



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

**ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΚΑΙ  
ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

Μεταπτυχιακή διατριβή τίτλου ειδίκευσης:

**Ρόλος των CRF πεπτιδίων στην κινητικότητα των MCF7 καρκινικών  
κυττάρων**

**ΑΝΔΡΕΑΚΟΥ ΕΙΡΗΝΗ-ΖΑΧΑΡΟΥΛΑ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2008**



MOLECULAR BASIS  
OF HUMAN DISEASES  
ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ  
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ  
ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

**ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΚΑΙ  
ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

Μεταπτυχιακή διατριβή τίτλου ειδίκευσης:

**Ρόλος των CRF πεπτιδίων στην κινητικότητα των MCF7 καρκινικών  
κυττάρων**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ:**

Τσατσάνης Χρήστος, Επίκουρος καθηγητής Κλινικής Χημείας, Τμήμα  
Ιατρικής

Μακρυγιαννάκης Αντώνης, Αναπληρωτής καθηγητής της Μαιευτικής-  
Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής

**ΑΝΔΡΕΑΚΟΥ ΕΙΡΗΝΗ-ΖΑΧΑΡΟΥΛΑ**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Κλινικής Χημείας, του τομέα Εργαστηριακής Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Κρήτης στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Κλινική & Γενετική Αιτιολογία, Διαγνωστική & Θεραπευτική των Ασθενειών του Ανθρώπου, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Κλινικής Χημείας, Χρήστου Τσατσάνη.

Καταρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Χρήστο Τσατσάνη για την επιλογή μου και τη δυνατότητα που μου έδωσε να δουλέψω στο εργαστήριο του αλλά κυρίως για την άριστη συνεργασία και τις επιστημονικές του συμβουλές καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αντώνη Μακρυγιαννάκη, Αναπληρωτή καθηγητή της μαιευτικής-γυναικολογικής κλινικής του Πανεπιστημίου Κρήτης για την αξιολόγηση της πορείας της παρούσης εργασίας.

Θα ήθελα, επιπλέον, μέσα από την καρδιά μου να ευχαριστήσω πολύ την Αριάδνη Ανδρουλιδάκη για τη βοήθειά της, τις εύστοχες συμβουλές και παρατηρήσεις της τόσο κατά την εκπόνηση όσο και κατά τη συγγραφή αυτής της εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στην Ειρήνη Δερμιτζάκη τόσο για τη βοήθειά της στη διαδικασία του ανοσοφθορισμού όσο και στις συμβουλές της και παρατηρήσεις για όποτε χρειάστηκα τη βοήθειά της.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη βοήθειά τους και τη συνεργασία μας καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας εργασίας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο συνηθέστερος καρκίνος στις γυναίκες και η συχνότητα εμφάνισής του αυξάνει σταθερά. Είναι η κύρια αιτία θανάτου στις γυναίκες και περίπου το 50% των ασθενών αναπτύσσουν μεταστατικό καρκίνο.

Για την αντιμετώπισή του καρκίνου του μαστού χρησιμοποιούνται πολλές θεραπείες όπως χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, εγχείρηση και ορμονοθεραπεία που μπορεί όμως να έχουν ανεπιθύμητες επιδράσεις. Μελλοντικός στόχος είναι να υπάρξουν νέες θεραπείες που να βασίζονται σε μηχανισμούς δράσης έναντι συγκεκριμένων μορίων-στόχων που χαρακτηρίζουν ειδικά τα καρκινικά κύτταρα.

Τα πεπτίδια της CRF οικογένειας, τα οποία λόγω του κυρίαρχου ρόλου που έχουν στην απόκριση του οργανισμού στο στρες χαρακτηρίζονται ως νευροπεπτίδια του στρες, έχει βρεθεί να εκφράζονται και να εκκρίνονται από διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων και μέσω των υποδοχέων τους που είτε εκφράζονται στα κύτταρα αυτά είτε σε γειτονικούς ιστούς, επάγουν διαδικασίες που επηρεάζουν τη φυσιολογία του όγκου.

Στην κυτταρική σειρά MCF7 του καρκίνου του μαστού έχειδειχθεί ότι σε συνθήκες χωρίς ορό τα CRF πεπτίδια επηρεάζουν διαδικασίες, όπως τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση τους. Με την παρούσα εργασία θέλαμε να ελέγξουμε αν τα πεπτίδια της CRF οικογένειας επηρεάζουν και μια άλλη ιδιότητά τους, την κινητικότητα. Πιο συγκεκριμένα μελετήσαμε την επίδραση που τα CRF πεπτίδια έχουν σε παράγοντες, που έχειδειχθεί να επηρεάζουν την ικανότητα μετάστασης των καρκινικών κυττάρων.

Οι κυκλοοξυγενάσες είναι ένζυμα που έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη του καρκινικού όγκου. Η δράση τους οδηγεί στην απελευθέρωση προσταγλανδινών, η παραγωγή των οποίων έχει άμεσα συνδεθεί με την ικανότητα που αποκτούν τα καρκινικά κύτταρα να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και να έχουν αυξημένη ικανότητα να δημιουργούν μεταστάσεις. Στη συγκεκριμένη εργασία παρατηρήθηκε ότι

τα CRF πεπτίδια δρουν μέσω της κυκλοοξυγενάσης Cox1 και προκαλούν αύξηση των επιπέδων των προσταγλανδινών, ύστερα από 6 και 16 ώρες επίδρασης των κυττάρων MCF7 με τα πεπτίδια αυτά.

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες, ένζυμα που αποδομούν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, έχει δειχθεί να εμπλέκονται σε πολλές φάσεις της καρκινογένεσης από την εμφάνισή της έως τη μετάσταση. Ελέγχθηκε η επίδραση που πιθανά τα CRF πεπτίδια έχουν στην έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών και παρατηρήθηκε ότι, ύστερα από μεγάλα χρονικά διαστήματα επίδρασης, τα CRF πεπτίδια αυξάνουν τα επίπεδα των μεταλλοπρωτεϊνών.

Επίσης ελέγχθηκε η επίδραση των CRF πεπτιδίων στα επίπεδα του αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών, TIMP1. Ο TIMP1 αναστολέας φαίνεται να επηρεάζει την εξέλιξη του καρκίνου όχι μόνο εμποδίζοντας τη δράση των μεταλλοπρωτεϊνών αλλά και δρώντας με τρόπο ανεξάρτητο των μεταλλοπρωτεϊνών. Ύστερα από μεγάλα χρονικά διαστήματα επίδρασης των MCF κυττάρων με τα CRF πεπτίδια παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του.

Η κινάση FAK είναι μία κινάση τυροσίνης, η φωσφορυλίωση της οποίας και κατ' επέκταση η ενεργοποίηση της, έχει άμεσα συνδεθεί με την ενεργοποίηση μονοπατιών που εμπλέκονται σε πολλές διαδικασίες των κυττάρων, όπως απόπτωση, πολλαπλασιασμός και κινητικότητα. Αύξηση της φωσφορυλίωσής της έχει συσχετιστεί με την αύξηση της κινητικότητας των καρκινικών κυττάρων. Χρησιμοποιώντας τη διαδικασία του ανοσοφθορισμού παρατηρήθηκε αύξηση της φωσφορυλίωσής της ύστερα από επίδραση των MCF κυττάρων με τα CRF πεπτίδια.

Συγκεντρώνοντας τα παραπάνω αποτελέσματα καταλήγουμε ότι στην κυτταρική σειρά MCF7 του μαστού, σε συνθήκες χωρίς ορό, τα CRF πεπτίδια εμφανίζουν πλειοτροπική δράση. Επηρεάζουν πολλούς και διαφορετικούς παράγοντες, η δράση των οποίων έχει δειχθεί ότι επηρεάζει την κινητικότητα των κυττάρων αυτών.

## ABSTRACT

Breast cancer is the most common type of cancer amongst women and the most common cause of cancer death. The incidence of breast cancer varies greatly around the world, being lower in less-developed countries and greatest in the more-developed countries.

Many times breast cancer can metastasize via lymphatics to nearby lymph nodes, usually those under the arm. Breast cancer can also spread to other parts of the body via blood vessels or the lymphatic system, like to the lungs, pleura (the lining of the lungs), liver, brain, and most commonly to the bones.

There are many therapies for breast cancer treatment such as, surgery, hormonal therapy, chemotherapy and radiotherapy. All these therapies, usually cause health problems. In the future scientists are trying to find new therapies against molecules that characterize specifically cancer cells.

Peptides of the CRF family, that belong to stress neuropeptides, are expressed and secreted by cancer cells and through their receptors (CRFRs), which are expressed by cancer cells or by neighboring cells, they induce actions that affect the progress of the tumor.

