 S43A) ή της φωσφο-μμητικής μορφής (I-2 S43D) του αναστολέα I-2. Ο φθορισμός για GFP δείχνει την έκφραση της εξωγενούς μορφής του I-2 σε κάθε κύτταρο. Η χρώση με DAPI δείχνει την περιοχή του πυρήνα.

3.2.7. Η αναστολή της ATM ενισχύει τη σταθερότητα της p14^{ARF} μέσω ενεργοποίησης της κινάσης Nek2.

Η αποφωσφορυλίωση της NPM/B23 από την PP1 ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της ATM προϋποθέτει και την ύπαρξη μίας κινάσης η οποία φωσφορυλιώνει τις αντίστοιχες θέσεις της NPM/B23. Σε αναζήτηση αυτής της κινάσης καταλήξαμε στην κινάση **Nek2**. Η έκφραση της Nek2 εξαρτάται από τη φάση του κυτταρικού κύκλου, ενώ η λειτουργία της έχει συνδεθεί με τον διπλασιασμό των κεντροσωμάτων [121]. Η Nek2 έχει δειχθεί ότι αδρανοποιείται από την ενεργοποιημένη PP1 μετά από βλάβες του DNA [121, 122], ενώ επίσης έχει αναφερθεί φωσφορυλίωση της NPM/B23 από την Nek2, χωρίς όμως να έχουν προσδιοριστεί συγκεκριμένες θέσεις φωσφορυλίωσης [123, 124].

Για να ελέγξουμε το ρόλο της Nek2 κινάσης στη φωσφορυλίωση της NPM/B23 και στη σταθερότητα της p14^{ARF} μετά από αναστολή της ATM κινάσης,

πραγματοποιήσαμε αποσιώπηση της Nek2 υπό την επίδραση αναστολέα της ATM. Το αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης έδειξε ότι η αποσιώπηση της Nek2 δεν επιτρέπει την αύξηση των επιπέδων της p14^{ARF} μετά από αναστολή της ATM (Εικ. 28), αποτελώντας ισχυρή ένδειξη για το ρόλο της στη φωσφορυλίωση της NPM/B23 μετά από αναστολή της ATM.



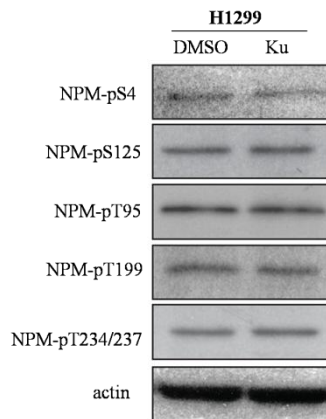
Εικόνα 28 Ανοσοαπτύπωση για Nek2 και p14^{ARF} πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα H1299 πριν και μετά από αποσιώπηση της Nek2 υπό την επίδραση (ATMi) ή όχι (DMSO) αναστολέα της ATM. Τα επίπεδα της Nek2 δείχνουν το ποσοστό επιτυχίας της αποσιώπησης. Ως αρνητικός έλεγχος για την αποσιώπηση χρησιμοποιήθηκε μη ειδικό siRNA (ctrlsi). Τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.

3.2.8. Προσδιορισμός των θέσεων φωσφορυλίωσης της NPM/B23 που παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της p14^{ARF} από την ATM.

Προκειμένου να εντοπίσουμε τις θέσεις φωσφορυλίωσης πάνω στην NPM οι οποίες ρυθμίζονται από την κινάση NEK2 και τη φωσφατάση PP1 και παίζουν ρόλο στην αλλαγή της πρόσδεσης της ARF με την NPM μετά από ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση της ATM κινάσης εξετάσαμε αρχικά τη πιθανή εμπλοκή κάποιων από τις γνωστές θέσεις φωσφορυλίωσης της NPM/B23 που παίζουν ρόλο σε ορισμένες λειτουργίες της και για τις οποίες υπάρχουν διαθέσιμα αντισώματα.

3.2.8.1. Η φωσφορυλίωση των γνωστών θέσεων της NPM/B23 T95, T199 και S4 δεν μεταβάλλεται μετά από αναστολή της ATM.

Χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα προχωρήσαμε σε ανοσοαποτύπωση για τις φωσφορυλιωμένες στις θέσεις Σερίνη 4 (S4), Σερίνη (S125), Θρεονίνη 95 (T95), Θρεονίνη 199(T199) και Θρεονίνες 234/237 (T234/237) μορφές της NPM/B23 μετά από αναστολή της ATM σε κύτταρα H1299. Το αποτέλεσμα έδειξε ότι τα επίπεδα φωσφορυλίωσης στις θέσεις αυτές δεν επηρεάζονται από την αναστολή της ATM (Εικ. 29)

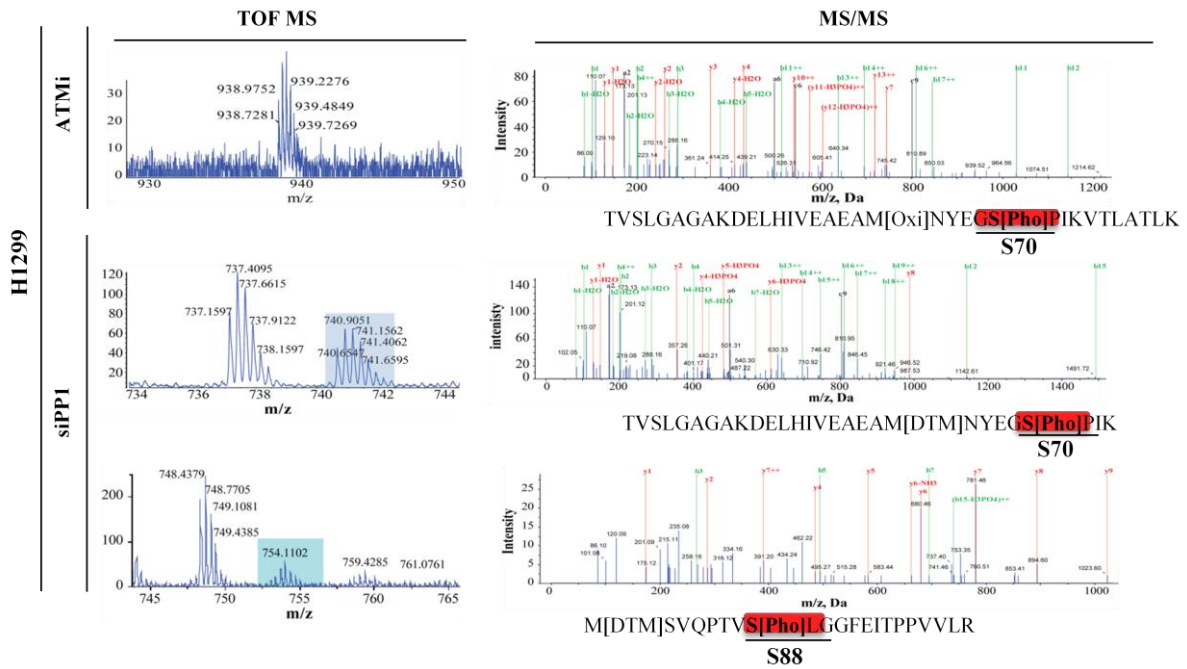


Εικόνα 29: Ανοσοαποτύπωση για τις φωσφορυλιωμένες μορφές της NPM/B23 στις θέσεις S4, S125, T95, T199 και T234/237 σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων H1299 πριν και μετά από επίδραση με τον αναστολέα ATM (Ku). Τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

Εφόσον οι γνωστές θέσεις φωσφορυλίωσης της NPM/B23 δεν παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της NPM/B23 από την ATM, προχωρήσαμε σε συνεργασία με την ομάδα πρωτεωμικής του ΙΙΒΕΑΑ (Δρ Κ. Βουγάς και Δρ Θ. Ρουμελιώτης) σε μία συγκριτική φωσφο-πρωτεομική ανάλυση βασισμένη σε φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry-based comparative phosphoproteomic analysis) [119] για την εύρεση θέσεων φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης NPM από κύτταρα με 1) αποσιώπηση της ATM (ATMi), 2) αποσιώπηση της PP1 (siPP1), 3) επίδραση με δοξορουβικίνη (doxorubicin), 4) αποσιώπηση της NEK2 σε συνδυασμό με αναστολή της ATM (siNEK2-ATMi) και 5) αποσιώπηση της NEK2 σε συνδυασμό με αναστολή της PP1 (siNEK2-PP1i) .

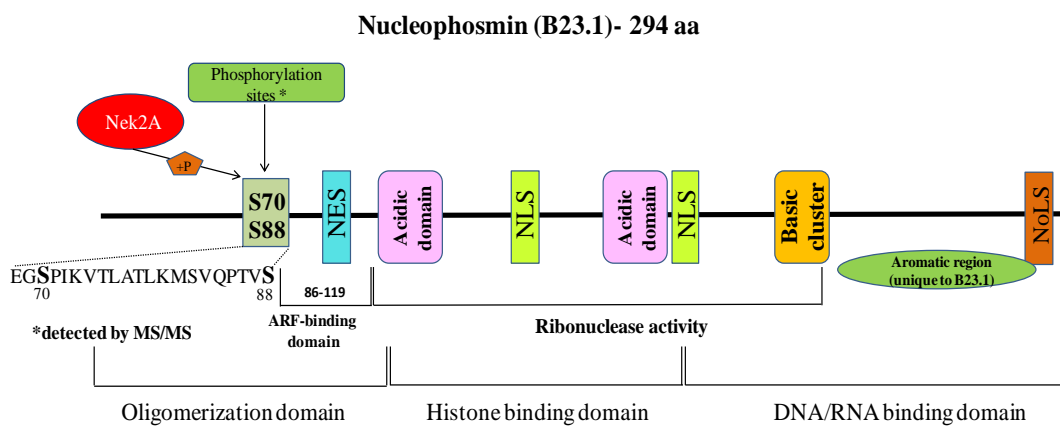
3.2.8.2. Η φωσφορυλίωση στις θέσεις σερίνη 70 και σερίνη 88 της NPM εξαρτάται από τη δράση της ATM μέσω της Nek2 κινάσης και της PP1 φωσφατάσης.

Η φωσφο-πρωτεομική ανάλυση έδειξε ότι η σερίνη 70 εμφανίζεται φωσφορυλιωμένη στα δείγματα ATMi και siPP1 ενώ η φωσφορυλίωση απουσίαζε από τα δείγματα doxorubicin, siNEK2-ATMi και siNEK2-PP1i (Εικ. 30). Επιπρόσθετα, η σερίνη στη θέση 88 εμφανίζεται φωσφορυλιωμένη στο siPP1 σε αντίθεση με τα doxorubicin, siNEK2-ATMi και siNEK2-PP1i. Αυτό σημαίνει ότι η φωσφορυλίωση των δύο αυτών θέσεων εξαρτάται από τις ATM, PP1 και NEK2.



Εικόνα 30: Αποτελέσματα ανάλυσης φασματομετρίας μάζας από ανοσοκατακρημνισμένης πρωτεΐνης NPM/B23 από κύτταρα H1299 μετά από αναστολή της ATM ή αποσιώπηση της PP1 για την εύρεση μεταβολών σε συγκεκριμένες θέσεις φωσφορυλίωσης. Όλες οι αναλύσεις πρωτεομικής και βιοπληροφορικής πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με την ομάδα πρωτεομικής του ΙΙΒΕΑΑ (Δρ Κ. Βουγάς και Δρ Θ. Ρουμελιώτης).

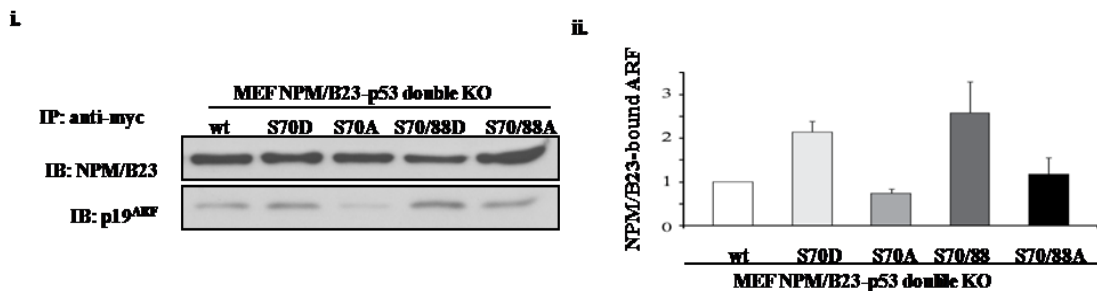
Οι δύο αυτές θέσεις, μάλιστα, βρίσκονται στο τμήμα της NPM/B23 που αλληλεπιδρά με την p14^{ARF} (Εικ. 31), ενισχύοντας την πιθανότητα οι αλλαγές στη φωσφορυλίωσή τους να επηρεάζει την ικανότητα διασύνδεσης του συμπλόκου NPM/B23-p14^{ARF}.



Εικόνα 31: Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης NPM/B23 και των σημαντικών επικρατειών της. Σημειώνεται η σχετική θέση των καταλοίπων σερίνης 70 και σερίνης 88, που ανέδειξαν τα αποτελέσματα της φωφο-πρωτεομικής ανάλυσης.

3.2.8.2. Οι θέσεις Σερίνη 70 και 88 επηρεάζουν την ικανότητα πρόσδεσης της ARF στην NPM.

