



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

**Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών**

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΜΣ «ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Διευθύντρια: Καθηγήτρια Ισιδώρα Παπασιδέρη

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας,
Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ)
Διευθυντής: Καθηγητής Α.Γ. Παπαβασιλείου

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Συσχέτιση των μηχανοευαίσθητων πολυκυστινών και φλεγμονωδών παραγόντων στην παθογένεια του ορθοκολικού καρκίνου»

Μαλάκου Σ. Σταυρούλα-Νικολέττα

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαρία Γαζούλη (Επιβλέπουσα),
Εργαστήριο Βιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Καθηγητής Ευάγγελος Μαρίνος,
Εργαστήριο Βιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Αναπληρωτής Καθηγητής Δημήτριος Ι. Στραβοπόδης,
Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Βιολογικό Τμήμα, Σχολή Θετικών
Επιστημών Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 2019

Πρόλογος

Με την ευκαιρία ολοκλήρωσης της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να αναφέρω και να ευχαριστήσω θερμά ορισμένους ανθρώπους, που στάθηκαν αρωγοί δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια πραγματοποίησής της. Πρώτα από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους επιστημονικούς υπεύθυνους του συγκεκριμένου έργου, τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών Καθηγητή κ. Αθανάσιο Παπαβασιλείου, την Καθηγήτρια κ. Έφη Μπάσδρα και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Χριστίνα Πιπέρη, οι οποίοι είναι απαιτητικοί κριτές και παράλληλα Δάσκαλοι, μαθαίνοντας μας τη φιλοσοφία προσέγγισης της βιολογικής έρευνας, ενώ μας εκπαιδεύουν ώστε να μπορέσουμε να ανταποκριθούμε σε όποιο επιστημονικό ή ακαδημαϊκό περιβάλλον βρεθούμε, καθώς και για την εμπιστοσύνη που δείχνουν στο πρόσωπο μου αυτά τα χρόνια.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Γαζούλη Μαρία, που δέχτηκε να είναι η επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και τον Καθηγητή Ευάγγελο Μαρίνο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Δημήτρη Στραβοπόδη, για την άψογη συνεργασία και βοήθεια τους.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στον Αντώνη Γαργαλιώνη, Μεταδιδακτορικό Συνεργάτη και εμπνευστή της συγκεκριμένης εργασίας. Εκτός από το υλικό που μου έδινε συνεχώς για διάβασμα και προβληματισμό, είχα την τεράστια τύχη να μου επιτραπεί να σχεδιάζω το πειραματικό κομμάτι της εργασίας δίπλα του αλλά και να παίρνω πρωτοβουλίες, δίνοντας μου τη δυνατότητα για συνεχή αυτοβελτίωση.

Τέλος, να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες Ηλιάννα Ζώη, Μάιρα Κατσιάνου, Αλεξία Κλώνου και τον Δρ. Άρη Ανέστη που με την βοήθεια τους και την παρουσία τους με βοηθούσαν πάντα και δημιούργησαν ένα υπέροχο κλίμα στο εργαστήριο.

Ευχαριστώ,

Μαλάκου Σ. Λίνα

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1. ΟΙ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΝΕΣ	9
1.1 Η οικογένεια των Πολυκυστινών.....	9
1.2 Πολυκυστίνη-1	10
1.2.3 Έκφραση και ιστική κατανομή.....	12
1.2.4 Λειτουργία	13
1.3 ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΝΗ-2	15
1.3.1 Δομή.....	15
1.3.3 Έκφραση και ιστική κατανομή.....	20
1.3.4 Λειτουργικός Ρόλος.....	20
1.4 Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΝΩΝ ΩΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ	21
1.4.1 Ο ρόλος των Πολυκυστινών στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου	24
1.4.2 Διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις – αλληλεπιδράσεις με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία.....	25
1.5 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΗ ΝΟΣΟ ΤΩΝ ΝΕΦΡΩΝ.....	27
1.6 Ο ρόλος των Πολυκυστινών στη καρκινογένεση.....	29
2. Ο ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	32
2.1. Επιδημιολογικά δεδομένα.....	32
2.2 Αιτιολογία	32
2.3 Μοριακή βιολογία	33
2. Ο ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΣΤΗΝ ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	37
3.1 Η φλεγμονή ως προαγωγός του ΟΚΚ και του CAC	40
4. ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΝΕΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	42
ΣΚΟΠΟΣ	43
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	44
3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	44
3.1.1 Καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων.....	44
3.1.2 Γονιδιακή αποσιώπηση με siRNA (silence RNA)	45
3.1.3 Επίδραση με κυτταροκίνες.....	47
3.1.4 Προσδιορισμός Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού-MTT Assay	48
3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ	48
3.2.1 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	49
3.2.2 Διαχωρισμός πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση	49
3.2.3 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)	51
3.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ HCT-116 ΚΑΙ HT29	53
3.5.1 Ποσοτικός προσδιορισμός και ποιοτική ανάλυση του απομονωμένου ολικού RNA	53
3.5.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής RT-PCR	54
3.6 ΠΟΣΟΤΙΚΗ PCR ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ (QREAL-TIME PCR) ΜΕ ΤΗ ΧΡΩΣΤΙΚΗ SYBR GREEN.....	55
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	58
4.1 ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΗ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ PKD1 ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ HCT-116 ΚΑΙ HT-29	58

4.1.1 Διερεύνηση της πρωτεϊνικής έκφρασης μορίων που σχετίζονται με καρκινογένεση και φλεγμονή, <i>phospho-mTOR</i> , <i>VEGF</i> , <i>IKKβ</i> , <i>NF-Kb</i> και <i>phospho-STAT-3</i> μετά από μεταγραφική αναστολή της <i>PC-1</i>	59
4.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ <i>HCT-116</i> ΚΑΙ <i>HT-29</i>	62
4.2.1 Διερεύνηση της έκφρασης των Πολυκυστινής 1 μετά από επίδραση με κυτταροκίνες σε καρκινικές κυτταρικές σειρές <i>HCT-116</i> και <i>HT-29</i>	64
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	66
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	70

Περίληψη

Οι πολυκυστίνες 1 και 2 (PC1, PC2) είναι πρωτεΐνες που εκφράζονται σε πολλά είδη επιθηλιακών κυττάρων, συμμετέχοντας αιτιολογικά στην παθογένεια της αυτοσωμικής επικρατούσας πολυκυστικής νόσου των νεφρών. Λειτουργούν ως μηχανο-αισθητήρια μόρια που ρυθμίζουν την κυτταρική απόκριση και διαθέτουν ομοιοστατικό ρόλο σε βασικές λειτουργίες του κυττάρου που διαταράσσονται κατά την ογκογένεση, πιθανολογώντας τη βιολογική συμμετοχή τους κυρίως στις διαδικασίες επέκτασης και μετάστασης του όγκου. Επιπλέον οι πολυκυστίνες παρουσιάζουν σημαντικό ρόλο στην αυτοάνοση επικρατή πολυκυστική νόσο των νεφρών, στον καρκίνο του παχέος εντέρου και στην ψωρίαση. Το κοινό χαρακτηριστικό αυτών των 3 ασθενειών είναι η στενή παθογενετική σύνδεση με μηχανισμούς φλεγμονής.

Ο ορθοκολικός καρκίνος αποτελεί έναν από τους βασικότερους πολυπαραγοντικούς καρκίνους, ενώ καίριο ρόλο διαδραματίζει στην εξέλιξη του η ανάπτυξη φλεγμονής στο περιβάλλον του παχέος εντέρου.

Στόχος της μεταπτυχιακής διπλωματικής ήταν η διερεύνηση για πρώτη φορά του ρόλου των πολυκυστινών στην φλεγμονή κατά την καρκινογένεση χρησιμοποιώντας ως μοντέλο, καρκινικές σειρές ορθοκολικού καρκίνου (ΟΚΚ), που είναι μια συχνή κακοήθεια και στα δύο φύλα αρκετά καλά μελετημένη και ιεραρχικά δομημένη.

Η υποέκφραση της Πολυκυστίνης-1 προάγει την ενεργοποίηση μορίων όπως ο mTOR, με επακόλουθη έκφραση του VEGF, που αποτελεί βασικό παράγοντα κατά την φλεγμονή. Επίσης, η μεταγραφική αποσιώπηση της Πολυκυστίνης 1, οδηγεί σε συσσώρευση του IKKβ στο κυτταρόπλασμα και αυξημένη ενεργοποίηση του NF-κΒ, ο οποίος στη συνέχεια ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με φλεγμονή. Επίσης ο μεταγραφικός παράγοντας STAT3, ο οποίος ενεργοποιεί αρκετά γονίδια κυτταροκινών επηρεάζεται από την υποέκφραση της Πολυκυστίνης-1 και εμφανίζει αυξημένα επίπεδα ενεργοποίησης στα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου.

Τέλος, το φλεγμονώδες περιβάλλον στον καρκίνο του παχέος εντέρου επηρεάζει την έκφραση της Πολυκυστίνης-1, με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες να προκαλούν μείωση στην έκφραση της.

Συμπερασματικά, η Πολυκυστίνη-1 μπορεί να αποτελέσει έναν νέο τελεστή της φλεγμονής, που εμπλέκονται σε παθολογικούς μηχανισμούς ανάπτυξης

επιθετικού φαινοτύπου στον ορθοκολικό καρκίνο, και να αποτελέσει ένα νέο μόριο θεραπευτικής στόχευσης.

Λέξεις ευρετηρίου: πολυκυστίνη 1, καρκινογένεση, καρκίνος παχέος εντέρου, φλεγμονή, mTOR, VEGF, NF-κB, STAT3

Abstract

Polycystins 1 and 2 (PC1, PC2) are proteins that are expressed in many types of epithelial cells, contributing to the pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease. They function as motor - sensing molecules that regulate cellular response and play a homeostatic role in key cellular functions that are disturbed during oncogenesis, potentially assuming their biological involvement mainly in the processes of tumor expansion and metastasis. They also appear to play a key role in colon cancer, autoimmune dominant polycystic kidney disease and psoriasis. The common feature of these 3 diseases is the close pathogenetic association with inflammatory mechanisms.

Colorectal cancer is one of the most important multifactorial cancers. The development of inflammation in the colon environment plays a key role in its development.

The aim of the master's thesis was to investigate for the first time the role of polycystins in inflammation during carcinogenesis using a model of colorectal cancer (CRC) as a model, which is a common malignancy in both sexes that is well thought out and hierarchically structured.

Hypoexpression of Polycystin-1 promotes activation of molecules such as mTOR, with subsequent expression of VEGF, which is a key factor in inflammation. Also, transcriptional silencing of Polycystin 1, leads to accumulation of IKK β in the cytoplasm and increased activation of NF-Kb, which then regulates the expression of inflammatory-related genes. STAT3, which also activates several cytokine genes, is affected by Polycystin-1 hypoexpression and exhibits elevated levels of activation.

Finally, inflammatory environment in colorectal cancer affects the expression of Polycystin-1, with pro-inflammatory cytokines causing a decrease in its expression.

In conclusion, Polycystin-1 may be a novel effector of inflammation, involved in pathological mechanisms of development of an aggressive phenotype in colorectal cancer, and may be a new therapeutic targeting molecule.

Key-words: polycystin-1, colorectal cancer, carcinogenesis, inflammation, mTOR, VEGF, NF-Kb, STAT3

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Οι Πολυκυστίνες

1.1 Η οικογένεια των Πολυκυστινών

Ο όρος Πολυκυστίνες περιλαμβάνει μια σχετικά νέα οικογένεια πρωτεϊνών που αποτελείται από 8 πρωτεϊνικά μόρια. Τα δύο αντιπροσωπευτικά μέλη της οικογένειας είναι η Πολυκυστίνη-1 (Polycystin-1, PC1) και η Πολυκυστίνη-2 (Polycystin-2, PC2), που ανιχνεύονται στους περισσότερους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού και κωδικοποιούνται από τα γονίδια PKD1 (Polycystic Kidney Disease 1) και PKD2 (Polycystic Kidney Disease 2), τα οποία εδράζονται στα χρωμοσώματα 16p13.3 και 4q21-23 αντίστοιχα.

Τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας διακρίνονται σε δύο υποκατηγορίες με βάση τη λειτουργική και δομική συγγενείά τους με την PC1 και την PC2. Στην κατηγορία της PC1 συμπεριλαμβάνονται η Polycystin-REJ, που εκφράζεται στους όρχεις, και οι πρωτεΐνες Polycystin-1L1, Polycystin-1L2 και Polycystin-1L3 που έχουν σχετικά διάχυτη ιστική έκφραση. Στην κατηγορία της PC2 ανήκουν η Polycystin-2L1 (PC2L1) και η Polycystin-2L2 (PC2L2), η οποία περιορίζεται στην καρδιά και στους όρχεις. Λόγω ομοιότητας της PC2 υποοικογένειας σε αλληλουχία και τοπολογία με την οικογένεια των καναλιών παροδικού δυναμικού του υποδοχέα TRP (transient receptor potential channels) έχει συμπεριληφθεί ως υποοικογένεια των TRP καναλιών (TRPP2 ή PC2, TRPP3 ή PC2L1, TRPP5 ή PC2L2)[1]

Η πρώτη πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε ήταν η PC1 μέσω κλωνοποίησης με βάση την τοπολογία του γονιδίου PKD1 το 1994 [2]. Αφορμή υπήρξε η συνεχής έρευνα για την ανάδειξη των αιτίων της αυτοσωμικής επικρατούσας πολυκυστικής νόσου των νεφρών (ΑΕΠΝΝ, autosomal dominant polycystic kidney disease - ADPKD), μιας συχνής γενετικής νόσου που οδηγεί στη δημιουργία πολυκυστικών νεφρών και επακόλουθη έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Μεταλλάξεις στα γονίδια PKD1 και PKD2 συνδέθηκαν αιτιολογικά με τη νόσο, ενώ οι ραγδαίες εξελίξεις πάνω στην έρευνα της μοριακής γενετικής της ΑΕΠΝΝ είναι αυτές που διευκολύνουν συνεχώς την αποκρυπτογράφηση της λειτουργίας των εν λόγω πρωτεϊνών [3].

1.2 Πολυκυστίνη-1

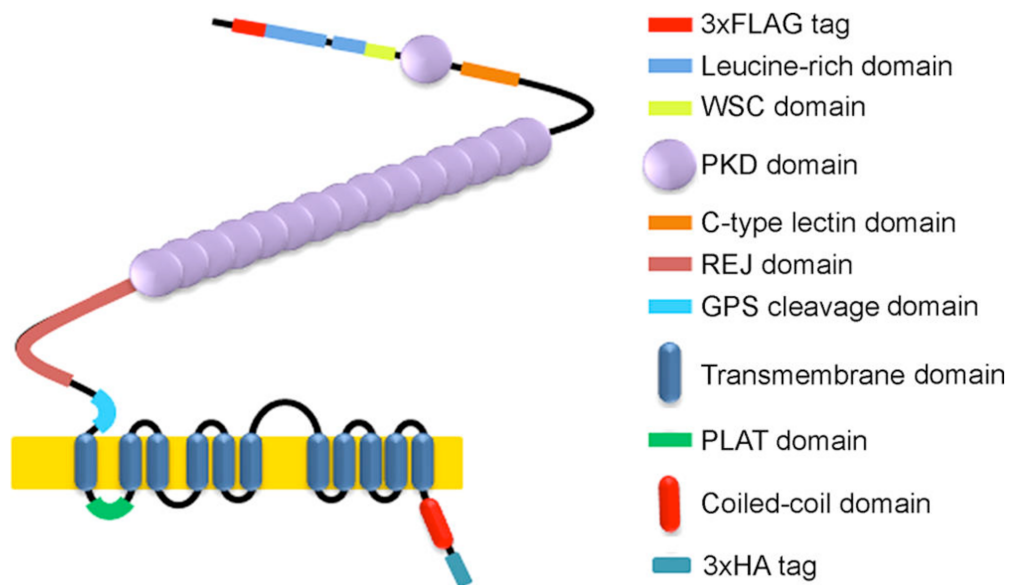
1.2.1 Δομή

Η PC1 προέρχεται από τη μετάφραση ενός μεταγράφου με μέγεθος 14,5 kb (kilobases), το οποίο διαθέτει 228 νουκλεοτίδια στην 5' αλληλουχία και 1019 νουκλεοτίδια στην 3' αλληλουχία της αμετάφραστης περιοχής του (untranslated region, UTR). Το πολυπεπτίδιο που κωδικοποιείται αποτελείται από 4304 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 462 kDa (kiloDalton). Διαθέτει ένα μεγάλο εξωκυττάριο αμινοτελικό άκρο, έντεκα διαμεμβρανικές περιοχές και ένα μικρότερο ενδοκυττάριο καρβοξυτελικό [2, 4, 5].

Το εξωκυττάριο άκρο αποτελείται από 3000 περίπου αμινοξέα και περιέχει ένα μοναδικό συνδυασμό πεπτιδικών περιοχών: δύο περιοχές πλούσιες σε λευκίνη LRR (leukine rich repeats), που πλαισιώνονται από δύο περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη, την περιοχή WSC (cell wall integrity/cell response component), μια περιοχή λεκτίνης τύπου C (C-type lectin domain), μια περιοχή ομόλογη με αυτή της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας A LDL-A (low-density lipoprotein A), 16 διακριτές περιοχές PKD (polycystic kidney disease) και μια περιοχή 1000 περίπου αμινοξέων που ονομάζεται REJ (receptor for egg jelly) και είναι ομόλογη με την πρωτεΐνη που ανιχνεύεται σε αβγά αχινού [6]. Οι περιοχές LRR και C-type lectin απαντώνται συχνά και σε άλλες δομές παίζοντας ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών, στην κυτταρική προσκόλληση και στην εξωκυττάρια δέσμευση αμινοξέων υδατανθράκων. Ως σημείο πρόσδεσης λειτουργεί και η περιοχή LDL-A [5]. Ιδιαίτερο όμως ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι επαναλαμβανόμενες δομές PKD, από τις οποίες οι 15 βρίσκονται σε αλληλουχία, έχουν δομή ανοσοσφαιρίνης και προσφέρουν μηχανική υποστήριξη, ελαστικότητα και επαγόμενη από μηχανικές δυνάμεις δυνατότητα αυξομείωσης της έκτασης του αμινοτελικού άκρου [6].

Πριν την έναρξη των διαμεμβρανικών περιοχών υπάρχει μια πρωτεολυτική περιοχή 50 αμινοξέων τύπου υποδοχέα συζευγμένου με G πρωτεΐνες GPCR (G-protein coupled receptor proteolytic site), όπου η PC1 υφίσταται λειτουργική αυτοπρωτεόλυση και διάσπαση, με αποτέλεσμα το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό τμήμα να παραμένουν μη ομοιοπολικά προσδεδεμένα. Οι διαμεμβρανικές περιοχές περιέχουν 5 ενδοκυττάρια και 5 εξωκυττάρια βρόχους, ενώ τέλος το καρβοξυτελικό άκρο αποτελείται από 225 αμινοξέα, έχει τη δομή ενός σπειροειδούς πηνίου και έχει την ικανότητα λειτουργικής διάσπασης σε διαφορετικές περιοχές,

όπως θα αναλυθεί περαιτέρω (Εικόνα 1.2-1) [7].



Εικόνα 1.2-1 Σχηματική απεικόνιση της PC-1[7].

1.2.2 Κυτταρική εντόπιση

Η μεγάλη πλειονότητα των δεδομένων που αφορούν την ανίχνευση της PC1 μέσα στην κυτταρική δομή προέρχονται από μελέτες στον νεφρικό ιστό, όπου εντοπίζονται οι κύριες κλινικές εκδηλώσεις της ΑΕΠΝΝ. Η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι διαφορετικών επιτόπων της πρωτεΐνης στον εξωκυττάριο βρόχο της διαμεμβρανικής περιοχής και στο ενδοκυττάριο τμήμα της δείχνει ότι η PC1 εκφράζεται στην κυτταρική μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα και απουσιάζει από τον πυρήνα των επιθηλιακών κυττάρων [8]. Σε συμφωνία με τον προτεινόμενο ρόλο της PC1 ως διαμεσολαβητή της διακυτταρικής επικοινωνίας, η κύρια κατανομή της εντοπίζεται στις βασικοπλευρικές επιφάνειες της κυτταρικής μεμβράνης των σωληναριακών επιθηλιακών κυττάρων [9]. Παρόμοια εντόπιση εμφανίζει σε κυτταρικές καλλιέργειες νεφρικών σωληναριακών κυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC (human umbilical vein endothelial cell), εμφανίζοντας

συνεντοπισμό με μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, όπως το PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1 ή CD-31) [10].

Δεδομένα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας αποκαλύπτουν ότι η πλειονότητα των μορίων της PC1 κυτταροπλασματικά σχετίζεται με διάφορες δομές κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης [8]. Στα νεφρικά κύτταρα από σκύλους MDCK (Madin-Darby canine kidney), η PC1 εντοπίζεται σε σύμπλοκα κυτταρικής προσκόλλησης στα δεσμοσώματα και βρίσκεται σε επαφή με πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων, συμμετέχοντας στην κυτταρική μηχανική στήριξη και σταθεροποίηση [11]. Αντίθετα, η PC1 έχει ανιχνευθεί στην κορυφαία επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης στον εμβρυικό νεφρικό ιστό σε σχέση με τη βασική και τις πλευρικές επιφάνειες του κυττάρου, κάτι που συνάδει με τον συν-εντοπισμό της με την E-cadherin και την β -catenin στους συνδέσμους κυτταρικής προσκόλλησης που βρίσκονται κοντά στην κορυφαία επιφάνεια [8, 9].

Η PC1 εντοπίζεται επίσης στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) όπου η έκφραση της μεταβάλλεται ανάλογα με τα ποσοστά έκφρασης της PC2 [12]. Η «κυκλοφορία» και τοπολογία της PC1 μέσα στο κύτταρο επηρεάζεται από διάφορους τύπους μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ΑΕΠΝΝ, εμποδίζοντας κυρίως τη σταθερή σύνδεση των διαμεμβρανικών υποδοχέων 10 και 11 με την κυτταρική μεμβράνη [4]. Επίσης, η μεταφορά της PC1 στην πλευρική επιφάνεια διακόπτεται στα κύτταρα που έχουν ανεπάρκεια του γονιδίου TSC2 (Tuberous sclerosis complex 2) του συμπλέγματος οζώδους σκλήρυνσης, περιορίζοντας την PC1 στη συσκευή Golgi, κάτι που αναστρέφεται με την εκ νέου έκφραση του TSC2 [13].

1.2.3 Έκφραση και ιστική κατανομή

Η PC1 εκφράζεται ευρέως σε ένα μεγάλο φάσμα ιστών του ανθρώπινου οργανισμού. Έχει ανιχνευθεί σε κυτταρικά εκχυλίσματα και σε ιστούς στο θύμο αδένα, στο δωδεκαδάκτυλο, στην καρδιά, στις αμυγδαλές, στο έντερο, στον σπλήνα, στο θυρεοειδή αδένα, στους πνεύμονες, στους όρχεις, στο στόμαχο, στο ήπαρ, στο αγγειακό ενδοθήλιο, κλπ. Η έκφραση περιορίζεται συνήθως στα επιθηλιακά κύτταρα κάθε ιστού, όπως στο ουροθήλιο της ουροδόχου κύστης, στο επιθήλιο των ηπατικών χοληφόρων, του μαστού και του παγκρέατος [10]. Πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης έχουν διαπιστωθεί στον εγκεφαλικό φλοιό, ενώ τα επίπεδα στον νεφρικό ιστό χαρακτηρίζονται από διάμεσα επίπεδα έκφρασης [14].

Η έκφραση της PC1 εντοπίζεται σε επιθηλιακά κύτταρα κατά τον σχηματισμό του νεφρού, που προέρχονται είτε από το νεφρογενές μεσέγγυμα είτε από την ουρητηρική καταβολή [14]. Στον διαφοροποιημένο νεφρικό ιστό ισχυρή έκφραση παρατηρείται στα νεφρικά σωληνάκια του φλοιού γύρω από το σπείραμα, στο άπω εσπειραμένο σωληνάριο, στην αγκύλη του Henle και στα αθροιστικά σωληνάκια, ένα πρότυπο έκφρασης που φαίνεται να εγκαθιδρύεται κατά τα τελευταία στάδια της νεφρογένεσης [14, 15]. Ασθενής έκφραση έχει παρατηρηθεί και στο αγγειακό ενδοθήλιο [10]. Διεξοδική μελέτη της έκφρασης της PC1 έχει γίνει στην ΑΕΠΝΝ, όπως αναμενόταν, όπου η έκφραση περιορίζεται και εδώ στα επιθηλιακά σωληναρικά κύτταρα και ανιχνεύεται στο 70-100% των κύστεων. Η διαφορά είναι ότι σε αρκετές μελέτες υπάρχει σαφής αύξηση στην ένταση της έκφρασης στα επιθηλιακά κύτταρα που σχηματίζουν τις παθολογικές κύστες, αν και ανάμεσα σε αυτά η ένταση της έκφρασης διαφοροποιείται πολλαπλά [10, 15].

1.2.4 Λειτουργία

Η PC1 λειτουργεί ως μηχανοαισθητήριο μόριο που αντιλαμβάνεται τα εξωκυττάρια, μηχανικής φύσεως, ερεθίσματα και διαμορφώνει ανάλογα την κυτταρική απόκριση ρυθμίζοντας κυρίαρχες κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση [16]. Η PC1 λειτουργεί, κυρίως, ως ένας άτυπος υποδοχέας συζευγμένος με τις G πρωτεΐνες. Όταν η PC1 εκφράζεται μόνη της, φαίνεται να ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια με απευθείας σύνδεση και ενεργοποίηση με τις ετεροτριμερείς Gαί/ο πρωτεΐνες.

Ακολουθεί τροποποίηση των κατιοντοεκλεκτικών διαύλων ασβεστίου (Ca^{2+}) και καλίου (K^+) GIRK (G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels) μέσω της απελευθέρωσης των Gβγ υπομονάδων [17, 18]. Με βάση αυτόν τον μηχανισμό φαίνεται να πρωταγωνιστεί στις διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις, καθώς και στις αλληλεπιδράσεις με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, ενώ έχει βρεθεί να σχηματίζει πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα με πρωτεΐνες εστιακής προσκόλλησης, όπως η p130cas, η FAK (focal adhesion kinase), η paxillin, η p-p60c-src (phospho p60 cellular-src) και με μόρια προσκόλλησης διακυτταρικής επικοινωνίας όπως η E-cadherin, η β- και η γ-catenin [19].

Η PC1 σχηματίζει λειτουργικά σύμπλοκα με πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες τροποποιώντας, μέσω φωσφορυλίωσης, την ενεργότητά της. Έχει βρεθεί ότι η PC1 φωσφορυλιώνεται στο καρβοξυτελικό της άκρο από την πρωτεϊνική κινάση A (protein kinase A, PKA) [20]. Επίσης, η πρώτη PKD περιοχή της PC1 αλληλεπιδρά με την Ig (immunoglobulin) περιοχή του πρωτεϊνικού υποδοχέα τυροσινικής φωσφατάσης RPTP ζ (receptor protein tyrosine phosphatase ζ) και οι καρβοξυτελικές περιοχές με τον RPTP γ (receptor protein tyrosine phosphatase γ). Με αυτόν τον τρόπο ο RPTP γ αποφωσφορυλιώνει την PC1 στη θέση Y4237 και τροποποιεί πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, π.χ. με την PC2, και επαγόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια [21]. Παρομοίως, η PC1 αλληλεπιδρά και αποφωσφορυλιώνεται από την φωσφατάση PP-1a (protein phosphatase- 1a) και η αλληλεπίδραση αυτή εξασθενεί σημαντικά σε μεταλλάξεις της PC1 που έχουν σχέση με την ΑΕΠΝΝ [22].