The aim of this study was to find out the role that possibly CRF peptides have in cell motility and metastasis of cell line MCF7 of breast cancer. Generally it has been shown that CRF peptides affect many functions of breast cancer cell line MCF7, like proliferation and apoptosis. Apart from these functions we wanted to study the action of CRF peptides in MCF7 cell motility, and more specifically we wanted to see how CRF peptides affect the expression of many factors that have been implicated in the increase of cancer cell motility.

Cyclooxygenase Cox1 is an enzyme that catalyzes the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. The production of prostaglandins has been associated with increase in cancer cell motility. From our results, it was shown that CRF peptides induce the expression of Cox1 after 6 and 16 hours of incubation and also increase the production of prostaglandins.

Metalloproteinases are endopeptidases that also play significant role in tumor progression. It has been shown that CRF peptides affect the express

ion of the MMP2 and MMP9 metalloproteinases. More specifically there was an increase of the levels of these two metalloproteinases after many hours incubation of MCF7 cells with CRF peptides.

In contrast, TIMP1 an enzyme that inhibits the action of the metalloproteinases and also implicates in cancer cell motility, it was found from our results that CRF peptides decrease the production of it.

Finally FAK kinase and more specifically the phosphorylation levels of it has also been implicated with the process of metastasis. With immunofluorescence we showed that CRF peptides increase the phosphorylation of this kinase.

Conclusively, our results show that CRF peptides affect the expression of many factors that are involved in breast cancer cell motility and probably represent very good targets in order to avoid cancer progression.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
1. 1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ .....	2
1. 2. CRF ΠΕΠΤΙΔΙΑ .....	3
1. 2.1. CRF .....	3
1. 2.2. UROCORTINS .....	4
1. 3. CRF RECEPTORS .....	5
1. 4. CRF ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	8
1. 5. ΚΥΚΛΟΞΥΓΕΝΑΣΕΣ .....	10
1. 5.1. ΠΡΟΣΤΑΓΛΑΝΔΙΝΕΣ .....	11
1. 6. ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΙΝΑΣΕΣ .....	12
1. 6.1. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΙΝΑΣΩΝ .....	13
1. 6.2. ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΙΝΑΣΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ .....	14
<b><u>ΣΚΟΠΟΣ</u></b> .....	17
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	18
2. 1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ .....	18
2. 1.1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ .....	19
2. 1.2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ .....	20
2. 1.3. ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΡΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑ .....	21
2. 2. ΜΕΘΟΔΟΙ .....	22
2. 2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ.....	22



2. 2.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΛΕΚΤΙΚΗΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΤΟΥ RNA ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΙΔΙΚΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ .....	23
2. 2.2a. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ.....	23
2. 2.2b. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ .....	24
2. 2.2c. PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ .....	28
2. 2.3. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ .....	29
2. 2.3a. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ .....	29
2.2.3b. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ.....	30
2.2.3c. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ.....	32
2. 2.3d. ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΜΕ ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΕΙΔΙΚΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΘΥΜΗΤΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ .....	33
2. 2.4. PROSTAGLANDIN SCREENING EIA KIT.....	35
2. 2.5. ΕΝΖΥΜΟΣΥΝΔΕΤΗ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΗ ΜΕΤΡΗΣΗ.....	36
2. 2.6. ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ .....	37
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>38</b>
3. 1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ CRF ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ COX1 .....	39
3. 2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ ΠΡΟΣΤΑΓΛΑΝΔΙΝΩΝ ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ CRF ΚΑΙ UCN1 .....	41
3. 2.1. ΕΠΩΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MCF7 ΜΕ ΤΟΝ CRF .....	41

3. 2.2. ΕΠΩΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MCF7 ΜΕ ΤΗΝ UCN1 .....	42
3. 2.3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ ΠΡΟΣΤΑΓΛΑΝΔΙΝΩΝ ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΟΝ CRF ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ COX1 .....	43
3. 2.3.1. ΕΠΩΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΟΝ CRF ΓΙΑ 6 ΩΡΕΣ ..	44
3. 2.3.2. ΕΠΩΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΟΝ CRF ΓΙΑ 16 ΩΡΕΣ.	45
3. 3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΕ REAL-TIME PCR ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΙΝΑΣΩΝ MMP2 ΚΑΙ MMP9 ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ TIMP1 ...	46
3. 3.1. ΕΠΙΠΕΔΑ mRNA ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΙΝΑΣΗΣ MMP1 .....	46
3. 3.1.a. ΕΠΩΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MCF7 ΜΕ ΤΟΝ CRF.....	46
3. 3.1.b. ΕΠΩΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MCF7 ΜΕ ΤΗΝ UCN1 .....	47
3. 3.2. ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΟΥ mRNA ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΙΝΑΣΗΣ MMP9.....	48
3. 3.2.a. ΕΠΩΑΣΗ ΤΩΝ MCF7 ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΟΝ CRF.....	48
3. 3.2.b. ΕΠΩΑΣΗ ΤΩΝ MCF7ΚΥΤΤΑΡΩΝ MCF7 ΜΕ ΤΗΝ UCN1 ...	49
3. 3.3. ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΟΥ mRNA ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΙΝΑΣΩΝ TIMP1 .....	50
3. 3.3.a. ΕΠΩΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MCF7 ΜΕ ΤΟΝ CRF.....	50
3. 3.3.b. ΕΠΩΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MCF7 ΜΕ ΤΗΝ UCN1 .....	51

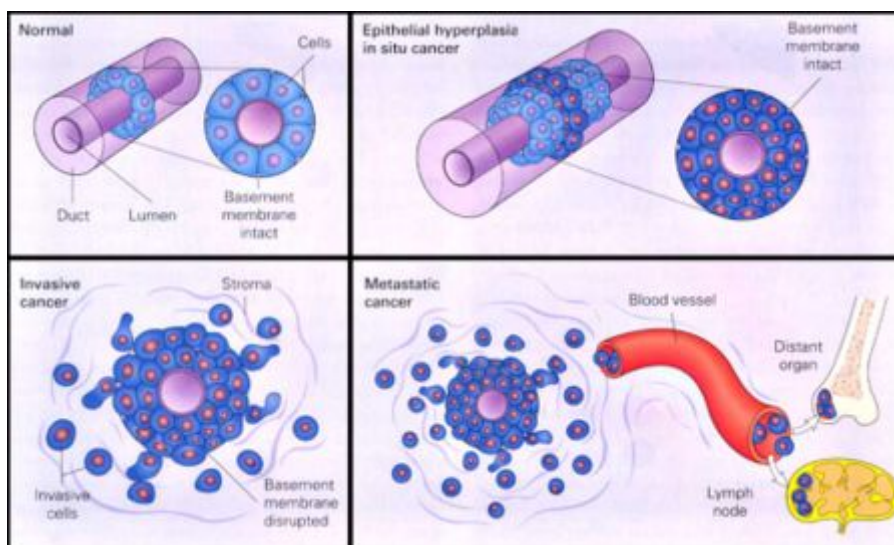
3. 4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΙΝΑΣΩΝ ΤΙΜΡΙ ΜΕ ELISA.....	52
3. 5. ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ FAK.....	53
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	55
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	62

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Είναι η συνήθης κακοήθεια και παγκοσμίως η πιο συχνή αιτία θανάτου στις γυναίκες. Στις ανεπτυγμένες κυρίως χώρες του Δυτικού ημισφαιρίου ο καρκίνος του μαστού είναι η συχνότερη νεοπλασία των γυναικών. Ο κίνδυνος εμφάνισης του καρκίνου του μαστού αυξάνει με την ηλικία. 1 στις 7 γυναίκες που φτάνουν στην ηλικία των 90 ετών προσβάλλονται από τον καρκίνο του μαστού.

Μερικές φορές ο καρκίνος του μαστού εμφανίζεται ως μεταστατική νόσος, που σημαίνει ότι ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί πέρα από το αρχικό όργανο. Ο μεταστατικός καρκίνος του στήθους εμφανίζει συμπτώματα που εξαρτάται από το μέρος της μετάστασης. Τα πιο συνήθη σημεία μετάστασης είναι το οστόν, το ήπαρ, ο πνεύμονας και ο εγκέφαλος (1).



**ΕΙΚΟΝΑ 1.** Αρχικά τα κύτταρα του στήθους έχουν χάσει την ικανότητα ρύθμισης της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού τους αλλά παραμένουν εντός ορίων του αγωγού. Όσο τα κύτταρα αυτά υφίστανται πολλούς διπλασιασμούς σε κάποιο σημείο εισβάλλουν μέσω της βασικής μεμβράνης του αγωγού και τελικά μεταναστεύουν σε απομακρυσμένα όργανα

## **1. 2. CRF ΠΕΠΤΙΔΙΑ**

Η οικογένεια **CRF** – **Corticotrophin Releasing Factor** περιλαμβάνει δομικά συσχετιζόμενα πεπτίδια – τον εκλυτικό παράγοντα της κορτικοτροπίνης (CRF, Corticotropin Releasing Factor), τις Ουροκορτίνες (UCN1, UCN2 UCN3) στα θηλαστικά (2–4), την Ουροτενσίνη I (Urotensin I) των ιχθύων (5) και τη Sauvagine των αμφιβίων (6).