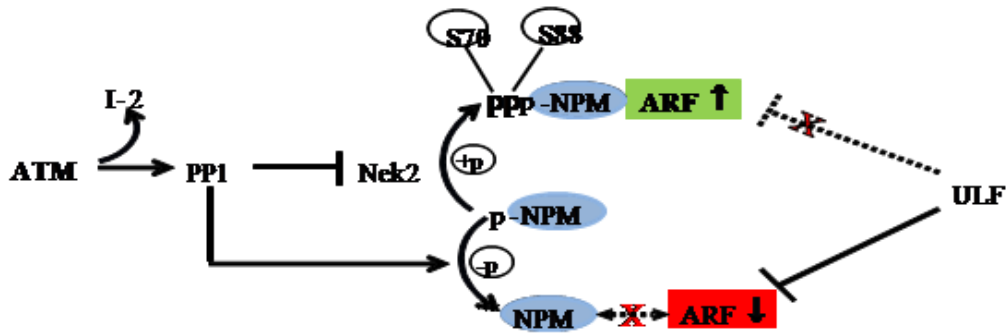
Για να επιβεβαιώσουμε ότι η φωσφορυλίωση των θέσεων σερίνης 70 και σερίνης 88 επηρεάζει την πρόσδεση της ARF στην NPM/B23, δημιουργήσαμε μεταλλαγμένες μορφές της NPM/B23 με φωσφο-αδρανοποιητικές (S→A) και φωσφο-μιμητικές (S→D) μεταλλάξεις και ελέγξαμε την επίδρασή τους στην ικανότητα πρόσδεσης της $p19^{ARF}$ σε ινοβλάστες ποντικού που δεν εκφράζουν ενδογενή NPM (MEF $NPM^{-/-}$, $p53^{-/-}$). Η ανοσοκατακρήμνιση του συμπλόκου $p19^{ARF}$ με τις διαφορετικές μορφές της NPM/B23 (wt-φυσιολογική, S70D,S70/88D-φωσφομιμητικές, S70A,S70/88A-φωσφο-αδρανοποιητικές) έδειξε ότι η φωσφομιμητική μετάλλαξη (S→D) οδηγεί σε αύξηση της πρόσδεσης της ARF στην NPM (Εικ. 32). Αντίθετα η φωσφοαδρανοποιητική μετάλλαξη (S→A) οδηγεί σε μείωση της ικανότητας σύνδεσης του συμπλόκου. Αυτό σημαίνει ότι η φωσφορυλίωση στις θέσεις σερίνη 70 και σερίνη 88 της NPM/B23 ενισχύει την πρόσδεση της ARF.



Εικόνα 32: i. Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεΐνης NPM/B23 και ανοσοαποτύπωση για $p19^{ARF}$ σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων MEF $NPM^{-/-}$, $P53^{-/-}$ έπειτα από εισαγωγή εξωγενών μορφών της NPM/B23 φυσιολογικών (wt) ή με φωσφομιμητικές (S70D,S70/88D) ή αδρανοποιητικές (S70A, S70/88A) μεταλλάξεις στις θέσεις σερίνη 70 και σερίνη 88. ii. Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοκατακρήμνισης με διάγραμμα που αναπαριστά την ποσότητα της $p19^{ARF}$ που είναι προσδεμένη στην NPM/B23 σε κάθε δείγμα.

Ο συνδυασμός όλων των παραπάνω αποτελεσμάτων αποδεικνύει την ύπαρξη ενός μηχανισμού μέσω του οποίου η ενεργοποίηση της ATM μέσω ενεργοποίησης του DDR οδηγεί σε πτώση των επιπέδων της ARF. Όπως φαίνεται στην σχηματική αναπαράσταση (Εικ. 33), η ενεργοποίηση της ATM, μέσω της φωσφορυλίωσης του αναστολέα I-2, ενεργοποιεί την φωσφατάση PP1, η οποία αποφωσφορυλιώνει τις θέσεις σερίνη 70 και σερίνη 88 της NPM ενώ παράλληλα εμποδίζει πιθανότατα την περαιτέρω φωσφορυλίωσή τους μέσω αναστολής της κινάσης Nek2. Η αποφωσφορυλίωση των θέσεων αυτών μειώνει τη σύνδεση της ARF με την

NPM/B23, οδηγώντας σε αποσταθεροποίηση της ARF μέσω αυξημένης ουβικιτινίωσης και στόχευσης προς αποικοδόμησης από την ULF E3 λιγάση στο πυρηνόπλασμα. Αντίθετα, η αναστολή της ATM ενισχύει τη φωσφορυλίωση της NPM/B23 στις θέσεις S70 και S88 από την κινάση Nek2, αυξάνοντας τη πρόσδεση της ARF στην NPM και προστατεύοντάς την από αποικοδόμηση.



Εικόνα 33: Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού μέσω του οποίου η ATM ρυθμίζει τα επίπεδα της ARF.

3.3. Μελέτη της πιθανής λειτουργικής σημασίας της αύξησης της ARF στην καρκινική εξέλιξη

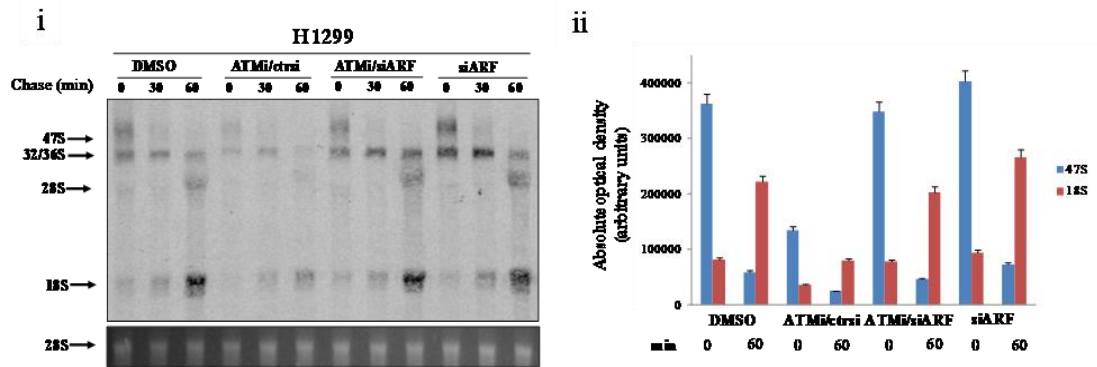
Έχοντας επιβεβαιώσει την ύπαρξη ρυθμιστικής σχέσης μεταξύ της ATM κινάσης και της p14^{ARF}, θελήσαμε να προσδιορίσουμε την πιθανή λειτουργική σημασία αυτής της αλληλεπίδρασης ειδικά στο πλαίσιο της καρκινικής εξέλιξης. Για το λόγο αυτό διερευνήσαμε την επίδραση της αναστολής της ATM και της συνεπακόλουθης αύξησης της p14^{ARF} σε διαδικασίες με σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση και στις οποίες εμπλέκεται η δράση της p14^{ARF} [17, 29].

3.3.1 Επίδραση της αύξησης της p14^{ARF} μέσω της αναστολής της ATM στη σύνθεση πρωτεϊνών

Μία από τις λειτουργίες της p14^{ARF}, η οποία φαίνεται να είναι και ανεξάρτητη της p53 είναι η ανασταλτική της δράση στην έκφραση και ωρίμανση των ριβοσωμικών υπομονάδων και επομένως της μετάφρασης πρωτεϊνών [17, 29, 55, 125]. Η λειτουργία της αυτή επηρεάζει μία από τις βασικές κυτταρικές διαδικασίες με σημαντικό ρόλο στην καρκινική εξέλιξη. Για το λόγο αυτό, κρίνεται απαραίτητη η αξιολόγηση του ρόλου της στη δράση της p14^{ARF} που αυξάνεται λόγω αναστολής της ATM.

3.3.1.1. Η αύξηση της p14^{ARF} μέσω αναστολής της ATM οδηγεί σε αναστολή της σύνθεσης και ωρίμανσης των ριβοσωμικών υπομονάδων.

Σε πείραμα όπου έγινε σήμανση του ριβοσωμικού RNA και ακόλουθη παρακολούθηση των επιπέδων του σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, παρουσία ή μη αναστολής της ATM, παρατηρήθηκε μείωση των πρόδρομων ριβοσωμικών υπομοναδων (47S) και καθυστέρηση της ωρίμανσης των ενδιάμεσων υπομονάδων (32/36S) και των ώριμων υπομονάδων (28S,18S), μετά από αναστολή της ATM (Εικ. 34). Οι επιδράσεις αυτές χάθηκαν όταν συνυπήρχε παράλληλα αποσιώπηση της p14^{ARF}, γεγονός που σημαίνει ότι η p14^{ARF} είναι υπεύθυνη για την δράση αυτή.

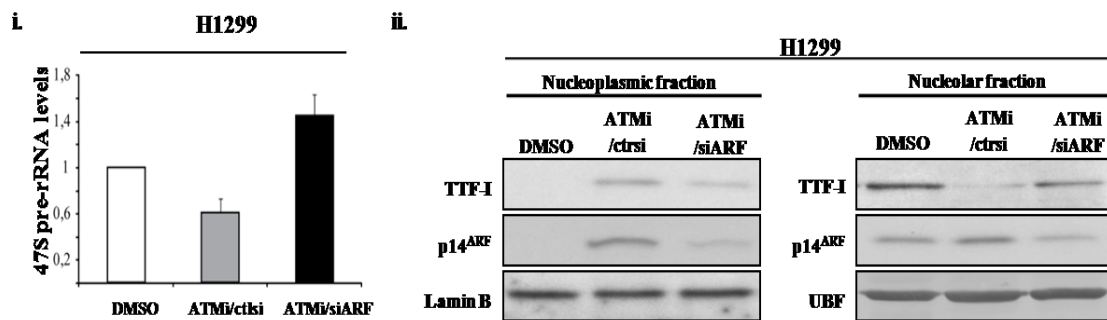


Εικόνα 34: i) Ανάλυση pulse-chase μετά από ραδιοσήμανση του νεοσυντιθέμενου ριβοσωμικού RNA (rRNA) και ηλεκτροφόρηση για την μέτρηση του ρυθμού σύνθεσης και ωρίμανσης των ριβοσωμικών υπομονάδων έπειτα από αναστολή της ATM (ATMi) και με ή χωρίς ταυτόχρονη αποσιώπηση της $p14^{ARF}$. Η χρώση των 28S υπομονάδων με βρωμιούχο αιθίδιο (κάτω ζώνη) χρησιμεύει ως έλεγχος ισοφόρτωσης των δειγμάτων ii) Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης pulse-chase που απεικονίζει συγκριτικά τα επίπεδα της πρόδρομης ριβοσωμικής υπομονάδας 47S σε σχέση με την ώριμη υπομονάδα 18S.

3.3.1.2. Η αύξηση της $p14^{ARF}$ μέσω αναστολής της ATM οδηγεί σε μείωση του ρυθμού μεταγραφής των ριβοσωμικών υπομονάδων μέσω μετατόπισης της NPM/B23 στο πυρηνόπλασμα και αναστολής της δράσης του παράγοντα TTF-I.

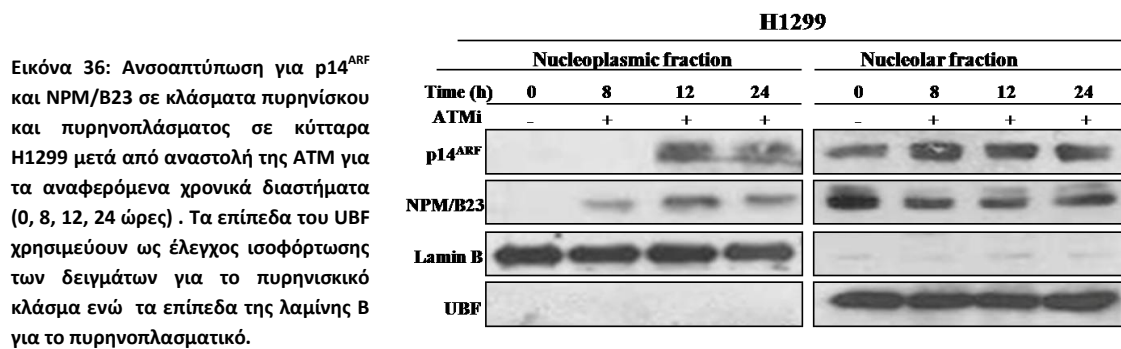
Η NPM/B23 είναι γνωστό ότι παίζει ρόλο στη σύνθεση και ωρίμανση των ριβοσωμάτων, μέσω της λειτουργίας της ως πρωτεΐνης-συνοδού και μεταφοράς των υπομονάδων από τον πυρηνίσκο στο κυτταρόπλασμα και μέσω της ικανότητάς της για άμεση αλληλεπίδραση με το ριβοσωμικό RNA στον πυρηνίσκο [64, 126]. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η $p14^{ARF}$ ρυθμίζει αρνητικά την σύνθεση των ριβοσωμάτων μέσω αναστολής της δράσης του παράγοντα τερματισμού της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση I (RNA Polymerase I Transcription Termination Factor I, TTF-I) [125]. Στη διαδικασία αυτή εμπλέκεται η αναστολή της δράσης της NPM/B23 ως πρωτεΐνης-συνοδού και η συγκράτηση του παράγοντα TTF-I στο πυρηνόπλασμα. Για να διερευνήσουμε το ρόλο του παραπάνω μηχανισμού στη δράση της $p14^{ARF}$ μετά από αναστολή της ATM, προχωρήσαμε σε μελέτη των επιπέδων της NPM/B23 και του TTF-I στον πυρηνίσκο και στο πυρηνόπλασμα μετά από αναστολή της ATM, καθώς και την επίδραση στην μεταγραφή του ριβοσωμικού RNA. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA της πρόδρομης ριβοσωμικής υπομονάδας 47S με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative Real Time PCR) δείχνει ότι, πράγματι, εκτός από την ωρίμανση, και η μεταγραφή των ριβοσωμικών

υπομονάδων μειώνεται μετά από αναστολή της ATM (Εικ. 35i). Η δράση αυτή αποδίδεται στην $p14^{ARF}$, αφού αναιρείται έπειτα από αποσιώπηση της $p14^{ARF}$. Παράλληλα για να ελέγξουμε εάν η αύξηση της $p14^{ARF}$ μειώνει τη μεταγραφή του ριβοσωμικού RNA μέσω συγκράτησης του παράγοντα TTF-I στο πυρηνόπλασμα, όπως αναφέρει η μελέτη των Lessard *et al.*, πραγματοποιήσαμε διαχωρισμό πρωτεϊνικών κλασμάτων από τον πυρηνίσκο και το πυρηνόπλασμα και ανοσοαποτύπωση για $p14^{ARF}$ και TTF-I. Το αποτέλεσμα έδειξε ότι η αύξηση της $p14^{ARF}$ μετά από αναστολή της ATM συνοδεύεται από αυξημένη παρουσία του TTF-I στο πυρηνόπλασμα, ενώ η ταυτόχρονη αποσιώπηση της $p14^{ARF}$ επαναφέρει τον παράγοντα TTF-I στον πυρηνίσκο (Εικ. 35ii).



Εικόνα 35: i) Ποσοτικοποίηση αποτελεσμάτων Real Time PCR για τα επίπεδα mRNA της πρόδρομης ριβοσωμικής υπομονάδας 47S μετά από αναστολή της ATM με ή χωρίς ταυτόχρονη αποσιώπηση της $p14^{ARF}$. ii) Ανοσοαπτύπωση για $p14^{ARF}$ και TTF-I σε κλάσματα πυρηνίσκου και πυρηνόπλασματος σε κύτταρα H1299 μετά από αναστολή της ATM με ή χωρίς ταυτόχρονη αποσιώπηση της $p14^{ARF}$. Τα επίπεδα του UBF χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των δειγμάτων για το πυρηνισκικό κλάσμα ενώ τα επίπεδα της λαμίνης B για το πυρηνόπλασματικό.