Η PC1 εκφράζεται και στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων όπου παίζει κύριο μηχανοευαίσθητο ρόλο. Φαίνεται ότι η ομοιοστατική ρύθμιση της PC1, όσον αφορά στην τοπολογία και τη λειτουργία της, είναι προαπαιτούμενη για τη μεταβίβαση της εξωκυττάριας διαμηκτικής τάσης λόγω ροής, τη μετατροπή της σε ενδοκυττάρια σηματοδότηση μέσω αλλαγής της συγκέντρωσης του ασβεστίου και τη βιοχημική σύνθεση ενός σημαντικού αγγειοδιασταλτικού παράγοντα, του μονοξειδίου του αζώτου (nitric oxide, NO) [23].

Η PC1 ρυθμίζει κυτταρικές λειτουργίες μέσω ενεργοποίησης βασικών μεταγραφικών παραγόντων. Η PC1 ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης JAK2 (janus activating kinase 2), γεγονός που οδηγεί σε φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης και ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η πρωτεολυτική διάσπαση του καρβοξυτελικού άκρου της PC1, όμως, και η μετανάστευσή του στον πυρήνα αποτρέπει την απευθείας ενεργοποίηση του STAT3, ενώ η διασπασμένη καρβοξυτελική ουρά λειτουργεί ως συνενεργοποιητής του STAT3 με τη συνδρομή κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων. Συνεπώς, η PC1 εμφανίζει διττό ρόλο στο μηχανισμό ενεργοποίησης του συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα [24]. Διαφορετικό παράδειγμα ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης μέσω της PC1 είναι η ενεργοποίηση του οστεοειδικού μεταγραφικού παράγοντα Runx2. Η υπερέκφραση του καρβοξυτελικού άκρου ενεργοποιεί τον υποκινητή του Runx2 στους οστεοβλάστες μέσω ρύθμισης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου [25].

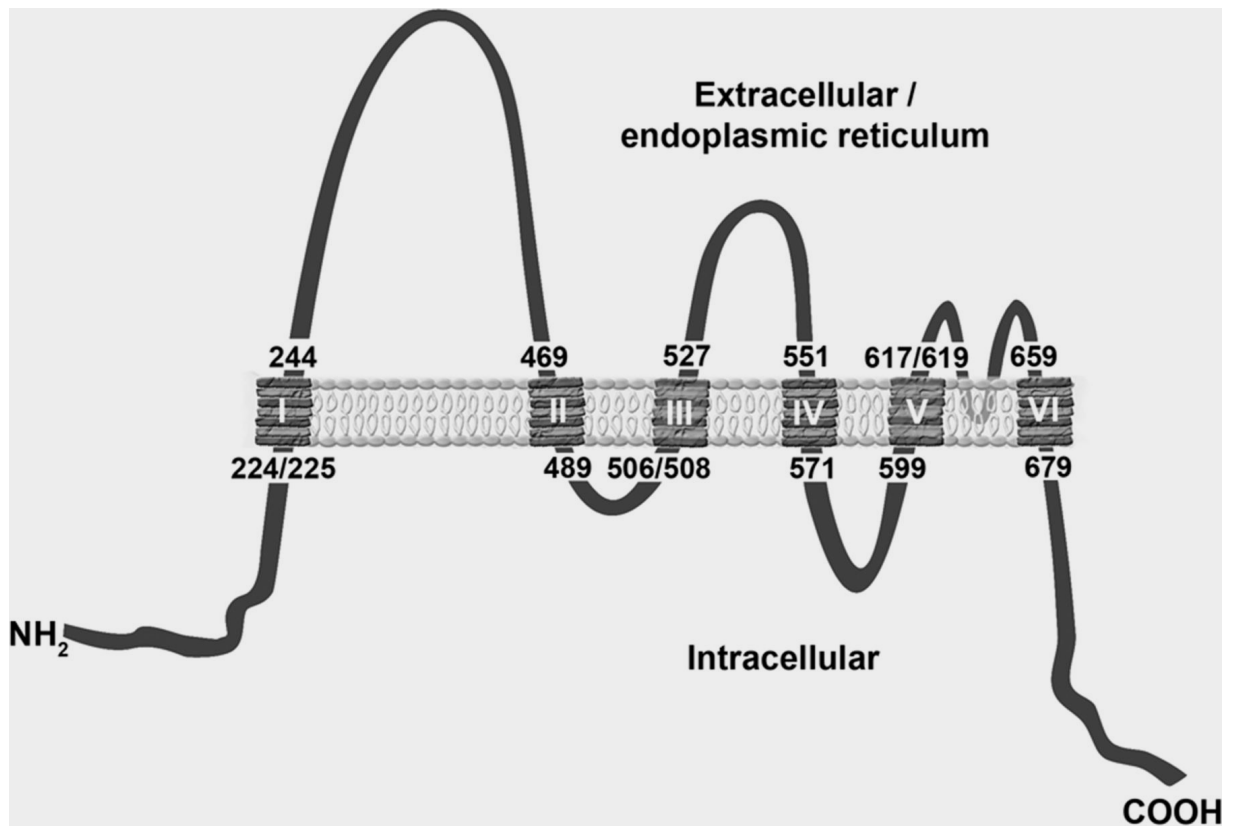
Μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας έδειξε, επίσης, ότι η PC1, σε οστεοβλαστικού τύπου κύτταρα PDL που υποβλήθηκαν σε μηχανική διέγερση, ενεργοποιεί τη γονιδιακή έκφραση του Runx2 μέσω του άξονα καλσινευρίνης/NFAT (nuclear factor of activated T-cells) ενισχύοντας το ρόλο της PC1 στη σκελετογένεση και στην εν γένει ρύθμιση της οστικής ανάπτυξης [26].

Σημαντικός θεωρείται ο ρόλος που παίζει το καρβοξυτελικό άκρο της PC1 στη λειτουργία της πρωτεΐνης. In vivo πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν ότι η PC1 στα νεφρικά σωληναριακά κύτταρα, υπό την εφαρμογή μηχανικών ερεθισμάτων, υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση στο καρβοξυτελικό της άκρο, το οποίο μεταναστεύει στον πυρήνα και ενεργοποιεί σηματοδοτικές διαδικασίες [27]. Το καρβοξυτελικό άκρο της PC1 περιέχει επίσης μοτίβα που επηρεάζουν τη μορφή και την τοπολογία του δικτύου των μικροσωληνίσκων και του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) [28]

1.3 Πολυκυστίνη-2

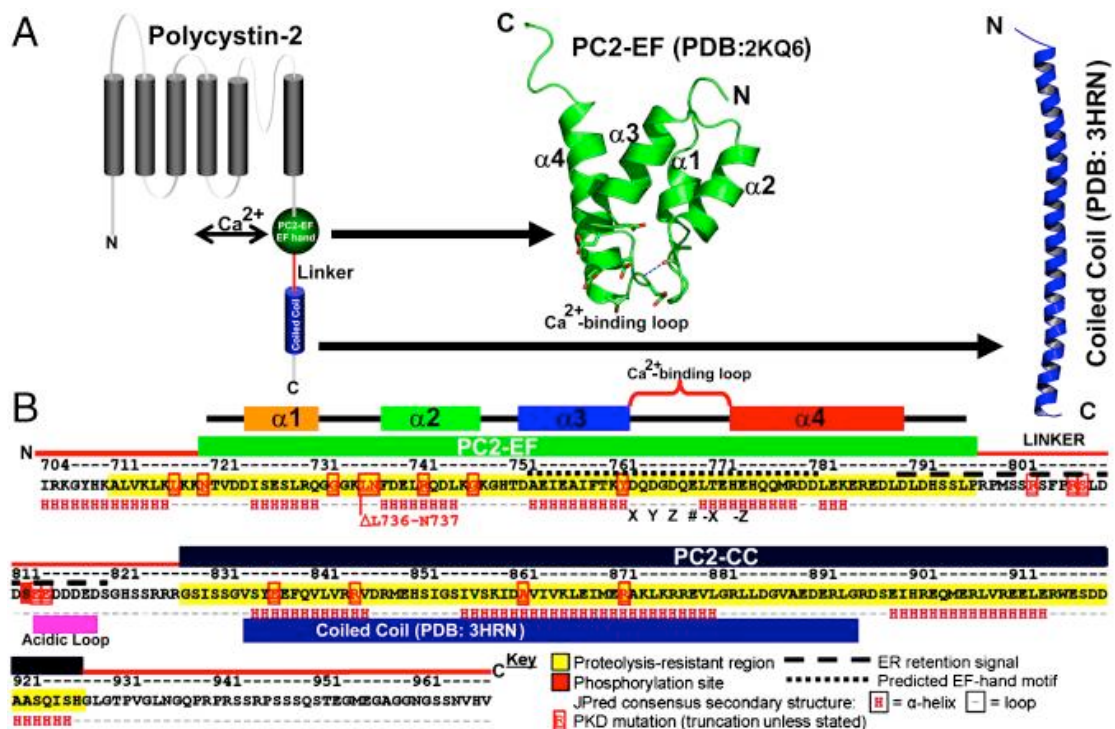
1.3.1 Δομή

Η PC2 είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελείται από 968 αμινοξέα και έχει προβλεπόμενο μοριακό βάρος περίπου 110 kDa. Αποτελεί το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου PKD2, που εδράζεται στο χρωμόσωμα 4q21-23 και έχει υπολογιστεί ότι διαθέτει μια αλληλουχία περίπου 5057 ζευγών βάσεων [29]. Το γονίδιο PKD2 διαθέτει 21% ταυτόσημη και 46% ομόλογη αλληλουχία με τα αμινοξέα 3688-4109 του PKD1 [30]. Η PC2 διαθέτει έξι διαμεμβρανικές περιοχές, ένα αμινοτελικό και ένα καρβοξυτελικό άκρο. Οι βρόχοι 1, 3 και 5 των διαμεμβρανικών περιοχών εκτείνονται μέσα στον αυλό του ΕΔ, όταν η PC2 εντοπίζεται στη μεμβράνη του ΕΔ, ή στον εξωκυττάριο χώρο, όταν η PC2 εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη, ενώ οι βρόχοι 2 και 4 εκτείνονται μέσα στο κυτταρόπλασμα. Αυτή ακριβώς η διάταξη ευνοεί και την προσέγγιση που θέλει τα δύο άκρα της πρωτεΐνης να βρίσκονται μέσα στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 1.3-1) [31].



Εικόνα 1.3-1 Προβλεπόμενη δομή της ανθρώπινης PC2 [31].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το καρβοξυτελικό άκρο της PC2, για το οποίο οι βιοφυσικές αναλύσεις και η μοριακή μοντελοποίηση έχουν δείξει ότι αποτελείται από τρεις λειτουργικές περιοχές. Η πρώτη είναι το λεγόμενο «χέρι EF» (EF hand) (PC2-EF), που είναι μια γνωστή δομική περιοχή τύπου έλικας-βρόχου-έλικας, ειδική για τη δέσμευση ιόντων ασβεστίου. Η δεύτερη είναι μια ευέλικτη περιοχή σύνδεσης (linker) και η τρίτη ένα μοτίβο με τη μορφή σπειροειδούς πηνίου που αποτελεί και την καταλυτική περιοχή διμερισμού της πρωτεΐνης. Συνεπώς, η PC2-EF περιοχή αποτελεί έναν αισθητήρα για τα ιόντα ασβεστίου και υφίσταται μεταβολές διαμόρφωσης που εξαρτώνται από τη συγκεκριμένη λειτουργία (Εικόνα 1.3-2) [32].



Εικόνα 1.3-2 Μοριακή αρχιτεκτονική της PC2 και του καρβοξυτελικού άκρου. Οι τρεις λειτουργικές περιοχές στο καρβοξυτελικό άκρο της PC2: η περιοχή PC2-EF, η περιοχή σύνδεσης (linker) και η περιοχή με τη μορφή σπειροειδούς πηνίου (coiled coil) [32].

Συμβατή με την ένταξη της PC2 στην οικογένεια των TRP καναλιών είναι η δυνατότητά της να διατάσσεται σε ομο- ή ετερο-πολυμερή σύμπλοκα. Πέρα από την PC1, με την οποία η PC2 σχηματίζει ετεροδιμερή, η PC2 σχηματίζει ετεροδιμερή με διαφορετικά μέλη της οικογένειας των TRP καναλιών, όπως με το κανάλι TRPC1. Εκτός, όμως, από την περιοχή που καταλύει το διμερισμό της πρωτεΐνης στην περιοχή coiled coil του καρβοξυτελικού άκρου, έχει ανιχνευθεί και χαρακτηριστεί λειτουργικά και νέα περιοχή διμερισμού στο αμινοτελικό άκρο της PC2 (NT2-1-223, L224XH). Αυτό ακριβώς το εύρημα έχει διαμορφώσει ένα μοντέλο συνάθροισης των μορίων της PC2 ως ένα λειτουργικό ομο-τετραμερές, που εξαρτάται από τη λειτουργία και των δύο, αμινο- και καρβοξυτελικών, περιοχών διμερισμού της πρωτεΐνης [33].

Πρόσφατη μελέτη επιβεβαίωσε την τετραμερή διαμόρφωση της PC2 ως μια σταθερή και λειτουργική δομή της πρωτεΐνης, ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι ιόντων ασβεστίου, και έδειξε ότι μόνο η καρβοξυτελική περιοχή ολιγομερισμού είναι ικανή για την διαμόρφωση του τετραμερούς [34].

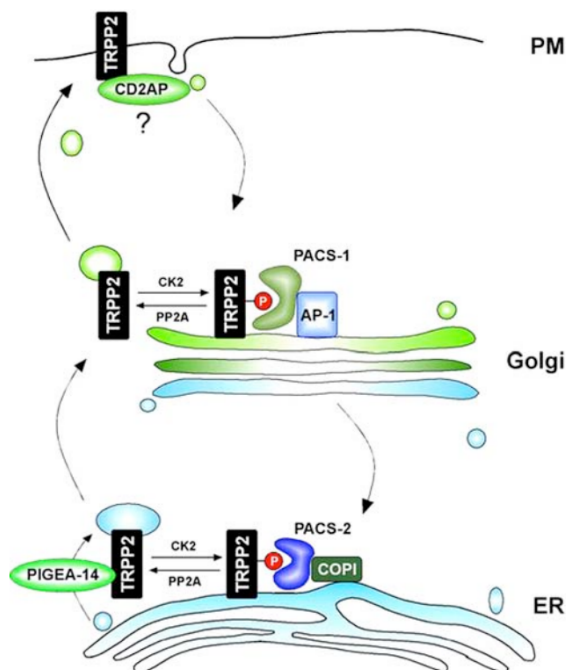
1.3.2 Κυτταρική εντόπιση

Η PC2 εντοπίζεται κυρίως στο ΕΔ, στην κυτταρική μεμβράνη και στους πρωτογενείς κροσσούς [9]. Επίσης, η PC2 έχει εντοπιστεί στη μιτωτική άτρακτο και στο κεντρόσωμα σε κύτταρα υπό διαίρεση και σε κύτταρα σε ηρεμία αντίστοιχα [35]. Πειράματα ανίχνευσης της PC2 με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας σε διαφοροποιημένο νεφρικό ιστό, αλλά και πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας σε κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι η PC2 εντοπίζεται κυρίως στη βασική και στις πλευρικές επιφάνειες των επιθηλιακών κυττάρων [36]. Μελέτες ανοσοφθορισμού σε κυτταρικές σειρές διαμολυσμένες με το γονίδιο PKD2 έδειξαν ένα διακριτό κυτταροπλασματικό και περιπυρηνικό πρότυπο έκφρασης, το οποίο συνάδει με την εντόπιση της PC2 στο ΕΔ. Το γεγονός ότι η PC2 εδράζεται κυρίως στο ΕΔ επιβεβαίωσε ο διπλός ανοσοφθορισμός έναντι επιτόπων της PC2 και της πρωτεΐνης-δείκτη του ΕΔ PDI (protein disulfide isomerase). Τα ευρήματα έδειξαν σημαντική αλληλοεπικάλυψη των δύο πρωτεϊνών αποδεικνύοντας την ειδική εντόπιση της PC2 στο ΕΔ, με το καρβοξυτελικό άκρο της να αποδεικνύεται ως λειτουργικός ρυθμιστής της συγκεκριμένης εντόπισης [37, 38]. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι το καρβοξυτελικό άκρο της PC2 φέρει ένα μοτίβο δέσμησης της PC2 στο ΕΔ (ER retention motif), ενώ μια σειρά από μελέτες με ελλειπτικές μορφές της PC2, όπου έλειπε το αντίστοιχο μοτίβο, δείχνει ότι η πρωτεΐνη μεταναστεύει και εκφράζεται στην κυτταρική μεμβράνη. Οι διαφορές στα ευρήματα που αφορούν στην έκφραση της PC2 φαίνεται να οφείλονται στην ιστο-ειδική έκφρασή της, στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων που μελετώνται και στα διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης των κυττάρων [9].

Η μετανάστευση της PC2 σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα εξαρτάται από αλληλεπιδράσεις τύπου πρωτεΐνης-πρωτεΐνης που ρυθμίζουν δυναμικά και ελέγχουν στενά τις δεξαμενές PC2 ανάμεσα, κυρίως, στο ΕΔ και στην κυτταρική μεμβράνη [9]. Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα είναι οι πρωτεΐνες-προσαρμογείς PACS-1 και PACS-2 (phosphofurin acidic cluster sorting protein 1, 2), οι οποίες αναγνωρίζουν ένα όξινο σύμπλεγμα στο καρβοξυτελικό άκρο της PC2 και κατευθύνουν την τοπολογία της PC2. Η δέσμευσή της στις PACS-1 και PACS-2 εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση της PC2 στη σερίνη 812 (Ser812) από την πρωτεϊνική κινάση CK2 (casein kinase 2), ενώ μεταλλαγμένες μορφές της PC2 που

δεν δεσμεύονται στις πρωτεΐνες-προσαρμογείς, καθώς και η αναστολή της CK2, οδηγούν στη μεταφορά της PC2 στην κυτταρική μεμβράνη, όπου λειτουργεί ως διάυλος ιόντων ασβεστίου.

Η διαδικασία μετανάστευσης της PC2 στην κυτταρική μεμβράνη φαίνεται να είναι μια διαδικασία δύο σταδίων, όπου στο πρώτο στάδιο ελέγχεται από την PACS-2 στο ΕΔ και στο δεύτερο στάδιο από την PACS-1 στο σύστημα Golgi [9, 39, 40]. Η κυτταρική κατανομή της PC2, όμως, εξαρτάται και από τη φωσφορυλίωσή της στη θέση Ser76/Ser80 του αμινοτελικού άκρου της από την κινάση συνθετάσης του γλυκογόνου GSK3 (glycogen synthase kinase 3), που είναι σημαντική *in vivo* και *in vitro* για τη διατήρηση της φυσιολογικής σπειραματικής και σωληναριακής μορφολογίας του νεφρού [41]. Επίσης, η PIGEA-14 (polycystin-2 interactor, Golgi- and endoplasmic reticulum-associated protein) είναι μια ακόμη πρωτεΐνη που αναγνωρίστηκε ως ρυθμιστής της ενδοκυττάριας τοπολογίας της PC2 που κατευθύνει τη μεταφορά της PC2 από το ΕΔ στο σύστημα Golgi (Εικόνα 1.3-3) [42].



Εικόνα 1.3-3 Μοντέλο «κυκλοφορίας» της PC2 στο κύτταρο. Η PC2 φωσφορυλιώνεται από την CK2 και δεσμεύεται από την PACS-2 που την επαναφέρει στο ΕΔ. Η αποφωσφορυλίωση της PC2 από την φωσφατάση PP2A και η απελευθέρωσή της από τις PACS επιτρέπει τη μεταφορά της στην κυτταρική μεμβράνη. Η PACS-1 διευκολύνει την υποχώρηση της PC2 στη συσκευή Golgi, ενώ η PIGEA-14 την μεταφορά από το ΕΔ στη συσκευή Golgi [9].

1.3.3 Έκφραση και ιστική κατανομή

Η PC2 έχει ανιχνευθεί στους περισσότερους εμβρυικούς και διαφοροποιημένους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού. Στους διαφοροποιημένους ιστούς η υψηλότερη έκφραση σε επίπεδο mRNA παρατηρείται στο μυοκάρδιο, στους νεφρούς και στο πάγκρεας. Στους εμβρυικούς ιστούς υψηλή είναι η έκφραση στους πνεύμονες και στους νεφρούς [43].

1.3.4 Λειτουργικός Ρόλος

Η PC2 ανήκει, όπως αναφέρθηκε, στην οικογένεια των διαύλων TRP, οι οποίοι σε κυτταρικό επίπεδο λειτουργούν κάτω από την φωσφολιπάση C (phospholipase C, PLC) ως αισθητήρες του κυττάρου, που ενεργοποιούνται από ένα ευρύ φάσμα ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων ερεθισμάτων [44]. Η PC2 διαφοροποιεί τη λειτουργία της ανάλογα με το διαμέρισμα του κυττάρου στο οποίο εντοπίζεται κάθε φορά. Στο ΕΔ βρέθηκε για πρώτη φορά η PC2 να λειτουργεί ως ένας νέος διάυλος ιόντων ασβεστίου, ο οποίος ενεργοποιείται ως απόκριση στην αύξηση αποκλειστικά της ενδοκυττάριας συγκέντρωσής του, όχι όμως της εξωκυττάριας. Στην ίδια μελέτη, στη νεφρική επιθηλιακή κυτταρική σειρά LLC-PK1, φαίνεται ότι η υπερέκφραση του PKD2 ενισχύει την ένταση και τη διάρκεια της παροδικής απελευθέρωσης ιόντων ασβεστίου που επάγεται από τους υποδοχείς GPCR [45]. Περισσότερες μελέτες επιβεβαίωσαν τη θεώρηση αυτή, αφού η PC2 βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την ισομορφή 1 του διαύλου ιόντων ασβεστίου IP3R1 (inositol triphosphate receptor) ενισχύοντας περισσότερο τη διάρκεια παρά την ένταση της παροδικής απελευθέρωσης ασβεστίου [46].

Συνεπώς, αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι η PC2 λειτουργεί αποκλειστικά ως διάυλος απελευθέρωσης ασβεστίου που επάγεται από την ίδια την ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου.

Η PC2 εκφράζεται λειτουργικά στην κυτταρική μεμβράνη, όπου φαίνεται ότι από μόνη της δεν έχει την ικανότητα σχηματισμού ενός λειτουργικού διαύλου παρά μόνο με τη συνδρομή της PC1 [47]. Η συνδρομή της PC1 δεν περιορίζεται μόνο στο σχηματισμό του διαύλου, αλλά είναι αυτή η συνοδός πρωτεΐνη (chaperone) που διευκολύνει τη μεταφορά της PC2 στην κυτταρική μεμβράνη [47]. Παρά τις μικρές διαφορές ανάμεσα στα ευρήματα των μελετών που ακολούθησαν το συμπέρασμα

ήταν ότι η PC2 μπορεί να σχηματίσει έναν λειτουργικό διάυλο στην κυτταρική μεμβράνη που ενεργοποιείται συνεχώς όταν αυτή υπερεκφράζεται, επιτρέποντας τη μη εκλεκτική δίοδο κατιόντων με ελαφρώς αυξημένη εκλεκτικότητα για τα ιόντα ασβεστίου σε σχέση με τα ιόντα καλίου (K⁺) και νατρίου (Na⁺) και με υψηλότερη αγωγιμότητα για το κάλιο [48, 49]. Τη συνδρομή της PC1 χρειάζεται η PC2 και στους πρωτογενείς κροσσούς, όπου και οι δύο πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για την πυροδότηση της σηματοδότησης μέσω ιόντων ασβεστίου επαγόμενη από τη ροή υγρού στα νεφρικά σωληνάρια [58]. Διαφορετικές μελέτες όμως δείχνουν ότι η PC2 μπορεί να λειτουργήσει ανεξάρτητα από την PC1 στους πρωτογενείς κροσσούς, κάτι που συνάδει με την απουσία έκφρασης της PC1 στους πρωτογενείς κροσσούς του εμβρυικού κόμβου [23]. Η μεταφορά της PC2 στις μιτωτικές ατράκτους από την πρωτεΐνη *mdia1* (*diaphanous related formin1*) μέσω φυσικών αλληλεπιδράσεων υποδηλώνει τον πιθανό ρόλο της PC2 στη σηματοδότηση του ασβεστίου όσον αφορά στα κύτταρα που διαιρούνται, ενώ η ανεύρεσή της στο κεντρόσωμα την πιθανή λειτουργία της ως ρυθμιστής μαζί με παράγοντες του συστήματος της ενδομαστιγιακικής μεταφοράς του κυττάρου (*intraflagellar transport*, IFT) στο σχηματισμό των πρωτογενών κροσσών [35].

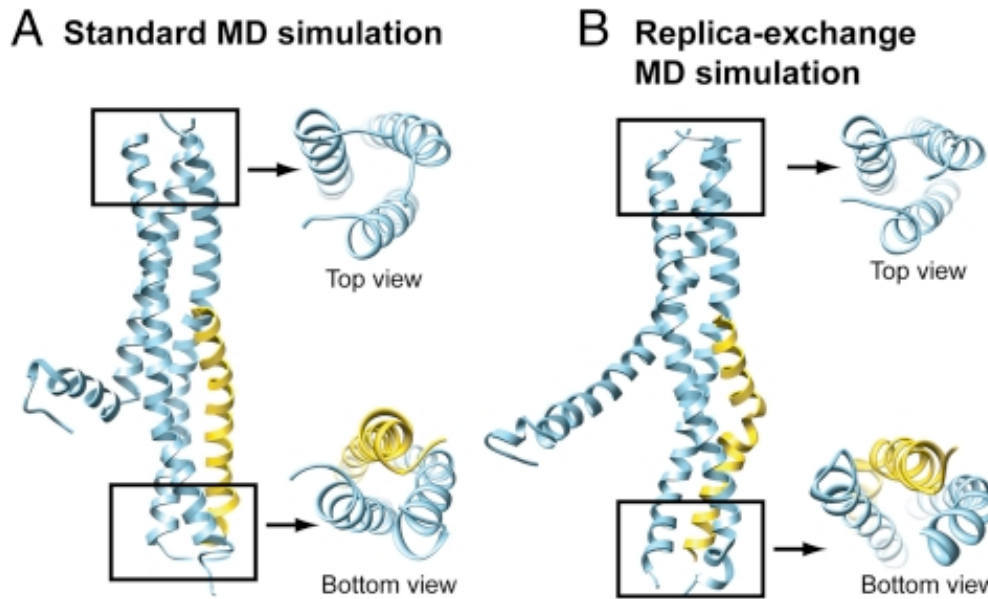
Η PC2 ενεργοποιείται και λαμβάνει σήματα μεταφοράς της στην κυτταρική μεμβράνη όχι μόνο από την PC1 [17], αλλά και από άλλους παράγοντες όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας EGF (*epidermal growth factor*). Η PC2 ενεργοποιείται ως απόκριση της διέγερσης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR (*epidermal growth factor receptor*) στην κυτταρική σειρά LLC-PK1 [50]. Ο EGF ενεργοποιεί την PC2 μέσω της δραστηριότητας της $\gamma 2$ ισομορφής της PLC (PLC- $\gamma 2$) και της κινάσης 4,5 τρι-φωσφο-ινοσιτολης PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*), καθώς και της παράλληλης μείωσης της δραστηριότητας του φωσφολιπιδίου PIP2 (*phosphatidylinositol 4,5-biphosphate*) [50].