### **1. 2.1. CRF–Corticotropin Releasing Factor**

Είναι ένα υποθαλαμικό νευροπεπτίδιο, που αποτελείται από 41 αμινοξέα με πολλαπλές δράσεις σχεδόν σε όλους τους ιστούς του σώματος. Ο CRF συντίθεται κυρίως στον υποθάλαμο αλλά και σε άλλα σημεία του σώματος όπως στον πλακούντα, στον σπλήνα, στο πάγκρεας, στους πνεύμονες, στο στομάχι, στον γαστρεντερικό σωλήνα, στο δέρμα και στο θύμο αδένα (7).

Θεωρείται ο κυριότερος ρυθμιστής του Υποθαλαμο – Υποφύσιο – Επινεφριδιακού (ΥΥΕ) άξονα (8). Κάτω από συνθήκες στρες CRF εκκρίνεται από τον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου, προσδέεται σε υποδοχείς στα κορτικοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης και επάγει την παραγωγή και έκκριση της ACTH (adenocorticotropin hormone), η οποία με τη σειρά της επάγει τη σύνθεση και απελευθέρωση γλυκοκορτικοειδών από τον επινεφριδιακό αδένα (9). Τα γλυκοκορτικοειδή μειώνουν την έκφραση πολλών συστατικών της φλεγμονής και γενικά θεωρούνται ισχυροί αντιφλεγμονώδεις παράγοντες. Με αυτόν τον τρόπο, ο CRF που παράγεται κεντρικά,

φαίνεται έμμεσα να ρυθμίζει την ανοσοαπόκριση και πιο συγκεκριμένα να έχει αντιφλεγμονώδεις δράσεις.

Ωστόσο ο CRF εμπλέκεται και άμεσα στο ανοσοποιητικό σύστημα. mRNA του CRF καθώς και το πεπτίδιο έχουν ανιχνευθεί σε πολλά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (10). Έχει ανιχνευθεί σε περιφερικά κύτταρα του αίματος και σε περιφερικά λεμφοκύτταρα στον άνθρωπο (11,12), καθώς και στο ήπαρ, στον θύμο αδένα και στο σπλήνα αρουραίων (13). Έχει βρεθεί επίσης ότι πολλά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος εκφράζουν υποδοχείς για CRF, όπως τα σιτευτικά (mast cells), τα μονοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα (Th cells) (14, 15).

Έχει δειχθεί ότι ενώ ο CRF που παράγεται στην περιφέρεια από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού δρα άμεσα και έχει παρατηρηθεί να έχει προ- αλλά και αντι- φλεγμονώδεις δράσεις, ο CRF που παράγεται και απελευθερώνεται από τον υποθάλαμο ως απόκριση στο στρες δρα έμμεσα και οδηγεί σε μείωση της δράσης του ανοσοποιητικού, μέσω των τελικών προϊόντων του ΥΓΕ άξονα, τα γλυκοκορτικοειδή. Το γεγονός αυτό αποτελεί μηχανισμό αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης με σκοπό την αποφυγή της παρατεταμένης ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού (16).

Επίσης ο CRF εμπλέκεται σε δράσεις του γαστρεντερικού και του καρδιαγγειακού συστήματος (17) κι έχει σημαντική δράση στο αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας προωθώντας την εμφύτευση της βλαστοκύστης, ρυθμίζοντας τον αγγειακό τόνο του πλακούντα και τη σύσπαση του μυομητρίου (18). CRF παράγεται από τα κύτταρα του τροφοβλάστη στον πλακούντα. Έχει δειχθεί ότι η παραγωγή του CRF εμπλέκεται με τη διάρκεια και το χρόνο τοκετού (19, 20).

### **1. 2.2. Urocortins (UCN1, UCN2,UCN3)**

#### **UCN1**

Ένα νέο μέλος της οικογένειας CRF κλωνοποιήθηκε από το μεσεγκέφαλο αρουραίου το 1995 (21), η UCN1. Είναι ένα πεπτίδιο 40 αμινοξέων που εμφανίζει ομολογία της τάξης του 45% με τον ανθρώπινο CRF. Εκφράζεται σε πολλά σημεία του εγκεφάλου αλλά πιο ευρεία είναι η έκφρασή της στην περιφέρεια. Εντοπίζεται στα λεμφικά όργανα συμπεριλαμβανομένου το σπλήνα και το θύμο, το γαστρεντερικό σωλήνα και την καρδιά (22, 23). Έχει επίσης εντοπιστεί στο δέρμα και στο λιπώδη ιστό (24). Έχει δειχθεί η UCN1 να έχει πολλές από τις δράσεις του CRF και γενικά να συμμετέχει στην απόκριση στο στρες (25).

### **UCN2 – Stresscopin Related Peptide**

Η UCN2 είναι ένα πεπτίδιο 38 αμινοξέων. Εκφράζεται σε διακριτές περιοχές του Κ.Ν.Σ. Στον ποντικό έχει εντοπιστεί στο μακροκυτταρικό τμήμα του παρακοιλιακού πυρήνα του υποθάλαμου, στον υπεροπτικό και τοξοειδή πυρήνα και στους κινητικούς πυρήνες του στελέχους και του νωτιαίου μυελού. Έχει εντοπιστεί και στην περιφέρεια, όπως στην καρδιά, στο δέρμα, στο σκελετικό μυ και στους επινεφριδιακούς αδένες (26, 27). Η UCN2 φαίνεται κατά κύριο λόγο να εμπλέκεται στον κεντρικό αυτόνομο και ενδοκρινικό έλεγχο της όρεξης (3).

### **UCN3 – Stresscopin**

Η UCN3 είναι επίσης ένα πεπτίδιο 38 αμινοξέων. Εκφράζεται σε περιοχές του ΚΝΣ (υποθάλαμο, μέσο πυρήνα της αμυγδαλής και στέλεχος) καθώς και στην περιφέρεια (σκελετικό μυ, λιπώδη ιστό, δέρμα και επινεφριδιακούς αδένες, γαστρεντερικό σωλήνα) (4, 28).

## **1. 3. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ CRF**

Όλες οι δράσεις των CRF πεπτιδίων πραγματοποιούνται μέσω της πρόσδεσης τους σε ειδικούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς, τον CRF1 και τον CRF2, που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια (29).

Ο CRF1 είναι ένα πεπτίδιο 415 αμινοξέων. Εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον εγκέφαλο και στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Αρχικά είχαν χαρακτηριστεί 4 διαφορετικές ισομορφές για τον ανθρώπινο υποδοχέα CRF1: CRF1b (περιέχει όλα και τα 14 εξώνια), CRF1a (δεν έχει το εξώνιο 6), CRF1c (δεν έχει τα εξώνια 3 και 6), CRF1d (δεν έχει τα εξώνια 6 και 13). Πρόσφατα όμως ανακαλύφθηκαν και άλλες τέσσερις καινούριες ισομορφές: CRF1e, CRF1f, CRF1g, CRF1h (30). Σε όλες αυτές τις ισομορφές απουσιάζει το εξώνιο 6. Η πιο διαδεδομένη ισομορφή είναι η CRF1a και εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο και στην υπόφυση αλλά και στην περιφέρεια, όπως στον πλακούντα, στο ενδομήτριο, στο μυομήτριο και στα επινεφρίδια (31, 32).

Ο CRF2 έχει 70% αμινοξική ομολογία με τον CRF1. Εκφράζεται κυρίως σε ιστούς της περιφέρειας, στην καρδιά, στους πνεύμονες και στο σκελετικό μυ. Το γονίδιο για τον CRF2 εκφράζει 3 διαφορετικές ισομορφές: CRF2α, CRF2β, CRF2γ (33).

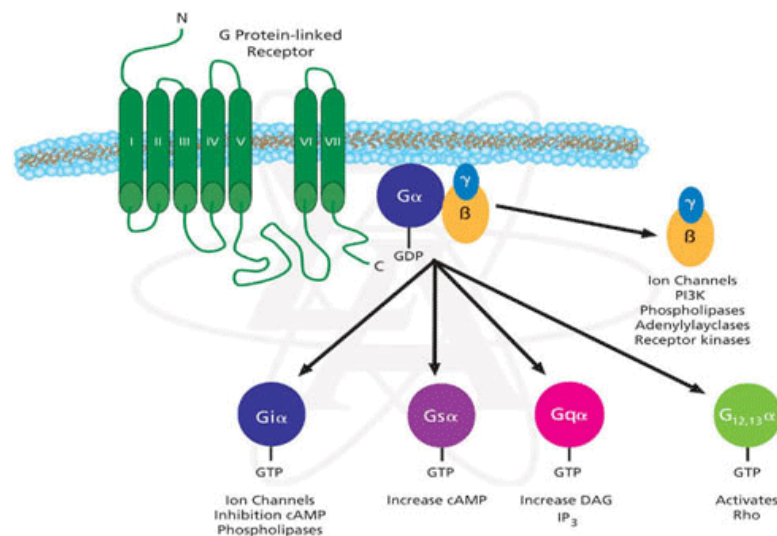
Θεωρείται ότι στην απόκριση στο στρες ο CRF1 παίζει κυρίαρχο ρόλο, ενώ ο CRF2 μικρότερο. Γενικά ο CRF2 υποδοχέας φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά την όρεξη μέσω των πεπτιδίων CRF και επίσης διαμεσολαβεί αγχολυτικές συμπεριφορές σε αντίθεση με τον CRF1 (34).