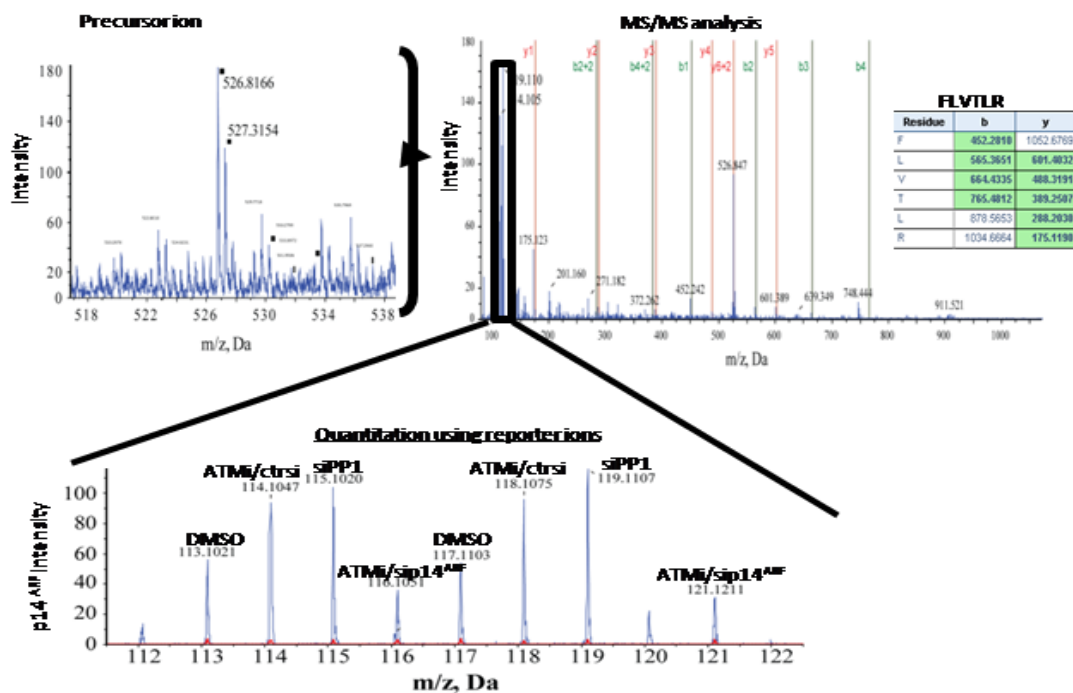
Επίσης η αύξηση της $p14^{ARF}$ μετά από αναστολή της ATM προκαλεί μετατόπιση μέρους της RNANPM/B23 στο πυρηνόπλασμα εμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή της με το ριβοσωμικό RNA και εμποδίζοντας την επεξεργασία των ριβοσωμικών υπομονάδων (Εικ. 36).



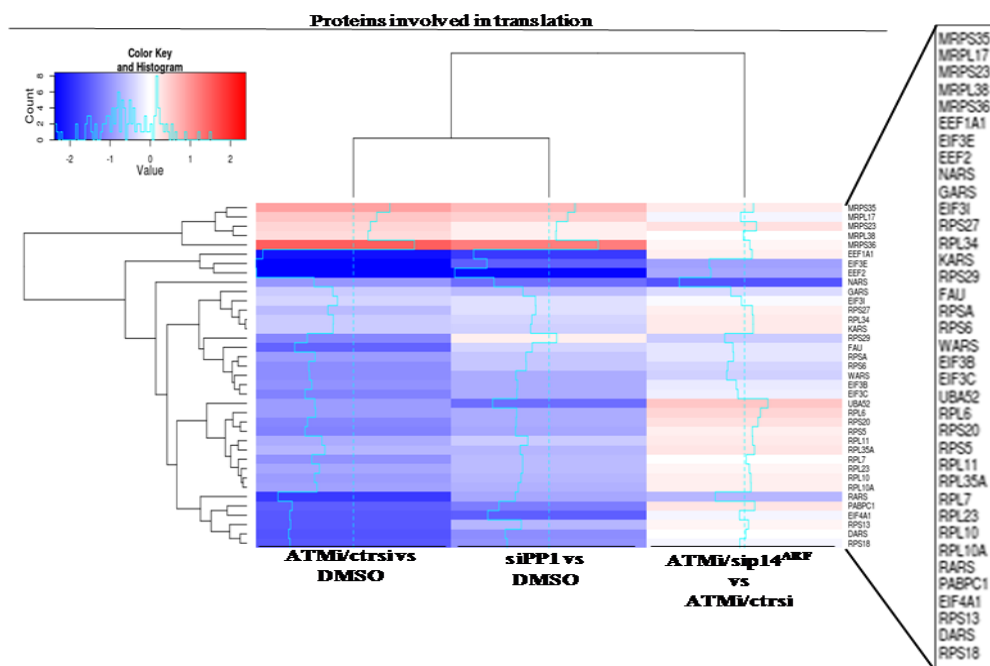
Εικόνα 36: Ανοσοαπτύπωση για $p14^{ARF}$ και NPM/B23 σε κλάσματα πυρηνίσκου και πυρηνόπλασματος σε κύτταρα H1299 μετά από αναστολή της ATM για τα αναφερόμενα χρονικά διαστήματα (0, 8, 12, 24 ώρες). Τα επίπεδα του UBF χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των δειγμάτων για το πυρηνισκικό κλάσμα ενώ τα επίπεδα της λαμίνης B για το πυρηνόπλασματικό.

3.3.1.3. Η αύξηση της p14^{ARF} μέσω αναστολής της ATM προκαλεί καταστολή της έκφρασης πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μεταφραστικό μηχανισμό

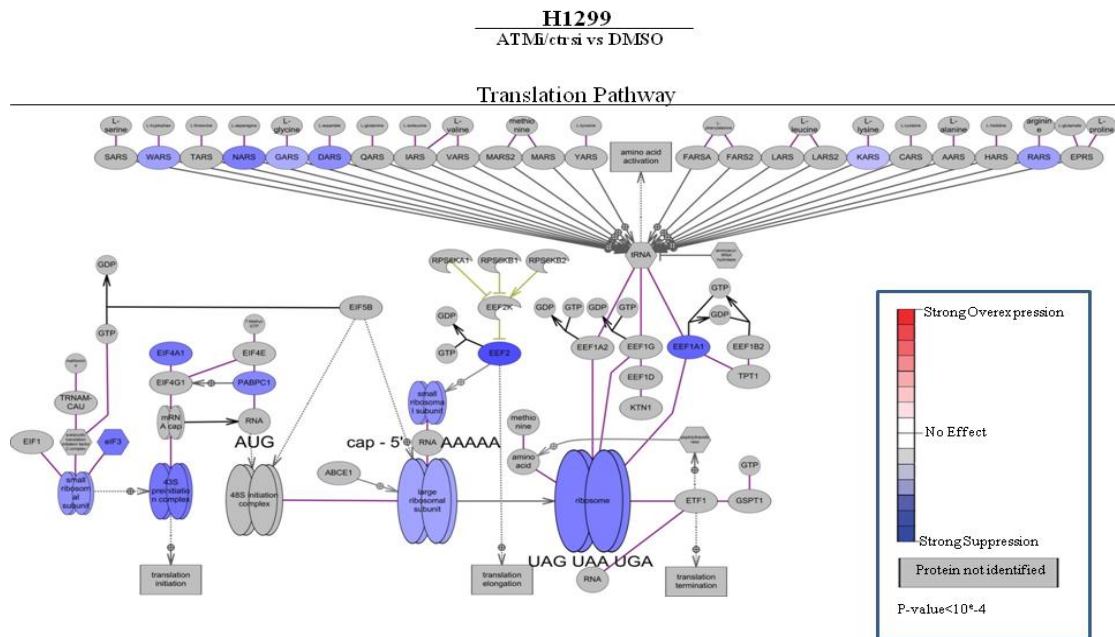
Προκειμένου να αποκτήσουμε μία πιο γενική εικόνα της επίδρασης της αυξημένης p14^{ARF} στο σύνολο του κυτταρικού πρωτεώματος, πραγματοποιήσαμε μία ευρείας κλίμακας πρωτεομική ανάλυση με πολλαπλή σήμανση χρησιμοποιώντας τη μέθοδο iTRAQ [110, 127]. Στη μέθοδο αυτή διαφορετικά δείγματα σημάνθηκαν με διαφορετικά ισοβαρή πεπτίδια και στη συνέχεια με τη χρήση φασματομετρίας μάζας ανιχνεύθηκαν οι πρωτεΐνες που παρουσιάζουν μεταβολή μετά από αναστολή της ATM με ή χωρίς ταυτόχρονη αποσιώπηση της p14^{ARF} και μετά από αναστολή της φωσφατάσης PP1 (Εικ. 37). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων (Gene Set Enrichment Analysis) έδειξε ότι η αναστολή της ATM ή της PP1 οδηγεί σε μία στατιστικώς σημαντική μείωση της έκφρασης πρωτεϊνών του μεταφραστικού μηχανισμού ($p < 0.0001$) (Εικ. 38, 39), ενώ η παράλληλη αποσιώπηση της p14^{ARF} αποκατέστησε μερικώς την μείωση αυτή, προκαλώντας αύξηση των επιπέδων κυρίως των πρωτεϊνών των μεγάλων ριβοσωμικών υπομονάδων ($p = 0,008575$). Η αποσιώπηση της p14^{ARF} προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του 50% των πρωτεϊνών που εμφανίζονται μειωμένες στα δείγματα με αναστολή της ATM ή αποσιώπηση της PP1. Οι πρωτεΐνες αυτές περιλαμβάνουν την πλειοψηφία των πρωτεϊνών των μεγάλων ριβοσωμικών υπομονάδων, το 50% των πρωτεϊνών των μικρών ριβοσωμικών υπομονάδων καθώς και αρκετούς παράγοντες έναρξης της μετάφρασης (Εικ. 38, 39).



Εικόνα 37: Ανίχνευση πρόδρομων ιόντων (precursor ions) και ανάλυση φασματομετρίας μάζας (MS/MS). Η σήμανση με iTRAQ δείχνει την ποσότητα της p14^{ARF} σε καθένα από τα διαφορετικά δείγματα (DMSO, ATMi/ctrlsi, siPP1, ATMi/sip14). Οι αναλύσεις πρωτεομικής και βιοπληροφορικής πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με την ομάδα πρωτεομικής του ΙΙΒΕΑΑ (Δρ Κ. Βουγάς και Δρ Θ. Ρουμελιώτης)



Εικόνα 38: Χάρτης πρωτεϊνών από ανάλυση πρωτεώματος που καταστέλλονται (μπλε) ή αυξάνονται (κόκκινο) μετά από σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων κάθε ζεύγους (ATMi σε σχέση με DMSO, siPP1 σε σχέση με DMSO, ATMi+siPP1 σε σχέση με ATMi+ctrlsi). Οι περισσότερες από τις 37 ταυτοποιημένες πρωτεΐνες του μεταφραστικού μηχανισμού καταστέλλονται στα δείγματα με αναστολή της ATM (ATMi) ή αποσιώπηση της PP1 (siPP1), ενώ η αποσιώπηση της p14^{ARF} επαναφέρει μερικώς τα επίπεδα των κατασταλμένων πρωτεϊνών. Οι αναλύσεις πρωτεομικής και βιοπληροφορικής πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με την ομάδα πρωτεομικής του ΙΙΒΕΑΑ (Δρ Κ. Βουγάς και Δρ Θ. Ρουμελιώτης)

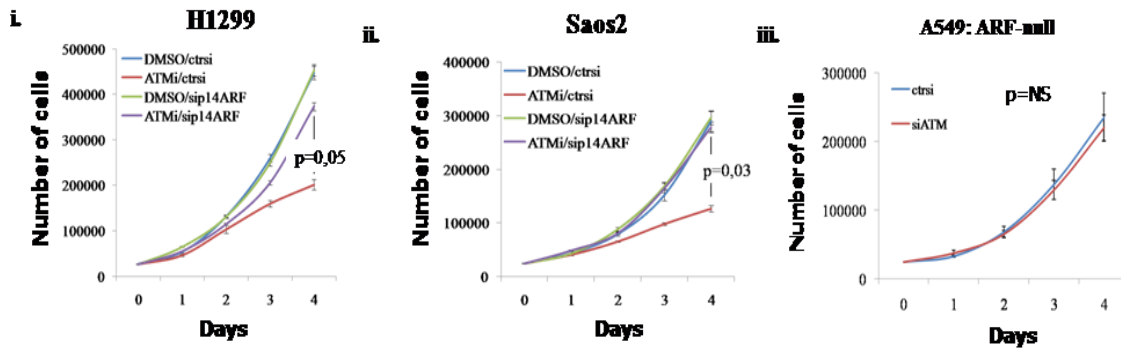


Εικόνα 39: Σχηματικός χάρτης αναπαράστασης των μονοπατιών της μετάφρασης και των πρωτεϊνών που καταστέλλονται (μπλε χρώμα) μετά από αναστολή της ATM (ATMi). Οι αναλύσεις πρωτεομικής και βιοπληροφορικής πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με την ομάδα πρωτεομικής του IIBEAA (Δρ Κ. Βουγάς και Δρ Θ. Ρουμελιώτης

3.3.2. Επίδραση της αύξησης της p14^{ARF} μετά από αναστολή της ATM στην ανάπτυξη των κυττάρων.

3.3.2.1. Η αύξηση της p14^{ARF} οδηγεί σε μείωση του ρυθμού αύξησης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων

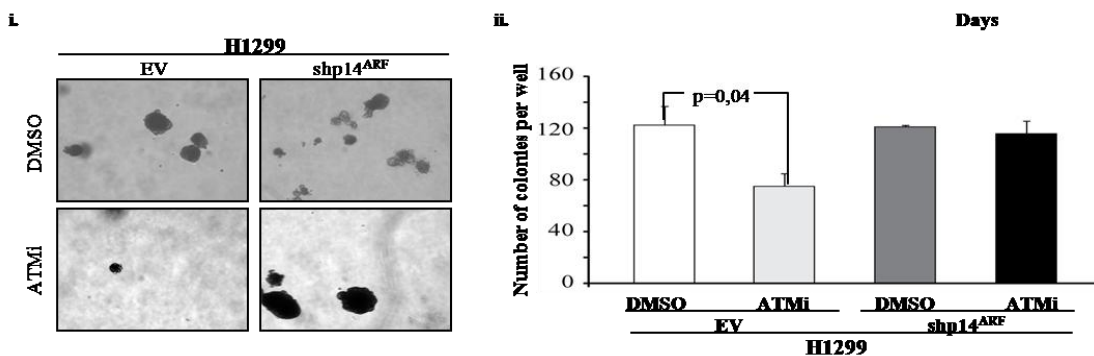
Σε πειράματα όπου έγινε μέτρηση του ρυθμού αύξησης κυττάρων σε καλλιέργεια, η αποσιώπηση της ATM (ATMi/*ctrl*) είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων, κάτι που δεν παρατηρήθηκε με παράλληλη αποσιώπηση της p14^{ARF} (ATMi/*si p14^{ARF}*). Στα κύτταρα A549, στα οποία απουσιάζει η έκφραση του γονιδίου CDKN2A, η αναστολή της ATM δεν επηρεάζει το ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων, επιβεβαιώνοντας την ειδικότητα της δράσης της p14^{ARF} (Εικ. 40).