1.4 Η λειτουργία των πολυκυστινών ως πρωτεϊνικό σύμπλοκο

Είναι αποδεκτό πλέον ότι οι PC1 και PC2 αναπτύσσουν φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους μέσω του καρβοξυτελικού άκρου τους και σχηματίζουν ετεροδιμερή σύμπλοκα *in vivo* στην κυτταρική μεμβράνη. Αυτή η «συνάθροιση» καταλήγει στο σχηματισμό μη εκλεκτικών διαύλων κατιόντων που είναι διαπερατή για τα ιόντα ασβεστίου. Φαίνεται ότι η PC2 παραμένει μέσα στο κυτταρόπλασμα σε

απουσία της PC1 και μεταναστεύει στην κυτταρική μεμβράνη μόνο όταν η PC1 είναι παρούσα [47, 51]. Για αρκετό διάστημα κυριαρχούσε το ερώτημα αν η PC1 αποτελεί ένα λειτουργικό συστατικό αυτού του συμπλέγματος ή αν απλά παίζει το ρόλο μιας συνοδού πρωτεΐνης (chaperone) για τη μεταφορά της PC2 στη μεμβράνη. Επόμενες μελέτες έδειξαν ότι η PC1 ενεργοποιεί και σταθεροποιεί την PC2. Μεταλλάξεις στις περιοχές αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο πρωτεϊνών – δηλαδή η μετάλλαξη R742X στην PC2 και μετάλλαξη στο μοτίβο σπειροειδούς πηνίου (coiled coil) στην PC1 – έχουν ως συνέπεια αμοιβαίες επιδράσεις με σκοπό τη ρύθμιση και τη σταθεροποίηση των δύο πρωτεϊνών [52]. Για παράδειγμα, η PC2 ανταγωνίζεται την ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών από την PC1. Η PC1 λειτουργεί, όπως είδαμε και προηγουμένως, ως ένας ανεξάρτητος ενεργοποιητής των πρωτεϊνών τύπου Gi/o μέσω απελευθέρωσης των υπομονάδων Gβγ. Η έκφραση ολόκληρης της PC2 μαζί με την PC1 σε καλλιέργειες νευρικών κυττάρων εμπόδισε αυτό το αποτέλεσμα υποδηλώνοντας ότι πιθανές μεταλλάξεις στις περιοχές αλληλεπίδρασης μπορούν να οδηγήσουν στην ακατάληπτη ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών από την PC1 [53].

Η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών στην επιφάνεια του κυττάρου, όμως, αποδείχθηκε ότι δεν υφίσταται ως σχηματισμός απλά ετεροδιμερών που επαναλαμβάνονται. Με τη χρησιμοποίηση βιοχημικών μεθόδων και μεθόδων κρυσταλλογραφίας διευκρινίστηκε η σύσταση των υπομονάδων σε ζώντα κύτταρα και βρέθηκε ότι η PC2 σχηματίζει ομοτριμερή (3 μόρια PC2) μέσω ενός μοτίβου σπειροειδούς πηνίου στην πρωτεΐνη, και το ομοτριμερές με τη σειρά του συνδέεται με 1 μόριο PC1 μέσω αυτή τη φορά του μοτίβου σπειροειδούς πηνίου της PC1. Μεταλλάξεις που διακόπτουν το ομοτριμερές της PC2 οδηγούν όχι μόνο σε διάσπασή του αλλά και σε διάσπαση του συμπλόκου που περιέχει την PC1, καθώς και σε περιορισμό της έκφρασης και των δύο πρωτεϊνών στην επιφάνεια του κυττάρου [54]. Επιπλέον, έχει προταθεί και ένα δεύτερο μοντέλο κατά το οποίο η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών υφίσταται ως ένα δι-τριμερές κατά το οποίο το ένα τριμερές αποτελείται από 3 μόρια PC2 και το δεύτερο από 2 μόρια PC2 και ένα μόριο PC1 πάλι μέσω αλληλεπίδρασης των μοτίβων σπειροειδούς πηνίου (Εικόνα 1.4-1) [55]



Εικόνα 1.4-1 Μοντέλο συμπλόκου PC1/PC2 στην επιφάνεια του κυττάρου. Το σύμπλοκο αποτελείται από 3 μόρια PC2 και ένα μόριο PC1 που αλληλεπιδρούν μέσω των μοτίβων coiled coil του καρβοξυτελικού άκρου τους.

Η PC2 επίσης, μέσω του καρβοξυτελικού άκρου της, επηρεάζει και σταθεροποιεί τη διάσπαση του καρβοξυτελικού άκρου της PC1 που μεταναστεύει στον πυρήνα, ενώ ευνοεί παράλληλα τη διάσπαση της PC1 στην περιοχή GPS, διαδικασίες που είναι ανεξάρτητες από τη λειτουργία της PC2 ως διάυλος ιόντων ασβεστίου [56, 57]. Άλλωστε, φαίνεται ότι οι διαφορές που παρουσιάζονται στο πρότυπο έκφρασης της PC1 μέσα στο κύτταρο οφείλονται εν μέρει στα επίπεδα έκφρασης της PC2. Όταν η PC1 εκφράζεται μόνη της ανιχνεύεται στην κυτταρική μεμβράνη και στο ΕΔ, ενώ η συν-έκφραση με υψηλά επίπεδα PC2 οδηγεί σε αποκλειστική έκφραση της PC1 στο ΕΔ μαζί με την PC2 [12].

Τα νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι μεταξύ των δύο πρωτεϊνών υπάρχει, πιθανώς, μία ανταγωνιστική σχέση κατά την οποία η κάθε πρωτεΐνη υποβάλει την άλλη σε έλεγχο. Η PC2 φέρει έναν μεγάλο αριθμό θέσεων για φωσφορυλίωση και μία από αυτές, η θέση Ser829, αποτελεί στόχο τόσο της PKA όσο και της κινάσης Aurora A (AurA), που ρυθμίζουν την μετανάστευση της PC2 στα διάφορα σημεία του κυττάρου. Με βάση αυτά τα δεδομένα προτείνεται ένα μοντέλο, ειδικά στην ΑΕΠΝΝ, που περιλαμβάνει την διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης της PC2 στη θέση Ser829 και η οποία εν τέλει συνδέεται με διαταραχή των επιπέδων της λειτουργικής PC1 και την αποφωσφορυλίωσή της [41].

Τέλος, οι PC1 και PC2 εμφανίζουν κοινά ρυθμιστικά στοιχεία στις περιοχές των υποκινητών στα δύο γονίδια που τις κωδικοποιούν. Η σύγκριση μεταξύ διαφορετικών ειδών όσον αφορά στις αλληλουχίες των υποκινητών έδειξε ότι υπάρχουν ομόλογες και καλά συντηρημένες περιοχές με θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και για τα δύο γονίδια. Οι μεταγραφικοί παράγοντες E2F, EGRF, Ets (E-twenty six), MZF1 (myeloid zinc finger 1), Sp1 (Specificity protein 1), και ZBP-89 (zinc-binding protein-89) αναδείχθηκαν ως δυνητικά κοινοί ρυθμιστές της έκφρασης τόσο του PKD1 όσο και του PKD2 [58].

1.4.1 Ο ρόλος των Πολυκυστινών στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

Η πολυκυστική νόσος έχει χαρακτηριστεί ως μια «μεταμφιεσμένη νεοπλασία» όπου παρατηρείται μεταξύ άλλων αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός και διαταραχή στην διαδικασία της απόπτωσης. Η παρεκκλίνουσα ρύθμιση αυτών των λειτουργιών οδηγεί στην υπόθεση ότι οι πολυκυστίνες έχουν ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στην κυτταρική διαφοροποίηση και στην απόπτωση. Τρία είναι τα βασικά σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω των οποίων οι πολυκυστίνες ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο: το μονοπάτι JAK-STAT, το μονοπάτι Id (inhibitor of DNA binding) και το μονοπάτι mTOR [1]. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια της PC1 περιλαμβάνουν τους μεταγραφικούς παράγοντες STAT1 και STAT6. Σε νεφρικά κύτταρα που υπερεκφράζουν ολόκληρη την PC1 ενεργοποιείται η κινάση JAK2 και κατ' επέκταση ο STAT1. Η ενεργοποίηση αυτή με τη σειρά της επάγει την έκφραση του αναστολέα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cyclin- dependent kinases, CDKs) p21 και διακόπτει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G0/G1. Όπως αποδείχθηκε η PC2 είναι ένας απαραίτητος συμπαράγοντας στην όλη διαδικασία [59].

Επίσης, ισχυρή είναι η σχέση των πολυκυστινών με το μονοπάτι mTOR, μια κινάση σερίνης/θρεονίνης που είναι κύριος ρυθμιστής της κυτταρικής αύξησης και του μεταβολισμού σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα [60]. Η φωσφορυλιωμένη-ενεργοποιημένη μορφή της mTOR, καθώς και του τελεστή της mTOR μεταγενέστερα στο μονοπάτι, κινάσης S6, έχουν βρεθεί αυξημένες στα επιθηλιακά κύτταρα των κύστεων ασθενών με AEΠNN και PKD1/-/- ποντικών. Η αναστολή της mTOR με χορήγηση ραπαμυκίνης μείωσε τον κυστικό φαινότυπο στα ζωικά μοντέλα [61].

Η PC1 ρυθμίζει επίσης την απόπτωση μέσω του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). Στην νεφρική

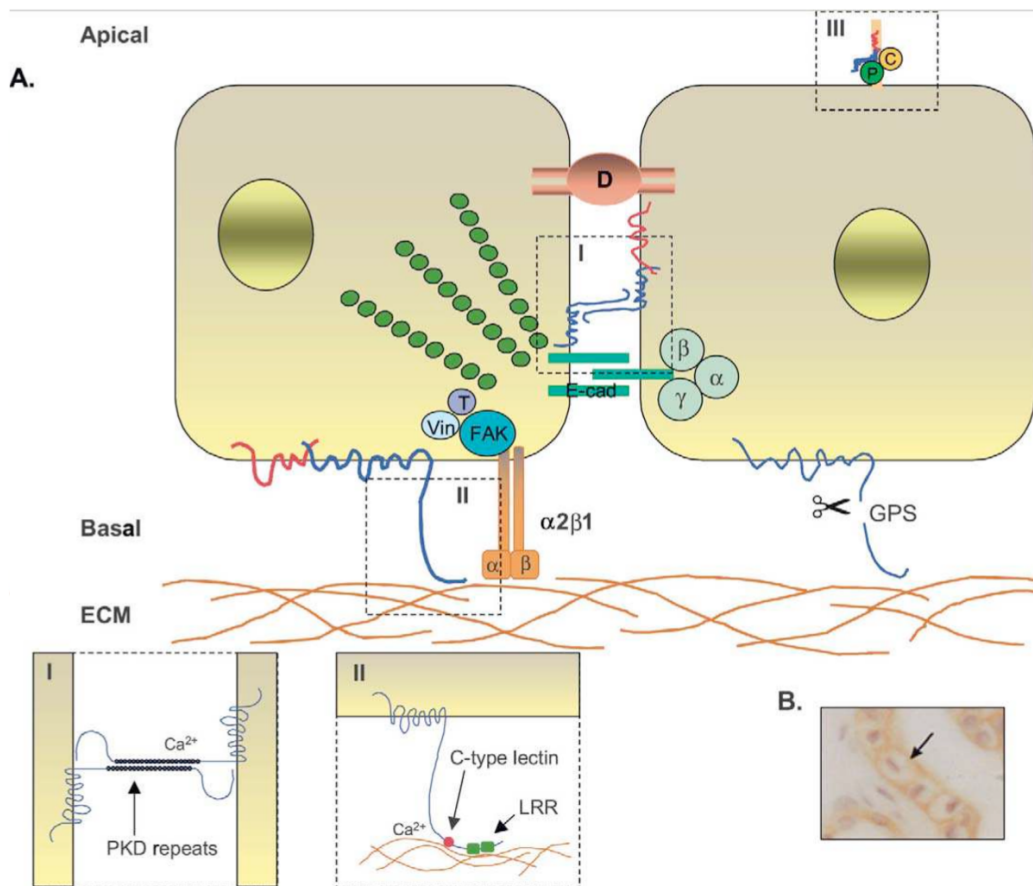
κυτταρική σειρά HEK293 η υπερέκφραση του καρβοξυτελικού άκρου οδήγησε σε ενεργοποίηση του NF-κB μέσω της PKC κινάσης και καταστολή της κυτταρικής απόπτωσης [62]. Προστασία από την απόπτωση φαίνεται να προσφέρει η PC1 μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K-Akt, καθώς και στο μοντέλο έκφρασής της στα MDCK κύτταρα [63]. Πρόσφατη μελέτη έδειξε επίσης ότι οι PC1 και PC2 προστατεύουν τα νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα από την απόπτωση ως αποτέλεσμα απόκρισης στο μηχανικό στρες και αυτή η λειτουργία διαμεσολαβείται από το άνοιγμα μηχανοευαίσθητων διαύλων καλίου (K⁺) τύπου K2p. Κατά συνέπεια καθιερώνεται πλέον μια απευθείας σχέση μεταξύ μηχανοδιέγερσης και μηχανοπροστασίας ενάντια στην απόπτωση με κύριο διαμεσολαβητή τις πολυκυστίνες [64]. Τέλος, η PC2 προστατεύει από την απόπτωση μέσω μείωσης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου στο ΕΔ [65].

1.4.2 Διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις – αλληλεπιδράσεις με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία

Σε κυτταρικά και ζωικά μοντέλα ΑΕΠΝΝ έχει κατά καιρούς ανιχνευθεί υπερπαραγωγή των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ΕΘΜ), αυξημένη τάση προσκόλλησης στο κολλαγόνο τύπου I και IV, μειωμένη κυτταρική μετανάστευση ως απόκριση στους αυξητικούς παράγοντες και αλλοιωμένη έκφραση των υποτύπων υποδοχέων ιντεγκρινών κυτταρικής προσκόλλησης. Επίσης, σε μελέτες ποντικών με απαλοιφή γονιδίων υπήρξαν αποδείξεις ότι μεταλλάξεις σε γονίδια υπεύθυνα για την κυτταρική προσκόλληση και την ΕΘΜ, όπως η λαμινίνη-5 και η τενσίνη, οδηγούν στον σχηματισμό κύστεων. Παράλληλα, οι εξωνεφρικές εκδηλώσεις της ΑΕΠΝΝ υποδηλώνουν έναν απευθείας σύνδεσμο των πολυκυστινών με την ΕΘΜ. Ενδοκρανιακά/αορτικά ανευρύσματα και διαφόρων ειδών κήλες της κοιλιακής χώρας δείχνουν ότι στην ΑΕΠΝΝ υπάρχει διαταραχή της ομοιοστατικής ρύθμισης όσον αφορά στην μηχανο-επαγόμενη απόκριση των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων και διαταραχή στη φυσιολογική παραγωγή πρωτεϊνών της ΕΘΜ στους χιτώνες των αγγείων και στο κοιλιακό τοίχωμα. Ενώ αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι οι πολυκυστίνες ρυθμίζουν τις διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις και την σύνθεση της ΕΘΜ, είναι δύσκολο να διαχωριστούν οι περιπτώσεις όπου οι πολυκυστίνες έχουν έναν πρωταρχικό ρυθμιστικό ρόλο που οδηγεί στο σχηματισμό

των κύστεων από αυτές όπου οι αλλαγές στην ΕΘΜ είναι αποτέλεσμα απλά της εξέλιξης της νόσου [66].

Η PC1 βρίσκεται σε πολλαπλές δομές εστιακής προσκόλλησης, την πρωταρχική κυτταρική δομή που διαμεσολαβεί την επικοινωνία των κυττάρων με την ΕΘΜ. Έτσι, συναντάται σε σύμπλοκα με την ταλίνη, τενσίνη, βινκουλίνη, α-ακτινίνη και με σηματοδοτικές πρωτεΐνες όπως η κινάση εστιακής προσκόλλησης FAK, η Src, η p130cas και η paxillin, τόσο στα επιθηλιακά όσο και στα λεία μυϊκά κύτταρα [67]. Παράλληλα, η PC1 βρίσκεται σε σύμπλοκα στις θέσεις διακυτταρικής επικοινωνίας μαζί με την PC1 και πρωτεΐνες όπως η E-cadherin και η β-catenin (Εικόνα 1.4-2) [68].



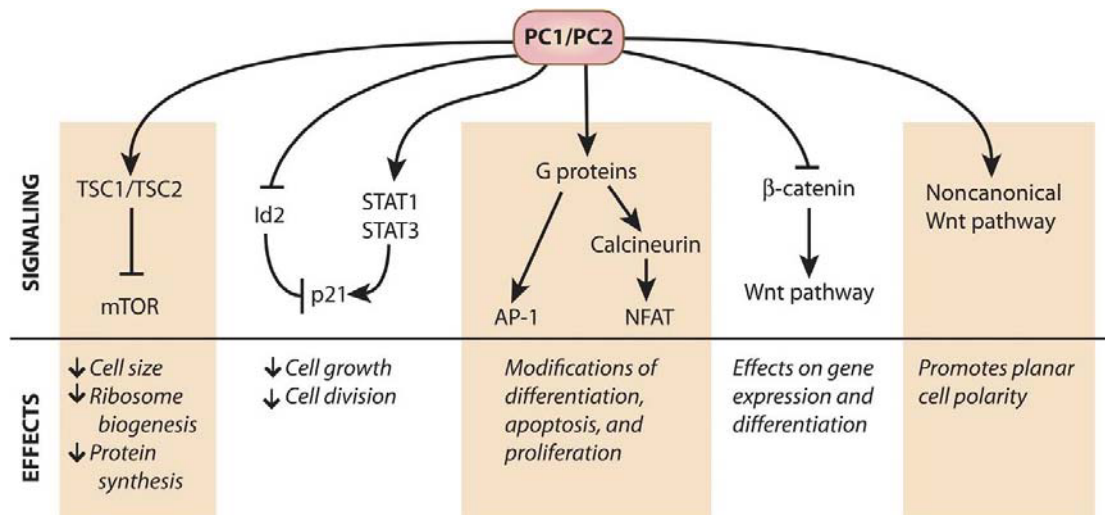
Εικόνα 1.4-2 Α) Οι πολυκυστίνες σε θέσεις I) διακυτταρικής επικοινωνίας, II) επικοινωνίας με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM). I) οι περιοχές PKD του αμινοτελικού άκρου της PC1 με πρωτεΐνες όπως η E-cadherin (E-cad) και II) οι περιοχές C-type lectin και LRR του αμινοτελικού άκρου της PC1 με πρωτεΐνες όπως

η FAK, η βινκουλίνη (Vin), η ταλίνη (T) και οι ιντεγκρίνες ($\alpha 2\beta 1$) παίζουν ρόλο στη διακυτταρική και στην επικοινωνία με την ΕΘΜ

1.5 Ο ρόλος των πολυκυστινών στην πολυκυστική νόσο των νεφρών

Η αυτοσωμική πολυκυστική νόσος των νεφρών είναι μια κληρονομική συστηματική διαταραχή με σοβαρές νεφρικές εκδηλώσεις και, σε ορισμένες περιπτώσεις, ανωμαλίες στο ήπαρ, στο πάγκρεας, στον εγκέφαλο, στα αρτηριακά αιμοφόρα αγγεία ή σε συνδυασμό αυτών των οργάνων. Κάθε χρόνο 300.000-600.000 άνθρωποι στις ΗΠΑ διαγιγνώσκονται, ανεξαρτήτως φύλου ή φυλής, με τη συχνότητα να είναι 1:1000 περίπου διεθνώς και το 50% των ασθενών να οδηγούνται σε νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου μέχρι 60 ετών [69,70]. Στο 5% των περιπτώσεων η ΑΕΠΝΝ εμφανίζεται ως αυτόματη μετάλλαξη, ενώ στο των νέων περιπτώσεων δεν αναφέρεται οικογενειακό ιστορικό της νόσου. Οι προσβεβλημένοι ασθενείς έχουν πολυάριθμες κύστεις στους νεφρούς που μπορούν να αποτελέσουν εστία λοίμωξης ή αιμορραγικής συλλογής μετά από τραυματισμό [71]. Το 85% των περιπτώσεων οφείλονται σε μεταλλάξεις του PKD1, ενώ οι υπόλοιπες σε μεταλλάξεις του PKD2 γονιδίου [70]. Συγκεκριμένα, στη χώρα μας, μελέτη σε 53 ελληνικές οικογένειες αποκάλυψε 8 πιθανές μεταλλάξεις αιτιολογικές για τη νόσο, από τις οποίες οι 5 ήταν απαλοιφές και οι 3 αφορούσαν αντικατάσταση αμινοξέων στην περιοχή REJ του PKD1 [69].

Στην κυτταρική βιολογία της νόσου οι «προβληματικές» πολυκυστίνες συμμετέχουν κυρίως μέσω διαταραχής στη ρύθμιση και στην ενεργοποίηση των ίδιων σηματοδοτικών μονοπατιών με τα οποία συμμετέχουν στην διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης (βλ. κεφ. 1.5.2) (Εικόνα 1.11).



Εικόνα 1.11. Οι PC1 και PC2 επηρεάζουν πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια στην ΑΕΠΝΝ. Περιληπτική παράθεση της επίδρασης των πολυκυστινών στην ενδοκυττάρια μετάδοση μηνυμάτων που έχει σχέση με τον σχηματισμό ριβοσωμάτων και την πρωτεϊνική σύνθεση (mTOR), την κυτταρική αύξηση και την κυτταρική διαίρεση (STAT, Id, p21), τη διαφοροποίηση, την απόπτωση και τον πολλαπλασιασμό (G πρωτεΐνες, AP-1, NFAT, Wnt) και την επίπεδη κυτταρική πολικότητα (μη κανονικό Wnt) στην ΑΕΠΝΝ [114].

Οι νεφροί ενός ασθενή που φέρει το μεταλλαγμένο γονίδιο θα αναπτυχθούν κανονικά κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου. Κάποια στιγμή θα δημιουργηθούν οι κύστεις και τότε οι μελέτες προβλέπουν ότι τα κύτταρα που επενδύουν τις κύστεις θα έχουν χάσει και τα δύο αντίγραφα του λειτουργικού PKD1 ή PKD2 γονιδίου. Αυτό υποδηλώνει ότι είναι απαραίτητο ένα «δεύτερο χτύπημα» (second hit), δηλαδή μια δεύτερη, σωματική αυτή τη φορά, μετάλλαξη που θα οδηγήσει στην απώλεια και του δεύτερου αλληλομόρφου [69]. Η απώλεια της λειτουργίας των PC1 και PC2 κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του νεφρού προκαλεί πιο σοβαρή κυστική νόσο δείχνοντας ότι οι πολυκυστίνες έχουν σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια του έντονου κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της συνεχούς κυτταρικής διαίρεσης που χαρακτηρίζει την νεογνική περίοδο [70,71]. Επίσης, η ΑΕΠΝΝ φαίνεται ότι είναι ένα δόσο-εξαρτώμενο γεγονός που εκδηλώνει όλο και πιο σοβαρά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά όσο μειώνεται ο βαθμός λειτουργικότητας της PC1 [72].

Συνεπώς, φαίνεται ότι οι κύστεις μπορούν να δημιουργηθούν όταν το επίπεδο έκφρασης των πολυκυστινών είναι χαμηλότερο ή υψηλότερο από ένα κρίσιμο

κατώφλι που απαιτείται για την διατήρηση της φυσιολογικής διαμόρφωσης των νεφρικών σωληναρίων. Σε αυτές τις περιπτώσεις μοιάζει απίθανο να απαιτείται μόνο μια σωματική μετάλλαξη του φυσιολογικού αλληλομόρφου για την έναρξη δημιουργίας των κύστεων και κερδίζει έδαφος η θεωρία της επίδρασης της «έκφρασης κατώφλιου» και του «τρίτου χτυπήματος» που σχετίζονται με στοχαστικούς παράγοντες όπως η νεφρική βλάβη ή η ισχαιμία [73].

Στον διαφοροποιημένο και ώριμο νεφρικό ιστό που δεν πολλαπλασιάζεται, η απώλεια της ετεροζυγωτίας θα ήταν ένα γεγονός χωρίς συνέπειες αν δεν ακολουθούσε το λεγόμενο «τρίτο χτύπημα» που προσφέρει η ισχαιμική και η νεφροτοξική βλάβη, καθώς και η αντισταθμιστική νεφρική υπερτροφία πυροδοτώντας την έναρξη της κυστεογένεσης. Αυτές οι παρατηρήσεις αποκαλύπτουν εν μέρει και τον άγνωστο ρόλο των πολυκυστινών στον ώριμο νεφρικό ιστό, δηλαδή την ενορχήστρωση της σωστής εκτέλεσης της ιστικής αναγέννησης ως απάντηση στη νεφρική βλάβη [73].

1.6 Ο ρόλος των Πολυκυστινών στη καρκινογένεση

Ανάμεσα στις βιολογικές ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τα καρκινικά κύτταρα είναι η συνεχής μετάδοση μηνυμάτων που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό, την ανθεκτικότητα στην αποπτωτική διαδικασία και την ενεργοποίηση μηχανισμών επέκτασης και μετάστασης [74,75]. Η συμμετοχή των πολυκυστινών σε κυρίαρχες κυτταρικές – επιθηλιακές κυρίως λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η διαμεσολάβηση των διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων, η επικοινωνία με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και ο κυτταρικός προσανατολισμός υποδηλώνουν και την δυναμική συμμετοχή των δύο πρωτεϊνών στις διεργασίες της ογκογένεσης και, κυρίως, σε αυτές της επέκτασης και της μετάστασης του όγκου (Εικόνα 1.12).



Εικόνα 1.12. Προτεινόμενοι μηχανισμοί συμμετοχής των πολυκυστινών στις διεργασίες διήθησης και μετάστασης του όγκου.