Η ορμόνη CRF έχει 10 φορές μεγαλύτερη συγγένεια για τον υποδοχέα CRF1 απ' ότι για τον υποδοχέα CRF2, η UCN1 έχει εξίσου την ίδια συγγένεια και για τους δύο τύπους υποδοχέων (21) ενώ η UCN2 και η UCN3 προσδένονται αποκλειστικά και με μεγάλη συγγένεια με τον CRF2 (36).

Οι υποδοχείς των CRF πεπτιδίων ανήκουν στην οικογένεια της τάξης II των υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες, που περιλαμβάνει μεταξύ άλλων υποδοχείς για την αντιδιουρητική ορμόνη, την καλσιτονίνη και την PTH (35). Η δέσμευση των CRF πεπτιδίων με έναν από τους υποδοχείς προκαλεί αλλαγή στη δομή των υποδοχέων κι αυτό



οδηγεί στη δέσμευσή τους με τις G πρωτεΐνες και κατά συνέπεια στην ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών. Η ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών οδηγεί σε αύξηση των 'δεύτερων μηνυμάτων', c-AMP, C-GMP, Ca<sup>2+</sup>, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση διαφόρων ενζύμων.



**ΕΙΚΟΝΑ 2.** Οι υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες (G protein-coupled receptors) έχουν το χαρακτηριστικό μοτίβο των 7 διαμεμβρανικών  $\alpha$ -ελίκων. Το σύμπλοκο προσδέτης-υποδοχέας οδηγεί στην αλλαγή της δομής των υποδοχέων και κατά ' επέκταση στη δέσμευσή τους με τις τριμερείς G πρωτεΐνες που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών με ταυτόχρονη ανταλλαγή της GDP με GTP στην  $\alpha$  υπομονάδα. Η με GTP συνδεδεμένη μορφή της  $\alpha$ -υπομονάδας αποδεσμεύεται από το ετεροδιμερές  $\beta\gamma$  και μετατοπίζεται σε ένα μεμβρανικό ένζυμο-τελεστή, όπως η αδενυλική κυκλάση και η φωσφολιπάση C (PLC), και διεγείρει την έναρξη της καταλυτικής του δραστηριότητας. Η καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου αυτού παράγει τα λεγόμενα 'δεύτερα μηνύματα', που μπορεί να είναι c-AMP, c-GMP, 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP<sub>3</sub>), διακυλογλυκερόλη (DAG), ή Ca<sup>2+</sup>

#### **1. 4. CRF ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ**

Έχει βρεθεί ότι πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές, όπως κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος, μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, καρκίνου του ενδομητρίου, προστάτη και παγκρέατος εκφράζουν τους υποδοχείς των CRF πεπτιδίων (CRF1, CRF2) (37-40). Έκφραση υποδοχέων CRF1, CRF2 σε πολύ μεγάλο βαθμό έχει βρεθεί σε αδενώματα της υπόφυσης και γενικά σε καρκίνους του εγκεφάλου (41).

Έχει παρατηρηθεί ότι συγκεκριμένοι καρκινικοί κυτταρικοί τύποι εκφράζουν κατά προτίμηση σε μεγάλο βαθμό τον έναν από τους δύο υποδοχείς, είτε τον CRF1 είτε τον CRF2. Πιστεύεται ότι ο τύπος του CRF υποδοχέα που εκφράζεται στους διάφορους καρκίνους απεικονίζει τον τύπο που εκφράζεται κυρίως στον ιστό από τον οποίο προέρχεται ο καρκίνος. Για παράδειγμα τα κορτικοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης εκφράζουν τον CRF1, ενώ τα κύτταρα που παράγουν γοναδοτροπίνη εκφράζουν CRF2 κι έχει παρατηρηθεί ότι τα αδενώματα της υπόφυσης που παράγουν κορτικοτροπίνη (ACTH) εκφράζουν κυρίως CRF1 ενώ τα αδενώματα που παράγουν γοναδοτροπίνη εκφράζουν κυρίως CRF2 (41).

Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι διάφοροι καρκινικοί τύποι παράγουν και εκκρίνουν CRF πεπτιδία ενισχύοντας τη άποψη ότι μπορεί τα CRF πεπτιδία μέσω των υποδοχέων τους να επηρεάζουν την ανάπτυξη του καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα στην κυτταρική σειρά μαστού MCF7 (42), στην κυτταρική σειρά ενδομητρίου IK (Ishikawa) (37), σε μικροκυτταρικούς όγκους του πνεύμονα, καθώς και σε καρκίνους προστάτη (43) βρέθηκε ότι παράγεται σε μεγάλες ποσότητες και εκκρίνεται CRF.

Η παρουσία CRF υποδοχέων και η παραγωγή CRF πεπτιδίων σε διάφορους καρκίνους, δείχνει ότι πιθανά τα πεπτίδια της οικογένειας CRF να έχουν δράση στα καρκινικά κύτταρα και πιο συγκεκριμένα να επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την κινητικότητα και άλλες δράσεις των κυττάρων. Από διάφορες εργαστηριακές ομάδες μελετήθηκε η δράση των CRF πεπτιδίων και παρατηρήθηκε ότι επηρεάζουν τα καρκινικά κύτταρα, άλλοτε εμποδίζοντας και άλλοτε ενισχύοντας την ανάπτυξη του καρκίνου.

Στην κυτταρική σειρά IK (Ishikawa) βρέθηκε ότι ο CRF εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Αυτή η ανασταλτική δράση του CRF πραγματοποιείται μέσω δέσμευσής του στον υποδοχέα CRF1 και ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού cAMP-PKA (37).

Αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων από τον CRF μέσω του CRF1 παρατηρήθηκε επίσης στην κυτταρική σειρά HaCaT (κερατινοκύτταρα) (44), σε μελανοκύτταρα (45) και στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y ανθρώπινου νευροβλαστώματος (46). Ο καρκίνος του μαστού είναι ένας οιστρογόνο - εξαρτώμενος καρκίνος, δηλαδή τα οιστρογόνα διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και προάγουν την ανάπτυξη του καρκίνου. Στα MCF7 κύτταρα ο CRF, μέσω του CRF1, βρέθηκε να δρα ανασταλτικά στο αποτέλεσμα των οιστρογόνων και να εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (42).

Έχει επίσης δειχθεί ότι τα CRF πεπτίδια επηρεάζουν και τη διαδικασία της αγγειογένεσης. Η αγγειογένεση είναι γενικά μια διαδικασία αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ ενεργοποιητών και αναστολέων (47). Στα ενδοθηλιακά και τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων εκφράζεται ο υποδοχέας CRF2 οπότε και θεωρήθηκε ότι τα CRF πεπτίδια πιθανά να έχουν κάποια δράση στη δημιουργία νέων αγγείων. Σε λεία μυϊκά κύτταρα αρουραίων βρέθηκε ότι η UCN1 μέσω της σύνδεσής της με τον υποδοχέα CRF2 εμποδίζει την επαγόμενη από τον VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor ) αγγειογένεση (48).

Εκτός όμως από την ανασταλτική δράση των CRF πεπτιδίων στην ανάπτυξη του όγκου έχουν υπάρξει μελέτες που δείχνουν ότι τα CRF πεπτίδια προάγουν την ανάπτυξη του. Στο δέρμα έχει δειχθεί ότι ο CRF διεγείρει τη χημειοταξία των ενδοθηλιακών κυττάρων και ότι επάγει την αγγειογένεση σε επιθηλιακούς όγκους (49). Επίσης σε κύτταρα του

μελανώματος έχει παρατηρηθεί ότι ο CRF αυξάνει την κινητικότητά τους και ότι καταστέλλει την απόπτωση (50).

Γενικά ο ρόλος των CRF πεπτιδίων στην καρκινογένεση δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί. Φαίνεται να έχουν μια σύνθετη δράση το αποτέλεσμα της οποίας σε μεγάλο βαθμό εξαρτάται από τον τύπο των κυττάρων.