Εικόνα 40: Γραφήματα απεικόνισης της ανάπτυξης κυττάρων H1299, Saos2 μετά από αναστολή της ATM (ATMi/ctrlsi), αποσιώπηση της p14^{ARF} (DMSO/sip14^{ARF}) και ταυτόχρονη αναστολή της ATM και αποσιώπηση της p14^{ARF} (ATMi/sip14^{ARF}). Η κυτταρική σειρά A549 στην οποία δεν υπάρχει έκφραση του γονιδίου CDKN2A, λειτουργούν ως επιπρόσθετος αρνητικός έλεγχος για την σημασία της p14^{ARF}.

3.3.2.2. Η αύξηση της p14^{ARF} μετά από αναστολή της ATM προκαλεί μείωση του μεγέθους στις αποικίες που σχηματίζουν τα κύτταρα σε άγαρ.

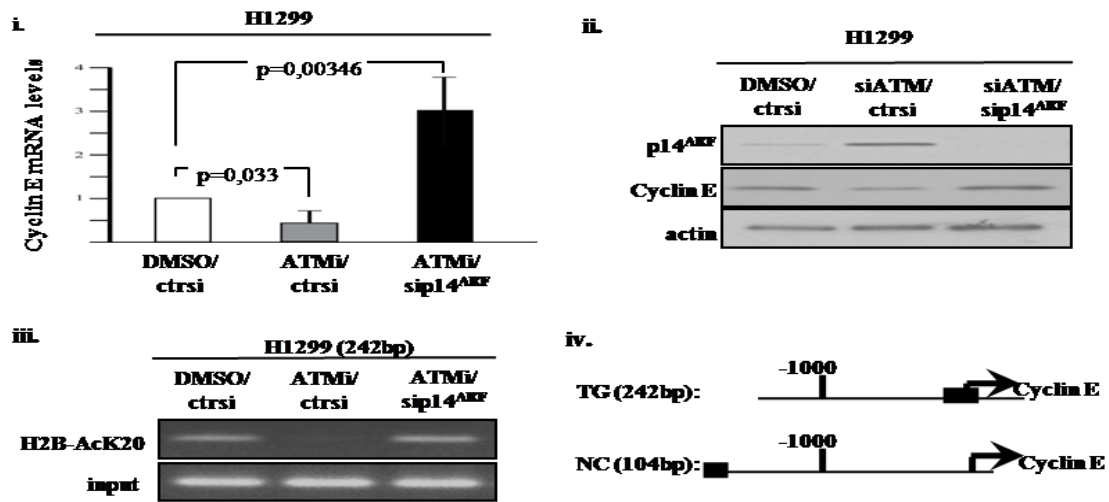
Κύτταρα χωρίς (DMSO) ή με (ATMi) αναστολή της ATM καλλιεργήθηκαν σε μαλακό άγαρ και μετά από χρονικό διάστημα δύο εβδομάδων παρατηρήθηκαν οι αποικίες που σχημάτισαν. Το μέγεθος και ο αριθμός των αποικιών ήταν μικρότερα σε κύτταρα με αναστολή της ATM σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (DMSO) ενώ η αποσιώπηση της ARF (shp14^{ARF}) είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του μεγέθους ακόμα και μετά από αναστολή της ATM (Εικ. 41). Αυτό δείχνει ότι η αύξηση της ARF ευθύνεται για τη μείωση του μεγέθους και του αριθμού των αποικιών μετά από αναστολή της ATM.



Εικόνα 41: i) Φωτογραφίες που απεικονίζουν τις αποικίες που αναπτύσσονται σε άγαρ κύτταρα H1299 πριν (DMSO) και μετά (ATMi) από αναστολή της ATM και με ή χωρίς αποσιώπηση της p14^{ARF} (shp14^{ARF}). ii) Γράφημα ποσοτικοποίησης του αριθμού των αποικιών που αναπτύσσονται σε άγαρ κύτταρα H1299 πριν (DMSO) και μετά (ATMi) από αναστολή της ATM και με ή χωρίς αποσιώπηση της p14^{ARF} (shp14^{ARF}).

3.3.2.3. Η αύξηση της p14^{ARF} μετά από αναστολή της ATM καταστέλλει την έκφραση της κυκλίνης E μέσω υποακετυλίωσης της ιστόνης H2B.

Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη, η p14ARF συμβάλλει στην καταστολή της έκφρασης ορισμένων γονιδίων μέσω αλληλεπίδρασης με υποακετυλιωμένη μορφή της ιστόνης H2B στον υποκινητή τους[128]. Η καταστολή αυτή από την p14ARF είναι αντιστρόφως ανάλογη με το βαθμό ακετυλίωσης της ουράς της ιστόνης H2B. Μεταξύ των γονιδίων που καταστέλλονται μέσω αυτού του μηχανισμού πρελαμβάνεται και το γονίδιο της κυκλίνης E, ενός σημαντικού ρυθμιστή της προόδου του κυτταρικού κύκλου. Για να ελέγξουμε την επίδραση της αναστολής της ATM στην έκφραση της κυκλίνης E, πραγματοποιήσαμε Real-Time RT-PCR και ανοσοαποτύπωση για κυκλίνη E πριν και μετά από αποσιώπηση της ATM. Το αποτέλεσμα έδειξε ότι η αύξηση της p14ARF μετά από αποσιώπηση της ATM οδηγεί σε μείωση των επιπέδων μεταγραφής και έκφρασης της κυκλίνης E (Εικ. 42i, ii). Επίσης, δοκιμασία ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης για ακετυλιωμένη ιστόνη H2B στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της κυκλίνης E έπειτα από αναστολή της ATM έδειξε ότι η αναστολή της ATM συνοδεύεται από υποακετυλίωση της ιστόνης H2B, η οποία αναιρείται μετά από αποσιώπηση της p14^{ARF} (Εικ. 42 iii, iv), επιβεβαιώνοντας ότι η αύξηση της p14^{ARF} καταστέλλει την έκφραση της κυκλίνης E μέσω υποακετυλίωσης της ιστόνης H2B, εμποδίζοντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.



Εικόνα 42:i) Ποσοτικοποίηση αποτελεσμάτων ποσοτικής Real-Time RT-PCR για κυκλίνη E σε εκχυλίσματα mRNA και ii) ανοσοαποτύπωση για κυκλίνη E και p14^{ARF} σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα H1299 πριν (DMSO) και μετά (ATMi) από αναστολή της ATM και με ή χωρίς αποσιώπηση της p14^{ARF} (sip14^{ARF}). Τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών δειγμάτων. iii) Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP) για ακετυλιωμένη ιστόνη H2B στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της κυκλίνης E σε κύτταρα H1299 πριν (DMSO) και μετά (ATMi) από αναστολή της ATM και με ή χωρίς αποσιώπηση της p14^{ARF} (sip14^{ARF}). iv) Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής στόχευσης του υποκινητή της κυκλίνης E και της περιοχής αρνητικού ελέγχου που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση CHIP.

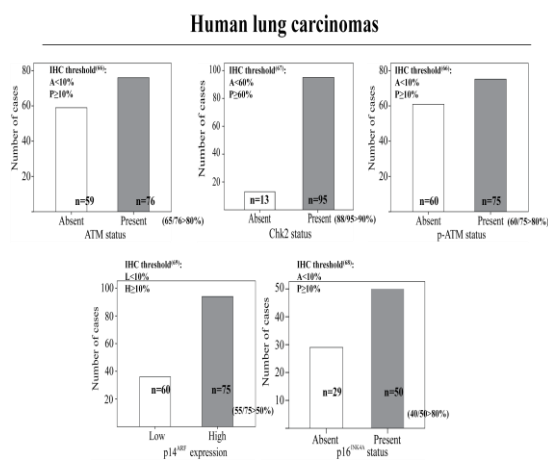
3.4. Διερεύνηση *in vivo* ενδείξεων που επιβεβαιώνουν την αλληλεπίδραση μεταξύ της ATM και της p14^{ARF}.

Μέχρι στιγμής έχουμε επιβεβαιώσει την ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ της ATM και της p14^{ARF} και του μηχανισμού της καθώς και της λειτουργικής σημασίας της σε *in vitro* κυτταρικά μοντέλα. Όμως, για τον προσδιορισμό της πραγματικής βιολογικής σημασίας της σχέσης αυτής απαιτείται η ύπαρξη *in vivo* ευρημάτων που να ενισχύουν τη σχέση μεταξύ ATM και p14^{ARF} και τη σημασία της στην εξέλιξη της καρκινογένεσης. Για το λόγο αυτό έγινε ανάλυση σε μεγάλο αριθμό ανθρώπινων καρκινικών δειγμάτων, αλλά και χρήση ξενομοσχευμάτων ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων σε ποντίκια.

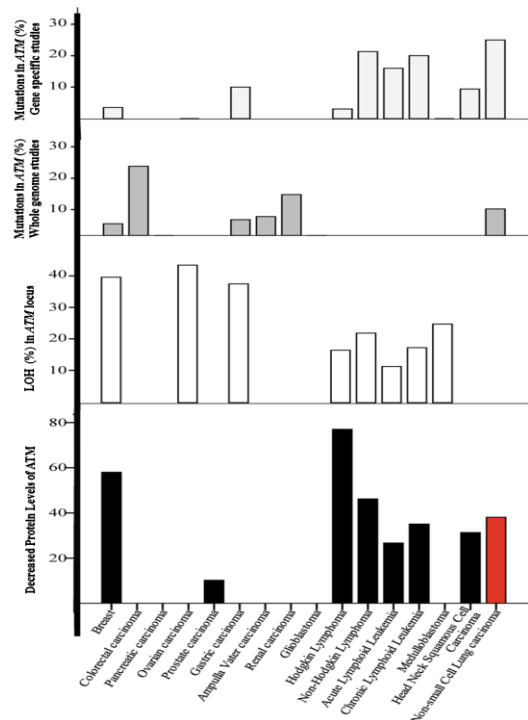
3.4.1. Μελέτη του μονοπατιού αλληλεπίδρασης ATM-ARF και της σημασίας του in vivo σε καρκινικά δείγματα ασθενών.

Για την αξιολόγηση της έκφρασης των στοιχείων του μονοπατιού σε ανθρώπινους καρκινικούς ιστούς πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική ανάλυση σε δείγματα από καρκίνο του πνεύμονα (Εικ 43i). Ο τύπος αυτός καρκίνου επιλέχθηκε γιατί εμφανίζει υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων και χαμηλής έκφρασης της ATM (Εικ. 43ii).

i.



ii.



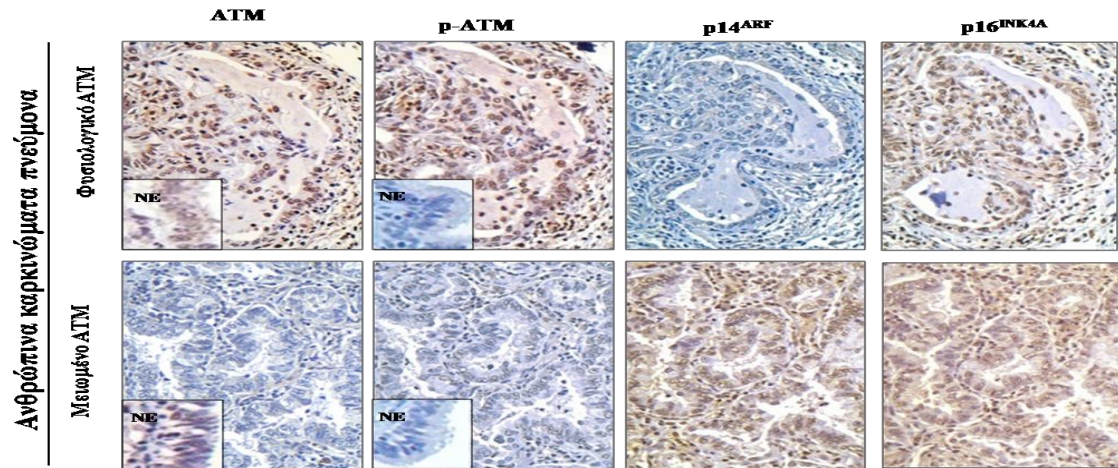
Εικόνα 43: i)Γραφική αναπαράσταση της έκφρασης των πρωτεϊνών ATM, Chk2, phosphor-ATM (p-ATM), p14^{ARF} και p16^{INK4A} έπειτα από ανοσοϊστοχημική χρώση στα αναλυθέντα περιστατικά καρκίνου του πνεύμονα. ii)Γραφική αναπαράσταση ποσοστών μεταλλάξεων, απώλειας ετεροζυγωτίας (LOH) και χαμηλής έκφρασης σε περιστατικά των διαφόρων τύπου καρκίνου.

3.4.1.1. Αντίστροφη σχέση έκφρασης ATM και ARF σε δείγματα καρκίνου του πνεύμονα.