Η αυξημένη έκφραση των πολυκυστινών στο κυστικό επιθήλιο ως αντανάκλαση της αποδιαφοροποίησης του ιστού και η αντίληψη της κυστεογένεσης ως μια πολυσταδιακή διαδικασία που απαιτεί την προοδευτική συσσώρευση γενετικών αλλοιώσεων έχουν δικαιολογημένα αποδώσει στην ΑΕΠΙΝΝ τον όρο «μεταμφιεσμένη νεοπλασία» [76]. Μελέτες που παρουσιάζουν του πρωτογενείς κροσσούς να πρωταγωνιστούν στην καρκινογένεση αποτέλεσαν το πρώτο ερέθισμα για τη διαμόρφωση μιας θεωρίας που περιγράφει την μηχανο-επαγόμενη μετάδοση κυτταρικών μηνυμάτων από τους κροσσούς ως συστατικό της ογκογένεσης [77]. Τόσο στο μυελοβλάστωμα, τον πιο συχνό όγκο εγκεφάλου στα παιδιά, όσο και στο βασικοκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος η απουσία των πρωτογενών κροσσών αποδείχθηκε ότι είτε οδηγεί σε αναστολή είτε συμβάλλει στην ανάπτυξη του όγκου ανάλογα με το αν η απαρχή της ογκογένεσης οφείλεται στην ακατάληπτη ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Smoothened (Smo) του σηματοδοτικού μονοπατιού Hedgehog ή στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Gli2 του ίδιου μονοπατιού αντίστοιχα [75,76]. Επιπλέον, η μελέτη ανθρώπινων κυτταρικών σειρών

γλοιοβλαστώματος αποκάλυψαν βλάβες στη λειτουργία και στον ίδιο τον σχηματισμό των πρωτογενών κροσσών [78].

Όσον αφορά στις πολυκυστίνες, λίγες είναι οι μελέτες που αφορούν μια πρώτη προσέγγιση της σχέσης τους με την καρκινογένεση. Διαμόλυνση με σκοπό την υπερέκφραση της PC1 σε κυτταρικές σειρές ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, καρκίνου του πνεύμονα και του παχέος εντέρου οδήγησε σε προαγωγή των διακυτταρικών και με την ΕΘΜ αλληλεπιδράσεων και σε αναστολή της επέκτασης και μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων μέσω του μονοπατιού Wnt προσδίδοντας στην PC1 έναν πιθανό ογκοκατασταλτικό ρόλο [80]. Η μείωση της έκφρασης της PC2 με τη χρήση RNA αποσιώπησης (silencing RNA, siRNA) οδήγησε σε σημαντική καταστολή της διακυτταρικής προσκόλλησης σε κύτταρα μελανώματος από ποντίκια B16 [80]. Οι δύο αυτές μελέτες δείχνουν ότι και στα καρκινικά κύτταρα οι PC1 και PC2 επηρεάζουν τις διαδικασίες κυτταρικής προσκόλλησης και επικοινωνίας με την ΕΘΜ. Καταληκτικά, η υπερέκφραση της PC1 στις ίδιες κυτταρικές σειρές οδήγησε σε σημαντική αύξηση της απόπτωσης και σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη G0/G1 φάση υποδηλώνοντας τη συμμετοχή της στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στα καρκινικά κύτταρα .

2. Ο Ορθοκολικός καρκίνος

2.1. Επιδημιολογικά δεδομένα

Ο ΟΚΚ είναι ο τέταρτος πιο συχνός καρκίνος στους άνδρες (μετά τον καρκίνο του πνεύμονα, του προστάτη και του στομάχου) και ο τρίτος πιο συχνός στις γυναίκες (μετά του μαστού και του τραχήλου της μήτρας). Περίπου 1,23 εκατομμύρια νέα περιστατικά διαγνώστηκαν παγκοσμίως το 2008 αντιπροσωπεύοντας το 9,7% όλων των νέων περιπτώσεων καρκίνου. Τα υψηλότερα ποσοστά εμφανίζονται στις βιομηχανοποιημένες- αναπτυγμένες/αναπτυσσόμενες χώρες της Ευρώπης, στην Αυστραλία, στη Νέα Ζηλανδία, στη Β. Αμερική και στην Ιαπωνία (40-60περιπτώσεις/100.000) και πολύ χαμηλότερα ποσοστά στην Ασία και στην Αφρική. Η επίπτωση του ΟΚΚ αλλάζει συνεχώς σε πολλές χώρες, όπου σε άλλες τα ποσοστά μειώνονται (π.χ. Β. Αμερική), σταθεροποιούνται (Β. και Δ. Ευρώπη) ή αυξάνονται απλά σταδιακά εκεί όπου ήταν ήδη υψηλά. Ανάμεσα στους ιθαγενείς και τους μετανάστες τα ποσοστά γρήγορα πλησιάζουν αυτά της χώρας διαμονής υποδηλώνοντας ότι ο τρόπος ζωής, διαιτητικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες αποτελούν σημαντικούς παράγοντες κινδύνου [81].

Η επίπτωση αυξάνει με την ηλικία, ενώ τα καρκινώματα είναι σπάνια στα άτομα κάτω των 40 ετών. Εξαιρέση αποτελούν τα άτομα με γενετική προδιάθεση ή αυτά με προδιαθεσικούς παράγοντες, όπως οι ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου [82]. Το ποσοστό θνησιμότητας διεθνώς είναι περίπου το μισό του ποσοστού της επίπτωσης. Το ποσοστό θνησιμότητας ποικίλλει ανάλογα με τις διαθέσιμες επιλογές θεραπευτικής αντιμετώπισης, με χαμηλότερα ποσοστά στις αναπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες με υψηλή επίπτωση. Παρ' όλ' αυτά, ο ΟΚΚ αποτελεί σε ορισμένες χώρες την πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο που δεν συνδέεται με τη χρήση καπνού και, συνολικά, αποτελεί την τέταρτη αιτία θανάτου ασθενών με καρκίνο [83].

2.2 Αιτιολογία

Υψηλά ποσοστά παρατηρούνται σε πληθυσμούς που ακολουθούν τη δίαιτα «Δυτικού τύπου», που είναι διατροφή με υψηλή πρόσληψη θερμίδων, πλούσια σε ζωικά λίπη, σε συνδυασμό με την καθιστική ζωή. Η παχυσαρκία, η κατανάλωση κρέατος, το κάπνισμα και το αλκοόλ αποτελούν τροποποιήσιμους παράγοντες

κινδύνου [81]. Τα μοριακά μονοπάτια που βρίσκονται πίσω από τις επιδημιολογικές συσχετίσεις δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένα, περιλαμβάνουν όμως πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις με βάση τα διατροφικά πρότυπα, τη μακρο- και τη μικροδιατροφική σύσταση των τροφών, τις τεχνικές παρασκευής τους, τις ορμονικές επιδράσεις και τα γενετικά χαρακτηριστικά [84]. Οι ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου (νόσος Crohn, ελκώδης κολίτιδα) είναι αιτιολογικοί παράγοντες της νόσου, ενώ με μειωμένη επίπτωση συνδέονται η μακροχρόνια χορήγηση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, η κατανάλωση ασβεστίου, βιταμίνης D, φρούτων, λαχανικών και φυτικών ινών [85,86].

2.3 Μοριακή βιολογία

Οι γονιδιακές ανωμαλίες που συναντώνται στον ΟΚΚ αφορούν γενετικές μεταλλάξεις που συνοδεύουν τη κληρονομήσιμη προδιάθεση για ΟΚΚ και σωματικές αλλοιώσεις (συμβαίνουν σε μη γαμετικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου) που εμφανίζονται στον σποραδικό ΟΚΚ. Οι μοριακές βλάβες είναι δύο ειδών και έχουν να κάνουν είτε με την αυξημένη λειτουργία ογκογονιδίων ή με την απώλεια της λειτουργίας ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Η μετατροπή των γονιδίων σε ογκογονίδια προέρχεται από σημειακές μεταλλάξεις, από αναδιοργάνωση της γονιδιακής δομής και λειτουργίας, και από χρωμοσωμική αναδιοργάνωση ή διεύρυνση που διαταράσσουν τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων οφείλεται σε εντοπισμένες μεταλλάξεις, σε πλήρη απώλεια του γονιδίου ή σε επιγενετικές αλλοιώσεις που αλλάζουν τη γονιδιακή έκφραση [87].

Η διαδικασία που ορίζει το σύνολο αυτών των βλαβών στα καρκινικά κύτταρα ονομάζεται κλωνική επιλογή και αποτελεί μια εξελικτική διαδικασία κατά την οποία διαφορετικοί πληθυσμοί μεταλλαγμένων κυττάρων ανταγωνίζονται για τα θρεπτικά συστατικά έως ότου μια συγκεκριμένη γενετική αλλοίωση δώσει τη δυνατότητα σε έναν τύπο κυττάρου, μέσω φυσικής επιλογής, να κυριαρχήσει έναντι των άλλων και να αρχίσει να επεκτείνεται μέσα στο νεόπλασμα [88].

2.3.1 Το σηματοδοτικό μονοπάτι mTOR στον ορθοκολικό καρκίνο

Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των mTOR, Raptor και Rictor έχουν βρεθεί αυξημένα στα ορθοκολικά καρκινώματα, ειδικότερα στους πρωτοπαθείς όγκους των ασθενών τετάρτου σταδίου όσο και στις αντίστοιχες μεταστατικές εστίες που αφαιρέθηκαν [89, 90]. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης στον ορθοκολικό καρκίνο (ΟΚΚ) έχουν βρεθεί και για τις ενεργοποιημένες μορφές του μονοπατιού p-mTORSer2448 και p-p70S6KThr389 [90]. Στα καρκινικά κύτταρα η αναστολή των mTORC1 και mTORC2 μείωσε το μεταναστευτικό δυναμικό και το δυναμικό επέκτασης των κυττάρων ΟΚΚ, προήγαγε την μεσεγγυματο- επιθηλιακή μετατροπή (mesenchymal-to-epithelial transition, MET) και εμπόδισε την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού μέσω των μικρών GTPασών RhoA και Rac1 [87]. Η αναστολή των mTORC1 και mTORC2 μειώνει επίσης τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, επάγει την απόπτωση *in vitro*, ενώ αναστέλλει και την ανάπτυξη ΟΚΚ σε εμφυτευμένα ξενόγραφα *in vivo* [91]. Επιπλέον, η μειωμένη λειτουργία του miR-144 συνδέεται με την ανάπτυξη ΟΚΚ μέσω απευθείας στόχευσης και αναστολής της έκφρασης του mTOR [90].

Μια διαφορετική προσέγγιση είναι η προσπάθεια ανάπτυξης πολυδιάστατων μοριακών επιδημιολογικών μελετών για την ανίχνευση επιδημιολογικών δεδομένων που συνδέουν το mTOR με τον κίνδυνο ανάπτυξης ΟΚΚ σχετιζόμενου με την ενεργειακή ισορροπία. Είναι γνωστό ότι η παχυσαρκία σε συνδυασμό με τη σαρκοπενία, η μειωμένη φυσική δραστηριότητα, η μεγάλη κατανάλωση θερμίδων και το υψηλό ανάστημα στη νεαρή ηλικία αποτελούν παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης και δυσμενούς πρόγνωσης για τον ΟΚΚ. Υπάρχει μια μηχανιστική αντίληψη που υποστηρίζει την αλλοίωση του μονοπατιού mTOR ως υποκείμενο μηχανισμό που κατευθύνει αυτές τις συσχετίσεις. Αυτό συμβαίνει γιατί στο mTOR απαρτιώνονται μηνύματα από αυξητικούς παράγοντες, θρεπτικά συστατικά, μεταλλαξιογόνα ερεθίσματα και ορμόνες που επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αντίσταση στην απόπτωση και την αυτοφαγία [90].

Προκλινικές μελέτες είναι στη φάση διερεύνησης του κατά πόσο η στόχευση του mTOR μπορεί να αποφέρει ενθαρρυντικά αποτελέσματα στον ΟΚΚ. Για παράδειγμα ο συνδυασμός αναστολέων του BRAF, οι οποίοι είναι αναποτελεσματικοί σε ασθενείς με ΟΚΚ που φέρουν τη μετάλλαξη BRAFV600E, με ταυτόχρονη αναστολή του μονοπατιού PI3K/mTOR ενίσχυσε την απόπτωση και οδήγησε σε μείωση του όγκου *in vivo* [90]. Παράλληλα, ο συνδυασμός Everolimus

και ιρινοτεκάνης έδειξε ωφέλιμα αποτελέσματα και συνεργική δράση σε μεταλλαγμένα BRAF/PIK3CA HT29 ξενόγραφα σε σχέση με τα μεταλλαγμένα KRAS/PIK3CA HT29 ξενόγραφα [89]. Διακοπή του κυτταρικού κύκλου τόσο σε κύτταρα OKK με μεταλλαγμένο KRAS όσο και σε αυτά με KRAS άγριου τύπου έδειξε και ο συνδυασμός του αναστολέα του EGFR erlotinib με ραπαμυκίνη [88].

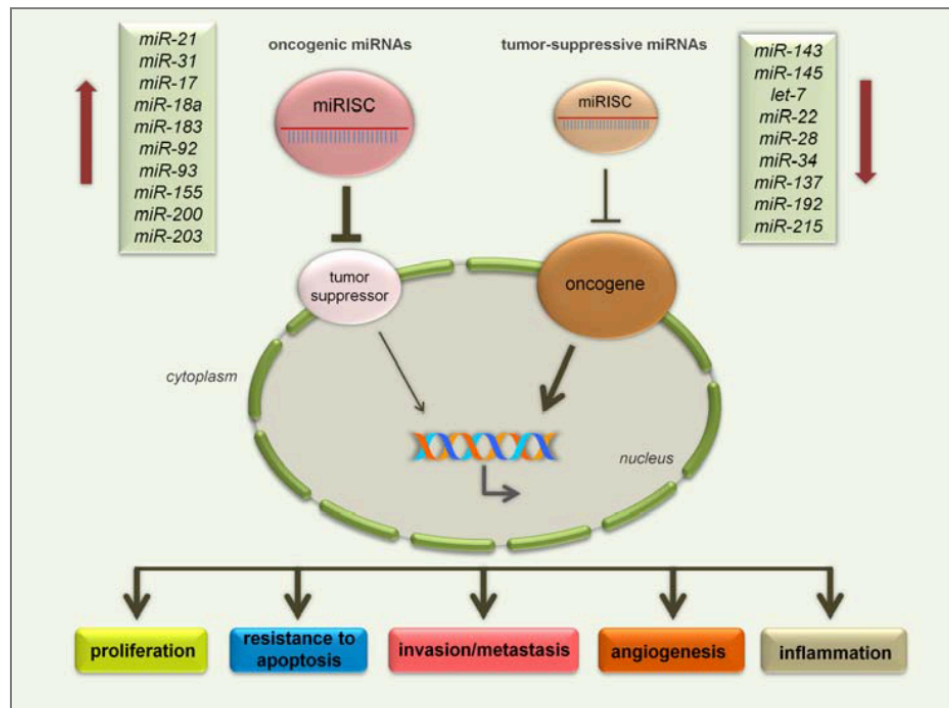
Διάφορες κλινικές μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη για την αξιολόγηση των αναστολέων του mTOR στην κλινική πράξη. Μελέτη φάσης I εκτίμησε το συνδυασμό του Temsirolimus με λιποσωμική δοξορουμπικίνη και τον αντιαγγειογενετικό παράγοντα bevacizumab σε προχωρημένες κακοήθειες (ανάμεσά τους και σε 17 ασθενείς με OKK), ένα σχήμα που ήταν ανεκτό για τους ασθενείς χωρίς όμως ιδιαίτερα αποτελέσματα στον OKK [88].

2.3.2 *Επιγενετικές αλληλεπιδράσεις στον OKK*

Ο όρος επιγενετική αναφέρεται σε κληρονομήσιμες αλλοιώσεις που δεν επηρεάζουν την αλληλουχία του DNA, επηρεάζουν όμως τη γονιδιακή έκφραση. Εκτός από την υπερ-μεθυλίωση των νησίδων CpG του DNA, που είναι το τρίτο χτύπημα στο κλασικό μοντέλο του Knudson της απενεργοποίησης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, και τη συνολική υπο-μεθυλίωση του DNA, που συνδέεται με πτωχή πρόγνωση στον OKK, οι χημικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών και η λειτουργία των miRNAs (microRNAs) συμπληρώνουν το παζλ των επιγενετικών μηχανισμών στην παρεκκλίνουσα γονιδιακή έκφραση που παρατηρείται στον OKK [89]. Η ακετυλίωση και η μεθυλίωση αποτελούν τις σημαντικότερες τροποποιήσεις των ιστονών, οι οποίες διαμεσολαβούνται από ένα σημαντικό αριθμό ενζύμων. Τα ένζυμα αυτά ταξινομούνται στις ακετυλοτρανσφεράσες (HATs, histone acetyltransferases), στις αποακετυλάσες (HDACs, histone deacetylases), στις μεθυλοτρανσφεράσες (HMTs, histone methyltransferases) και στις απομεθυλάσες (HDMs, histone demethylases) των ιστονών. Ο ρόλος τους βασίζεται στη διακοπή της συνέχειας της χρωματίνης και στην επιστράτευση άλλων πρωτεϊνών που ορίζουν τη χωροχρονικά σωστή δομή της χρωματίνης και επιτρέπουν το σχηματισμό πρωτεϊνικών συμπλόκων με σκοπό την ανάλογη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Εικόνα 3.2) [90].

Τα miRNAs είναι μικρά, μη κωδικοποιούντα RNAs που ρυθμίζουν μετα-μεταγραφικά τη γονιδιακή έκφραση μέσω αναστολής των mRNAs. Στον OKK, πολλά

τέτοια μόρια ανιχνεύονται είτε με παθολογικά αυξημένη ή μειωμένη λειτουργία, αποτελώντας έτσι ιστο-ειδικούς βιοδείκτες με ογκογόνες ή ογκοκατασταλτικές ιδιότητες (Εικόνα 2.3)[91].

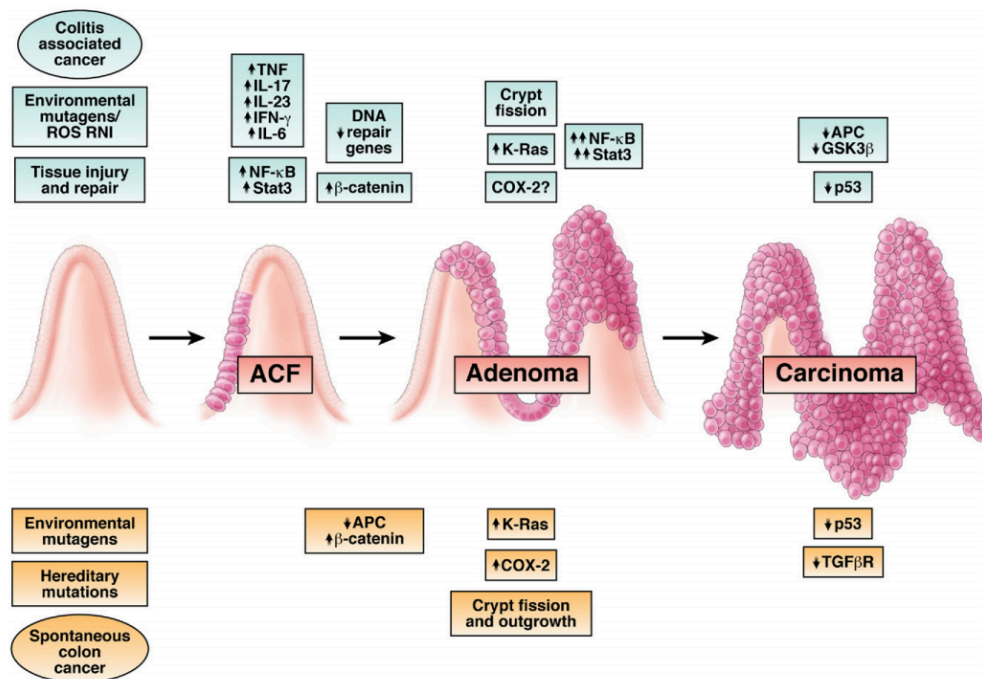


Εικόνα 2.3. Διαταραγμένη ρύθμιση των miRNAs στον OKK. Τα ενεργοποιημένα/ογκογονικά miRNAs ασκούν ενισχυμένη αναστολή στα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Τα απενεργοποιημένα/ογκοκατασταλτικά miRNAs εμφανίζουν μειωμένη αναστολή στα δυνητικώς ογκογονίδια. Οι δύο μηχανισμοί καταλήγουν σε μειωμένη έκφραση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και σε αυξημένη έκφραση των ογκογονιδίων αντίστοιχα, ενώ προάγουν τη γονιδιακή έκφραση που ευνοεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την ανθεκτικότητα στην απόπτωση, τη διήθηση, τη μετάσταση, την αγγειογένεση και τη φλεγμονή των καρκινικών κυττάρων στον OKK [91].

2. Ο παθογενετικός ρόλος της φλεγμονής στην ογκογένεση του παχέος εντέρου

Η σύνδεση μεταξύ της φλεγμονής και της ογκογένεσης είναι καθιερωμένη και την τελευταία δεκαετία και έχει λάβει πολλά αποδεικτικά στοιχεία από γενετικά, φαρμακολογικά και επιδημιολογικά δεδομένα. Η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Η φλεγμονή είναι επίσης πιθανό να εμπλακεί σε άλλες μορφές κληρονομικού καρκίνου του παχέος εντέρου. Οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους η φλεγμονή προάγει την ανάπτυξη του καρκίνου εξακολουθούν να αποκαλύπτονται και θα μπορούσαν να διαφέρουν μεταξύ του συσχετιζόμενου με κολίτιδα καρκίνου του παχέος εντέρου και άλλων μορφών του. Πρόσφατες εργασίες έχουν διασαφηνίσει το ρόλο των διακριτών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, των κυτταροκινών και άλλων ανοσοδιαμεσολαβητών σε όλα σχεδόν τα στάδια της ογκογένεσης του παχέος εντέρου, συμπεριλαμβανομένης της έναρξης, της προαγωγής, της προόδου και της μετάστασης.

Ο καρκίνος που σχετίζεται με κολίτιδα (CAC) είναι ο υπότυπος καρκίνου του παχέος εντέρου που συνδέεται με τη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (IBD) και είναι δύσκολο να αντιμετωπιστεί με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Περισσότερο από το 20% των ασθενών με IBD αναπτύσσουν CAC εντός 30 ετών από την εμφάνιση της νόσου και το 50% αυτών θα πεθάνει από την CAC. Αν και οι μηχανισμοί που συνδέονται με το ανοσοποιητικό σύστημα συνδέουν το IBD με το CAC, υπάρχουν ομοιότητες μεταξύ του CAC και άλλων τύπων ΟΚΚ που αναπτύσσονται χωρίς οποιαδήποτε σημάδια εμφανής φλεγμονώδους νόσου (Εικόνα 3.1). Ορισμένα από τα βασικά στάδια της ανάπτυξης του καρκίνου, είναι παρόμοια μεταξύ μη-φλεγμονωδών καρκίνων του παχέος εντέρου και CAC. Εντούτοις, έχουν προταθεί ορισμένες διαφορετικές παθογενετικές οδοί για CAC, συμπεριλαμβανομένης της χρόνιας φλεγμονής και της δυσπλασίας μετά από τραυματισμό, η οποία προκύπτει χωρίς τον σχηματισμό σαφώς καθορισμένου αδενώματος. Παρόλα αυτά, οι συνήθεις γενετικές και σηματοδοτικές οδοί, όπως αυτές που περιλαμβάνουν Wnt, -κατενίνη, K-ras, p53, τροποποιούνται σε σποραδικά καρκίνο του παχέος εντέρου και CAC. Τέλος, ακόμη και καρκίνοι του παχέος εντέρου που δεν σχετίζονται με κλινικά ανιχνεύσιμο IBD παρουσιάζουν ισχυρή φλεγμονώδη διείδυση.



Εικόνα 3.1: Παθογενετικές οδοί καρκινογένεσης στον ορθοκολικό καρκίνο

Οι όγκοι που σχετίζονται με τον ορθοκολικό καρκίνο και την κολίτιδα διεισδύουν σε διάφορους τύπους ανοσοκυττάρων. Τα κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα ουδετερόφιλα, τα μαστοκύτταρα, τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (NK), τα δενδριτικά κύτταρα (DC) και τα μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο μπορούν να ανιχνευθούν εύκολα σε αυτούς τους όγκους.

Κύτταρα του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος συμμετέχουν επίσης στον καρκίνο του παχέος εντέρου και σχετιζόμενους με κολίτιδα όγκους, όπου έχουν είτε προ- ή αντι-ογκογόνους ρόλους. Τα T κύτταρα, για παράδειγμα, απαιτούνται για φλεγμονή, ανάπτυξη καρκίνου και εξέλιξη όγκου, καθώς και για αντικαρκινική ανοσία.

Ποια είναι η συμβολή της ανοσοεπάρκειας του όγκου έναντι της φλεγμονής που προάγει τον όγκο στα καρκινώματα του παχέος εντέρου και CAC; Στην CAC, το ανοσοποιητικό σύστημα φαίνεται να έχει ως επί το πλείστον βασικό ρόλο. Σε σποραδικό ορθοκολικό καρκίνο, φαίνεται να υπάρχει μια καλά καθορισμένη ισορροπία μεταξύ ανοσοποιητικού συστήματος (που εκτελείται από CD8 T κύτταρα, NK κύτταρα και CD4 T κύτταρα) και φλεγμονής που προάγει τον όγκο (που

εκτελείται από Β κύτταρα και διάφορους υποτύπους του Τ κύτταρα). Στον ορθοκολικό καρκίνο και στην CAC, η ανοσοεπαγρύπνιση θα μπορούσε να μεσολαβήσει στην έγκαιρη ανίχνευση και απομάκρυνση των μετασχηματισμένων κακοηθών κυττάρων και επίσης να κρατήσει τους μικρούς όγκους σε αδρανή κατάσταση. Η ανοσοεπαγρύπνιση μπορεί επίσης να είναι σημαντική κατά τη διάρκεια της μετάστασης, όταν ταξιδεύουν μικρές «αποικίες» ή μεμονωμένα μεταστατικά κύτταρα και μπορούν να δεχθούν επίθεση από αντικαρκινικά ανοσοκύτταρα που δεν παρεμποδίζονται από παράγοντες στο μικροπεριβάλλον του όγκου.

Σε πολλά άλλα στάδια της ογκογένεσης που σχετίζεται με τον ορθοκολικό καρκίνο και την κολίτιδα, η φλεγμονή αντισταθμίζει και εξουδετερώνει την αντικαρκινική ανοσία με άμεσες ανοσοκατασταλτικές επιδράσεις, καθώς και με ρύθμιση της επιβίωσης των κυττάρων όγκου, του πολλαπλασιασμού, της αγγειογένεσης και άλλων χαρακτηριστικών της ογκογένεσης. Η διήθηση λεμφοκυττάρων σε σποραδικούς όγκους του παχέος εντέρου συνήθως σχετίζεται με καλή πρόγνωση. Από την άλλη πλευρά, ρυθμιστικά Τ (Treg) κύτταρα, τα οποία είναι άφθονα στο έντερο, καταστέλλουν την φλεγμονή και τον ανοσοποιητικό κατά του όγκου.