## 1. 5. ΚΥΚΛΟΟΞΥΓΕΝΑΣΕΣ

Η κυκλοοξυγενάση είναι ένα ένζυμο σημαντικό για το σχηματισμό των προστανοϊδών (μια ομάδα που περιλαμβάνει προσταγλανδίνες, προστακυκλίνη και θρομβοξάνη). Το ένζυμο αυτό καταλύει τη μετατροπή του αραχιδονικού οξέως σε προσταγλανδίνη  $H_2$  ( $PGH_2$ ) που είναι πρόδρομος των προστανοϊδών. Η κυκλοοξυγενάση έχει δύο ενεργές θέσεις: μια θέση κυκλοοξυγενάσης, όπου το αραχιδονικό οξύ μετατρέπεται σε προσταγλανδίνη  $G_2$  ( $PGG_2$ ) και μία αίμη με δράση υπεροξειδάσης, που οδηγεί στη μετατροπή της  $PGG_2$  σε  $PGH_2$ . Μέχρι στιγμής έχει βρεθεί ότι υπάρχουν 3 ισομορφές του COX ενζύμου-COX1, COX2 και COX3.

### ⇒ COX1

Είναι ένα ένζυμο 70kDa πολύ σημαντικό για τη διατήρηση της ομοιόστασης. Εκφράζεται σταθερά σε πολλούς ιστούς, όπως στα μακροφάγα, στο γαστρεντερικό σωλήνα, στο νεφρικό σωλήνα και στα αιμοπετάλια. Όμως πρόσφατα βρέθηκε ότι κάτω από κάποιες συνθήκες μπορεί να παρατηρηθεί αύξηση της έκφρασης αυτού του ενζύμου. Για παράδειγμα σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα παρατηρήθηκε ότι στα κύτταρα της άρθρωσης η IL1 προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του ενζύμου COX1. Επίσης σε διάφορους καρκίνους, όπως σε επιθηλιακούς όγκους των ωοθηκών, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του ενζύμου (51).

### ⇒ COX2

Είναι ένα ένζυμο 72kDa και έχει 65% ομολογία ως προς την αμινοξική ακολουθία με το ένζυμο COX1. Η σημαντικότερη δομική διαφορά αυτού του ενζύμου από το ένζυμο COX1 είναι η αντικατάσταση της ισολευκίνης στη θέση 523 στην COX1 με βαλίνη στην COX2. Αυτή η διαφορά επιτρέπει να υπάρχουν εκλεκτικοί αναστολείς για την COX2. Διάφορες κυτοκίνες, μιτογόνα και αυξητικοί παράγοντες επάγουν την έκφραση αυτού του ενζύμου. Γενικά η COX2 παίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή και η έκφραση της επάγεται ύστερα από δράση με LPS ή άλλου προφλεγμονώδους ερεθίσματος στα μακροφάγα (52).

### ⇒ COX3

Είναι μια διαφορετική εκδοχή, όσον αφορά τη συρραφή των εξωνίων του γονιδίου του ενζύμου COX1, που διατηρεί το ιντρόνιο 1 κι έχει μια πλαισιοτροποποιητική μετάλλαξη. Είναι αλλιώς γνωστό ως COX1b ή COX1v (COX1 variant) (53).

## 1. 5.1. ΠΡΟΣΤΑΓΛΑΝΔΙΝΕΣ

Οι προσταγλανδίνες ανήκουν στα εικοσανοειδή. Βρίσκονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς και τα όργανα. Δρουν σε πολλούς διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους με ποικίλους τρόπους. Προκαλούν συστολή ή διαστολή των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων, ανάλογα με τον ιστό στον οποίο δρουν, συσώρευση ή διαχωρισμό των αιμοπεταλίων, ρυθμίζουν την ανάπτυξη των κυττάρων, ρυθμίζουν τη φλεγμονή καθώς και άλλες δράσεις.

Έχει βρεθεί ότι οι προσταγλανδίνες παίζουν σημαντικό ρόλο και συνεισφέρουν στην ανάπτυξη του καρκίνου, προκαλώντας αύξηση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, εμποδίζοντας την απόπτωσή τους και αυξάνοντας την ικανότητα μετάστασης (54).

## 1. 6.ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΕΣ (MMPs)

Οι μεταλλοπρωτεΐνάσες είναι μια οικογένεια από δομικά και λειτουργικά συγγενικές ενδοπρωτεΐνάσες που εμπλέκονται στην αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM). Φυσιολογικά τα ένζυμα αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο σε γεγονότα ανακατασκευής των ιστών όπως στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, στην αγγειογένεση, στην ωορρηξία και στην επούλωση τραύματος. Αυξημένη έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών μπορεί να συμβάλλει σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως σε ρευματοειδή αρθρίτιδα, οστεοαρθρίτιδα, σε πνευμονικό εμφύσημα καθώς επίσης προάγει την ανάπτυξη καρκινικών όγκων και τη μετάσταση τους (55).

Το σύνολο των μεταλλοπρωτεϊνών έχει χωριστεί σε τέσσερις ομάδες. Η **πρώτη** ομάδα είναι οι ενδιάμεσες κολλαγενάσες (interstitial collagenases). Περιλαμβάνει τις MMP1, MMP8 και την MMP13. Αυτές οι μεταλλοπρωτεΐνάσες καταλύουν την αποδόμηση των ινωδών μορφών του κολλαγόνου (τύπος I, τύπος II, τύπος III).

Η **δεύτερη** ομάδα είναι οι ζελατινάσες (gelatinases) ή τύπου IV κολλαγενάσες που αποικοδομούν τη ζελατίνη (αποδιατεταγμένο κολλαγόνο) και το κολλαγόνο τύπου IV, V, VII, IX και X. Περιλαμβάνει την MMP2 και την MMP9.

Η **τρίτη** ομάδα είναι οι στρωμελυσίνες. Περιλαμβάνει τις MMP3, MMP10, MMP11 και MMP7. Αποικοδομούν πολλές και διαφορετικές πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας όπως πρωτεογλυκάνες και μη-κολλαγόνες πρωτεΐνες όπως λαμινίνη και φιμπρονεκτίνη.

Η **τέταρτη** ομάδα περιλαμβάνει τις μεμβρανικού τύπου μεταλλοπρωτεΐνάσες που έχουν μια διαμεμβρανική περιοχή. Έχει συνολικά πέντε μέλη από τα οποία μόνο ένα είναι καλά χαρακτηρισμένο, η μεμβρανική τύπου-1 MMP η οποία καταλύει την ενεργοποίηση της προζελατινάσης A σημαντική για την αποδόμηση πολλών πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.

Γενικά οι μεταλλοπρωτεΐνάσες είναι μια οικογένεια ενδοπεπτιδασών εξαρτώμενες από ψευδάργυρο και ασβέστιο. Οι περισσότερες συντίθενται και εκκρίνονται σε ζυμογόνο μορφή και η ενεργοποίησή τους πραγματοποιείται ύστερα από απώλεια μιας περιοχής 10 περίπου kDalton.

#### **1. 6.1. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ (TIMPs)**

Έχουν χαρακτηριστεί τέσσερις ενδογενείς αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών: TIMP1, TIMP2, TIMP3, TIMP4. Αυτοί οι αναστολείς εμποδίζουν την πρωτεολυτική δράση των μεταλλοπρωτεϊνών σχηματίζοντας υψηλής συγγένειας 1:1 στοιχειομετρικά, μη-ομοιοπολικά σύμπλοκα με τις ενεργές μορφές των μεταλλοπρωτεϊνών, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη δέσμευση των υποστρωμάτων στην καταλυτική θέση τους. Η TIMP1 είναι μια επαγώγιμη πρωτεΐνη ενώ η TIMP2 είναι μια δομική πρωτεΐνη. Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες είναι διαλυτές και ευρέως κατανεμημένες. Αντίθετα, η TIMP3 βρίσκεται αποκλειστικά και μόνο στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, ενώ η TIMP4 βρίσκεται σε μεγάλο βαθμό στον καρδιακό ιστό.

Εκτός από την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση των μεταλλοπρωτεϊνών φαίνεται να έχουν και άλλες δράσεις. Για παράδειγμα η TIMP1, μια πρωτεΐνη 184 αμινοξέων έχει βρεθεί να προκαλεί κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά και να εμποδίζει την απόπτωση των B κυττάρων (56, 57). Έχει επίσης δειχθεί, σε in vitro και in vivo πειράματα, ότι και οι τέσσερις αναστολείς εμποδίζουν την

αγγειογένεση με έναν μηχανισμό ανεξάρτητο των μεταλλοπρωτεϊνών (58-60).

Η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου του αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών TIMP1 έχει βρεθεί σε πολλές μελέτες να επηρεάζει την ανάπτυξη του καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται ο TIMP1 να έχει διπλό ρόλο όσον αφορά την εξέλιξη του. Από τη μία εμποδίζει την ανάπτυξη του καρκίνου αναστέλλοντας τη δράση των μεταλλοπρωτεϊνών και εμποδίζοντας την αγγειογένεση.