Ανοσοϊστοχημική ανάλυση για ATM και p14^{ARF} σε δείγματα καρκίνου του πνεύμονα έδειξε ότι η χαμηλή έκφραση ATM σχετίζεται με αυξημένη έκφραση p14^{ARF}, γεγονός που συμφωνεί με την ύπαρξη του μονοπατιού που παρατηρήσαμε και σε ιστολογικά δείγματα. Παράλληλα η φυσιολογική έκφραση της p16^{INK4A} ανεξάρτητα

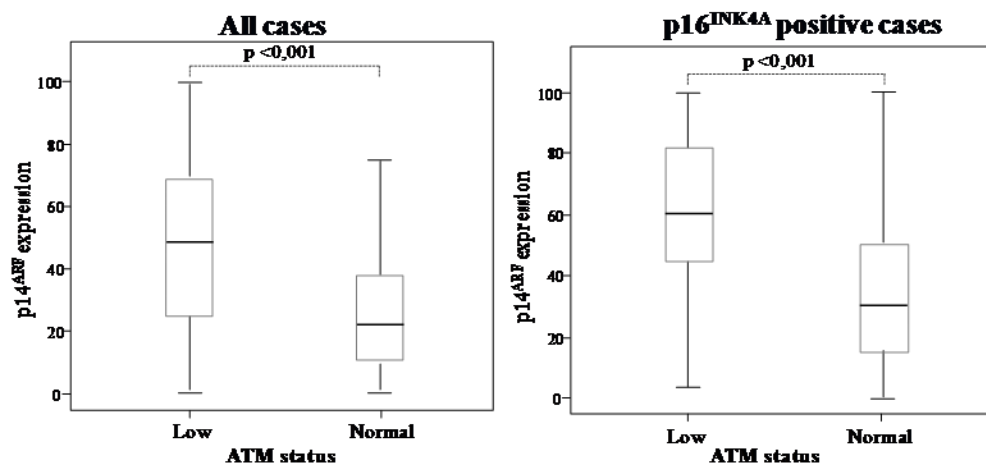
i.

από την έκφραση της ATM υποδεικνύει ότι η σχέση αυτή είναι ειδική για την p14^{ARF} πρωτεΐνη και όχι συνολικά για τον γενετικό τόπο *CDKN2A*, που κωδικοποιεί και για την p16^{INK4A} (Εικ. 44i και ii).



ii.

Human Lung Carcinomas

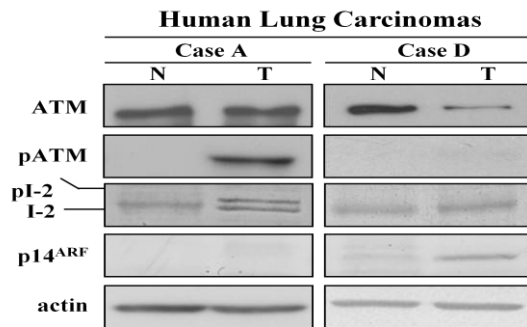


Εικόνα 44: i)Ανοσοϊστοχημική χρώση για ATM, φωσφορυλιωμένη ATM (p-ATM), p14^{ARF} και p16^{INK4A} σε ιστολογικά δείγματα καρκίνου του πνεύμονα με φυσιολογική ή χαμηλή έκφραση ATM. ii)Μπάρες απεικόνισης της αντίστροφης σχέσης μεταξύ της έκφρασης της p14^{ARF} και της ATM σε δείγματα καρκίνου του πνεύμονα συνολικά και σε δείγματα με έκφραση p16^{INK4A}.

3.4.1.2. Αυξημένη έκφραση της ATM σχετίζεται με αυξημένη φωσφορυλίωση του αναστολέα I-2 της φωσφατάσης PP1 σε δείγματα καρκίνου του πνεύμονα

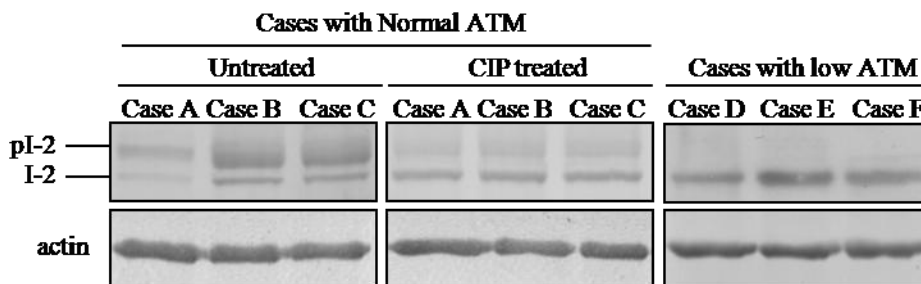
Όπως προκύπτει από πείραμα ανοσοαποτύπωσης σε εκχυλίσματα πρωτεϊνών από ιστούς καρκίνου του πνεύμονα, τα αυξημένα επίπεδα ATM συνοδεύονται από μειωμένη έκφραση p14^{ARF} και αυξημένη έκφραση της φωσφορυλιωμένης μορφή

(πάνω μπάντα της διπλής ζώνης) του αναστολέα I-2 (Εικ. 45), γεγονός που επιβεβαιώνει το ρόλο της PP1 ως στόχο της ATM και *in vivo*.



Εικόνα 45: Ανοσοαποτύπωση για ATM, φωσφορυλιωμένη ATM (p-ATM), I-2 και φωσφορυλιωμένο I-2 (p I-2), p14^{ARF} σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς πνεύμονα. Τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

Η εξάρτηση της φωσφορυλίωσης του αναστολέα I-2 από την ATM επιβεβαιώνεται σε δείγματα ιστού από καρκίνο του πνεύμονα στα οποία η χαμηλή έκφραση της ATM συνοδεύεται από μειωμένη φωσφορυλίωση του I-2 (Εικ. 46)

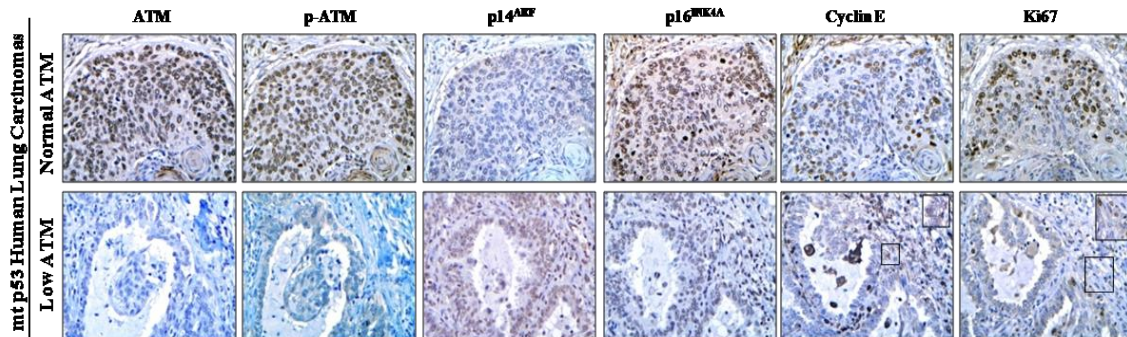


Εικόνα 46: Ανοσοαποτύπωση για ATM, I-2 και φωσφορυλιωμένο I-2 (p I-2) σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από καρκινικούς ιστούς πνεύμονα. Η πάνω μπάντα της διπλής ζώνης αντιστοιχεί στη φωσφορυλιωμένη μορφή του I-2, γεγονός που επιβεβαιώνεται από την απουσία της στα δείγματα που έχουν υποστεί επίδραση με αλκαλική φωσφατάση (CIP) Τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

3.4.1.3. Μειωμένη έκφραση της ATM σε καρκινικά ιστολογικά δείγματα με μεταλλαγμένο p53 σχετίζεται με αυξημένη έκφραση p14^{ARF}, μειωμένη έκφραση της κυκλίνης E και μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Για να ελέγξουμε τη συσχέτιση της έκφρασης της ATM και της αύξησης της p14^{ARF} με την ικανότητα αναστολής του κυτταρικού κύκλου ακόμα και ανεξάρτητα από την p53 σε ιστολογικά δείγματα, πραγματοποιήσαμε ανοσοϊστοχημική ανάλυση σε ιστολογικά δείγματα καρκίνου του πνεύμονα με μεταλλαγμένο p53. Η ανάλυση έδειξε ότι η μειωμένη έκφραση ATM σε αυτούς τους ιστούς συνοδεύεται από

αυξημένη έκφραση της $p14^{ARF}$ και μειωμένη έκφραση της κυκλίνης E αλλά και του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67 (Εικ. 47), επιβεβαιώνοντας τα *in vitro* ευρήματα .



Εικόνα 47: Ανοσοϊστοχημική χρώση για ATM, φωσφορυλιωμένη ATM (p-ATM), $p14^{ARF}$, $p16^{INK4A}$, κυκλίνη E και Ki67 σε ιστολογικά δείγματα καρκίνου του πνεύμονα με μεταλλαγμένο το γονίδιο του p53 και με φυσιολογική (normal ATM) ή χαμηλή (Low ATM) έκφραση ATM.

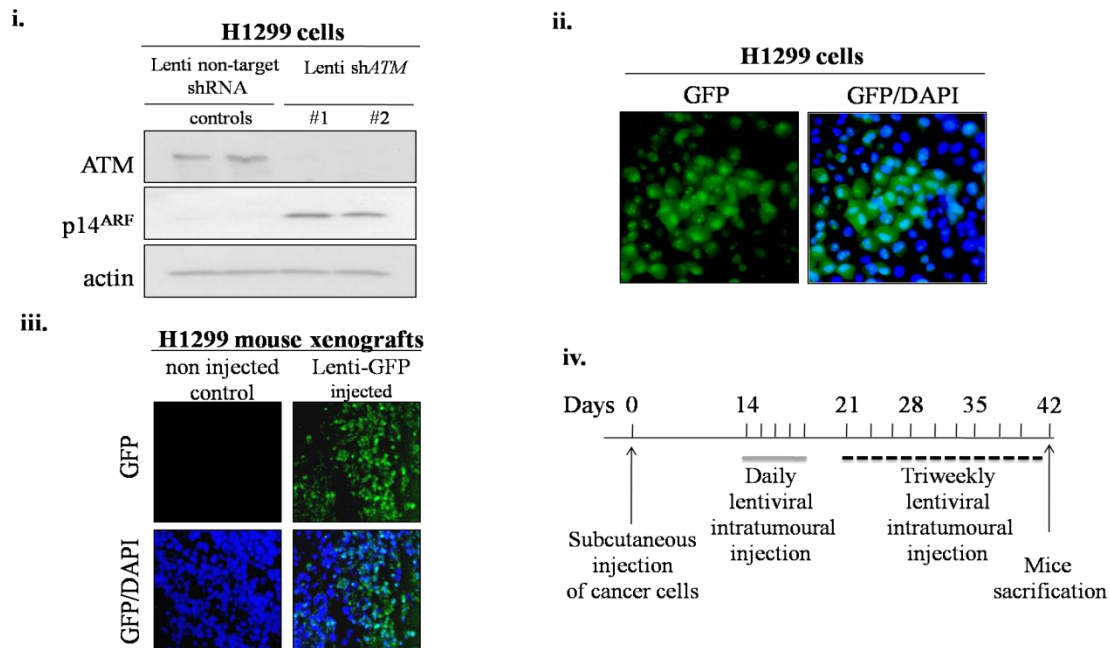
3.4.2. Μελέτη του μονοπατιού αλληλεπίδρασης ATM-ARF και της σημασίας του *in vivo* σε ξενομοσχεύματα καρκινικών κυττάρων σε ποντίκια.

Για να διερευνήσουμε το ρόλο του μονοπατιού στα πλαίσια της διαδικασίας της ογκογένεσης σε ένα πιο δυναμικό *in vivo* καρκινικό περιβάλλον, ελέγξαμε την επίδραση της αύξησης της ARF μετά από απώλεια της ATM σε όγκους ποντικων που προέρχονται από ξενομοσχεύματα κυττάρων H1299.

3.4.2.1. Η αποσιώπηση της ATM μειώνει το μέγεθος των όγκων που δημιουργούνται από ξενομοσχεύματα καρκινικών κυττάρων σε ποντίκια μέσω αύξησης της $p14^{ARF}$.

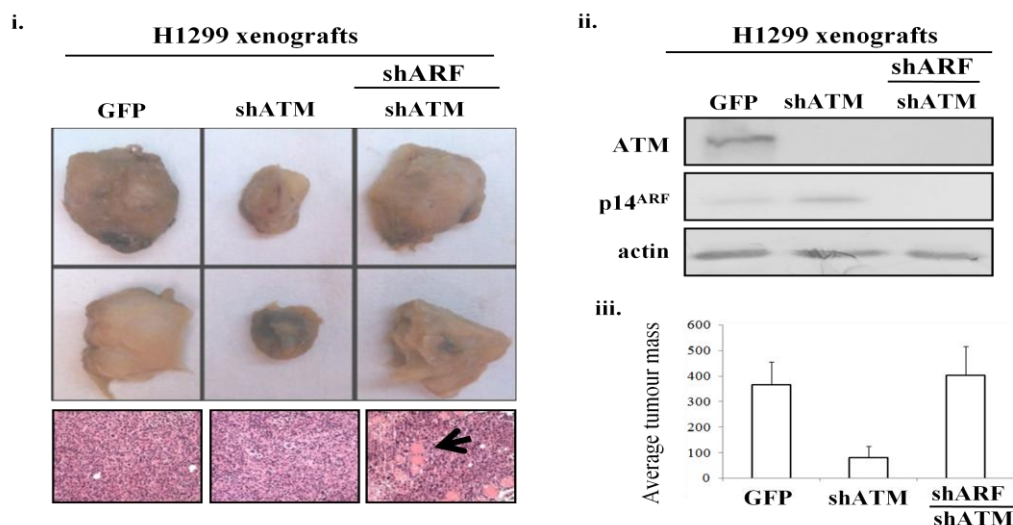
Προκειμένου να διαπιστώσουμε την επίδραση της αποσιώπησης της ATM και της αύξησης της $p14^{ARF}$ στην ανάπτυξη του όγκου πραγματοποιήσαμε μεταμόσχευση κυττάρων H1299 ελέγχου (control shRNA, ctr) και κυττάρων με μόνιμη αποσιώπηση της $p14^{ARF}$ (shARF) σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια. Στους όγκους που αναπτύχθηκαν έγινε ένεση λεντι-ιών, οι οποίοι έφεραν φορέα αποσιώπησης της ATM. Για τον έλεγχο της αποσιωπητικής ικανότητας των λεντι-ικών φορέων έγινε διαμόλυνση κυττάρων H1299 με τους φορείς και στη συνέχεια ανοσοαποτύπωση

(Εικ. 48i) Η ανίχνευση της GFP μετά από ένεση αντίστοιχων GFP-λεντι-ικών φορέων χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος επιτυχίας της διαμόλυνσης (Εικ. 48ii, iii)



Εικόνα 48: i) Ανοσοαποτύπωση για ATM και p14^{ARF} σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων H1299 μετά από διαμόλυνση με τους λεντι-ικούς φορείς αποσιώπησης της ATM για έλεγχο της επιτυχίας της αποσιώπησης και της επακόλουθης αύξησης της p14^{ARF}. Τα επίπεδα της β-ακτίνης χρησιμεύουν ως έλεγχος ισοφόρτωσης των πρωτεϊνικών δειγμάτων ii) Ανοσοφθορισμός για GFP σε κύτταρα H1299 μετά από διαμόλυνση με τον λεντιικό φορέα pLKO.1-GFP-Turbo για έλεγχο της αποδοτικότητας της διαμόλυνσης. iii) Ανοσοφθορισμός για GFP στους όγκους ποντικών από ξενομοσχεύματα μετά από διαμόλυνση με τον λεντιικό φορέα pLKO.1-GFP-Turbo για έλεγχο της αποδοτικότητας της διαμόλυνσης, iv) Χρονοδιάγραμμα ενέσεων των κυττάρων και των λεντι-ικών σωματιδίων για δημιουργία όγκων και διαμόλυνση με τον λεντιό.