Μια φαινομενικά σημαντική διαφορά μεταξύ του ορθοκολικού καρκίνου (και ιδιαίτερα του CAC) και άλλων επιθηλιακών καρκίνων είναι ότι στους άλλους τύπους καρκίνου, τα Τ κύτταρα που έχουν διεισδύσει έχουν εξειδίκευση για αλλοιωμένα, ειδικά για τον όγκο, αντιγόνα και έτσι μπορούν να καταστρέψουν τα καρκινικά κύτταρα. Στην περίπτωση της CAC, πολλά φλεγμονώδη Τ κύτταρα είναι στην πραγματικότητα ειδικά για τη μικροχλωρίδα και συνεπώς δεν είναι σε θέση να θανατώνουν άμεσα τα καρκινικά κύτταρα. Έτσι, στην CAC, ακόμη και τα κυτταροτοξικά CD8 Τ κύτταρα μπορούν να προάγουν την ανάπτυξη του όγκου μέσω της παραγωγής κυταροκινών.

Σε αντίθεση με τον κλασσικό ορθοκολικό καρκίνο, στον CAC προηγείται η χρόνια φλεγμονή και έπεται η ανάπτυξη του όγκου. Στον CAC, η χρόνια φλεγμονή προκαλεί οξειδωτική βλάβη στο DNA, οδηγώντας στις μεταλλάξεις p53 που παρατηρούνται στα καρκινικά κύτταρα και στο φλεγμονώδες επιθήλιο. Η μεταλλαξογένεση που προκαλείται από την φλεγμονή μπορεί επίσης να προκαλέσει την απενεργοποίηση της πρωτεΐνης ή την καταστολή των γονιδίων που σχετίζονται

με MMR και οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) μπορούν να οξειδώσουν άμεσα και να αδρανοποιήσουν τα ένζυμα επιδιόρθωσης σε επίπεδο πρωτεϊνών.

3.1 Η φλεγμονή ως προαγωγός του OKK και του CAC

Η ογκογένεση είναι μια διαδικασία ανάπτυξης όγκων από ένα κύτταρο σε έναν πλήρως αναπτυγμένο όγκο. Η αρχική και συνεχής ανάπτυξη όγκου εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ κυτταρικού θανάτου και κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Οι κυτταροκίνες και οι χημειοκίνες μπορούν να χρησιμεύσουν ως αυξητικοί παράγοντες και παράγοντες επιβίωσης και μπορούν να προάγουν την ανάπτυξη όγκου, προάγοντας την αγγειογένεση και καταστέλλοντας την απομάκρυνση του όγκου μέσω του ανοσοποιητικού. Άλλοι παράγοντες, όπως το εντερικό μικροβιακό φορτίο και οι διαιτητικές ενώσεις, μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου, ρυθμίζοντας δίκτυα προ-φλεγμονώδους σηματοδότησης κυτταροκινών-μεταγραφικών παραγόντων.

3.1.1 Σηματοδότηση κυτταροκινών και ογκογένεση στο παχύ έντερο

Οι περισσότερες, αλλά όχι όλες, οι κυτταροκίνες που συμμετέχουν στην ογκογένεση ενεργοποιούν υποδοχείς σε εντερικά επιθηλιακά κύτταρα που ενεργοποιούν παράγοντες και σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως το μονοπάτι Akt/mTOR. Οι παράγοντες μεταγραφής NF-κB και STAT3 είναι ιδιαίτερα σημαντικοί για την ανάπτυξη CAC και OKK.[92,93]. Οι κυτταροκίνες που προάγουν την ανάπτυξη όγκου σχετιζόμενη με τον ορθοκολικό και τον κολίτιδα περιλαμβάνουν TNF, IL-6 και IL-22,IL-17.[94,95]

Ο STAT3, ένας μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιείται από πολλούς αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες, συμπεριλαμβανομένης της IL-11 και της IL-22.[96] Η ενεργοποίηση του STAT3 από την κυτταροκίνη IL-6 προστατεύει το γαστρεντερικό επιθήλιο και διεγείρει την αναγέννησή του.[96] Συνεπώς, οι IL-6 και STAT3 είναι ελκυστικοί θεραπευτικοί στόχοι για CAC, επειδή η αναστολή τους εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.[96]. Στο CAC, ο STAT3 μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί από IL-11, που έχει παρόμοιο ρόλο με την IL-6. Η ενεργοποίηση STAT3 επάγει έκφραση αντιαποπτωτικών γονιδίων, όπως Bcl2 ή Bcl-xL, γονίδια όπως η Κυκλίνη D1 ή c-Myc και ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF).[97] Ο ενεργοποιημένος STAT3 μπορεί επίσης να προκαλέσει

παρατεταμένη ενεργοποίηση του NF-κB, κάτι το οποίο αποτελεί ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της παθογένειας, επειδή και οι δύο αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποιούν γονίδια που απαιτούνται για κάθε πτυχή της ανάπτυξης του καρκίνου. [98].

3.1.2 NF-κB και καρκίνου του παχέος εντέρου

Οι περισσότερες κυταροκίνες που συμμετέχουν στην ογκογένεση, ενεργοποιούνται μέσω του μεταγραφικού συμπλόκου NF-κB ή (μαζί με άλλα φλεγμονώδη ερεθίσματα) ενεργοποιούν τη σηματοδότηση μέσω του NF-κB.[99] Ο NF-κB είναι πιθανό να διαδραματίζει εξέχοντα ρόλο στην ανάπτυξη κολίτιδας και κολίτιδας που σχετίζεται με ογκογένεση. Η λανθασμένη ενεργοποίηση του NF-κB ανιχνεύθηκε στο 50% των όγκων που σχετίζονται με τον ορθοκολικό και την κολίτιδα. [100]

Η δράση του NF-κB μπορεί να επιτευχθεί μέσω κλασικής ή εναλλακτικής οδού ενεργοποίησης.[102] Η ενεργοποίηση του NF-κB μπορεί να υποστηρίξει την ογκογένεση με την αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της αγγειογένεσης, την αναστολή του κυτταρικού θανάτου και την προαγωγή της κυτταρικής εισβολής και μετάστασης.[103] Η αντιαποπτωτική δράση του NF-κB μεσολαβείται μέσω της ενεργοποίησης των Bcl2, Bcl-xL και cFLIP, μαζί με άλλα γονίδια.[103,104] Τα καρκινικά κύτταρα με ενεργοποιημένο NF-κB είναι ανθεκτικά σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα και ιονίζουσα ακτινοβολία. Η αναστολή της δραστηριότητας του NF-κB σε μεγάλο βαθμό αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων σε αυτούς τους παράγοντες.[105]

Ο παράγοντας μεταγραφής NF-κB είναι διμερές. Κάθε συνδυασμός υπομονάδων είναι πιθανόν να εμπλέκεται στη ρύθμιση διαφορετικών γονιδίων.[106] Υπάρχουν 5 μέλη της οικογένειας υπομονάδων: p105 / p50, p100 / p52, RelA (p65), c-Rel και RelB. Αυτά διατηρούνται ανενεργά στο κυτταρόπλασμα ως πρόδρομοι. Κλασικοί μηχανισμοί ενεργοποίησης του NF-κB συμβαίνουν σε CAC και OKK και περιλαμβάνουν σηματοδότηση με αναγνώριση προτύπων σε υποδοχείς και από κυταροκίνες, όπως TNF, IL-1 και IL-17.. Αυτή η μεταγωγή σήματος ενεργοποιεί μονοπάτια όπως το σύμπλεγμα IB κίνησης (IKK), που περιλαμβάνει 1 ρυθμιστική υπομονάδα (IKK / NEMO) και 2 καταλυτικές (IKK και IKK) υπομονάδες. Το ενεργοποιημένο IKK φωσφορυλιώνει τα IBδ, στοχεύοντας σε αυτά για την

ουβικιτινιλίωση και την επακόλουθη αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα, η οποία απελευθερώνει το NF-kB (κυρίως p50 / p65) να μεταναστεύσει στον πυρήνα και να ρυθμίσει τη γονιδιακή μεταγραφή. Η εναλλακτική οδός περιλαμβάνει ένα IKK ομοδιμερές και παράγοντες μεταγραφής p52 / RelB.[106] Σε OKK και CAC, αυτή η οδός θα μπορούσε να ενεργοποιηθεί από κυτταροκίνες όπως το RANKL.

4. Πολυκυστίνες και παθογένεια του καρκίνου

Συγκεκριμένα, οι πολυκυστίνες μελετώνται στον ορθοκολικό καρκίνο, μία από τις συχνότερες κακοήθειες και στα δύο φύλα. Το αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου συνιστά μια πολυσταδιακή και πολυπαραγοντική διαδικασία, αρκετά καλά μελετημένη και ιεραρχικά δομημένη, συνιστώντας ένα ιδανικό γενετικό μοντέλο της νόσου. Η πειραματική μελέτη κινήθηκε σε τρεις άξονες: στη διερεύνηση εμπλεκόμενων μοριακών μηχανισμών σε μοντέλα υπερέκφρασης των δύο πρωτεϊνών σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου *in vitro*, σε μοντέλο τροποποίησης της ενεργότητας της πολυκυστίνης-1 σε ανθρώπινα ξενομοσχεύματα ορθοκολικού καρκίνου σε ποντίκια και, τέλος, στη μελέτη της έκφρασης των πολυκυστινών σε ένα μεγάλο αριθμό ασθενών που διαγνώστηκαν και χειρουργήθηκαν με ορθοκολικό καρκίνο. Τα ευρήματα της μελέτης έδειξαν ότι η αυξημένη έκφραση των πολυκυστινών συνδέεται με την ανάπτυξη ενός επιθετικού φαινότυπου στον ορθοκολικό καρκίνο και με μειωμένη πιθανότητα επιβίωσης των ασθενών χωρίς υποτροπή, προάγοντας παράλληλα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της ογκογένεσης όπως η επιθηλιο- μεσεγχυματική μετατροπή (EMM), ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η αντίσταση στην απόπτωση. Επιπρόσθετα, οι πολυκυστίνες φαίνεται ότι διαμεσολαβούν την λειτουργία τους μέσω ενδοκυττάρων μονοπατιών μεταγωγής μηνυμάτων που παίζουν ρόλο στην ογκογένεση, όπως είναι αυτό της πρωτεϊνικής κινάσης mTOR (mammalian target of rapamycin).

Συνεπώς, είναι σαφές ότι οι πολυκυστίνες, λειτουργώντας ως δυνητικά ογκογονίδια, τίθενται πλέον στο «κάδρο» της καρκινογένεσης ως πιθανοί νέοι βιοδείκτες και είναι επιβεβλημένη η γένεση ενός νέου ερευνητικού πεδίου που θα επεξεργαστεί τόσο την ιστο-ειδική συμπεριφορά των δύο μορίων και σε άλλου τύπου κακοήθειες, όσο και την περαιτέρω εξερεύνηση των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων συμμετέχουν στη διαδικασία.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της βιολογικής σημασίας των πολυκυστινών στην φλεγμονή στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε καρκινικές κυτταρικές σειρές HCT-116 και HT-29 συσχετίζοντας τον πιθανό ρόλο των πολυκυστινών και των φλεγμονοδών παραγόντων, όπως οι κυτταροκίνες στην ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Για το σκοπό αυτό αρχικά μελετήθηκε, η επίδραση της μεταγραφική αποσιώπησης του γονιδίου της PC-1 στα καρκινικά κύτταρα, μελετώντας με ανοσοαποτύπωση κατά Western, τα επίπεδα έκφρασης μορίων που σχετίζονται άμεσα με την ανάπτυξη φλεγμονής, όπως ο NF-κB.

Ακολούθως, μελετήθηκε αν οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα της PC-1 στα καρκινικά κύτταρα. Για το λόγο αυτό έγινε επιλογή τριών βασικών προφλεγμονωδών κυτταροκινών, γνωστών για την εμπλοκή τους στον ΟΚΚ. Πραγματοποιήθηκε επώαση των καρκινικών κυττάρων με τις κυτταροκίνες και παρακολούθηση των επιπέδων έκφρασης της PC-1.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Μελέτη σε μοντέλα καλλιέργειών καρκινικών κυττάρων

3.1.1 Καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων

Καλλιεργήθηκαν οι καρκινικές κυτταρικές σειρές ανθρώπινης προέλευσης:

- HCT116: κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου από ενήλικο άνδρα που φέρει μετάλλαξη για το KRAS στο κωδικόνιο 13, σταδίου D κατά Dukes
- HT29: κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου από Καυκάσιο άνδρα 44 ετών, δευτέρου βαθμού διαφοροποίησης

Χρησιμοποιήθηκε θάλαμος νηματικής ροής με βάση τους προβλεπόμενους κανόνες υγιεινής και ασφάλειας στη Μονάδα Κυτταρικών Καλλιέργειών του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε πλαστικές φλάσκες επιφανείας 75cm², σε επωαστικό κλίβανο με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας 37 °C, υγρασίας 95% και 5% CO₂, παρουσία θρεπτικού υλικού DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM, L-γλουταμίνη, 4,5g/L D- γλυκόζη, πυροσταφυλικό νάτριο, Gibco.) και RPMI (RPMI Media 1640, Gibco.) εμπλουτισμένου με 10% εμβρυϊκό βόειο ορό (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco.), 100U/ml πενικιλίνη, 100μg/ml στρεπτομυκίνη και 0,25μg/ml αμφοτερικίνη B (Antibiotic/Antimycotic 100X, 10000U/ml πενικιλίνη, 10000μg/ml στρεπτομυκίνη και 25μg/ml αμφοτερικίνη B, Gibco.). Χρησιμοποιήθηκαν επίσης τα Trypsin-EDTA (0,5%w/v θρυψίνη και 0,53mM EDTA, Gibco.) και PBS (phosphate buffered saline, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄ x7H₂O, Gibco.).

Επιπρόσθετα, εφαρμόστηκε η δοκιμασία με χρήση χρωστικής Trypan Blue (κυανού του τρυπανίου) για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων που βρίσκονται σε εναιώρημα. Η δοκιμασία βασίζεται στην αρχή ότι τα ζωντανά κύτταρα διαθέτουν ακέραιη κυτταρική μεμβράνη η οποία αποκλείει την είσοδο συγκεκριμένων χρωστικών, όπως η Trypan Blue, σε αντίθεση με τα νεκρά κύτταρα στα οποία εισέρχεται η χρωστική. Επομένως σύμφωνα με τη δοκιμασία αυτή, ένα ζωντανό κύτταρο θα έχει διαυγές κυτταρόπλασμα ενώ ένα νεκρό θα έχει μπλε κυτταρόπλασμα. Τα κύτταρα μετά την αποκόλληση από την επιφάνεια καλλιέργειας, χρησιμοποιώντας διάλυμα θρυψίνης, αραιώθηκαν με θρεπτικό υλικό, μεταφέρθηκαν σε σωλήνες τύπου falcon όγκου 15ml και φυγοκεντρήθηκαν στις 1500rpm για 5

λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα των κυττάρων επαναϊωρήθηκε σε 1-5ml θρεπτικού. Από το κυτταρικό εναιώρημα ποσότητα 10μl αναμίχθηκε με 10μl διαλύματος Trypan Blue και τοποθετήθηκε σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer, όπου μετρήθηκαν τα ζωντανά κύτταρα στο μικροσκόπιο (Trypan Blue Solution, 0.4%, Gibco.).

3.1.2 Γονιδιακή αποσιώπηση με siRNA (silence RNA)

Επιλεκτική αποσιώπηση γονιδίων που προκαλείται από τεχνητό δίκλωνο RNA μέσω εισαγωγής του σε κύτταρα ,προκαλώντας μετα-μεταγραφική καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Η εισαγωγή του τεχνητού δίκλωνου RNA είναι δυνατόν να επιτευχθεί:

- 1) με διαμόλυνση : Πραγματοποιείται με χρήση λιποσωματίων
- 2) με ηλεκτροδιάτρηση : Δημιουργούνται πόροι κατά μήκος της μεμβράνης μέσω εφαρμογής ηλεκτρικού ρεύματος. Υπάρχει σοβαρός κίνδυνος να πεθάνει το κύτταρο.
- 3) Μέσω ιού : Χρησιμοποιούνται ιοί για τη μεταφορά. Πραγματοποιείται κυρίως σε κυτταρικές σειρές ,όπου η διαμόλυνση είναι δύσκολη και σε in vivo πειράματα. Ο κίνδυνος που υπάρχει είναι η συμπεριφορά του κυττάρου ως προς τον ιό.

Όλα τα βήματα του πρωτοκόλλου πραγματοποιήθηκαν σε πλήρως στείρες συνθήκες ,χρησιμοποιήθηκε θάλαμος νηματική ροή με βάση τους προβλεπόμενους κανόνες υγιεινής και ασφάλειας στη Μονάδα Κυτταρικών Καλλιεργειών του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας. Για την επιλεκτική αποσιώπηση του γονιδίου της PC-1 χρησιμοποιήθηκε χημικά συντιθέμενο siRNA SMARTpool της Dharmacon (human PC-1, 1-007666-00).

Επίστρωση κυττάρων

Τα κύτταρα εκπλύθηκαν με PBS και προστέθηκε διάλυμα θρυψίνης για 5 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια, η θρυψίνη απενεργοποιήθηκε με την προσθήκη ίσης ποσότητας θρεπτικού υλικού DMEM εμπλουτισμένου με 10% FBS και τα κύτταρα αφού αποκολλήθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν στις 1000rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων αναδιάλυθηκε σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM, L-γλουταμίνη, 4,5g/L D- γλυκόζη, πυροσταφυλικό νάτριο, Gibco®) εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό βόειο ορό (Fetal Bovine Serum, FBS,

Gibco®), χωρίς την προσθήκη αντιβιοτικού προκειμένου να επιτευχθεί η κατάλληλη πυκνότητα επίστρωσης. Σε μικροπλάκα καλλιέργειας 4 φρεατίων επιστρώθηκαν 100 μ L κυττάρων ανά φρεάτιο και επωάστηκαν στον κλίβανο σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας 37 °C, υγρασίας 95% και 5% CO₂ για 24 ώρες.

Στη συνέχεια, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικό και προστίθεται θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικό και χωρίς εμβρυϊκό βόειο ορό και τα κύτταρα επωάζονται για 6 ώρες προκειμένου να πραγματοποιηθεί συγχρονισμός του κυτταρικού κύκλου σε όλα τα φρεάτια.

Διαμόλυνση

Για το πείραμα διαμόλυνσης με siRNA χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ελέγχου βασικών χαρακτηριστικών της κυτταρικής σειράς (untreated samples), δείγματα αρνητικού ελέγχου (negative control siRNA) και δείγματα siRNA σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.1 :Χαρακτηριστικά δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα διαμόλυνσης siRNA

Δείγματα	Σκοπός
Κύτταρα ελέγχου (untreated)	Προσδιορισμός βασικού φαινότυπου, κυτταρικής βιωσιμότητας, στόχευσης γονιδιακού επιπέδου
Αρνητικού ελέγχου siRNA(negative control)	Διαχωρισμός ειδικής στόχευσης της αλληλουχίας του γονιδίου ενδιαφέροντος από μη ειδική στόχευση
siRNA(test siRNA)	Αποσιώπηση του γονιδίου στόχου

1. Σε μικροσωλήνα τύπου eppendorf προετοιμάζονται 400 μ l διαλύματος siRNA σε θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς αντιβιοτικό και εμβρυϊκό βόειο ορό, προσθέτοντας 20 μ l siRNA σε 380 μ l θρεπτικού υλικού DMEM χωρίς αντιβιοτικό και εμβρυϊκό βόειο ορό. (Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 2 φορές σε ξεχωριστούς μικροσωλήνες, χρησιμοποιώντας κάθε φορά το κατάλληλο διάλυμα siRNA: negative control (μικροσωλήνας 1-negative) και test siRNA (μικροσωλήνας 1-siRNA)
2. Σε μικροσωλήνα τύπου eppendorf προετοιμάζονται 800 μ l διαλυμένου αντιδραστηρίου διαμόλυνσης της DharmaFECT1 σε θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς αντιβιοτικό και εμβρυϊκό βόειο ορό, προσθέτοντας 16 μ l διαλυμένου αντιδραστηρίου

διαμόλυνσης της DharmaFECT1 σε 784μl θρεπτικού υλικού DMEM χωρίς αντιβιοτικό και εμβρυϊκό βόειο ορό (μικροσωλήνας 2).

3. Πραγματοποιείται ήπια ανάδευση κάθε μικροσωλήνα με χρήση πιπέτας και ακολουθεί επώαση τους για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Αναμειγνύεται το περιεχόμενο των μικροσωλήνων 1 και 2 για τελικό όγκο 800μl σε 2 νέους μικροσωλήνες (μικροσωλήνας 3-negative και μικροσωλήνας 3-siRNA).

Πραγματοποιείται ήπια ανάδευση με χρήση πιπέτας και ακολουθεί επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

5. Σε 2 δοκιμαστικούς σωλήνες όγκου 15 ml προστίθενται το περιεχόμενο των μικροσωλήνων 3 και 3200μl θρεπτικού υλικού DMEM χωρίς αντιβιοτικό, με εμβρυϊκό βόειο ορό για τελικό όγκο 4ml (διάλυμα διαμόλυνσης-negative και διάλυμα διαμόλυνσης-siRNA)

6. Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό καλλιέργειας από τα φρεάτια της μικροπλάκας καλλιέργειας. Στα δύο φρεάτια προστίθεται πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM, L-γλουταμίνη, 4,5g/L D- γλυκόζη, πυροσταφυλικό νάτριο, Gibco®) εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό βόειο ορό (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco®), 100U/ml πενικιλίνη, 100μg/ml στρεπτομυκίνη και 0,25μg/ml αμφοτερικίνη B (Antibiotic/Antimycotic 100X, 10000U/ml πενικιλίνη, 10000μg/ml στρεπτομυκίνη και 25μg/ml αμφοτερικίνη B, Gibco®) τα οποία χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των κυττάρων (untreated). Στο άλλα δύο φρεάτια προστίθεται 1ml διαλύματος διαμόλυνσης- negative, που χρησιμοποιείται ως δείγμα αρνητικού ελέγχου(negative control) και στο άλλο 1ml διαλύματος διαμόλυνσης-siRNA (test siRNA) που χρησιμοποιείται ως το δείγμα αποσιώπησης του γονιδίου.

7. Πραγματοποιείται επώαση της μικροπλάκας καλλιέργειας για 48 ώρες στον κλίβανο σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας 37 °C, υγρασίας 95% και 5% CO₂.

3.1.3 Επίδραση με κυτταροκίνες

Οι καρκινικές κυτταρικές σειρές HCT-116 και HT-29 επώαστηκαν με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, ιντερλευκίνη 17A (IL-17A), της ιντερλευκίνη 22 και TNF-α (Peprotech). Οι κυτταροκίνες διαλυτοποιήθηκαν σε BSA(συγκέντρωσης 1%

προκειμένου να επιτευχθεί η μεταφορά τους και σε BSA 0,1% προκειμένου να διατηρηθούν. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε μικροπλάκες καλλιέργειας 24 φρεατίων σε (σε πυκνότητα 10 x 10⁵ κύτταρα ανά θέση) Μετά από 35 ώρες και όταν αναπτύχθηκαν 40-60% πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού με παράλληλη επώαση των κυττάρων με IL-17A σε συγκεντρώσεις 10, 50, 250 και 500 ng/ml, με TNF-α 10,25,50 και 100 ng/ml και με IL-22 10,50 και 100 ng/ml για 48 ώρες (πραγματοποιήθηκαν και δοκιμές σε 12 και 24 ώρες, χωρίς σαφή αποτελέσματα). Ως θετικός έλεγχος χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία επώαστηκαν μόνο με BSA 1%.

3.1.4 Προσδιορισμός Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού-MTT Assay

Η τροποποιημένη μέθοδος του MTT στηρίζεται στη παρατήρηση ότι το κίτρινο άλας τετραζολίου [3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] ανάγεται από μεταβολικώς ενεργά κύτταρα λόγω της δράσης της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης των μιτοχονδρίων. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός αδιάλυτων μωβ κρυστάλλων φορμαζάνης που απελευθερώνονται από τα κύτταρα και διαλυτοποιούνται με την προσθήκη ισοπροπανόλης. Οι κρύσταλλοι αυτοί παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης σε φάσμα 500- 600nm με μήκος κύματος αναφοράς τα 690nm. Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζεται η μεταβολική ενεργότητα των μιτοχονδρίων και κατ'επέκταση μπορεί να εκτιμηθεί η ζωτικότητα των κυττάρων(Denizot&Lang,1986).

Οι καρκινικές κυτταρικές σειρές HCT-116 και HT-29 καλλιεργήθηκαν με τον τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω στην παράγραφο 3.1.4. Το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με το MTT (Sigma-Aldrich) αραιωμένο σε θρεπτικό απουσία ορού και ερυθρού φαινόλης (phenol red, PR) σε τελική συγκέντρωση 1 mg/mL, και μετέπειτα τα κύτταρα επώαστηκαν για άλλες 3 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια το προϊόν της MTT-φορμαζάνης διαλυτοποιήθηκε σε ισοπροπανόλη και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 570 nm.

3.2 Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα

Τα κύτταρα εκπλύθηκαν με PBS και προστέθηκε διάλυμα θρυψίνης για 5 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια, η θρυψίνη απενεργοποιήθηκε με την προσθήκη ίσης ποσότητας θρεπτικού υλικού εμπλουτισμένου με 10% FBS και τα κύτταρα αφού

αποκολλήθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν στις 1000rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων αναδιαλύθηκε σε 100μl διαλύματος RIPA, Thermo Scientific (25mM Tris-HCl (pH 7,6) 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% Δεοξυχολικό νάτριο, 0,1% SDS, Sodium Dodecyl Sulfate) στο οποίο είχε προστεθεί το μίγμα αναστολέων πρωτεασών (μείγμα αναστολέων πρωτεασών 100x, Protease inhibitor Cocktail kit, Thermo Scientific) και φωσφατασών: 1mM PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride), 2,5mM sodium pyrophosphate, 50mM NaF (sodium fluoride), 1mM β-glycerophosphate, 1mM Na₃VO₄ (sodium orthovanadate) και τοποθετήθηκε σε πάγο για 20 λεπτά. Το κυτταρικό εκχύλισμα που προέκυψε φυγοκεντρήθηκε στις 14000rpm για 10 λεπτά. Συλλέχθηκε το υπερκείμενο το οποίο διατηρήθηκε στους -20oC για άμεση χρήση ή στους -80oC για μακροπρόθεσμη χρήση.

3.2.1 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Σε σωλήνες τύπου eppendorf όγκου 1,5ml παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα αλβουμίνης συγκεντρώσεων 0μg/ml, 125μg/ml, 250μg/ml, 500μg/ml, 750μg/ml, και 1000μg/ml, 1500μg/ml και 2000μg/ml. Από κάθε ένα από τα διαλύματα αυτά μεταφέρονται 20μl σε νέο eppendorf όπου προστίθεται 1ml αντιδραστηρίου Bradford (Quick Start Bradford Dye Reagent 1x, Biorad) και ακολουθεί ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Η φωτομέτρηση των δειγμάτων πραγματοποιείται μέσα σε διάστημα μικρότερο της 1 ώρας, κατά τη διάρκεια της οποίας το σύμπλοκο πρωτεΐνη-χρωστική παραμένει σταθερό. Αφού πραγματοποιηθεί η πρότυπη καμπύλη, τα πρωτεϊνικά δείγματα αραιώνονται 1:10 (τελικός όγκος 20μl) με δις απιονισμένο νερό και στο διάλυμα αυτό προστίθεται 1ml αντιδραστηρίου Bradford. Ως τυφλό δείγμα για τη φωτομέτρηση χρησιμοποιείται διάλυμα RIPA-αναστολέων αραιωμένο (1:10) με δις απιονισμένο νερό τελικού όγκου 20μl και 1ml αντιδραστηρίου Bradford.