Από την άλλη φαίνεται να ευνοεί την ανάπτυξη του καρκίνου προάγοντας τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την αύξηση της κινητικότητας των καρκινικών κυττάρων με έναν μηχανισμό που δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί αλλά πιθανά να σχετίζεται με τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της FAK. Η FAK είναι μια κινάση τυροσίνης που ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και η φωσφορυλίωσή της οδηγεί στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού, επιβίωσης και κινητικότητας των κυττάρων (61).

## 1. 6.2. ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Έχει βρεθεί ότι πολλές μεταλλοπρωτεϊνάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Πιο συγκεκριμένα έχει δείχθει ότι πολλά ογκογονίδια οδηγούν στην εμφάνιση του καρκίνου ρυθμίζοντας την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών. Για παράδειγμα επιμόλυνση της κυτταρικής σειράς MCF7 με το ογκογονίδιο PEA-3 (της οικογένειας ets) οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της MMP9 μεταλλοπρωτεϊνάσης (62).

Υπερέκφραση της **MMP3** σε διαγονιδιακά ποντίκια οδήγησε σε κακοήθεις καρκίνους στο μαστικό αδέννα (63). Επίσης υπερέκφραση της **MMP11** στα MCF7 κύτταρα και χορήγησή τους σε ποντίκια οδήγησε σε αύξηση του μεγέθους των επαγόμενων καρκινικών όγκων (64). Επιπλέον, απενεργοποίηση του γονιδίου της **MMP11** οδήγησε σε μειωμένη χημικά



επαγόμενη καρκινογένεση σε ποντίκια (65). Χορήγηση του batimastat (συνθετικού αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών) σε ποντίκια που ενέθηκαν με την καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MDA-MB-435 οδήγησε σε μείωση του ρυθμού εμφάνισης όγκων (66).

Γενικά οι μεταλλοπρωτεϊνάσες φαίνεται να εμπλέκονται στην εμφάνιση και στην εξέλιξη του καρκίνου προάγοντας την αγγειογένεση. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται να ενεργοποιούν διεγερτικούς για την αγγειογένεση αυξητικούς παράγοντες ή τους υποδοχείς τους ή/και να απενεργοποιούν ανασταλτικούς για την αγγειογένεση αυξητικούς παράγοντες.

### ⇒ Αγγειογένεση

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες φαίνεται να προάγουν την αγγειογένεση με δύο διαφορετικούς μηχανισμούς. Αποδομώντας τις βασικές μεμβράνες των τριχοειδών αγγείων επιτρέποντας έτσι τη διείσδυση των επιθηλιακών κυττάρων και απελευθερώνοντας παράγοντες που προάγουν ή διατηρούν την αγγειογένεση. Για παράδειγμα η MMP2 αποδομεί την πρωτεΐνη της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας λαμνίνη-5 κι αυτό οδηγεί σε αύξηση της ανάπτυξης των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού (67).

Γενικά έχει αποδειχθεί ότι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες επάγουν τη διαδικασία της αγγειογένεσης. Υπάρχουν όμως και στοιχεία που δείχνουν ότι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες μπορούν και να αναστείλουν τη διαδικασία της αγγειογένεσης. Για παράδειγμα οι μεταλλοπρωτεϊνάσες MMP3, MMP7, MMP9 και η MMP12 αποδομούν το πλασμινογόνο με αποτέλεσμα να παραχθεί η αγγειοστατίνη που είναι αναστολέας της αγγειογένεσης (67).

### ⇒ Ενεργοποίηση των αυξητικών παραγόντων και των υποδοχέων τους

Έχει δειχθεί ότι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες συνεισφέρουν στην ανάπτυξη του καρκίνου ενεργοποιώντας διάφορους αυξητικούς

παράγοντες. Για παράδειγμα η δράση των μεταλλοπρωτεϊνών MMP1 και MMP3 οδηγεί στην απελευθέρωση του κυριότερου μιτογόνου των ενδοθηλιακών κυττάρων, του FGF. Επίσης η χρήση των αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνών οδήγησε σε μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων ως αποτέλεσμα της επίδρασής τους στην παραγωγή και απελευθέρωση του παράγοντα TGF $\alpha$  (Transforming growth factor- $\alpha$ ) (68).

### ⇒ Μετάσταση

Σε άλλες αναφορές έχει δειχθεί ότι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες εμπλέκονται και στην μεταστασιατική ικανότητα πειραματικά επαγόμενων καρκίνων. Χορήγηση του αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών batimistat σε αρουραίους με κακοήθη καρκίνο του μαστού οδήγησε σε μείωση της εξάπλωσης του καρκίνου στους πνεύμονες και γενικά σε μείωση της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων του μαστού (69). Στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MDA-MB-435, που έχει ικανότητα μετάστασης, έγινε επιμόλυνση με το γονίδιο που κωδικοποιεί τον αναστολέα TIMP4 και παρατηρήθηκε μείωση της ικανότητας μετάστασης(70). Επίσης υπερέκφραση του αναστολέα TIMP2 στα MDA-231 κύτταρα κι ένεσή τους σε ποντίκια οδήγησε σε μείωση της οστεόλυσης (71).

Επιπλέον έχει δειχθεί ότι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες πιθανά να προκαλούν την εξάπλωση του καρκίνου αποδομώντας την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία που αποτελείται από δύο κύρια συστατικά: τις βασικές μεμβράνες και τον ενδιάμεσο συνδετικό ιστό. Το κολλαγόνο IV είναι το κύριο συστατικό των βασικών μεμβρανών και αποδομείται κυρίως από τις MMP2 και MMP9. Ο ενδιάμεσος συνδετικός ιστός αποτελείται από κύτταρα κατανεμημένα σε ένα δίκτυο από ίνες κολλαγόνου, από γλυκοπρωτεΐνες, από πρωτεογλυκάνες και από υαλουρονικό οξύ. Οι κύριες μορφές κολλαγόνου που συναντώνται είναι οι I, II και III. Κατά τη διάρκεια διασποράς του καρκίνου ο ενδιάμεσος συνδετικός ιστός αποδομείται από τις ενδιάμεσες κολλαγενάσες και από τις στρωμελυσίνες.

Γενικά έχει δειχθεί ότι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες εμπλέκονται στις περισσότερες φάσεις της καρκινογένεσης από την εμφάνισή της ως τη μετάσταση, οπότε αναστολείς της δράσης αυτών των πρωτεασών μπορεί να αποτελέσει μια αποτελεσματική θεραπεία τόσο για την ανάπτυξη του καρκίνου όσο και για τη διασπορά του.

## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθεί η επίδραση που πιθανά τα CRF πεπτίδια έχουν στην ικανότητα των καρκινικών κυττάρων για μετάσταση.

Γενικά τα CRF πεπτίδια φαίνεται να επάγουν διαδικασίες που επηρεάζουν πολλά από τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων, όπως τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Η επίδρασή τους άλλοτε προωθεί και άλλοτε εμποδίζει την ανάπτυξη του καρκινικού όγκου. Το αποτέλεσμα της δράσης τους εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως από τον τύπο των καρκινικών κυττάρων και από του είδος του υποδοχέα CRF.

Υπήρξαν κάποιες μελέτες που συσχέτισαν τη δράση των CRF πεπτιδίων με τη ρύθμιση της έκφρασης πολλών παραγόντων που σχετίζονται με την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων και γενικά με την ικανότητά τους για μετάσταση.

Με την παρούσα εργασία θελήσαμε να ελέγξουμε την επίδραση που πιθανά τα CRF πεπτίδια έχουν σε παράγοντες που σχετίζονται άμεσα με την αύξηση της κινητικότητας των καρκινικών κυττάρων του μαστού, όπως τις κυκλοξυγενάσες και τις μεταλλοπρωτεϊνάσες .

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 2.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

### 2. 1.1 Κυτταρικές σειρές και καλλιέργειες

Για να μελετηθεί η σημασία των νευροπεπτιδίων στην κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων του μαστού χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού **MCF7**. Η κυτταρική αυτή σειρά για πρώτη φορά απομονώθηκε από πλευρική έκχυση από ασθενή με μεταστατικό καρκίνο του στήθους. Είναι μια κυτταρική σειρά ευαίσθητη στη δράση των οιστρογόνων (61). Πρόκειται για επιθηλιακά κύτταρα που μεγαλώνουν σε μονοστιβάδα και σε καλλιέργεια ο χρόνος διπλασιασμού τους είναι 45 ώρες.