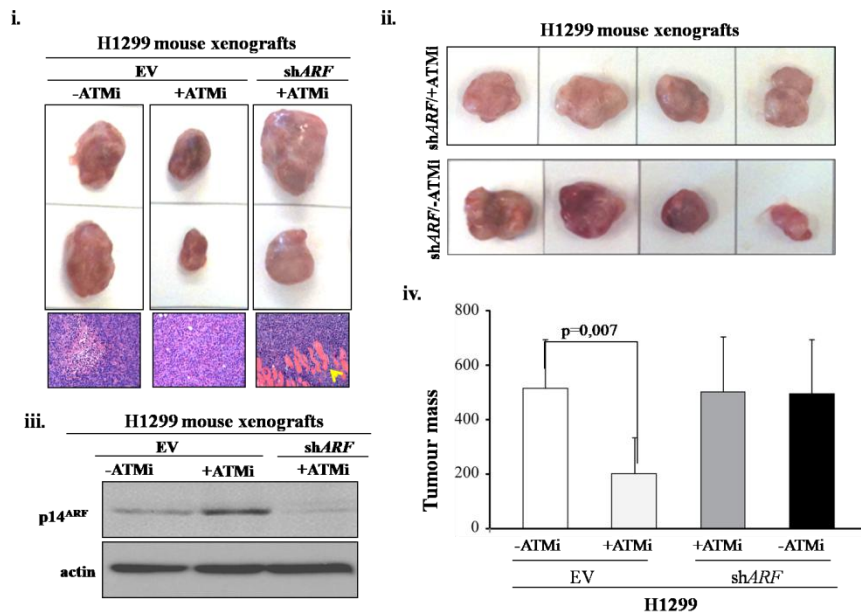
Η παρατήρηση των όγκων που δημιουργήθηκαν έδειξε ότι η αποσιώπηση της ATM (shATM), μέσω εισαγωγής με τους λεντι-ικούς φορείς, προκάλεσε την μείωση του μεγέθους των όγκων. Η δράση αυτή αποδίδεται στην αύξηση της p14^{ARF} όπως δείχνει η επαναφορά του μεγέθους στο αρχικό καθώς και η αυξημένη επιθετικότητα των όγκων όταν χάνεται η p14^{ARF} (Εικ. 49).



Εικόνα 49: i) Εικόνες από τους όγκους ξενομοσχευμάτων κυττάρων H1299 ελέγχου (GFP) και με αποσιώπηση της p14^{ARF} (shARF) σε ποντίκια και με ή χωρίς αποσιώπηση της ATM(shATM) μέσω διαμόλυνσης με λεντι-ϊικούς φορείς που δείχνουν το μέγεθος των όγκων. Η χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (κάτω μέρος) δείχνει την αυξημένη διηθητικότητα που εμφανίζουν οι όγκοι όπου έχει γίνει αποσιώπηση της p14^{ARF} (shARF). ii) Ανοσοπατύπωση για ATM και p14^{ARF} σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τους ιστούς των ξενομοσχευμάτων H1299 κυττάρων ελέγχου (GFP) και με αποσιώπηση της p14^{ARF} (shARF) σε ποντίκια και με ή χωρίς αποσιώπηση της ATM(shATM). iii) Γραφική αναπαράσταση του μέσου μεγέθους των όγκων κάθε ομάδας ξενομοσχευμάτων. Όλα τα πειράματα που περιλάμβαναν πειραματόζωα πραγματοποιήθηκαν σε κατάλληλα εξοπλισμένα εργαστήρια του Ινστιτούτου Δημόκριτος (ομάδα Δρ Δ. Κλέτσα) και του ΙΙΒΕΑΑ (ομάδα Δρ Α. Κλινάκη)

3.4.2.2. Η αναστολή της ATM με καφεΐνη μειώνει το μέγεθος των όγκων που δημιουργούνται από ξενομοσχεύματα καρκινικών κυττάρων σε ποντίκια μέσω αύξησης της p14^{ARF}.

Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε και η ανάλυση όγκων από ξενομοσχεύματα κυττάρων H1299 ελέγχου (control shRNA, ctr) και κυττάρων με μόνιμη αποσιώπηση της p14^{ARF} (shARF) σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια με ακόλουθη αναστολή της ATM μέσω χορήγησης καφεΐνης, ενός αναστολέα των κινασών ATM/ATR[129]. Η χορήγηση καφεΐνης οδήγησε σε δημιουργία όγκων με μικρότερο μέγεθος σε σχέση με τους όγκους χωρίς χορήγηση καφεΐνης, ενώ η δράση αυτή εξαρτάται από την p14^{ARF} όπως δείχνει η αύξηση του μεγέθους των όγκων με παράλληλη αποσιώπηση της p14^{ARF} (shARF), παρά τη χορήγηση καφεΐνης (Εικ. 50).



Εικόνα 50: i) Εικόνες που δείχνουν το μέγεθος των όγκων ξενομοσχευμάτων κυττάρων H1299 ελέγχου που φέρουν κενό φορέα (empty vector, EV) -ως αρνητικό έλεγχο για τα κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με τον φορέα shARF- και φορέα αποσιώπησης της p14^{ARF} (shARF) σε ποντίκια και με ή χωρίς αναστολή της ATM(ATMi) μέσω χορήγησης καφεΐνης. Η χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (κάτω μέρος) δείχνει την αυξημένη διηθητικότητα που εμφανίζουν οι όγκοι όπου έχει γίνει αποσιώπηση της p14^{ARF} (shARF). ii) Σύγκριση όγκων με αποσιώπηση της p14^{ARF} (shARF) με ή χωρίς αναστολή της ATM με καφεΐνη. Η απουσία σημαντικής διαφοράς στο μέγεθος των όγκων δείχνει ότι η παρουσία της p14^{ARF} είναι απαραίτητη για την μείωση του μεγέθους λόγω αναστολής της ATM. iii) Ανοσοαποτύπωση για ATM και p14^{ARF} σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τους ιστούς των ξενομοσχευμάτων H1299 κυττάρων ελέγχου (EV) και με αποσιώπηση της p14^{ARF} (shARF) σε ποντίκια και με ή χωρίς αναστολή της ATM(ATMi) . iv) Γραφική αναπαράσταση του μέσου μεγέθους των όγκων κάθε ομάδας ξενομοσχευμάτων. Όλα τα πειράματα που περιλάμβαναν πειραματόζωα πραγματοποιήθηκαν σε κατάλληλα εξοπλισμένα εργαστήρια του Ινστιτούτου Δημόκριτος (ομάδα Δρ Δ. Κλέτσα) και του ΙΙΒΕΑΑ (ομάδα Δρ Α. Κλινάκη)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1. Καινοτομία της παρούσας έρευνας

Με την παρούσα διατριβή, η οποία στηρίζεται σε ένα μεγάλο εύρος εργαστηριακών πειραμάτων και αποτελεσμάτων, αποκαλύπτεται ένα νέο μονοπάτι αλληλεπίδρασης που συνδέει την κινάση του μονοπατιού DDR ATM με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη ARF καθώς και ο ρόλος αυτής της αλληλεπίδρασης στον συντονισμό της συνολικής αντικαρκινικής απόκρισης του κυττάρου. Η ενεργοποίηση της ATM κινάσης ενεργοποιεί την φωσφατάση PP1 προκαλώντας αποφωσφορυλίωση της NPM/B23 σε δύο νέες θέσεις φωσφορυλίωσης, τη σερίνη 70 και τη σερίνη 88, δρώντας ανταγωνιστικά προς την κινάση NEK2 που είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση των θέσεων αυτών. Η αποφωσφορυλίωση της NPM/B23 μειώνει την ικανότητα πρόσδεσής της με την ARF, με αποτέλεσμα την στόχευσή της για αποικοδόμηση από την E3 λιγάση ULF. Έτσι, η ενεργοποίηση της ATM συνδέεται με την μείωση των επιπέδων της ARF, οποία συμβαίνει σε πρωτεϊνικό και όχι μεταγραφικό επίπεδο. Αντιστρόφως, η αναστολή της ATM οδηγεί σε αύξηση της ARF, η οποία προωθεί την ενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών δράσεων της ARF (Εικ. 33).

4.2. Συμβολή στην πρόοδο του διεθνούς σχετικού επιστημονικού πεδίου και στην προϋπάρχουσα βιβλιογραφία

Το μονοπάτι DDR και η πρωτεΐνη ARF διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πορεία της καρκινικής εξέλιξης, αν και από πολλά μέλη της επιστημονικής κοινότητας θεωρείται ότι δρουν σε εντελώς διαφορετικές συνθήκες και ανεξάρτητα μεταξύ τους. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια υπάρχουν πολλά ευρήματα επιστημονικών μελετών που δείχνουν αφενός μία επέκταση του φάσματος των ογκοκατασταλτικών δράσεων της ARF, αφετέρου μία πιθανή σχέση με στοιχεία του μονοπατιού DDR[17, 29, 96, 98, 101]. Τα ευρήματα ωστόσο είναι πολλές φορές αντικρουόμενα ή φαινομενικά ασυμβίβαστα μεταξύ τους ή και με την προϋπάρχουσα βιβλιογραφία. Αν και η ογκοκατασταλτική δράση της ARF είναι αδιαμφισβήτητη, ο ρόλος της *in vivo* παραμένει ένα πεδίο προβληματισμού, αφού οι περισσότερες λειτουργίες της έχουν παρατηρηθεί έπειτα από εξωγενή υπερέκφραση της πρωτεΐνης σε επίπεδα που δεν ανιχνεύονται σε φυσιολογικά κύτταρα ή από πειράματα σε μοντέλα ποντικών, στα οποία όπως είδαμε η δράση της p19^{ARF} διαφέρει σε πολλά σημεία

από αυτήν της ανθρώπινης p14^{ARF}. Καθώς είναι γνωστό ότι, όχι μόνο ο τύπος, αλλά και η ένταση και η διάρκεια ενός ερεθίσματος παίζουν καταλυτικό ρόλο στην τελική απόκριση, είναι πολύ σημαντικές μελέτες που εξετάζουν τη δράση έπειτα από ενεργοποίηση από ογκογόνα σήματα που εμφανίζονται στο πλαίσιο κυτταρικών συστημάτων και ζωικών μοντέλων που προσομοιάζουν περισσότερο στις πραγματικές συνθήκες που συναντώνται στη διάρκεια της καρκινογένεσης και τη συσχέτισή της με τις διαταραχές στην έκφρασή της που παρατηρούνται στους ανθρώπινους καρκίνους. Για το λόγο αυτό η παρούσα μελέτη έχει βαρύνουσα σημασία καθώς εξετάζει τη δράση της ARF έπειτα από μεταβολές στην έκφρασή της που παρατηρούνται υπό συνθήκες χαρακτηριστικές ενός περιβάλλοντος καρκινικού όγκου όπως είναι η αυξημένη ενεργοποίηση του DDR .

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμβάλλουν στην κατανόηση της διασύνδεσης των δύο μονοπατιών (DDR και ARF) στο πλαίσιο μιας οργανωμένης και συνδυασμένης κυτταρικής απόκρισης σε ογκογόνα ερεθίσματα. Παράλληλα, δείχνοντας ότι η επίδραση της ATM στην ARF συμβαίνει αποκλειστικά σε επίπεδο πρωτεΐνης εξηγεί ως ένα βαθμό την παρατήρηση φαινομενικά αντικρουόμενων αποτελεσμάτων που υποστηρίζουν την ανεξάρτητη δράση των δύο μονοπατιών, στηριζόμενα κυρίως [17, 34] . Ενώ τα επίπεδα μεταγραφής της ARF παραμένουν, πράγματι, ανεπηρέαστα από την ενεργοποίηση ή αναστολή του μονοπατιού DDR, δεν συμβαίνει το ίδιο για τα πρωτεϊνικά επίπεδα.

Έτσι, τα επίπεδα της ARF φαίνεται ότι επηρεάζονται σε διαφορετικό επίπεδο από διαφορετικά ερεθίσματα: η έκφραση των ογκογονιδίων ενεργοποιεί την ARF μέσω αύξησης της μεταγραφής του γονιδίου, ενώ η αναστολή της ATM και του DDR μονοπατιού προκαλεί αύξηση της ARF σε πρωτεϊνικό επίπεδο, μέσω σταθεροποίησής της. Δεδομένου ότι η έκφραση ογκογονιδίων ενεργοποιεί και την ATM[88, 130], φαίνεται αρχικά ότι τα δύο μονοπάτια δρουν ανταγωνιστικά. Ωστόσο, η ενεργοποίηση δύο μηχανισμών και η αξιοποίησή τους από το κύτταρο για την επίτευξη μέγιστου αποτελέσματος κατά την προσπάθεια καταπολέμησης των ογκογόνων ερεθισμάτων μοιάζει πιο πιθανή. Στο πλαίσιο αυτό, η απώλεια του ενός μονοπατιού- στην προκειμένη περίπτωση του DDR μέσω απώλειας της ATM-

οδηγεί σε ενίσχυση της δράσης του άλλου μονοπατιού (ARF), συμβάλλοντας σε μία συντονισμένη και οργανωμένη απόκριση.

Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν ορισμένες μελέτες οι οποίες εμφανίζουν την ARF να συμβάλλει στην λειτουργία του μονοπατιού DDR [96, 98, 101]. Παρόλο που τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών στηρίζονται κυρίως στην εκτοπική έκφραση της ARF σε επίπεδα αρκετά υψηλά, η παράλληλη ύπαρξη μίας αμοιβαίας σχέσης αλληλεπίδρασης της ARF με στοιχεία του μονοπατιού DDR δεν μπορεί να αποκλειστεί. Σε μία τέτοια περίπτωση η αύξηση της ARF μετά από αναστολή της ATM θα μπορούσε να συμβάλλει στην ενεργοποίηση άλλων οδών του μονοπατιού DDR όπως της ATR/Chk1[101].