3.2.2 Διαχωρισμός πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis-PAGE) χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση των μοριακών βαρών των πρωτεϊνών. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου σχηματίζεται με αντίδραση συμπολυμερισμού ακρυλαμιδίου και N,N'-μεθυλενοδισακρυλαμιδίου (αντιδραστήριο διασταύρωσης). Όσο μεγαλύτερη είναι η

συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου τόσο μικρότερο είναι το μέγεθος των πόρων της πηκτής. Ο πολυμερισμός γίνεται παρουσία μιας ουσίας που περιέχει ελεύθερες ρίζες, π.χ. υπερθειικό αμμώνιο (απαρχητής) και ενός καταλύτη, π.χ. TEMED που καταλύει την αντίδραση σχηματισμού ελευθέρων ριζών. Τελικά οι ελεύθερες ρίζες καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού. Η όλη αντίδραση πολυμερισμού πρέπει να γίνεται απουσία O₂, αφού αυτό δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα να σταματάει η δημιουργία πηκτής. Η πηκτή αποτελείται από δύο τμήματα, την πηκτή επιστοιβάξης και την πηκτή διαχωρισμού, οι οποίες έχουν διαφορετικό μέγεθος πόρων, pH και ιονική ισχύ. Ο ρόλος της πηκτής επιστοιβάξης, η οποία έχει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων και μικρότερο pH είναι να συσσωρεύει τις πρωτεΐνες σε μια στενή περιοχή, ώστε να εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού ως μια λεπτή ταινία και να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός και σύγκριση της κινητικότητας των πρωτεϊνών. _

Με την SDS-PAGE γίνεται διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση τη διαφορετική μοριακή τους μάζα. Το SDS συνδέεται στις πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, με αποτέλεσμα να καταστρέφονται οι μη ομοιοπολικοί δεσμοί των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται, διαχωρίζονται στις υπομονάδες τους και δημιουργούνται σύμπλοκα πρωτεΐνης-SDS. Στα σύμπλοκα αυτά ο λόγος της ποσότητας του SDS που συνδέεται ανά μονάδα μάζας πρωτεΐνης είναι σταθερός, όλα τα σύμπλοκα αποκτούν αρνητικό φορτίο και η κινητικότητά τους στην πηκτή εξαρτάται μόνο από το μοριακό μέγεθος των πρωτεϊνών. Πρωτεΐνες μικρής μοριακής μάζας κινούνται γρηγορότερα δια μέσου των πόρων της πηκτής από πρωτεΐνες μεγαλύτερης μοριακής μάζας. Συνήθως, γίνεται και περαιτέρω αποδιάταξη των πρωτεϊνών με τη χρησιμοποίηση αντιδραστηρίων που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, π.χ. 2-μερκαπτοαιθανόλη ή DTT, για το διαχωρισμό όλων των υπομονάδων.

Γενικά, η μετακίνηση των πρωτεϊνών προς την άνοδο κατά την SDS-PAGE είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου της μοριακής τους μάζας. Με τη χρησιμοποίηση έτσι δεικτών μοριακών βαρών και τον υπολογισμό της σχετικής κινητικότητάς τους στην πηκτή είναι δυνατή η εκτίμηση της μοριακής μάζας μιας άγνωστης πρωτεΐνης.

Με βάση τον παρακάτω πίνακα ετοιμάζονται οι πηκτές διαχωρισμού (separating gel, 6% και 10% ακρυλαμίδιο) και επιστοιβάξης (stacking gel, 5% ακρυλαμίδιο) και τοποθετούνται μεταξύ των πλακών σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης πάχους 0,75mm. Το πήκτωμα διαχωρισμού ήταν 6% και 10% για την ανίχνευση των πρωτεϊνών ανάλογα με το μέγεθος τους. Αρχικά προστίθεται η

πηκτή διαχωρισμού μέχρι ύψους 0,5cm κάτω από τις εγκοπές της χτένας και αφήνεται να πολυμεριστεί για 30λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου αφού πρώτα καλυφθεί με 1ml ισοπροπανόλη προκειμένου να αποκλειστεί το οξυγόνο που θα εμποδίσει τον πολυμερισμό. Στη συνέχεια αφού πολυμεριστεί η πηκτή διαχωρισμού και απομακρυνθεί η ισοπροπανόλη, προστίθεται η πηκτή επιστοιβάξης και τοποθετείται η πλαστική χτένα που επιτρέπει το σχηματισμό 10 πηγαδιών στην ήδη πολυμερισμένη πηκτή επιστοιβάξης και αφήνεται να πολυμεριστεί για περίπου 30 λεπτά.

	Πηκτή διαχωρισμού 6%	Πηκτή διαχωρισμού 10%	Πηκτή επιστοιβάξης 5%
30% ακρυλαμιδίου- Δισακρυλαμιδίου	2 ml	3,4ml	0,83 ml
1,5M Tris pH 8,8	2,6ml	2,6ml	-
0,5M Tris pH 6,8	-		2,5ml
ddH₂O	5,2ml	3,8ml	1,57ml
10% SDS	100μl	100μl	50μl
TEMED	10μl	10μl	5μl
APS (0,1g/ml)	100μl	100μl	50μl

3.2.3 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)

Μετά την ολοκλήρωση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, τόσο το πήκτωμα όσο και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ξεπλένονται στο ρυθμιστικό διάλυμα της μεταφοράς. Η μεταφορά των πρωτεϊνών του πηκτώματος στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επιτυγχάνεται ως εξής: Τοποθετούνται στη σχετική συσκευή μεταφοράς με προσανατολισμό από την κάθοδο (μαύρη επιφάνεια) προς την άνοδο ένα ακρυλικό σφουγγαράκι, δύο κομμάτια χαρτιού Whatman στο μέγεθος της πηκτής, η πηκτή, η μεμβράνη, δύο ακόμη κομμάτια χαρτιού Whatman και ένα ακόμη

ακρυλικό σφουγγαράκι. Τέλος, η συσκευή εμβυθίζεται στο ρυθμιστικό διάλυμα και εφαρμόζεται σταθερή διαφορά δυναμικού 90V για 1,5 ώρα σε θερμοκρασία 4oC

Για να ελέγξουμε αν έγινε επιτυχής μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη, βάψαμε την μεμβράνη με διάλυμα Ponceau S [0,2% (β/ο) Ponceau S – 3% (β/ο) τριγλωροοξικό οξύ]. Η χρωστική αυτή βάφει τις πρωτεΐνες οπότε στην επιτυχή μεταφορά παρατηρήσαμε ζώνες πρωτεϊνών στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Στη συνέχεια, το διάλυμα Ponceau S απομακρύνεται και η μεμβράνη εκπλένεται με νερό. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται σε διάλυμα 5% άπαχου γάλακτος σε TBST για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να παρεμποδιστούν όλες οι μη- ειδικές αντιγονικές θέσεις. Ακολουθούν η επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση που προτείνει ο κατασκευαστής σε διάλυμα 5% γάλακτος σε TBST υπό ανακίνηση για 16 περίπου ώρες στους 4oC. Ακολουθούν πλύσεις με TBST (4 φορές από 10 λεπτά) και επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση που προτείνει ο κατασκευαστής σε διάλυμα 5% γάλακτος σε TBST υπό ανάδευση για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά από πλύσεις με διάλυμα TBST (3 φορές από 10 λεπτά), η μεμβράνη επωάζεται για 2 λεπτά με (βασισμένο στην λουμινόλη) χημειοφωταυγές υπόστρωμα του ενζύμου HRP, καλύπτεται με διαφανή μεμβράνη και τοποθετείται σε κασέτα εμφάνισης. Εκτίθεται σε φωτογραφικό φιλμ (ο χρόνος έκθεσης ποικίλλει ανάλογα με το πρωτογενές αντίσωμα) και ακολουθεί εμφάνιση του φιλμ με επώαση πρώτα στο διάλυμα εμφάνισης και έπειτα στο διάλυμα μονιμοποίησης και τέλος έκπλυση με απιονισμένο νερό. Για την ημι-ποσοτική ανάλυση του σήματος από τα δείγματα που επεξεργάστηκαν, τα φιλμ σαρώνονται και κατόπιν αναλύονται με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (Image-J).

• Πρωτογενή Αντισώματα:

- Anti-Actin Antibody, clone C4 | MAB1501 (Milipore)
- Polycystin-1 (PC-1) Antibody CT πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι του καρξυτελικού άκρου της PC-1 (kindly provided by PKD Core facility)
- Polycystin-2 (PC-2) Antibody (G-20) (sc-10376, Santa Cruz Bt)
- Phospho-mTOR (p-mTOR) (Ser2448) (D9C2) XP® Rabbit mAb (5536, Cell Signaling)
- VEGF Antibody (C-1)⊗ sc-7269, Santa Cruz Bt)

- Phospho-Stat3 (Tyr705) (D3A7) XP[®] Rabbit mAb (5536, Cell Signaling)
- NF-κB p65 (D14E12) XP[®] Rabbit mAb (8242, Cell Signalling)
- NFκB p50 Antibody (E-10): (sc-8414, Santa Cruz Bt)
- IKKβ (D30C6) Rabbit mAb (8943, Cell Signaling)
- Polycystin-2 (PC-2) Antibody (G-20) (sc-10376, Santa Cruz Bt)
- Δευτερογενή αντισώματα:
 - Goat Anti-Mouse IgG Antibody, HRP conjugate | 12-349 (Millipore)
 - Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, HRP-conjugate | 12-348 (Millipore)

3.5 Απομόνωση ολικού RNA από καρκινικές κυτταρικές σειρές HCT-116 και HT29

Η απομόνωση ολικού RNA έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του RNeasy Extraction Kit (Qiagen). Εν συντομία, τα στάδια εκτέλεσης περιλαμβάνουν:

1. Λύση των κυττάρων με διάλυμα RLT και β-μερκαπτοαιθανόλη το οποίο απενεργοποιεί τις RNάσες.
2. Φυγοκέντρηση σε Quiashredder spin columns για την ομογενοποίηση των δειγμάτων.
3. Καθαρισμός του RNA με RNeasy στήλης, όπου το RNA προσδένεται επιλεκτικά, ενώ οι άλλες χημικές προσμίξεις από τα περιεχόμενα του κυττάρου, αδυνατώντας να προσδεθούν στη στήλη, ξεπλένονται διεξοδικά.
4. Το καθαρό RNA εκλύεται τέλος από τη στήλη με νερό απιονισμένο και απαλλαγμένο από RNάσες.

3.5.1 Ποσοτικός προσδιορισμός και ποιοτική ανάλυση του απομονωμένου ολικού RNA

Για τον έλεγχο της καθαρότητας και τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του εκχυλισμένου RNA χρησιμοποιήθηκε φωτόμετρο bioRad. Το δείγμα αραιώθηκε 1/50 σε ρυθμιστικό διάλυμα (χ) pH και ελήφθησαν οι οπτικές απορροφήσεις A260nm (μήκος κύματος απορρόφησης αζωτούχων βάσεων των νουκλεϊκών οξέων) και A280nm (μήκος κύματος απορρόφησης των αρωματικών αμινοξέων των πρωτεϊνών) αντίστοιχα. Για τον έλεγχο της καθαρότητας υπολογίστηκε ο λόγος A260nm/A280nm. Για το καθαρό απομονωμένο RNA χωρίς προσμίξεις ο λόγος κυμαίνεται από 1,8 έως 2,2. Λόγος <1,8 υποδηλώνει την παρουσία πρωτεϊνών ενώ λόγος >2,2 την παρουσία DNA. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του ολικού RNA

γίνεται με τη βοήθεια της σχέσης:

$$\text{RNA}(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260\text{nm}} \times 50 \times 44$$

Όπου 50 ο συντελεστής αραίωσης και 44 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ η μονάδα οπτικής απορρόφησης που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση RNA ίση με 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ σε μήκος κύματος 260nm. Για το μηδενισμό του φωτόμετρου και την αραίωση του RNA χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα 10 Mm Tris•Cl, pH 7.0.

3.5.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής RT-PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής RT-PCR (reverse transcription PCR) χρησιμοποιεί τις ιδιότητες του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση για τη παραγωγή cDNA από εκμαγείο RNA. Οι αντίστροφες μεταγραφάσες είναι ένζυμα που προέρχονται από ρετροϊούς, με δράσεις 5' - 3' πολυμεράσης και 3' - 5' εξωνουκλεάσης με αποτέλεσμα την υδρόλυση του RNA και την απελευθέρωση αδέσμευτου cDNA το οποίο μπορεί στη συνέχεια να ενισχυθεί με αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης. Για τη δημιουργία του cDNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν τυχαία εξαμερή (random hexamers) που υβριδίζονται μη ειδικά στο εκμαγείο RNA, παράγοντας περισσότερα από ένα μόρια cDNA ανά μόριο αρχικού RNA και τα ολιγονουκλεοτίδια δεόξυθυμιδίνης (oligo-dT) που εμφανίζουν μεγαλύτερη ειδικότητα. Χρησιμοποιήθηκαν: ρυθμιστικό διάλυμα 5X που περιέχει μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων δεόξυθυμιδίνης και τυχαίων εξαμερών (Biorad), αντίστροφη μεταγραφάση M-MLV με αναστολέα ριβονουκλεάσης (RNase inhibitor, Biorad), ολικό RNA, νερό απιονισμένο και απαλλαγμένο από RNάσες. Το RNA υποβλήθηκε σε σύνθεση ενός κλώνου cDNA με τη χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV (Moloney murine leukemia virus). Σε μικροσωλήνα τύπου eppendorf όγκου 0,5 mL προστίθενται τα παρακάτω αντιδραστήρια, σύμφωνα με τις οδηγίες του iScript cDNA synthesis kit της Biorad:

- Ρυθμιστικό διάλυμα 5X ,4 μl
- Αντίστροφη μεταγραφάση ,1 μl
- Δείγμα ολικού RNA συγκέντρωσης 1000ng/ μl ,15 μl
- Όγκος αντίδρασης ,20 μl

Ο όγκος του RNA που χρησιμοποιήθηκε από κάθε δείγμα υπολογίστηκε από την εξίσωση:

$$V_{RNA} = \frac{\text{ποσότητα (ng) αλικού RNA}}{[RNA] \left(\frac{ng}{\mu L} \right)}$$

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή master cycler personal (eppendorf)

και οι αντιδράσεις της αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις συνθήκες του πρωτοκόλλου iScript cDNA synthesis kit (Biorad) :

- 5 λεπτά στους 25.C (θερμοκρασία υβριδοποίησης των ολιγονουκλεοτιδίων δεόξυθυμιδίνης και τυχαίων εξαμερών)

- 30 λεπτά στους 42.C (βέλτιστη θερμοκρασία δράσης πολυμερισμού του ενζύμου M-MLV)

5 λεπτά στους 85.C (θερμοκρασία απενεργοποίησης του ενζύμου)

3.6 Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (qReal-Time PCR) με τη χρωστική SYBR Green

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (quantitative Real Time PCR/qRT-PCR) είναι μία μέθοδος που δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης τη στιγμή που πραγματοποιείται. Παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία και ανιχνεύει ακόμα και μικρές διαφορές έκφρασης γονιδίων. Αποτελεί σημαντικό εργαλείο ποσοτικοποίησης, καθώς η ποσοτικοποίηση γίνεται στα αρχικά στάδια της αντίδρασης, σε αντίθεση με τη συμβατική PCR στην οποία τα αποτελέσματα αξιολογούνται στο τέλος της αντίδρασης με αποτέλεσμα η ποσότητα του ειδικού προϊόντος να επηρεάζεται από τεχνικές μεταβολές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.

Η χρωστική SYBR Green είναι μία ένωση που φθορίζει έντονα μετά από πρόσδεση στο δίκλωνο DNA (dsDNA) αλλά δεν εκπέμπει φθορισμό όταν βρίσκεται ελεύθερη στο μίγμα της αντίδρασης. Κατά την υβριδικοποίηση των εκκινητών στη στοχευόμενη αλληλουχία παράγεται φθορίζον σήμα που εξαρτάται από την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος, με αποτέλεσμα τη δυνατότητα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων. Όσο αυξάνεται η ποσότητα του προϊόντος, το σήμα φθορισμού αυξάνεται εκθετικά (λογαριθμική

φάση). Η λογαριθμική ενίσχυση μετατρέπεται σε γραμμική για να καταλήξει στη φάση κορεσμού. Η ποσοτικοποίηση είναι αξιόπιστη όταν γίνεται κατά τη λογαριθμική φάση της αντίδρασης, ενώ οι μετρήσεις της PCR στο τελικό σημείο (πλατό) δεν παρέχουν καμία πληροφορία σχετικά με τις αρχικές ποσότητες του cDNA των δειγμάτων.

Ο έλεγχος της ειδικότητας του παραγόμενου προϊόντος γίνεται με ανάλυση της καμπύλης τήξης. Το προϊόν θερμαίνεται σταδιακά με αποτέλεσμα την απότομη απελευθέρωση της χρωστικής SYBR Green στη θερμοκρασία αποδιάταξης του δίκλωνου DNA (T_m). Η θερμοκρασία T_m είναι χαρακτηριστική της αλληλουχίας που ενισχύεται από κάθε ζεύγος εκκινητών. Η ύπαρξη μίας μοναδικής οξείας κορυφής στην καμπύλη τήξης που αντιστοιχεί στην T_m του προϊόντος, εξασφαλίζει την απουσία διμερών εκκινητών ή μη ειδικών προϊόντων.

Ρυθμίζεται το παρακάτω πρόγραμμα στο θερμικό κυκλοποιητή iCycler IQ Real Time PCR της Biorad:

Πρόγραμμα ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο

- 95°C :4 λεπτά

- 95°C :15 δεύτερα
- 62°C :30 δεύτερα (Επανάληψη για 40 κύκλους)
- 72°C :30 δεύτερα
- 72°C :5 λεπτά

- 55°C -95°C 1°C/λεπτό (Καμπύλη τήξεως)

Αντιδραστήρια ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο

- SYBR Green 10 μ l
- dd H₂O 5,88 μ l
- Forward Primer 50 μ M (150nM τελική) 0.06 μ l
- Reverse Primer 50 μ M (150nM τελική) 0.06 μ l
- cDNA 4 μ l
- Συνολικός όγκος μείγματος 20 μ l (1 αντίδραση)

Έλεγχος της απόδοσης (E) των εκκινητών

Η απόδοση (E) της αντίδρασης για κάθε ζεύγος εκκινητών υπολογίζεται από την καμπύλη αναφοράς η οποία προκύπτει από διαδοχικές αραιώσεις (1/1, 1/10, 1/100, 1/1.000) ενός θετικού δείγματος. Οι τιμές του άξονα y της καμπύλης αντιστοιχούν στις τιμές Ct των σειριακών αραιώσεων. Ο άξονας x αντιστοιχεί στον δεκαδικό λογάριθμο των συγκεντρώσεων. Η απόδοση υπολογίζεται από τη σχέση:

$$E = (10^{-1/s}) - 1$$

Όπου s είναι η κλίση slope της καμπύλης. Μία θεωρητική απόδοση 100% σημαίνει διπλασιασμό των ειδικών προϊόντων σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Ένα ζεύγος εκκινητών γονιδίου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ποσοτικοποίηση εφόσον η απόδοση της αντίδρασης είναι από 80% έως 105%.

- Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης γονιδίων με τη μέθοδο Pfaffl

Ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Pfaffl σύμφωνα με τον τύπο

$$\text{Ratio} = \frac{\text{ΕΔCt γονίδιο αναφοράς (Untreated-treated)}}{\text{ΕΔCt γονίδιο στόχος (Untreated-treated)}}$$

Εκκινητές και θερμοκρασίες υβριδισμού ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο

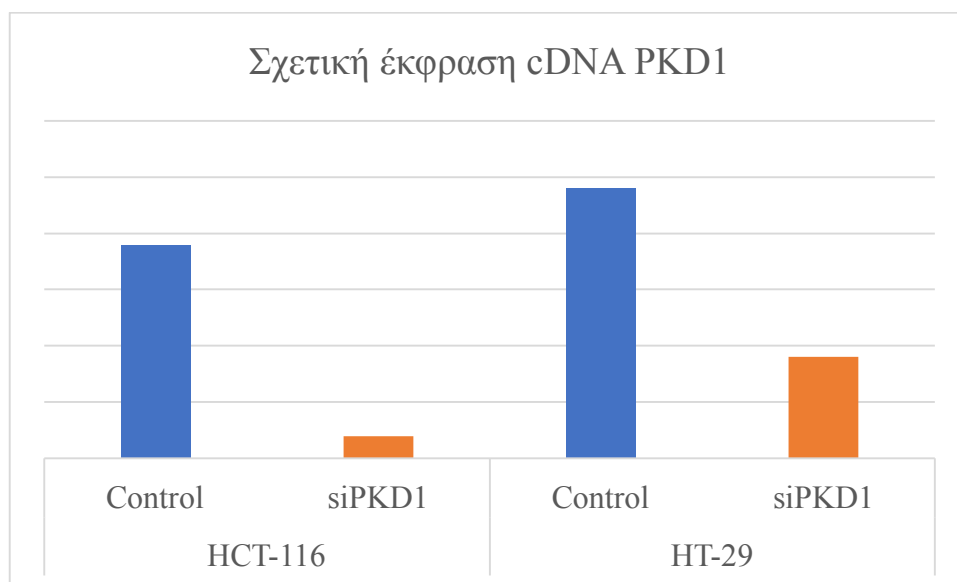
Γονίδιο	Εκκινητές	Θερμοκρασία υβριδισμού (°C)
GAPDH		62
Forward Reverse	GGGTGTGAACCATGAGAAGT CATGCCAGTGAGCTTCCCGTT	
PKD1		62

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Επιλεκτική αποσιώπηση του γονιδίου PKD1 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές HCT-116 και HT-29

Με τη διαμόλυνση των κυττάρων με ειδικά κατασκευασμένες αλληλουχίες siRNA έναντι συγκεκριμένων αλληλουχιών του γονιδίου PKD1 επιτεύχθηκε αποτελεσματική αποσιώπηση στις καρκινικές κυτταρικές σειρές HCT-116 και HT-29 για το γονίδιο PKD1 της PC-1. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που διαμολύνθηκαν με αντίστοιχες αλληλουχίες που δεν στοχεύουν μέσα στο γονίδιο PKD1 (non target).

Τα mRNA των δειγμάτων, στα οποία πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση με siRNA έναντι του PKD1 (siRNA-PKD1) και των δειγμάτων στα οποία πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση με αντίστοιχες αλληλουχίες που δεν στοχεύουν μέσα στο γονίδιο PKD1(non-target) επεξεργάστηκαν με RT-PCR, ώστε να προκύψουν αντίστοιχα cDNA. Η αποσιώπηση του γονιδίου πιστοποιήθηκε με την εφαρμογή ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (qReal-Time PCR) με τη χρωστική SYBR Green (Εικόνα 4.1-1).



Εικόνα 4.1-1 Έλεγχος αποσιώπησης του γονιδίου της PC1 (PKD1) με siRNA στις καρκινικές κυτταρικές σειρές HCT-116 και HT-29 με Real-time PCR.

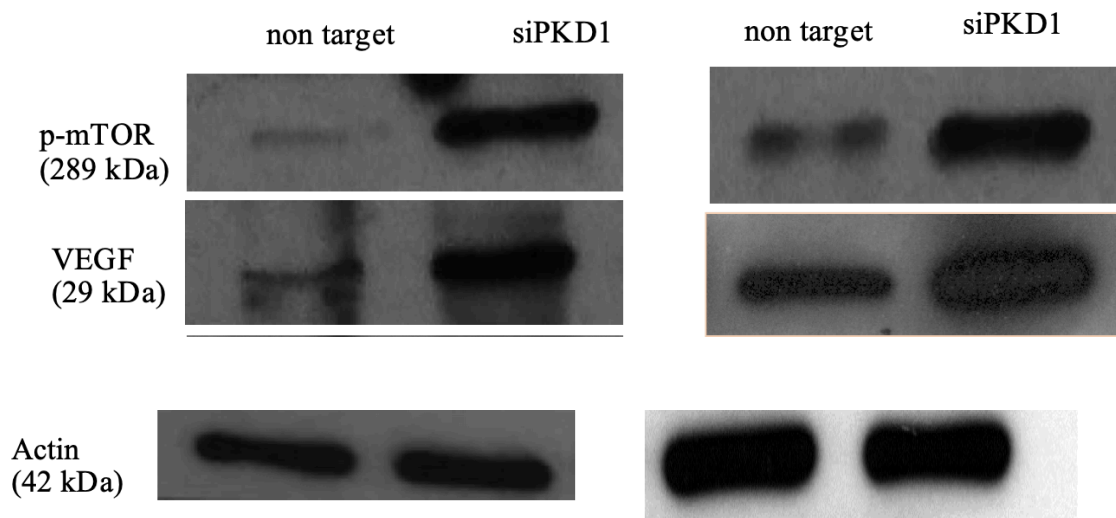
4.1.1 Διερεύνηση της πρωτεϊνικής έκφρασης μορίων που σχετίζονται με καρκινογένεση και φλεγμονή, phospho-mTOR, VEGF, IKKβ, NF-Kb και phospho-STAT-3 μετά από μεταγραφική αναστολή της PC-1.

Πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια που συνδέονται με τον mTOR ρυθμίζουν την έκφραση αγγειογόνων παραγόντων όπως το νιτρικό οξείδιο και οι αγγειοποιητές. Συγκεκριμένα, το mTORC1 συμβάλλει στην αγγειογένεση ενισχύοντας την παραγωγή του VEGF και / ή ενεργώντας ως ένας καθοδικός τελεστής σηματοδότησης του VEGF σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμοι αναστολείς που στοχεύουν την οδό PI3K / AKT / mTOR και οι παράγοντες αυτοί έχουν αποδειχθεί ότι μειώνουν την έκκριση του VEGF και την αγγειογένεση.[107]

Επίσης, η ενεργοποίηση του μονοπατιού mTOR διαμεσολαβεί τη βιολογική συμμετοχή των πολκυστινών.[108] Σε συνδυασμό με την κινάση mTOR, το υπόστρωμά της p70S6K ενεργοποιείται μαζί με τους εναπομείναντες τελεστές του mTOR, όπως ο στόχος του mTORC2 Akt, η 4E-BP1 (4E-binding protein 1) και η s6rp (s6 ribosomal protein).