Τα κύτταρα ανά τακτά χρονικά διαστήματα καταψύχονται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , ώστε να διατηρούνται σε χαμηλό αριθμό γενεών. Συγκεκριμένα, κυτταρικό εναιώρημα τοποθετείται σε σωληνάρια βαθιάς κατάψυξης, και τους προστίθεται αργά υπό συνεχή ανάδευση σε αναλογία 1:1 το κατάλληλο για κατάψυξη υλικό (FBS με 20% DMSO). Η κατάψυξη των κυττάρων πρέπει να γίνεται σταδιακά και προσεκτικά ώστε να εξασφαλιστεί η ακεραιότητά τους.

Για την απόψυξη τους τα παγωμένα κύτταρα θερμαίνονται στους  $37^{\circ}\text{C}$  κι άμεσα διαλύονται σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας ίδιας θερμοκρασίας. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1800 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά και καλλιέργεια τους.

## 2. 1. 2. Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς

### Υλικά και συσκευές καλλιιεργειών

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GIBCO-BRL Co,MD, USA)

Ορός εμβρύου βοός: FCS (Foetal Calf Serum) (GIBCO-BRL Co,MD, USA)

Πενικιλίνη/ Στρεπτομυκίνη: Penicillin/Streptomycin (GIBCO-BRL Co,MD ,USA)

Μικροσκόπιο ορατού φωτός: (Olympus, Japan)

Επωαστικός κλίβανος Forma (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).

Η κυτταρική σειρά MCF7 καλλιεργείται σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37°C και σε υγρή ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>/95% αέρα. Τα **MCF7** κύτταρα καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό **DMEM** - Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco-BRL Co,MD, USA) εμπλουτισμένο με 10% **FBS** (Foetal Bovine Serum - Ορός εμβρύου βοός) (Gibco-BRL Co,MD, USA) και 1% **Penicillin/Streptomycin** - Πενικιλίνη/ Στρεπτομυκίνη (Gibco-BRL Co,MD ,USA). Ο ορός που προστίθεται έχει προηγουμένως απενεργοποιηθεί στους 57°C για 45 λεπτά, διαδικασία που γίνεται μία φορά πριν χρησιμοποιηθεί.

Όταν τα κύτταρα καλύπτουν περίπου το 80% της επιφάνειας της φλάσκας, το υπερκείμενο απομακρύνεται και η επιφάνεια των κυττάρων εκπλένεται με πολύ μικρή ποσότητα τρυψίνης. Στη συνέχεια εκτίθεται σε διάλυμα τρυψίνης-EDTA (Gibco) και επανατοποθετούνται στο κλίβανο για 5 περίπου λεπτά. Έπειτα, αφού τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί από τη φλάσκα, προσθέτουμε ίση ποσότητα θρεπτικού υλικού για να απενεργοποιηθεί η τρυψίνη, η οποία είναι ιδιαίτερα τοξική για τα κύτταρα αν παραμείνουν σε αυτή για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1800 στροφές ανά λεπτό, στους 25°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε θρεπτικό υλικό και είτε ανακαλλιεργούνται, είτε μετριοούνται και επιστρώνονται στις ανάλογες πλάκες για πειράματα.

### **2. 1. 3. Μέτρηση και Επίστρωση κυττάρων για πείραμα**

#### Υλικά και συσκευές καλλιέργειών

Μικροσκόπιο ορατού φωτός: (Olympus, Japan)

Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή (Neubauer)

Χρωστική Trypan Blue (Seromed Biochrom, Germany)

Μετά τη φυγοκέντρηση προστίθεται μικρή ποσότητα θρεπτικού DMEM για επαναδιάλυση των κυττάρων και με τη μέθοδο της αιματοκυτταρομετρίας πραγματοποιείται ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, 10μl από τα κύτταρα που έχουν επαναδιαλυθεί με μικρή ποσότητα θρεπτικού αναμιγνύονται με 90μl Trypan Blue, τοποθετούνται σε πλάκα Neubauer και γίνεται καταμέτρηση των κυττάρων με την βοήθεια μικροσκοπίου ορατού φωτός. Ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων που απαιτούνται σε κάθε πείραμα, λαμβάνεται η κατάλληλη ποσότητα και τοποθετείται στις αντίστοιχες πλάκες καλλιέργειας.

Στα πειράματά μας χρησιμοποιούνται πλάκες 24 οπών και προστίθενται 500.000 κύτταρα/οπή και 500μl θρεπτικού/οπή, εκτός από τα πειράματα όπου το υπερκείμενο των κυτταροκαλλιέργειών χρησιμοποιείται για μέτρηση των επιπέδων της επιθυμητής πρωτεΐνης με τη μέθοδο της Elisa, όπου σε αυτά επιστρώνονται 500.000 κύτταρα και 250μl θρεπτικού/οπή. Ακολουθούν επιδράσεις των κυττάρων με τα πεπτιδία CRF και UCN σε διάφορες χρονικές στιγμές (3,6,16 και 24 ώρες). Έπειτα απομακρύνεται το υπερκείμενο και φυλάσσεται στους -80°C

για περαιτέρω χρήση του ενώ τα κύτταρα υφίστανται την κατάλληλη επεξεργασία ανάλογα με το τι επιθυμούμε να ελέγξουμε κάθε φορά.

## 2. 2. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2. 2.1.Απομόνωση RNA από Κυτταρικά Εκχυλίσματα

#### Υλικά και συσκευές

Trizol (Tri reagent™, Sigma, USA)

Χλωροφόρμιο (Sigma, USA)

Ισοπροπανόλη, Αιθανόλη (Merck, Γερμανία)

Η απομόνωση ολικού RNA από τα κύτταρα γίνεται με προσθήκη αντιδραστηρίου Trizol (1ml Trizol ανά 5-10 εκατομμύρια κύτταρα). Κατόπιν προσθέτουμε 200 μl χλωροφόρμιο για 1ml τρυζόλης και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση για περίπου 15sec. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και έπειτα φυγοκεντρείται στις 12.000 στροφές/λεπτό για άλλα 15 λεπτά. Η φυγοκέντρηση διαχωρίζει το μίγμα σε 3 φάσεις: Στην οργανική φάση (κόκκινου χρώματος) που περιέχει τις πρωτεΐνες, στην μεσόφαση που περιέχει το DNA και στην υδατική φάση (άχρωμη) που περιέχει το RNA.

Για την κατακρύμνιση του RNA, η υδατική φάση, η οποία μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο, επωάζεται με 500μl ισοπροπανόλης για 5- 10 λεπτά και κατόπιν φυγοκεντρείται στις 12.000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά. Αφαιρείται το υπερκείμενο και κατόπιν το RNA ξεπλένεται με 1ml 75% αιθανόλης. Το ίζημα του RNA αφήνεται να στεγνώσει και έπειτα επαναδιαλύεται σε 50μl H<sub>2</sub>O. Για καλύτερη διάλυση τα δείγματα



του RNA θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 65°C και φυλάσσονται στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

## 2. 2.2. Μέθοδος εκλεκτικής ενίσχυσης του RNA με χρήση ειδικής πολυμεράσης (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR).

Η RT-PCR - αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ανάστροφης μεταγραφής- είναι μια in vitro μέθοδος για τον προσδιορισμό του mRNA στα κυτταρικά εκχυλίσματα. Η μέθοδος περιλαμβάνει τη μετατροπή του mRNA σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (αντίδραση RT) και την παραγωγή με τη βοήθεια της ειδικής θερμοανθεκτικής πολυμεράσης (Taq polymerase) πολλών αντιγράφων του γονιδίου που μας ενδιαφέρει από το cDNA (αντίδραση PCR).

### 2. 2.2a Αντίστροφη μεταγραφή (RT)

#### Υλικά και συσκευές

Superscript III platinum kit (Invitrogen) το οποίο περιέχει:

Ρυθμιστικό διάλυμα σύνθεσης cDNA: 2X RT Reaction Mix

Ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης: RT enzyme mix

Νερό κατεργασμένο με διαιθυλπυροκαρβονικό εστέρα (DEPC-H<sub>2</sub>O)

Διάλυμα αναστολέων RNασών: E. coli RNaseH

Μετά την απομόνωση RNA ακολουθεί η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής με τη χρήση του kit Superscript III platinum της Invitrogen. Αρχικά προετοιμάζεται ένα μείγμα αντίδρασης που περιλαμβάνει 10μl 2X RT Reaction Mix και 2μl RT enzyme mix κι έπειτα προσθέτουμε 1μg ολικού RNA. Για κάθε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής παρασκευάζεται και ένα δείγμα στο οποίο δεν προστίθεται το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (NoRT), ως αρνητικό δείγμα ελέγχου.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση του δείγματος για 10 min στους 25°C και έπειτα στους 50°C για 30min οπότε και αρχίζει να δρα η αντίστροφη μεταγραφάση. Η αντίδραση τερματίζεται με επώαση του δείγματος για 5 min στους 85°C. Το cDNA που προκύπτει από αυτή την αντίδραση είτε χρησιμοποιείται αμέσως στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είτε φυλάσσεται στους -20°C.