4.3. Ρόλος στον ανθρώπινο καρκίνο

Στο παραπάνω πλαίσιο, το δίκτυο ογκογονίδια-ATM-ARF εμφανίζει ομοιότητες με τον ρυθμιστικό βρόχο που δημιουργείται μεταξύ ARF και p53, στον οποίο η p53 ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση της ARF[30, 131], με αποτέλεσμα όταν η p53 χάνεται να υπάρχει αύξηση στην έκφραση της ARF, σε μια προσπάθεια αντιστάθμισης της απώλειας της p53 μέσω ενίσχυσης των p53-ανεξάρτητων δράσεων της ARF.

Επιπλέον, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι σε κύτταρα με απώλεια της p53, η αναστολή της ATM οδηγεί σε ευαισθητοποίηση και προώθηση της διαδικασίας μιτωτικής καταστροφής λόγω βλαβών του DNA[132]. Σημαντικό στοιχείο που προκύπτει από την ίδια μελέτη και υποστηρίζει την ύπαρξη του μηχανισμού αυτού είναι η παρατήρηση ότι ασθενείς με καρκίνο του μαστού με μεταλλαγμένο το γονίδιο του p53 εμφάνιζαν μεγαλύτερο χρόνο επιβίωσης όταν η μετάλλαξη της p53 συνοδευόταν από χαμηλή έκφραση της ATM σε σύγκριση με τις περιπτώσεις όπου συνυπήρχε φυσιολογική έκφραση της ATM. Παρόλο που οι συγγραφείς προτείνουν ένα διαφορετικό πιθανό μηχανισμό, δεν μπορεί να αποκλειστεί ένας πιθανός ρόλος για το προτεινόμενο ATM-ARF μονοπάτι που παρουσιάζεται σε αυτήν την εργασία. Από τα *in vivo* αποτελέσματα, άλλωστε, της παρούσας εργασίας από τη μελέτη έκφρασης των ATM και ARF σε δείγματα καρκίνου του πνεύμονα με μεταλλαγμένο p53 (Εικ.47), προκύπτει μία αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της ATM

και της ARF, η οποία μπορεί να εξηγήσει την υψηλότερη διάρκεια επιβίωσης σε ασθενείς με χαμηλή έκφραση της ATM, όταν συνυπάρχει απώλεια της p53.

4.4. Ρόλος σε πειραματικά μοντέλα καρκινογένεσης σε ποντίκια

Αν και η χρήση μοντέλων ποντικών ως πειραματοζώων είναι πολύ διαδεδομένη, κερδίζοντας ολοένα έδαφος στο πεδίο των ερευνητικών μελετών και ειδικά στο πεδίο έρευνας του καρκίνου, έχουν διαπιστωθεί, κατά καιρούς, διαφορές ως προς τη δράση ορισμένων μορίων ή μονοπατιών. Έτσι, η ATM κινάση φαίνεται ότι εμφανίζει μία περιορισμένη ογκοκατασταλτική δράση στον ποντικό[105] ενώ η πρωτεΐνη ARF στον ποντικό (p19^{ARF}) εμφανίζει διαφορές ως προς τη ρύθμισή της σε σύγκριση με την ομόλογή της (p14^{ARF}) στον άνθρωπο[133]. Παρ' όλα αυτά, το μονοπάτι αλληλεπίδρασης ATM-ARF θα μπορούσε να παίζει κάποιο ρόλο σε ορισμένου τύπου κακοήθειες ποντικού όπως τα ινοσαρκώματα, όπου η ARF φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο, καθώς ποντίκια χωρίς ARF (ARF-null mice) εμφανίζουν ινοσαρκώματα σε μεγάλο ποσοστό, κάτι που δεν συμβαίνει όταν και η ATM είναι απενεργοποιημένη (ATM-ARF double null mice)[35]. Επίσης η ύπαρξη του μονοπατιού ATM-ARF μπορεί να ερμηνεύσει και την αύξηση της ARF που παρατηρείται σε ινοβλάστες ποντικού χωρίς ATM (ATM-null MEFs) σε σχέση με τους φυσιολογικούς (wild type, wt MEFs)[35, 133], ιδιαίτερα σε συνδυασμό με πρόσφατα επιστημονικά δεδομένα που δείχνουν ότι ινοβλάστες ποντικού σε καλλιέργεια εμφανίζουν ενεργοποιημένο το μονοπάτι DDR[134].

4.5. Σημασία στη θεραπευτική προσέγγιση

Η συνεχής ερευνητική πρόοδος και διαλεύκανση του ρόλου γονιδίων, μορίων-πρωτεϊνών και σηματοδοτικών μονοπατιών στους μηχανισμούς της καρκινογένεσης και της καρκινικής εξέλιξης έχει αναδείξει την μεγάλη ποικιλομορφία και ετερογένεια των αλλοιώσεων που συναντώνται μεταξύ διαφορετικών μορφών καρκίνου, ακόμα και μεταξύ διαφορετικών ασθενών. Η ετερογένεια αυτή καθιστά επιτακτική ανάγκη την προώθηση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων που να λαμβάνουν υπόψη το γενετικό υπόβαθρο του εκάστοτε όγκου με σκοπό τη χορήγηση εξατομικευμένης θεραπείας για την επίτευξη του μέγιστου δυνατού αποτελέσματος.

Από κλινική άποψη, η λειτουργία του νέου μονοπατιού ATM-ARF και ο ρόλος του στην εξέλιξη του ανθρώπινου καρκίνου θα μπορούσε να αξιοποιηθεί αποτελεσματικά για την ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων στο πλαίσιο της εξατομικευμένης αντικαρκινικής θεραπείας. Υπό αυτό το πρίσμα, η αναστολή της ATM σε όγκους όπου υπάρχει απώλεια της p53 θα οδηγούσε σε αύξηση της ARF προωθώντας την p53-ανεξάρτητη δράση της. Έτσι, την αδυναμία ενεργοποίησης των μηχανισμών της απόπτωσης και της γήρανσης μέσω του βασικού μορίου-τελεστή του μονοπατιού DDR p53, θα μπορούσε να υποκαταστήσει η ενίσχυση των p53-ανεξάρτητων ογκοκατασταλτικών δράσεων της ARF μέσω αναστολής της ATM κινάσης.

4.6. Τελικό Συμπέρασμα

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι η παρούσα εργασία, που πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο εκπόνησης διδακτορικής διατριβής, 1) αποκαλύπτει έναν νέο μηχανισμό αλληλεπίδρασης μεταξύ της κινάσης ATM του μονοπατιού απόκρισης σε βλάβες του DNA (DDR) και της πρωτεΐνης ARF, 2)ερμηνεύει ορισμένα φαινομενικά αντικρουόμενα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών 3)αναδεικνύει τη σημασία της συνολικής και συντονισμένης απόκρισης του κυττάρου σε ογκογόνα ερεθίσματα, στο πλαίσιο της οποίας το μονοπάτι DDR αποτελεί πρωταρχικό αντικαρκινικό φραγμό ενώ η ενεργοποίηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης ARF δρα ως δεύτερο επίπεδο απόκρισης συμπληρώνοντας ή αντισταθμίζοντας την απώλεια του πρώτου φραγμού (απώλεια ενεργοποίησης του DDR λόγω αναστολής της ATM) και 4) παρέχει τη δυνατότητα αξιοποίησης του προτεινόμενου μηχανισμού για την ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων για καρκινικούς όγκους ασθενών με απώλεια της p53, στους οποίους η αναστολή της ATM μπορεί να οδηγήσει σε ενίσχυση των p53-ανεξάρτητων ογκοκατασταλτικών δράσεων της ARF.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA: a cancer journal for clinicians, 2011. **61**(2): p. 69-90.
2. Weinberg, R.A., *The Nature of Cancer*, in *The Biology of Cancer*. 2006, Garland Science
3. Thomas P.Stricker, V.K., *Neoplasia*, in *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, W. Schmitt, Editor. 2010, SAUNDERS ELSEVIER.
4. Pat J.Morin, J.M.T., Francis S.Collins, Bert Vogelstein, *Cancer Genetics*, in *Harrison's Principles of Internal Medicine*, E.B. Dennis L.Kasper, Anthony S.Fauci, Stephen L.Hauser, Dan L.Longo, J. Larry Jameson, Editor. 2005, McGraw-Hill.
5. Hanahan, D. and R. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
6. Andres Joaquin Lopez-Contreras, O.F.-C., *Signalling DNA Damage*, in *Protein Phosphorylation in Human Health*, D.C. Huang, Editor. 2012, InTech.
7. Savitsky, K., et al., *A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase*. Science (New York, N.Y.), 1995. **268**(5218): p. 1749-1753.
8. Savitsky, K., et al., *The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species*. Human molecular genetics, 1995. **4**(11): p. 2025-2032.
9. Matsuoka, S., et al., *ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage*. Science (New York, N.Y.), 2007. **316**(5828): p. 1160-1166.
10. Kurz, E. and S. Lees-Miller, *DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways*. DNA repair, 2004. **3**(8-9): p. 889-900.
11. Ahmed, M. and N. Rahman, *ATM and breast cancer susceptibility*. Oncogene, 2006. **25**(43): p. 5906-5911.
12. Swift, M., et al., *Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia*. The New England journal of medicine, 1987. **316**(21): p. 1289-1294.
13. Thompson, D., et al., *Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers*. Journal of the National Cancer Institute, 2005. **97**(11): p. 813-822.
14. Stankovic, T., et al., *ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer*. American journal of human genetics, 1998. **62**(2): p. 334-345.
15. Serrano, M., G. Hannon, and D. Beach, *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*. Nature, 1993. **366**(6456): p. 704-707.
16. Quelle, D., et al., *Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest*. Cell, 1995. **83**(6): p. 993-1000.
17. Sherr, C., *Divorcing ARF and p53: an unsettled case*. Nature reviews. Cancer, 2006. **6**(9): p. 663-673.

18. Kuo, M.-L., et al., *N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor*. *Genes & development*, 2004. **18**(15): p. 1862-1874.
19. Chen, D., et al., *Transcription-independent ARF regulation in oncogenic stress-mediated p53 responses*. *Nature*, 2010. **464**(7288): p. 624-627.
20. Zindy, F., et al., *Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization*. *Genes & development*, 1998. **12**.
21. Ries, S., et al., *Opposing effects of Ras on p53: transcriptional activation of mdm2 and induction of p19ARF*. *Cell*, 2000. **103**(2): p. 321-330.
22. Lin, A. and S. Lowe, *Oncogenic ras activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001. **98**(9): p. 5025-5030.
23. Parisi, T., et al., *Transcriptional regulation of the human tumor suppressor p14(ARF) by E2F1, E2F2, E2F3, and Sp1-like factors*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2002. **291**(5): p. 1138-1145.
24. Dimri, G., et al., *Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor*. *Molecular and cellular biology*, 2000. **20**(1): p. 273-285.
25. Stanchina, E.d., et al., *E1A signaling to p53 involves the p19ARF tumor suppressor*. *Genes & development*, 1998. **12**.
26. Sharpless, N., *Ink4a/Arf links senescence and aging*. *Experimental gerontology*, 2004. **39**(11-12): p. 1751-1759.
27. Voorhoeve, P. and R. Agami, *The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus*. *Cancer cell*, 2003. **4**(4): p. 311-319.
28. Wei, W., R. Hemmer, and J. Sedivy, *Role of p14(ARF) in replicative and induced senescence of human fibroblasts*. *Molecular and cellular biology*, 2001. **21**(20): p. 6748-6757.
29. Ozenne, P., et al., *The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer*. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 2010. **127**(10): p. 2239-2247.
30. Stott, F., et al., *The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2*. *The EMBO journal*, 1998. **17**(17): p. 5001-5014.
31. Pomerantz, J., et al., *The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53*. *Cell*, 1998. **92**(6): p. 713-723.
32. Zhang, Y., Y. Xiong, and W. Yarbrough, *ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways*. *Cell*, 1998. **92**(6): p. 725-734.
33. Kamijo, T., et al., *Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998. **95**(14): p. 8292-8297.
34. Kamijo, T., et al., *Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF*. *Cell*, 1997. **91**(5): p. 649-659.
35. Kamijo, T., et al., *Loss of the ARF tumor suppressor reverses premature replicative arrest but not radiation hypersensitivity arising from disabled atm function*. *Cancer research*, 1999. **59**(10): p. 2464-2469.

36. Weber, J., et al., *p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor*. *Genes & development*, 2000. **14**(18): p. 2358-2365.
37. Kelly-Spratt, K., et al., *p19Arf suppresses growth, progression, and metastasis of Hras-driven carcinomas through p53-dependent and -independent pathways*. *PLoS biology*, 2004. **2**(8).
38. Carnero, A., et al., *p16INK4A and p19ARF act in overlapping pathways in cellular immortalization*. *Nature cell biology*, 2000. **2**(3): p. 148-155.
39. Eymir, B., et al., *Human ARF binds E2F1 and inhibits its transcriptional activity*. *Oncogene*, 2001. **20**(9): p. 1033-1041.
40. Eymir, B., et al., *p14ARF induces G2 arrest and apoptosis independently of p53 leading to regression of tumours established in nude mice*. *Oncogene*, 2003. **22**(12): p. 1822-1835.
41. Yarbrough, W., et al., *Human tumor suppressor ARF impedes S-phase progression independent of p53*. *Cancer research*, 2002. **62**(4): p. 1171-1177.
42. Tsuji, K., et al., *p53-independent apoptosis is induced by the p19ARF tumor suppressor*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2002. **295**(3): p. 621-629.
43. Hemmati, P., et al., *Loss of p21 disrupts p14 ARF-induced G1 cell cycle arrest but augments p14 ARF-induced apoptosis in human carcinoma cells*. *Oncogene*, 2005. **24**(25): p. 4114-4128.
44. Martelli, F., et al., *p19ARF targets certain E2F species for degradation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001. **98**(8): p. 4455-4460.
45. Datta, A., et al., *ARF directly binds DP1: interaction with DP1 coincides with the G1 arrest function of ARF*. *Molecular and cellular biology*, 2005. **25**(18): p. 8024-8036.
46. Qi, Y., et al., *p19ARF directly and differentially controls the functions of c-Myc independently of p53*. *Nature*, 2004. **431**(7009): p. 712-717.
47. Gregory, M., Y. Qi, and S. Hann, *The ARF tumor suppressor: keeping Myc on a leash*. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 2005. **4**(2): p. 249-252.
48. Tago, K., S. Chiocca, and C. Sherr, *Sumoylation induced by the Arf tumor suppressor: a p53-independent function*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. **102**(21): p. 7689-7694.
49. Rizos, H., S. Woodruff, and R. Kefford, *p14ARF interacts with the SUMO-conjugating enzyme Ubc9 and promotes the sumoylation of its binding partners*. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 2005. **4**(4): p. 597-603.
50. Johnson, E., *Protein modification by SUMO*. *Annual review of biochemistry*, 2004. **73**: p. 355-382.
51. Melchior, F., *SUMO--nonclassical ubiquitin*. *Annual review of cell and developmental biology*, 2000. **16**: p. 591-626.
52. Reef, S., et al., *A short mitochondrial form of p19ARF induces autophagy and caspase-independent cell death*. *Molecular cell*, 2006. **22**(4): p. 463-475.
53. Abida, W. and W. Gu, *p53-Dependent and p53-independent activation of autophagy by ARF*. *Cancer research*, 2008. **68**(2): p. 352-357.
54. Olson, M., K. Hingorani, and A. Szebeni, *Conventional and nonconventional roles of the nucleolus*. *International review of cytology*, 2002. **219**: p. 199-266.