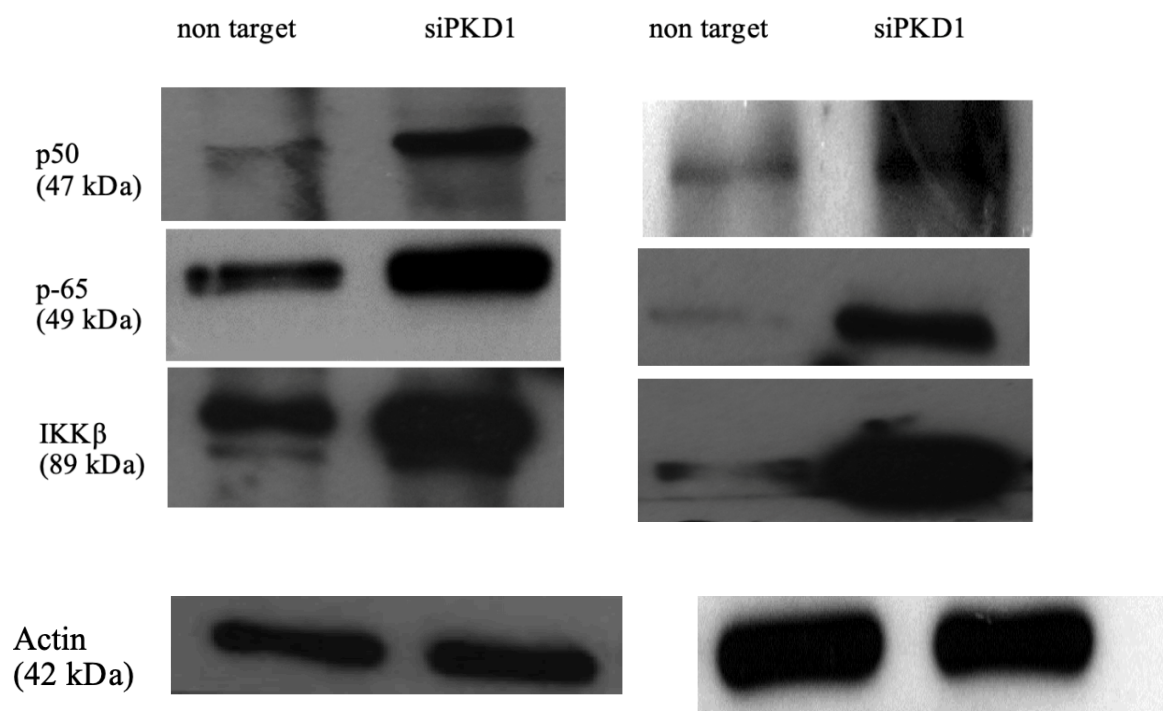
Κατά συνέπεια, διερευνήθηκε η επίδραση της αποσιώπησης του γονιδίου της PC-1 στο μόριο του mTOR και του VEGF στις καρκινικές κυτταρικές σειρές HCT-116 και HT-29. Η αποσιώπηση του γονιδίου της PC1 οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης των ενεργοποιημένων μορφών p-mTOR και σε αυξημένη έκφραση του VEGF.

(Εικόνα 4.1-2).



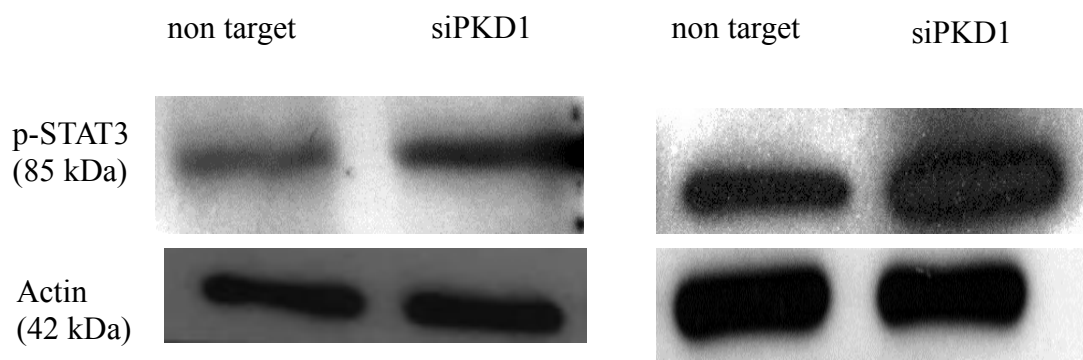
Εικόνα 4.1-2 Επίδραση της αποσιώπησης του γονιδίου της PC1 στον mTOR και στη αγγειογένεση. Οι εικόνες δείχνουν αντιπροσωπευτικό πείραμα όπου η αποσιώπηση του γονιδίου της PC1 στις καρκινικές κυτταρικές σειρές HCT-116 και HT-29 οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων έκφρασης των p-mTOR, και VEGF σε σχέση με τους μάρτυρες (non-target).

Κομβικό ρόλο στην ανάπτυξη φλεγμονής στον ΟΚΚ παρουσιάζει ο NF-κB. Ο NF-κB είναι πιθανό να διαδραματίζει εξέχοντα ρόλο στην ανάπτυξη κολίτιδας και κολίτιδας που σχετίζεται με ογκογένεση. Σε ανθρώπινες εμβρυϊκές νεφρικές κυτταρικές σειρές (HEK293), που εκφράζουν σταθερά την κυτταροπλασματική ουρά της PC-1 παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα πυρηνικού NF-κB.[109]. Κρίθηκε λοιπόν, σκόπιμο να μελετηθεί η επίδραση της αποσιώπησης του γονιδίου της Πολυκυστίνης-1 στο μονοπάτι που ενεργοποιεί τον NF-κB. Τα αποτελέσματα απέδειξαν ότι η μεταγραφική αποσιώπηση της PC-1 οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του IKKβ, γεγονός που λογικά οδηγεί και σε αυξημένα επίπεδα του ενεργοποιημένου συμπλόκου NF-κB, p50/p65 (Εικόνα 4.1-3). Επίσης η αύξηση επιπέδων του NF-κB σε κύτταρα χωρίς λειτουργία της PC-1, εξηγεί περαιτέρω και τα αυξημένα επίπεδα του VEGF.

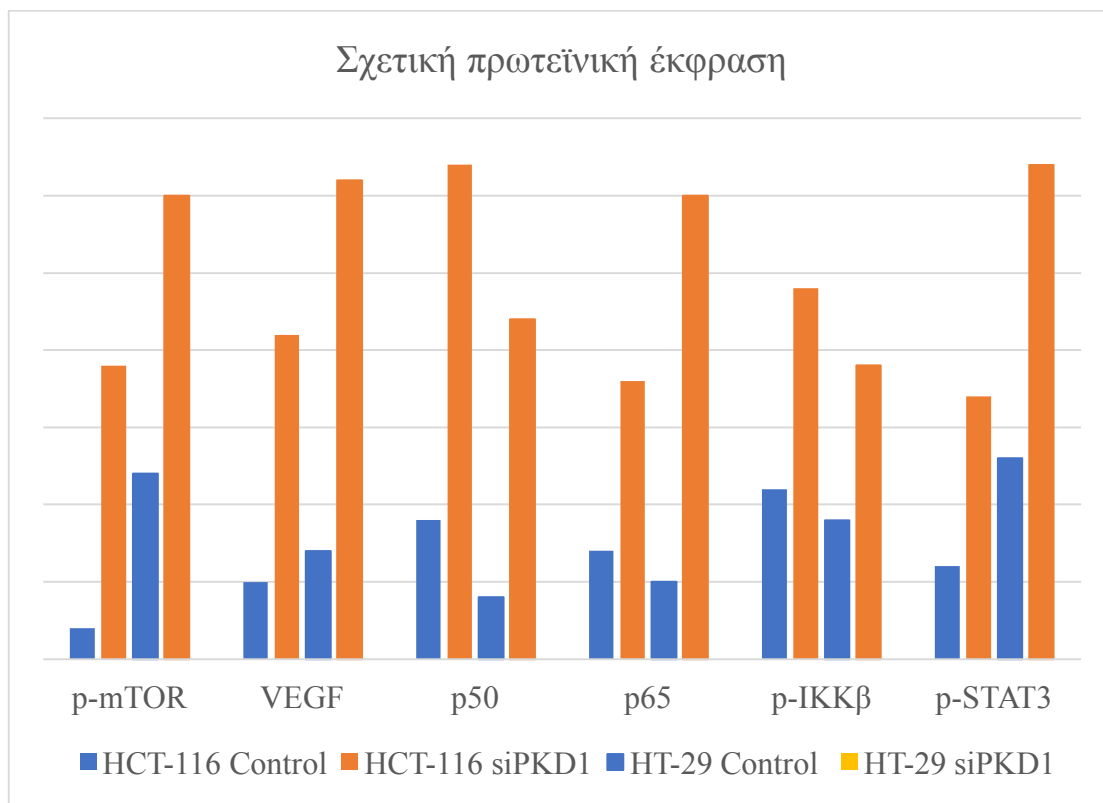


Εικόνα 4.1-2 Επίδραση της αποσιώπησης του γονιδίου της PC1 στο μονοπάτι του NF-κΒ. Σε σχέση με τους μάρτυρες (non target), οι καρκινικές κυτταρικές σειρές HCT-116 και HT-29 που δεν εκφράζουν PC-1 εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ΙΚΚβ και του συμπλόκου p50/p65

Τέλος, ο ενεργοποιημένος STAT3 μπορεί επίσης να προκαλέσει παρατεταμένη ενεργοποίηση του NF-κΒ στο CAC και στον ΟΚΚ. Η πρωτεολυτική διάσπαση του καρβοξυτελικού άκρου της PC1, και η μετανάστευσή του στον πυρήνα αποτρέπει την απευθείας ενεργοποίηση του STAT3. Πράγματι, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση p-STAT3 σε κύτταρα που είχαν ικανότητα έκφρασης της PC-1 σε σχέση με τους μάρτυρες (non-target) (Εικόνα 4.1-3)



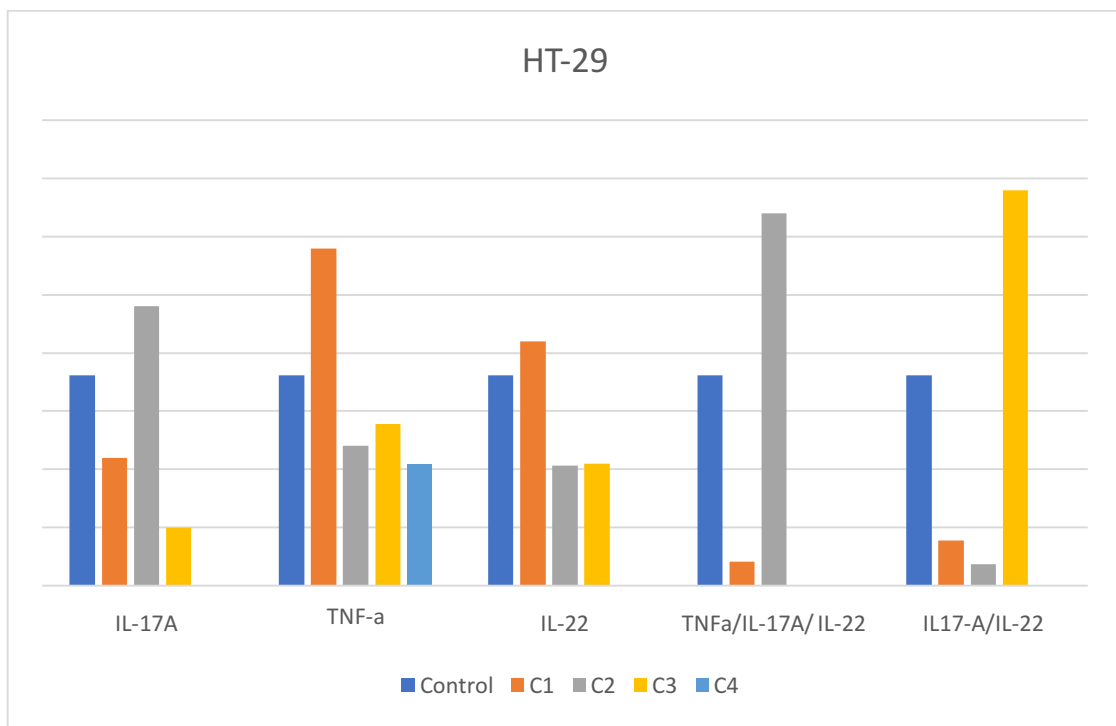
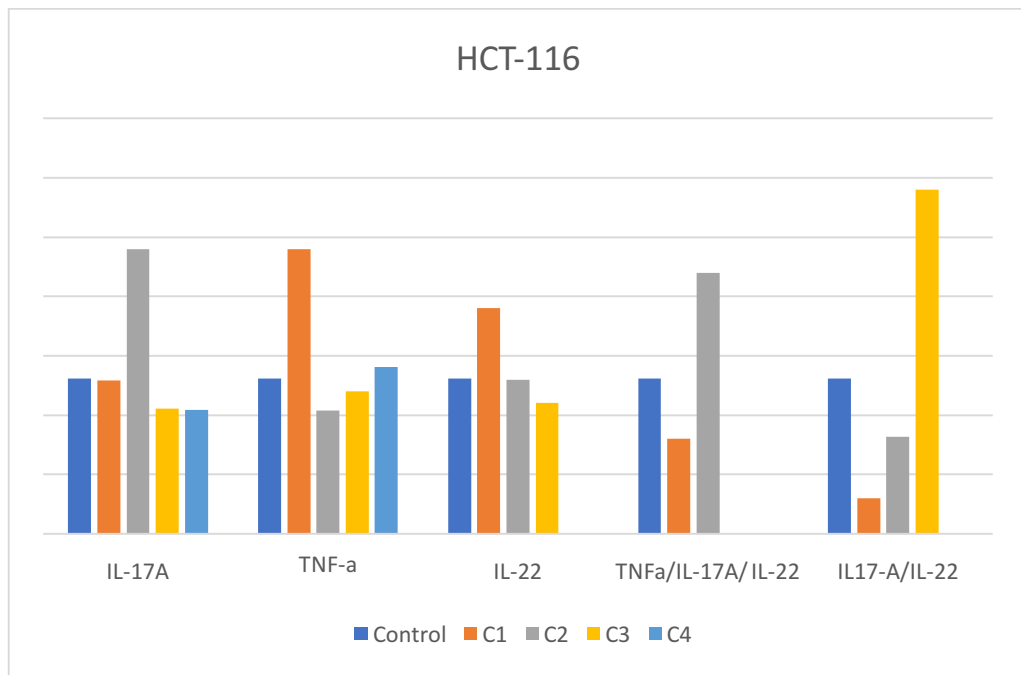
Εικόνα 4.1-2 Επίδραση της αποσιώπησης του γονιδίου της PC1 στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT3. Παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης του STAT3 στις καρκινικές κυτταρικές σειρές HCT-116 και HT-29, που έχουν υποστεί μεταγραφική αποσιώπηση της PC-1.



Εικόνα 4.1-3 Διάγραμμα στο οποίο φαίνεται η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων των εικόνων των Western Blot.

4.2 Διερεύνηση επίδρασης της επίδραση με κυτταροκίνες σε καρκινικές κυτταρικές σειρές HCT-116 και HT-29

Σε καρκινικές κυτταρικές σειρές HCT-116 και HT-29 πραγματοποιήθηκε επώαση με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, της ιντερλευκίνης 17A (IL-17A), της ιντερλευκίνης 22 και του TNF-α. Οι κυτταροκίνες συμμετέχουν ενεργά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και είναι ικανές να προάγουν την ανάπτυξη του όγκου. Μετά την καλλιέργεια των καρκινικών κυτταρικών σειρών και την επώαση με κυτταροκίνες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και διαφορετικούς συνδυασμούς, προστέθηκε το αντιδραστήριο MTT και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 570 nm. Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε στατιστικά σημαντική διαφορά τόσο όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με κάθε μία κυτταροκίνη ξεχωριστά, όσο και με τον συνδυασμό κυτταροκινών, το οποίο παρομοιάζει ένα φλεγμονώδες περιβάλλον γύρω από τα κύτταρα ενός όγκου (Εικόνα 4.2-1). Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για περαιτέρω διερεύνηση.



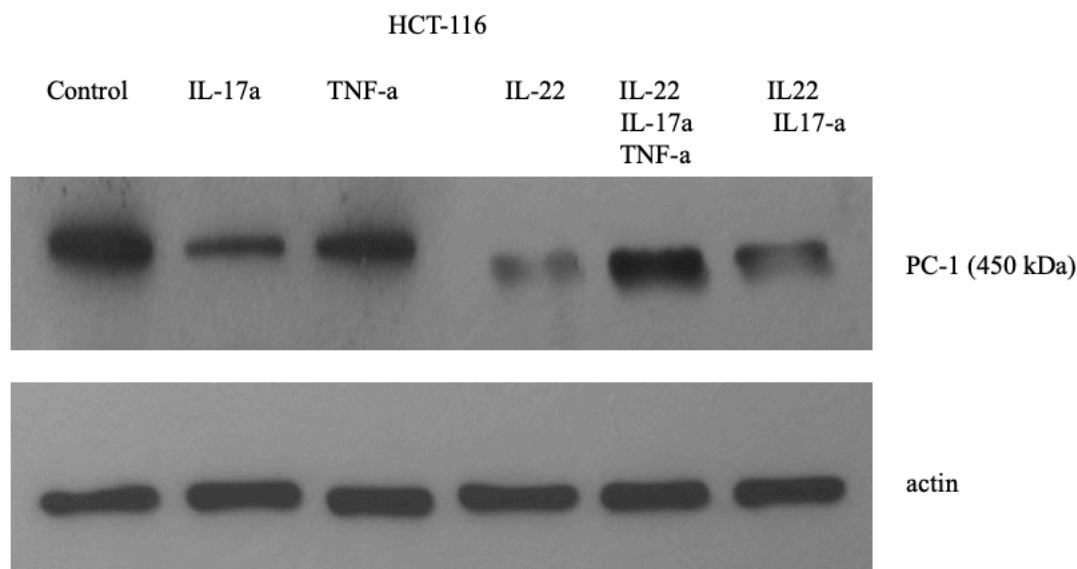
Εικόνα 4.2-1 Επίδραση της λειτουργικής αναστολής της PC-1 στον κυτταρικό

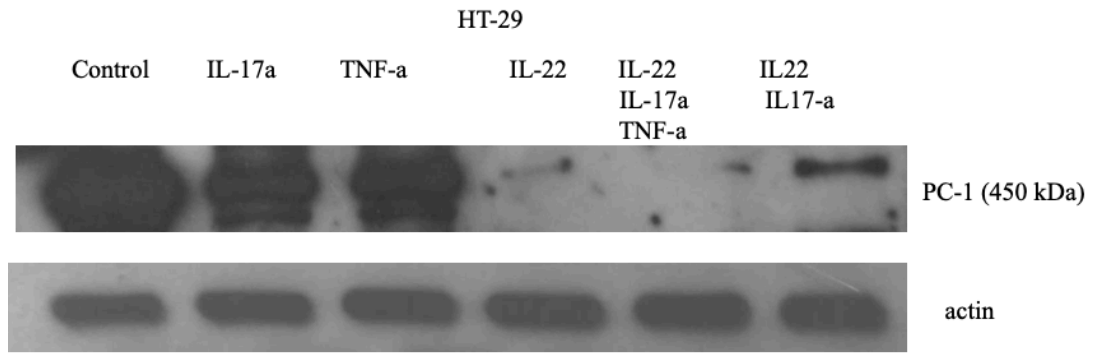
πολλαπλασιασμό. Στα δείγματα που είχαν επωαστεί με κυτταροκίνες παρατηρήθηκε αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε στατιστικά σημαντικό ποσοστό.

4.2.1 Διερεύνηση της έκφρασης των Πολυκυστίνης 1 μετά από επίδραση με κυτταροκίνες σε καρκινικές κυτταρικές σειρές HCT-116 και HT-29

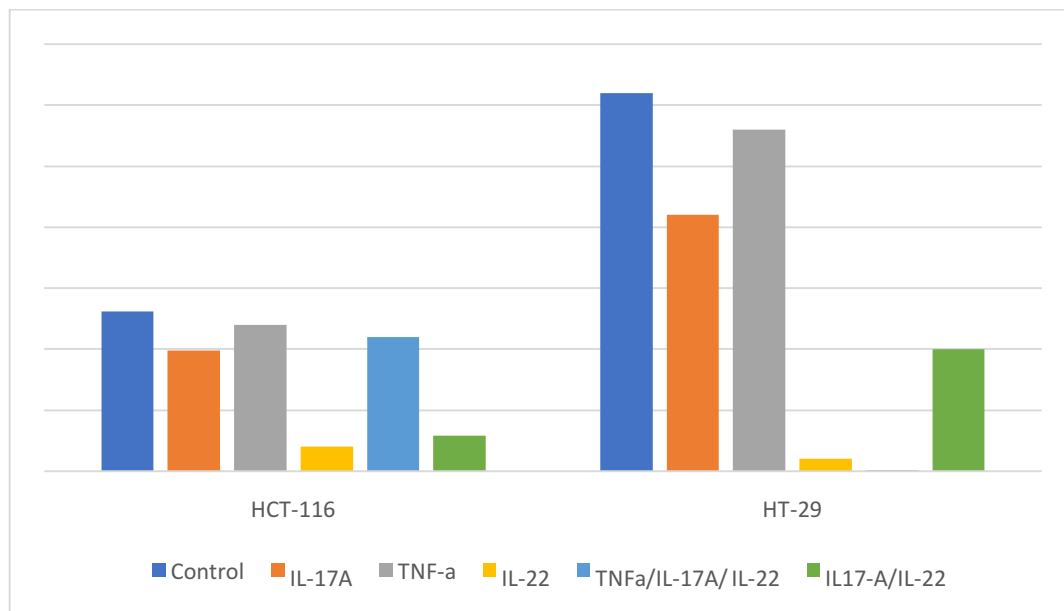
Οι κυτταροκίνες συμμετέχουν ενεργά στην δημιουργία φλεγμονώδους περιβάλλοντος γύρω από έναν όγκο και συμβάλλουν περαιτέρω στην πορεία της ογκογένεσης. Προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει την συσχέτιση της Πολυκυστίνης-1 με την καρκινογένεση. Συγκεκριμένα, η αναστολή της PC-1, είτε λειτουργική είτε μεταγραφική οδηγεί σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κυττάρων σε πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές[107]

Η υπόθεση είναι ότι, εφόσον οι κυτταροκίνες επηρεάζουν τα καρκινικά κύτταρα και τα καθοδηγούν σηματοδοτικά και η Πολυκυστίνη-1 εμφανίζει χαμηλά επίπεδα έκφρασης σε όγκους και καρκινικές κυτταρικές σειρές, άρα είναι πιθανό οι κυτταροκίνες να παίζουν ρόλο στην μειωμένη έκφραση της PC-1. Πράγματι, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε σχέση με κύτταρα ελέγχου υπάρχει μειωμένη έκφραση PC-1 σε κύτταρα που έχουν επωαστεί με κυτταροκίνες.





Εικόνα 4.3-1. Επίδραση των κυτταροκινών στα επίπεδα έκφρασης της PC-1 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.



Εικόνα 4.3-2 Διάγραμμα στο οποίο φαίνεται η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων των εικόνων των Western Blot.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι πολυκυστίνες συμμετέχουν στην ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της μετανάστευσης πολλών κυτταρικών τύπων, καθώς αποτελούν βασικά μόρια αρκετών σηματοδοτικών μονοπατιών [1]. Μεταλλάξεις στα γονίδια των πολυκυστινών ή αλλαγές στην έκφρασή τους οδηγούν σε βλάβες στις παραπάνω κυτταρικές λειτουργίες με αποτέλεσμα σοβαρές ασθένειες, όπως η αυτοσωμική επικρατούσα πολυκυστική νόσος των νεφρών (ΑΕΠΝΝ) [3] και διάφορες νεοπλασίες, όπως ο ορθοκολικός καρκίνος.

Οι συμπαγείς όγκοι, συμπεριλαμβανομένων των τεσσάρων πιο διαδεδομένων καρκίνων παγκοσμίως (καρκίνος του παχέος εντέρου, του μαστού, του πνεύμονα και του προστάτη), θεωρούνται τώρα ως "ανώμαλα" οργανοειδή που περιέχουν καρκινικά κύτταρα καθώς και πολλούς άλλους τύπους κυττάρων. Το μικροπεριβάλλον του όγκου αποτελείται από στρωματικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων ινοβλαστών που σχετίζονται με καρκινώματα, ενδοθηλιακών κυττάρων και διηθητικών ανοσοκυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα είναι σε θέση να μετατρέψουν ένα κανονικό μικροπεριβάλλον σε ένα που υποστηρίζει την ανάπτυξη του όγκου και εξαπλώνεται προκαλώντας αγγειογένεση, φλεγμονή και ανοσοκαταστολή.[112] Η μοριακή παθοβιολογία του CRC ενέχει προ-φλεγμονώδεις καταστάσεις για την προαγωγή της κακοήθους εξέλιξης του όγκου, της εισβολής και της μετάστασης. Είναι γνωστό ότι οι ασθενείς με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο CRC. [113]

Οι πολυκυστίνες, λοιπόν, εμφανίζουν δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά που συντελούν στη ρύθμιση της κυτταρικής ομοιόστασης. [1] Αυτά τα χαρακτηριστικά διαταράσσονται στα νεοπλασματικά κύτταρα, για αυτό το λόγο διερευνήσαμε το ρόλο των PC1 και PC2 σε νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές OKK. Συγκεκριμένα, γνωρίζουμε ότι η Πολυκυστίνη-1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση, όπως έχει αποδειχτεί πρόσφατα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι η λανθασμένη λειτουργία ή/και έκφραση της Πολυκυστίνης-1 οδηγεί σε ενεργοποίηση του μονοπατιού του mTOR, με αποτέλεσμα τον υπερπολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Βασιζόμενοι σε αυτά τα δεδομένα, αποδείξαμε ότι στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου, η μεταγραφική αποσιώπηση της Πολυκυστίνης-1 οδηγεί σε ενεργοποίηση του mTOR, ο οποίος με τη σειρά του επάγει την έκφραση του VEGF.

Ο VEGF αποτελεί έναν από τους πιο γνωστούς επαγωγείς της αγγειογένεσης, ο οποίος έχει άμεση παθογενετική σύνδεση με την ανάπτυξη πολλών τύπων καρκίνου και φλεγμονώδεις νόσους. Ο VEGF είναι γνωστό πως ενεργοποιείται από τον mTOR στα ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και στα καρκινικά κύτταρα νεφρού.[110] Σε σχετικές μελέτες, έχει παρατηρηθεί ότι σε ποντίκια knock-out για το γονίδιο της Πολυκυστίνης-1, αυξάνεται η έκφραση του VEGF στα κύτταρα του ήπατος τους. [111] Συμπερασματικά, η αύξηση της έκφρασης του σε κύτταρα που δεν εκφράζουν Πολυκυστίνη-1, αποδεικνύουν μια σχέση ανάμεσα στα δύο μόρια. Η μη σωστή λειτουργία της Πολυκυστίνης-1 και η λάθος κυτταρική σηματοδότηση που αυτό πυροδοτεί, πιθανό οδηγούν σε αύξηση έκφρασης από το καρκινικό κύτταρο του VEGF, μέσω του mTOR, με αποτέλεσμα να δρομολογείται η διαδικασία της αγγειογένεσης στο περιβάλλον του όγκου και να διευκολύνεται η μεταφορά κυττάρων του ανοσοποιητικού στην περιοχή του όγκου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία φλεγμονής.