55. Sugimoto, M., et al., *Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing*. *Molecular cell*, 2003. **11**(2): p. 415-424.
56. Itahana, K., et al., *Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation*. *Molecular cell*, 2003. **12**(5): p. 1151-1164.
57. Ayrault, O., et al., *Human tumor suppressor p14ARF negatively regulates rRNA transcription and inhibits UBF1 transcription factor phosphorylation*. *Oncogene*, 2006. **25**(58): p. 7577-7586.
58. Bertwistle, D., M. Sugimoto, and C. Sherr, *Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23*. *Molecular and cellular biology*, 2004. **24**(3): p. 985-996.
59. Colombo, E., et al., *Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability*. *Molecular and cellular biology*, 2005. **25**(20): p. 8874-8886.
60. Rodway, H., et al., *Stability of nucleolar versus non-nucleolar forms of human p14(ARF)*. *Oncogene*, 2004. **23**(37): p. 6186-6192.
61. Lindström, M. and Y. Zhang, *B23 and ARF: friends or foes?* *Cell biochemistry and biophysics*, 2006. **46**(1): p. 79-90.
62. Okuwaki, M., *The structure and functions of NPM1/Nucleophosmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein*. *Journal of biochemistry*, 2008. **143**(4): p. 441-448.
63. Enomoto, T., et al., *Essential role of the B23/NPM core domain in regulating ARF binding and B23 stability*. *The Journal of biological chemistry*, 2006. **281**(27): p. 18463-18472.
64. Gjerset, R., *DNA damage, p14ARF, nucleophosmin (NPM/B23), and cancer*. *Journal of molecular histology*, 2006. **37**(5-7): p. 239-251.
65. Grisendi, S., et al., *Nucleophosmin and cancer*. *Nature reviews. Cancer*, 2006. **6**(7): p. 493-505.
66. Falini, B., et al., *Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. *The New England journal of medicine*, 2005. **352**(3): p. 254-266.
67. Brady, S., et al., *ARF impedes NPM/B23 shuttling in an Mdm2-sensitive tumor suppressor pathway*. *Molecular and cellular biology*, 2004. **24**(21): p. 9327-9338.
68. Chen, D., J.-B. Yoon, and W. Gu, *Reactivating the ARF-p53 axis in AML cells by targeting ULF*. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 2010. **9**(15): p. 2946-2951.
69. Cheng, K., et al., *The leukemia-associated cytoplasmic nucleophosmin mutant is an oncogene with paradoxical functions: Arf inactivation and induction of cellular senescence*. *Oncogene*, 2007. **26**(53): p. 7391-7400.
70. Korgaonkar, C., et al., *Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function*. *Molecular and cellular biology*, 2005. **25**(4): p. 1258-1271.
71. Badal, V., et al., *Regulation of the p14ARF promoter by DNA methylation*. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 2008. **7**(1): p. 112-119.
72. Dominguez, G., et al., *Prevalence of aberrant methylation of p14ARF over p16INK4a in some human primary tumors*. *Mutation research*, 2003. **530**(1-2): p. 9-17.

73. Esteller, M., et al., *Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status*. *Cancer research*, 2000. **60**(1): p. 129-133.
74. Konishi, N., et al., *DNA hypermethylation status of multiple genes in prostate adenocarcinomas*. *Japanese journal of cancer research : Gann*, 2002. **93**(7): p. 767-773.
75. Silva, J., et al., *Analysis of genetic and epigenetic processes that influence p14ARF expression in breast cancer*. *Oncogene*, 2001. **20**(33): p. 4586-4590.
76. Ishida, E., et al., *Promotor hypermethylation of p14ARF is a key alteration for progression of oral squamous cell carcinoma*. *Oral oncology*, 2005. **41**(6): p. 614-622.
77. Hsu, H.-S., et al., *5' cytosine-phospho-guanine island methylation is responsible for p14ARF inactivation and inversely correlates with p53 overexpression in resected non-small cell lung cancer*. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2004. **10**(14): p. 4734-4741.
78. Zöchbauer-Müller, S., et al., *Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers*. *Cancer research*, 2001. **61**(1): p. 249-255.
79. Gazzeri, S., et al., *The human p19ARF protein encoded by the beta transcript of the p16INK4a gene is frequently lost in small cell lung cancer*. *Cancer research*, 1998. **58**(17): p. 3926-3931.
80. Park, M.-J., et al., *Pathogenetic and biologic significance of TP14ARF alterations in nonsmall cell lung carcinoma*. *Cancer genetics and cytogenetics*, 2003. **141**(1): p. 5-13.
81. Vonlanthen, S., et al., *Expression of p16INK4a/p16alpha and p19ARF/p16beta is frequently altered in non-small cell lung cancer and correlates with p53 overexpression*. *Oncogene*, 1998. **17**(21): p. 2779-2785.
82. Xue, Q., et al., *Aberrant expression of pRb, p16, p14ARF, MDM2, p21 and p53 in stage I adenocarcinomas of the lung*. *Pathology international*, 2002. **52**(2): p. 103-109.
83. Sano, T., et al., *Overexpression of p16 and p14ARF is associated with human papillomavirus infection in cervical squamous cell carcinoma and dysplasia*. *Pathology international*, 2002. **52**(5-6): p. 375-383.
84. Sánchez-Aguilera, A., et al., *p14(ARF) nuclear overexpression in aggressive B-cell lymphomas is a sensor of malfunction of the common tumor suppressor pathways*. *Blood*, 2002. **99**(4): p. 1411-1418.
85. Basso, K., et al., *Reverse engineering of regulatory networks in human B cells*. *Nature genetics*, 2005. **37**(4): p. 382-390.
86. Gorgoulis, V., et al., *Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions*. *Nature*, 2005. **434**(7035): p. 907-913.
87. Bartkova, J., et al., *DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis*. *Nature*, 2005. **434**(7035): p. 864-870.
88. Halazonetis, T., V. Gorgoulis, and J. Bartek, *An oncogene-induced DNA damage model for cancer development*. *Science (New York, N.Y.)*, 2008. **319**(5868): p. 1352-1355.

89. Maser, R. and R. DePinho, *Connecting chromosomes, crisis, and cancer*. Science (New York, N.Y.), 2002. **297**(5581): p. 565-569.
90. Hartwell, L. and M. Kastan, *Cell cycle control and cancer*. Science (New York, N.Y.), 1994. **266**(5192): p. 1821-1828.
91. Lengauer, C., K. Kinzler, and B. Vogelstein, *Genetic instabilities in human cancers*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 643-649.
92. Denko, N., et al., *The human Ha-ras oncogene induces genomic instability in murine fibroblasts within one cell cycle*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(11): p. 5124-5128.
93. Bartkova, J., et al., *Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints*. Nature, 2006. **444**(7119): p. 633-637.
94. Di Micco, R., et al., *Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication*. Nature, 2006. **444**(7119): p. 638-642.
95. Kamijo, T., et al., *Tumor spectrum in ARF-deficient mice*. Cancer research, 1999. **59**(9): p. 2217-2222.
96. Li, Y., et al., *ATM activity contributes to the tumor-suppressing functions of p14ARF*. Oncogene, 2004. **23**(44): p. 7355-7365.
97. Pauklin, S., et al., *ARF and ATM/ATR cooperate in p53-mediated apoptosis upon oncogenic stress*. Biochemical and biophysical research communications, 2005. **334**(2): p. 386-394.
98. Khan, S., J. Moritsugu, and G. Wahl, *Differential requirement for p19ARF in the p53-dependent arrest induced by DNA damage, microtubule disruption, and ribonucleotide depletion*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(7): p. 3266-3271.
99. Khan, S., et al., *p14ARF is a component of the p53 response following ionizing irradiation of normal human fibroblasts*. Oncogene, 2004. **23**(36): p. 6040-6046.
100. Lee, C., et al., *DNA damage disrupts the p14ARF-B23(nucleophosmin) interaction and triggers a transient subnuclear redistribution of p14ARF*. Cancer research, 2005. **65**(21): p. 9834-9842.
101. Eymis, B., et al., *p14ARF activates a Tip60-dependent and p53-independent ATM/ATR/CHK pathway in response to genotoxic stress*. Molecular and cellular biology, 2006. **26**(11): p. 4339-4350.
102. Rocha, S., et al., *Regulation of NF-kappaB and p53 through activation of ATR and Chk1 by the ARF tumour suppressor*. The EMBO journal, 2005. **24**(6): p. 1157-1169.
103. Rocha, S. and N. Perkins, *ARF the integrator: linking NF-kappaB, p53 and checkpoint kinases*. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 2005. **4**(6): p. 756-759.
104. Shiloh, Y., *ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity*. Nature reviews. Cancer, 2003. **3**(3): p. 155-168.
105. Efeyan, A., et al., *Limited role of murine ATM in oncogene-induced senescence and p53-dependent tumor suppression*. PloS one, 2009. **4**(5).
106. Hershko, T. and D. Ginsberg, *Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis*. The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(10): p. 8627-8634.

107. Ramirez, R., et al., *Immortalization of human bronchial epithelial cells in the absence of viral oncoproteins*. *Cancer research*, 2004. **64**(24): p. 9027-9034.
108. Sato, M., et al., *Multiple oncogenic changes (K-RAS(V12), p53 knockdown, mutant EGFRs, p16 bypass, telomerase) are not sufficient to confer a full malignant phenotype on human bronchial epithelial cells*. *Cancer research*, 2006. **66**(4): p. 2116-2128.
109. Hickson, I., et al., *Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM*. *Cancer research*, 2004. **64**(24): p. 9152-9159.
110. Li, Z., et al., *Systematic comparison of label-free, metabolic labeling, and isobaric chemical labeling for quantitative proteomics on LTQ Orbitrap Velos*. *Journal of proteome research*, 2012. **11**(3): p. 1582-1590.
111. Swift, S., et al., *Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems*. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]*, 2001. **Chapter 10**.
112. DiTullio, R., et al., *53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer*. *Nature cell biology*, 2002. **4**(12): p. 998-1002.
113. Kurz, E., P. Douglas, and S. Lees-Miller, *Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species*. *The Journal of biological chemistry*, 2004. **279**(51): p. 53272-53281.
114. Pollice, A., et al., *Functional and physical interaction of the human ARF tumor suppressor with Tat-binding protein-1*. *The Journal of biological chemistry*, 2004. **279**(8): p. 6345-6353.
115. Huang, M., et al., *Depletion of guanine nucleotides leads to the Mdm2-dependent proteasomal degradation of nucleostemin*. *Cancer research*, 2009. **69**(7): p. 3004-3012.
116. Huang, M., et al., *Guanine nucleotide depletion inhibits pre-ribosomal RNA synthesis and causes nucleolar disruption*. *Leukemia research*, 2008. **32**(1): p. 131-141.
117. Tang, X., et al., *A novel ATM-dependent pathway regulates protein phosphatase 1 in response to DNA damage*. *Molecular and cellular biology*, 2008. **28**(8): p. 2559-2566.
118. Kotani, H., et al., *The delta isoform of protein phosphatase type 1 is localized in nucleolus and dephosphorylates nucleolar phosphoproteins*. *Biochemical and biophysical research communications*, 1998. **249**(1): p. 292-296.
119. Lin, C., et al., *Dephosphorylation of nucleophosmin by PP1 β facilitates pRB binding and consequent E2F1-dependent DNA repair*. *Molecular biology of the cell*, 2010. **21**(24): p. 4409-4417.
120. Leach, C., S. Shenolikar, and D. Brautigan, *Phosphorylation of phosphatase inhibitor-2 at centrosomes during mitosis*. *The Journal of biological chemistry*, 2003. **278**(28): p. 26015-26020.
121. Hayward, D. and A. Fry, *Nek2 kinase in chromosome instability and cancer*. *Cancer letters*, 2006. **237**(2): p. 155-166.
122. Mi, J., et al., *Protein phosphatase-1 α regulates centrosome splitting through Nek2*. *Cancer research*, 2007. **67**(3): p. 1082-1089.

123. Yao, J., et al., *Nek2A kinase regulates the localization of numatrin to centrosome in mitosis*. FEBS letters, 2004. **575**(1-3): p. 112-118.
124. Noguchi, K., et al., *Nucleolar Nek11 is a novel target of Nek2A in G1/S-arrested cells*. The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(31): p. 32716-32727.
125. Lessard, F., et al., *The ARF tumor suppressor controls ribosome biogenesis by regulating the RNA polymerase I transcription factor TTF-I*. Molecular cell, 2010. **38**(4): p. 539-550.
126. Lindström, M., *NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling*. Biochemistry research international, 2011. **2011**: p. 195209.
127. Cox, J. and M. Mann, *Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology*. Annual review of biochemistry, 2011. **80**: p. 273-299.
128. Choi, J., et al., *Selective requirement of H2B N-Terminal tail for p14ARF-induced chromatin silencing*. Nucleic acids research, 2011. **39**(21): p. 9167-9180.
129. Sarkaria, J., et al., *Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine*. Cancer research, 1999. **59**(17): p. 4375-4382.
130. Negrini, S., V. Gorgoulis, and T. Halazonetis, *Genomic instability--an evolving hallmark of cancer*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2010. **11**(3): p. 220-228.
131. Zeng, Y., et al., *p53 binds to and is required for the repression of Arf tumor suppressor by HDAC and polycomb*. Cancer research, 2011. **71**(7): p. 2781-2792.
132. Jiang, H., et al., *The combined status of ATM and p53 link tumor development with therapeutic response*. Genes & development, 2009. **23**(16): p. 1895-1909.
133. Gorgoulis, V. and T. Halazonetis, *Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response*. Current opinion in cell biology, 2010. **22**(6): p. 816-827.
134. Di Micco, R., et al., *DNA damage response activation in mouse embryonic fibroblasts undergoing replicative senescence and following spontaneous immortalization*. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 2008. **7**(22): p. 3601-3606.