Η ρύθμιση της έκφρασης και ενεργοποίησης του NF-κB ελέγχεται αυστηρά στα φυσιολογικά κύτταρα. Ένας από τους γνωστούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς του NF-κB είναι ότι μπορεί να δεσμεύεται στην περιοχή του υποκινητή και να ρυθμίζει την έκφραση του αναστολέα του, IκB. Έτσι ενεργοποιημένος NF-κB μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα έκφρασης IκB και με τη σειρά του να διακόψει την ενεργοποίηση του ίδιου του NF-κB. Με τον τρόπο αυτό, η ενεργοποίηση του NF-κB σε φυσιολογικά κύτταρα είναι παροδική και ρυθμιζόμενη φυσικά. Σε πολλά καρκινικά κύτταρα, το NF-κB έχει ένα συστατικά υψηλό επίπεδο δραστηριότητας. Αυτό το υψηλό επίπεδο δραστηριότητας του NF-κB μπορεί να συσχετιστεί με την εξέλιξη του καρκίνου και την πρόοδο. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ενεργοποίηση του NF-κB οδηγεί σε μονοπάτια σηματοδότησης κατά της απόπτωσης, διεγείρει τον πολλαπλασιασμό, την εισβολή, τη μετάσταση και την αγγειογένεση σε καρκινικά κύτταρα. Είναι ενδιαφέρον ότι η ενεργοποίηση του NF-κB δεν οφείλεται συνήθως σε μεταλλαξιογένεση του ίδιου του NF-κB ή του IκB, αλλά λόγω της απορρύθμισης διαφόρων οδών σηματοδότησης. Επίσης εκτενής έρευνα έχει πραγματοποιηθεί για το ρόλο του NF-κB στη προαγωγή της φλεγμονής, όπου πλέον θεωρείται βασικός μεταγραφικός παράγοντας της φλεγμονής.[116]

Επιπρόσθετα, δεδομένα από τη βιβλιογραφία έχουν υποδείξει συσχέτιση της PC-1 με την διαδικασία της απόπτωσης μέσω του NF-κB. Σε εμβρυικά ηπατικά κύτταρα έχει προηγουμένως αποδειχθεί ότι υπερέκφραση της PC-1 προκαλεί

αυξημένη ενεργότητα του υποκινητή του NF-κB που οδηγεί σε «προστασία» από την απόπτωση, ακόμη και έπειτα από προσθήκη του TNF-α. Το καρβοξυτελικό άκρο της PC-1 υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση, μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου και είναι ικανό να ρυθμίσει την πρόσδεση του NF-κB στο DNA. Μέσω του μηχανισμού αυτού, η PC-1 προσδίδει αντίσταση στην απόπτωση. Αντίθετα, απαλοιφή του γονιδίου της PC-1 προκαλεί μείωση στην ενεργότητα του υποκινητή του NF-κB, γεγονός που καταδεικνύει ότι η σηματοδότηση μέσω NF-κB δεν είναι αποτέλεσμα μόνο του καρβοξυτελικού άκρου της PC-1, αλλά μπορεί να ρυθμιστεί από την ενδογενή έκφραση ολόκληρης της PC-1. Αντίθετα σε *Pkd1^{-/-}* κυτταρικές σειρές παρατηρήθηκε υπερενεργοποίηση των παραγόντων του NF-κB από το c-Met.[115]

Σε συνδυασμό με τα παραπάνω ευρήματα, τα δεδομένα που αποδεικνύουν συσχέτιση της σηματοδότησης μέσω NF-κB στην καρκινογένεση και τον γνωστό ρόλο του NF-κB στην ανάπτυξη φλεγμονής μπορούμε να υποθέσουμε ότι η δυσλειτουργία της PC-1 στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του ενδοκυττάρου ενεργού NF-κB, με αποτέλεσμα να ευνοείται η απαρχή φλεγμονώδους περιβάλλοντος.

Σταθερή ενεργοποίηση του STAT3 εμφανίζεται σε υψηλό ποσοστό όγκων, συμπεριλαμβανομένου του ορθοκολικού καρκίνου, συμβάλλοντας έτσι στον πολλαπλασιασμό των κακοηθών κυττάρων και στην επιβίωση. Αν και ο STAT3 αναγνωρίζεται ως ένας ελκυστικός θεραπευτικός στόχος στο ΟΚΚ, οι συμβατικές προσεγγίσεις που αποσκοπούν στην αναστολή των λειτουργιών του έχουν συναντήσει αρκετούς περιορισμούς. Επιπλέον, οι παράγοντες που διατηρούν την υπερ-ενεργοποίηση του STAT3 στον ΟΚΚ δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί. Επίσης, ενεργοποιείται από πολλούς αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες, συμπεριλαμβανομένης της IL-11 και της IL-22.[96] Η PC1 ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα STAT3 μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης JAK2, γεγονός που οδηγεί σε φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης και ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η PC-1 ρυθμίζει την πρόσδεση του STAT3 στο DNA μέσω του καρβοξυτελικού της άκρου, το οποίο λειτουργεί σαν συμπαράγοντας.

Στα αποτελέσματά μας παρατηρούμε ρύθμιση της ενεργοποίησης του STAT3 από την Πολυκυστίνη-1 με ένα πιο παράδοξο τρόπο. Η μη έκφραση της PC-1 στις καρκινικές σειρές οδηγεί σε υπερφωσφορυλίωση και υπερενεργοποίηση του STAT3. Πιθανόν, ελλείψει του ρυθμιστικού καρβοξυτελικού άκρου της PC-1, να

απορρυθμίζεται η ενεργοποίηση του STAT-3, χρονοεξαρτώμενα. Δηλαδή, ο STAT3 εφόσον δεν λαμβάνει το απαραίτητο σήμα για ρύθμιση από την PC-1, πιθανώς ενεργοποιείται με το πέρασ του χρόνου και από άλλα μονοπάτια, με αποτέλεσμα να απορρυθμίζεται και να υπερλειτουργεί, ευνοώντας την επαγωγή μεταγραφής γονιδίων σχετιζόμενων με φλεγμονή.

Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον είχε ο φαύλος κύκλος που δημιουργείται στον ΟΚΚ, όπου στοιχεία της ογκογένεσης και της φλεγμονής, αλληλοτροφοδοτούν το ένα την ανάπτυξη του άλλου. Καίριο ρόλο σε αυτό διαδραματίζουν οι κυτταροκίνες. Το καρκινικό κύτταρο, όπως εξηγήσαμε πριν, είναι δυνατόν να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή γονιδίων ή τη δραστηριότητα μορίων που επάγουν τη φλεγμονή, στην προκειμένη περίπτωση όταν δεν εκφράζει PC-1. Όμως οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες είναι ικανές να αλλοιώσουν το μεταγραφικό προφίλ του καρκινικού κυττάρου?

Πιο συγκεκριμένα, θεωρήθηκε ενδιαφέρον να μελετήσουμε εάν οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση και λειτουργία της Πολυκυστίνης 1 στα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου. Από προηγούμενες μελέτες σε ανθρώπινους καρκινικούς ιστούς, γνωρίζουμε ότι η PC-1 εμφανίζει μειωμένα επίπεδα έκφρασης σε πολλούς καρκινικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένου και του ΟΚΚ.

Τα αποτελέσματα ήταν θετικά καθώς αποδείχτηκε ότι οι κυτταροκίνες όταν επιδρούν ως μονάδες αλλά και συνεργατικά, δημιουργώντας φλεγμονώδεις περιβάλλον, μειώνουν αισθητά τα επίπεδα έκφρασης της PC-1 στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου. Τα μονοπάτια σηματοδότησης με τα οποία μπορεί να συμβαίνει αυτό είναι ακόμα άγνωστα.

Συμπερασματικά, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η Πολυκυστίνη-1 διατηρεί έναν προφυλακτικό και ανασταλτικό ρόλο τόσο ως προς την ανάπτυξη της ογκογένεσης όσο και για την προαγωγή της φλεγμονής. Μη-λειτουργική Πολυκυστίνη-1 φαίνεται να σημαίνει επαγωγή μονοπατιών και έκφρασης γονιδίων που ευνοούν την ανάπτυξη φλεγμονώδους περιβάλλοντος γύρω από τον όγκο. Επίσης, το φλεγμονώδες περιβάλλον, μέσω των κυτταροκινών είναι ικανό να μειώσει την έκφραση της Πολυκυστίνης-1, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να επιτελέσει τις λειτουργίες της. Η Πολυκυστίνη-1 συμμετέχει, λοιπόν, στον φαύλο κύκλο ανάμεσα στον ΟΚΚ και τη φλεγμονή και οι μηχανισμοί με τους οποίους μπορεί να διαμεσολαβηθεί αυτό αναμένεται να ανακαλυφθούν.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Zhou, J., Polycystins and primary cilia: primers for cell cycle progression. *Annu Rev Physiol*, 2009. 71: p. 83-113.
2. Hughes, J., et al., The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet*, 1995. 10(2): p. 151-60.
3. Torres, V.E., P.C. Harris, and Y. Pirson, Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet*, 2007. 369(9569): p. 1287-301.
4. Nims, N.M., D. Vassmer, and R.L. Maser, Effect of PKD1 gene missense mutations on polycystin-1 membrane topogenesis. *Biochemistry*, 2011. 50(3): p. 349-55.
5. The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. The European Polycystic Kidney Disease Consortium. *Cell*, 1994. 78(4): p. 725.
6. Qian, F., et al., The nanomechanics of polycystin-1 extracellular region. *J Biol Chem*, 2005. 280(49): p. 40723-30.
7. Oatley, P., et al., Atomic force microscopy imaging reveals the domain structure of polycystin-1. *Biochemistry*, 2012. 51(13): p. 2879-88
8. Geng, L., et al., Identification and localization of polycystin, the PKD1 gene product. *J Clin Invest*, 1996. 98(12): p. 2674-82.
9. Kottgen, M. and G. Walz, Subcellular localization and trafficking of polycystins. *Pflugers Arch*, 2005. 451(1): p. 286-93.
10. Ibraghimov-Beskrovnaya, O., et al., Polycystin: in vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(12): p. 6397-402.
11. Scheffers, M.S., et al., Polycystin-1, the product of the polycystic kidney disease 1 gene, co-localizes with desmosomes in MDCK cells. *Hum Mol Genet*, 2000. 9(18): p. 2743-50.
12. Grimm, D.H., et al., Polycystin-1 distribution is modulated by polycystin-2 expression in mammalian cells. *J Biol Chem*, 2003. 278(38): p. 36786-93.
13. Kleymenova, E., et al., Tuberin-dependent membrane localization of polycystin-1: a functional link between polycystic kidney disease and the TSC2 tumor suppressor gene. *Mol Cell*, 2001. 7(4): p. 823-32.
14. Ward, C.J., et al., Polycystin, the polycystic kidney disease 1 protein, is expressed by epithelial cells in fetal, adult, and polycystic kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(4): p. 1524-8.

15. Ong, A.C., Polycystin expression in the kidney and other tissues: complexity, consensus and controversy. *Exp Nephrol*, 2000. 8(4-5): p. 208-14.
16. Dalagiorgou, G., E.K. Basdra, and A.G. Papavassiliou, Polycystin-1: function as a mechanosensor. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010. 42(10): p. 1610-3.
17. Delmas, P., et al., Gating of the polycystin ion channel signaling complex in neurons and kidney cells. *FASEB J*, 2004. 18(6): p. 740-2.
18. Parnell, S.C., et al., The polycystic kidney disease-1 protein, polycystin-1, binds and activates heterotrimeric G-proteins in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. 251(2): p. 625-31.
19. Geng, L., et al., Modification of the composition of polycystin-1 multiprotein complexes by calcium and tyrosine phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 2000. 1535(1): p. 2135.
20. Parnell, S.C., et al., Identification of the major site of in vitro PKA phosphorylation in the polycystin-1 C-terminal cytosolic domain. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 259(3): p. 539-43.
21. Boucher, C.A., et al., Receptor protein tyrosine phosphatases are novel components of a polycystin complex. *Biochim Biophys Acta*, 2011. 1812(10): p. 1225-38.
22. Parnell, S.C., et al., Protein phosphatase-1alpha interacts with and dephosphorylates polycystin-1. *PLoS One*, 2012. 7(6): p. e36798.
23. Nauli, S.M., et al., Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet*, 2003. 33(2): p. 129-37.
24. Talbot, J.J., et al., Polycystin-1 regulates STAT activity by a dual mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(19): p. 7985-90.
25. Xiao, Z., et al., Polycystin-1 regulates skeletogenesis through stimulation of the osteoblast-specific transcription factor RUNX2-II. *J Biol Chem*, 2008. 283(18): p. 12624-34.
26. Dalagiorgou, G., et al., Mechanical stimulation of polycystin-1 induces human osteoblastic gene expression via potentiation of the calcineurin/NFAT signaling axis *Cell Mol Life Sci*, 2013. 70(1): p. 167-80.
27. Chauvet, V., et al., Mechanical stimuli induce cleavage and nuclear translocation of the polycystin-1 C terminus. *J Clin Invest*, 2004. 114(10): p. 1433-43.
28. Gao, H., et al., A short carboxy-terminal domain of polycystin-1 reorganizes the microtubular network and the endoplasmic reticulum. *Exp Cell Res*, 2009. 315(7): p.1157-70.

29. Mochizuki, T., et al., PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science*, 1996. 272(5266): p. 1339-42.
30. Schneider, M.C., et al., A gene similar to PKD1 maps to chromosome 4q22: a candidate gene for PKD2. *Genomics*, 1996. 38(1): p. 1-4.
31. Hoffmeister, H., et al., The human polycystin-2 protein represents an integral membrane protein with six membrane-spanning domains and intracellular N- and C-terminal domains. *Biochem J*, 2011. 433(2): p. 285-94.
32. Petri, E.T., et al., Structure of the EF-hand domain of polycystin-2 suggests a mechanism for Ca²⁺-dependent regulation of polycystin-2 channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(20): p. 9176-81.
33. Feng, S., et al., Identification and functional characterization of an N-terminal oligomerization domain for polycystin-2. *J Biol Chem*, 2008. 283(42): p. 28471-9.
34. Ferreira, F.M., et al., Macromolecular assembly of polycystin-2 intracytosolic C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(24): p. 9833-8.
35. Rundle, D.R., G. Gorbsky, and L. Tsiokas, PKD2 interacts and co-localizes with mDia1 to mitotic spindles of dividing cells: role of mDia1 IN PKD2 localization to mitotic spindles. *J Biol Chem*, 2004. 279(28): p. 29728-39.
36. Foggensteiner, L., et al., Cellular and subcellular distribution of polycystin-2, the protein product of the PKD2 gene. *J Am Soc Nephrol*, 2000. 11(5): p. 814-27.
37. Cai, Y., et al., Identification and characterization of polycystin-2, the PKD2 gene product. *J Biol Chem*, 1999. 274(40): p. 28557-65.
38. Scheffers, M.S., et al., Distinct subcellular expression of endogenous polycystin-2 in the plasma membrane and Golgi apparatus of MDCK cells. *Hum Mol Genet*, 2002. 11(1):p. 59-67.
39. Crump, C.M., et al., PACS-1 binding to adaptors is required for acidic cluster motif-mediated protein traffic. *EMBO J*, 2001. 20(9): p. 2191-201.
40. Kottgen, M., et al., Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation. *EMBO J*, 2005. 24(4): p. 705-16.
41. Streets, A.J., et al., Identification of an N-terminal glycogen synthase kinase 3 phosphorylation site which regulates the functional localization of polycystin-2 in vivo and in vitro. *Hum Mol Genet*, 2006. 15(9): p. 1465-73.
42. Hidaka, S., et al., PIGEA-14, a novel coiled-coil protein affecting the intracellular distribution of polycystin-2. *J Biol Chem*, 2004. 279(33): p. 35009-16.

43. Clapham, D.E., TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 2003. 426(6966): p. 517-24.
44. Koulen, P., et al., Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat Cell Biol*, 2002. 4(3): p. 191-7.
45. Li, Y., et al., Polycystin 2 interacts with type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to modulate intracellular Ca²⁺ signaling. *J Biol Chem*, 2005. 280(50): p. 41298-306.
46. Hanaoka, K., et al., Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature*, 2000. 408(6815): p. 990-4.
47. Cantiello, H.F., Regulation of calcium signaling by polycystin-2. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. 286(6): p. F1012-29.
48. Tsiokas, L., S. Kim, and E.C. Ong, Cell biology of polycystin-2. *Cell Signal*, 2007. 19(3): p. 444-53.
49. Ma, R., et al., PKD2 functions as an epidermal growth factor-activated plasma membrane channel. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(18): p. 8285-98.
50. Newby, L.J., et al., Identification, characterization, and localization of a novel kidney polycystin-1-polycystin-2 complex. *J Biol Chem*, 2002. 277(23): p. 20763-73.
51. Xu, G.M., et al., Polycystin-1 activates and stabilizes the polycystin-2 channel. *J Bio Chem*, 2003. 278(3): p. 1457-62.
52. Delmas, P., et al., Constitutive activation of G-proteins by polycystin-1 is antagonized by polycystin-2. *J Biol Chem*, 2002. 277(13): p. 11276-83.
53. Yu, Y., et al., Structural and molecular basis of the assembly of the TRPP2/PKD1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(28): p. 11558-63.
54. Zhu, J., et al., Structural model of the TRPP2/PKD1 C-terminal coiled-coil complex produced by a combined computational and experimental approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(25): p. 10133-8.
55. Bertuccio, C.A., et al., Polycystin-1 C-terminal cleavage is modulated by polycystin-2 expression. *J Biol Chem*, 2009. 284(31): p. 21011-26.
56. Chapin, H.C., V. Rajendran, and M.J. Caplan, Polycystin-1 surface localization is stimulated by polycystin-2 and cleavage at the G protein-coupled receptor proteolytic site. *Mol Biol Cell*, 2010. 21(24): p. 4338-48.

57. Lantinga-van Leeuwen, I.S., et al., Common regulatory elements in the polycystic kidney disease 1 and 2 promoter regions. *Eur J Hum Genet*, 2005. 13(5): p. 649-59.
58. Bhunia, A.K., et al., PKD1 induces p21(waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2. *Cell*, 2002. 109(2): p. 157-68.
59. Wullschleger, S., R. Loewith, and M.N. Hall, TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 2006. 124(3): p. 471-84.
60. Shillingford, J.M., et al., The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(14): p. 5466-71.
61. Banzi, M., et al., Polycystin-1 promotes PKCalpha-mediated NF-kappaB activation in kidney cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 350(2): p. 257-62.
62. Boletta, A., et al., Polycystin-1, the gene product of PKD1, induces resistance to apoptosis and spontaneous tubulogenesis in MDCK cells. *Mol Cell*, 2000. 6(5): p. 1267-73.
63. Peyronnet, R., et al., Mechanoprotection by polycystins against apoptosis is mediated through the opening of stretch-activated K(2P) channels. *Cell Rep*, 2012. 1(3): p. 241- 50.
64. Wegierski, T., et al., TRPP2 channels regulate apoptosis through the Ca²⁺ concentration in the endoplasmic reticulum. *EMBO J*, 2009. 28(5): p. 490-9.
65. Drummond, I.A., Polycystins, focal adhesions and extracellular matrix interactions. *Biochim Biophys Acta*, 2011. 1812(10): p. 1322-6.
66. Wilson, P.D. and C.R. Burrow, Cystic diseases of the kidney: role of adhesion molecules in normal and abnormal tubulogenesis. *Exp Nephrol*, 1999. 7(2): p. 114-24.
67. Roitbak, T., et al., A polycystin-1 multiprotein complex is disrupted in polycystic kidney disease cells. *Mol Biol Cell*, 2004. 15(3): p. 1334-46.
68. Lantinga-van Leeuwen, I.S., et al., Kidney-specific inactivation of the Pkd1 gene induces rapid cyst formation in developing kidneys and a slow onset of disease in adult mice. *Hum Mol Genet*, 2007. 16(24): p. 3188-96.
69. Piontek, K., et al., A critical developmental switch defines the kinetics of kidney cyst formation after loss of Pkd1. *Nat Med*, 2007. 13(12): p. 1490-5.
70. Hopp, K., et al., Functional polycystin-1 dosage governs autosomal dominant polycystic kidney disease severity. *J Clin Invest*, 2012. 122(11): p. 4257-73.

71. Harris, P.C., What is the role of somatic mutation in autosomal dominant polycystic kidney disease? *J Am Soc Nephrol*, 2010. 21(7): p. 1073-6.
72. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000. 100(1): p. 57- 70.
73. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011. 144(5): p. 646-74.
74. Harris, P.C. and M.L. Watson, Autosomal dominant polycystic kidney disease: neoplasia in disguise? *Nephrol Dial Transplant*, 1997. 12(6): p. 1089-90.
75. Barakat, M.T. and M.P. Scott, Tail wags dog: primary cilia and tumorigenesis. *Cancer Cell*, 2009. 16(4): p. 276-7.
76. Han, Y.G., et al., Dual and opposing roles of primary cilia in medulloblastoma development. *Nat Med*, 2009. 15(9): p. 1062-5.
77. Wong, S.Y., et al., Primary cilia can both mediate and suppress Hedgehog pathwaydependent tumorigenesis. *Nat Med*, 2009. 15(9): p. 1055-61.
78. Moser, J.J., M.J. Fritzler, and J.B. Rattner, Primary ciliogenesis defects are associated with human astrocytoma/glioblastoma cells. *BMC Cancer*, 2009. 9: p. 448.
79. Zhang, K., et al., PKD1 inhibits cancer cells migration and invasion via Wnt signaling pathway in vitro. *Cell Biochem Funct*, 2007. 25(6): p. 767-74.
80. Bian, G.H., et al., Down-regulation of Pkd2 by siRNAs suppresses cell-cell adhesion in the mouse melanoma cells. *Mol Biol Rep*, 2010. 37(5): p. 2387-95.
81. Boyle, P. and B. Levin, World Cancer Report 2008. World Health Organization (International Agency for Research on Cancer), 2008. Lyon 2008.
82. Levin, B., et al., Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology*, 2008. 134(5): p. 1570-95.
83. Ferlay, J., et al., Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 2010. 127(12): p. 2893-917.
84. Bosman, F.T., Carneiro, F., Hruban, R.H., Theise, N.D., WHO Classification of Tumours of the Digestive System, Fourth Edition. IARC W Classification of Tumours, 2010.

85. Marshall, J.R., Prevention of colorectal cancer: diet, chemoprevention, and lifestyle. *Gastroenterol Clin North Am*, 2008. 37(1): p. 73-82, vi.
86. Triantafyllidis, J.K., G. Nasioulas, and P.A. Kosmidis, Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Res*, 2009. 29(7): p. 2727-37.
87. Fearon, E.R., Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol*, 2011. 6: p. 479-507.
88. Talmadge, J.E., Clonal selection of metastasis within the life history of a tumor. *Cancer Res*, 2007. 67(24): p. 11471-5.
89. Knudson, A.G., Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*, 2001. 1(2): p. 157-62.
90. Gargalionis, A.N., et al., Histone modifications as a pathogenic mechanism of colorectal tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012. 44(8): p. 1276-89.
91. Gargalionis, A.N., E.K. Basdra, and A.G. Papavassiliou, MicroRNAs and Colorectal Cancer. *Curr Pharm Biotechnol*, 2013. accepted.
92. Sakamoto K, Maeda S, Hikiba Y, et al. Constitutive NF-kappaB activation in colorectal carcinoma plays a key role in angiogenesis, promoting tumor growth. *Clin Cancer Res* 2009;15:2248– 2258.
93. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009;9:798– 809.
94. Wang S, Liu Z, Wang L, Zhang X. NF-kappaB signaling pathway, inflammation and colorectal cancer. *Cell Mol Immunol* 2009;6: 327-234.
95. Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, et al. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest* 2008;118:560–570.
96. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 2009;15:103–113.
97. Naugler WE, Karin M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol ed* 2008;14:109–119.
98. Lee H, Herrmann A, Deng JH, et al. Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer Cell* 2009;15:283–293.

99. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006;441:431–436.
100. Kojima M, Morisaki T, Sasaki N, et al. Increased nuclear factor-kB activation in human colorectal carcinoma and its correlation with tumor progression. *Anticancer Res* 2004;24:675–681.
101. Greten FR, Karin M. NF-kB: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005;5:749–759.
102. Barbie DA, Tamayo P, Boehm JS, et al. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* 2009;462:108–112.
103. Naugler WE, Karin M. NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev* 2008;18:19–26.
104. Meylan E, Dooley AL, Feldser DM, et al. Requirement for NfkappaB signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma. *Nature* 2009;462:104–107.
105. Wang C-Y, Mayo MW, Baldwin AS Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kB. *Science* 1996;274:784–787.
106. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NfkappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 2009;27:693–733.
107. Wang S, Lu J, You Q, Huang H, Chen Y, Liu K. The mTOR/AP-1/VEGF signaling pathway regulates vascular endothelial cell growth. *Oncotarget*. 2016 Aug 16;7(33):53269-53276.
108. Papavassiliou KA, Zoi I, Gargalionis AN, Koutsilieris M. Polycystin-1 affects cancer cell behaviour and interacts with mTOR and Jak signalling pathways in cancer cell lines. *J Cell Mol Med*. 2019 Sep;23(9):6215-6227
109. Aguiari G, Varani K, Bogo M, Mangolini A, Vincenzi F, Durante C, Gessi S, Sacchetto V, Catizone L, Harris P, Rizzuto R, Borea PA, Del Senno L. Deficiency of polycystic kidney disease-1 gene (PKD1) expression increases A(3) adenosine receptors in human renal cells: implications for cAMP-dependent signalling and proliferation of PKD1-mutated cystic cells. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jun;1792(6):531-40.
110. Radboud University Medical Centre, Nijmegen, the Netherlands. p.mulders@uro.umcn.nl. Vascular endothelial growth factor and mTOR

- pathways in renal cell carcinoma: differences and synergies of two targeted mechanisms. *BJU Int.* 2009 Dec;104(11):1585-9.
111. Spirli C, Okolicsanyi S, Fiorotto R, Fabris L, Cadamuro M, Lecchi S, Tian X, Somlo S, Strazzabosco M. ERK1/2-dependent vascular endothelial growth factor signaling sustains cyst growth in polycystin-2 defective mice. *Gastroenterology.* 2010 Jan;138(1):360-371.e7
 112. Raymond N. Dubois, MD, PhD Role of Inflammation and Inflammatory Mediators in Colorectal Cancer, *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2014; 125: 358–373.
 113. Janakiram NB¹, Rao CV. The role of inflammation in colon cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2014;816:25-52.
 114. Manuela Banzi, Gianluca Aguiari, Viky Trimi, Alessandra Mangolini, Paolo Pinton, Ralph Witzgall, Rosario Rizzuto, Laura del Senno. Polycystin-1 promotes PKC-mediated NF- κ B activation in kidney cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006. 350 :257–262
 115. Shan Qin, Mary Taglienti, Lei Cai, Jing Zhou, and Jordan A. Kreidberg, c-Met and NF- κ B–Dependent Overexpression of Wnt7a and -7b and Pax2 Promotes Cystogenesis in Polycystic Kidney Disease, *J Am Soc Nephrol.* 2012 Aug; 23(8): 1309–1318.
 116. Ting Liu, Lingyun Zhang, Donghyun Joo, and Shao-Cong Sun. NF- κ B signaling in inflammation, *Signal Transduct Target Ther.* 2017; 2: 17023.