### **2. 2.2b. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Το επόμενο βήμα είναι η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) με σκοπό την παραγωγή πολλών αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας του cDNA. Είναι ένα σύνολο επαναλαμβανόμενων κύκλων. Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια - 1.Θερμική αποδιάταξη του εκμαγείου DNA, 2.Υβριδισμός των κατάλληλων ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων στις συμπληρωματικές ακολουθίες του DNA εκμαγείου, 3. Επιμήκυνση των εκκινήτων. Στο τέλος των επαναλαμβανόμενων κύκλων μεσολαβεί ένα χρονικό διάστημα 5-7 λεπτών σε θερμοκρασία 72° C, στο οποίο η Taq πολυμεράση ολοκληρώνει τη σύνθεση θυγατρικών αλυσίδων που πιθανόν να έμειναν ημιτελείς.

Απαιτούμενα αντιδραστήρια για την αντίδραση της PCR είναι η Taq πολυμεράση, το ρυθμιστικό διάλυμα (PCR buffer), τα ιόντα  $Mg^{2+}$  που προστίθενται με τη μορφή διαλύματος  $MgCl_2$ , τα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTP's) και οι εκκινήτες που είναι μονόκλιωνα μόρια

που παρασκευάζονται συνθετικά. Τα αντιδραστήρια και ο όγκος (μl) τους που απαιτείται για το κάθε δείγμα έχει ως εξής:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x(Invitrogen™)	2
MgCl <sub>2</sub> 25mM (Invitrogen™)	0,8
dNTPs (Invitrogen™)	0,4
Εκκινητής R	0,5
Εκκινητής F	0,5
Ταq πολυμεράση(Invitrogen™)	0,08
H <sub>2</sub> O	14,72
cDNA - από RT αντίδραση	1
Τελικός Όγκος	20

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας με τη μέθοδο της PCR, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για την ανίχνευση του mRNA των μεταλλοπρωτεϊνών **MMP1**, **MMP9**, του αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών **TIMP1** καθώς του γονιδίου της **GAPDH** ως γονίδιο αναφοράς. Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα ζεύγη εκκινητών:

#### MMP1

Primer R : 5'-GTTCTAGGGAAGCCAAAGGAGCTG-3'

Primer F : 5'-CTGCTTACGAATTTGCCGACAGA-3'

#### MMP9

Primer R : 5'-CATAGGTCACGTAGCCCCTTGGT-3'

Primer F : 5'-CACGACGTCTTCCAGTACCGAGA-3'

#### TIMP1

Primer R : 5'-GGTGGTCTGGTTGACTTCTGGTGT-3'

Primer F : 5'-TTCTGGCATCCTGTTGTTGCTG-3'

#### GAPDH

**Primer R** : 5'-GGGCCATCCACAGTCTTC-3'

**Primer F** : 5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3'

Οι συνθήκες του προγράμματος που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των περιοχών του γονιδιώματος που κωδικοποιούν την μεταλλοπρωτεϊνάση **MMP9** και τον αναστολέα **TIMP1** είναι οι εξής :

- ♦ Αρχική αποδιάταξη στους **94°C** για 5 min
- ♦ Αποδιάταξη των κλώνων του DNA στους **94°C** για 1 min
- ♦ Σύνδεση των εκκινητών στο DNA στόχο στους **60°C** για 45sec
- ♦ Επιμήκυνση των νεοσχηματιζόμενων αλυσίδων του DNA στους **72 °C** για 45sec
- ♦ Επανάληψη των τριών τελευταίων σταδίων 39 φορές
- ♦ Τελική επιμήκυνση των αλυσίδων στους **72 °C** για 5 min
- ♦ Διατήρηση των προϊόντων PCR στους **4°C** για μετέπειτα χρήση

Οι συνθήκες του προγράμματος που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της περιοχής του γονιδιώματος που κωδικοποιεί την **MMP1** μεταλλοπρωτεϊνάση είναι οι εξής :

- ♦ Αρχική αποδιάταξη στους **94°C** για 5 min
- ♦ Αποδιάταξη των κλώνων του DNA στους **94°C** για 1 min
- ♦ Σύνδεση των εκκινητών στο DNA στόχο στους **60°C** για 25sec
- ♦ Επιμήκυνση των νεοσχηματιζόμενων αλυσίδων του DNA στους **72 °C** για 45sec
- ♦ Επανάληψη των τριών τελευταίων σταδίων 39 φορές
- ♦ Τελική επιμήκυνση των αλυσίδων στους **72 °C** για 5 min
- ♦ Διατήρηση των προϊόντων PCR στους **4°C** για μετέπειτα χρήση

Σε κάθε PCR συμπεριλαμβάνεται κι ένας μάρτυρας ελέγχου (control) - ο οποίος αποτελείται από όλα τα υλικά του μίγματος αντίδρασης χωρίς το DNA - κι αυτό για να διαπιστωθεί τυχόν επιμόλυνση. Γενικά κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας θα πρέπει να είμαστε ιδιαίτερα προσεχτικοί για να αποφευχθεί τυχόν επιμόλυνση του μίγματος με εξωγενές DNA.

Στο τέλος κάθε PCR αντίδρασης το προϊόν διαχωρίζεται και ταυτοποιείται με **ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης**. Συγκεκριμένα, στα 20ml PCR προϊόντος προστίθενται 4ml διαλύματος φόρτωσης (πορτοκαλί της ακριδίνης 2% και γλυκερόλη 10% σε απιονισμένο νερό) και από αυτό φορτώνονται τα 12ml σε πηκτή αγαρόζης 1,8%. Για να παρασκευάσουμε πηκτή αγαρόζης 1,8% :

- Αρχικά προσθέτουμε σε μία κωνική φιάλη 98ml απεσταγμένο H<sub>2</sub>O και 2ml TE 50X
- Έπειτα ζυγίζουμε 1,8 gr αγαρόζης το οποίο το προσθέτουμε στην κωνική φιάλη
- Αναδεύουμε απαλά και στη συνέχεια τοποθετούσαμε τη φιάλη σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές
- Στη συνέχεια προσθέτουμε 5ml βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο έχει την ικανότητα να φθορίζει, λόγω σχηματισμού συμπλόκων παρεμβολής (intercalation) με το δίκλωνο DNA, όταν διεγερθεί από υπεριώδη ακτινοβολία (UV).
- Τέλος θέτουμε σε λειτουργία τη συσκευή ηλεκτροφόρησης στα 100Volts και τα κομμάτια DNA διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Εκτός από τα δείγματά μας φορτώνουμε και ένα μάρτυρα (100bp ladder) που μας δίνει ζώνες γνωστού μεγέθους και μας βοηθά στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους, των ενισχυμένων με τη μέθοδο της PCR, τμημάτων DNA.

### 2. 2.2c. PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Η PCR πραγματικού χρόνου εμφανίζει το πλεονέκτημα, σε σχέση με την κλασική PCR, ότι επιτρέπει την ανίχνευση του προϊόντος της PCR κατά τη διάρκεια των πρώτων κύκλων της αντίδρασης. Επίσης, είναι δυνατή η ανίχνευση της συσσώρευσης του προϊόντος σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Μια αντίδραση PCR περιλαμβάνει τα παρακάτω:

- **Master mix** 12,5μl (περιέχει dNTP's, MgCl<sub>2</sub>, ρυθμιστικό διάλυμα Ταq πολυμεράσης, Ταq πολυμεράση, χρωστική SYBER green)
- **Εκκινητής I** (forward) 0,5μl
- **Εκκινητής II** (reverse) 0,5μl
- **H<sub>2</sub>O** 11,5μl
- **cDNA** 1μl

Η χρωστική CYBER green έχει την ικανότητα να προσδένεται σε δίκλωνο DNA. Έτσι, η ένταση του φθορισμού αυξάνεται κατά το ποσοστό αύξησης του προϊόντος (γραμμική σχέση μεταξύ έντασης φθορισμού και ποσότητας δίκλωνου DNA). Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές και τα προγράμματα όπως στην RT-PCR.

### **2. 2.3. Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)**

Είναι μία τεχνική για την ανίχνευση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε κυτταρικά εκχυλίσματα. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται βάσει του μοριακού τους βάρους. Οι πρωτεΐνες αποκτούν αρνητικό φορτίο με τη διάλυσή τους σε διάλυμα δωδεκακυκλοθεικού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας πρωτεΐνης και της προσδίδει ένα αρνητικό φορτίο, και ηλεκτροφορούνται σε μία πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Η διαδικασία γενικά περιλαμβάνει πολλά βήματα τα οποία περιγράφονται παρακάτω.

#### **2. 2.3a. Συλλογή και προετοιμασία των δειγμάτων**

##### **Υλικά και συσκευές**

###### **Διάλυμα λύσης**

1,50 mM Tris

150 mM NaCl

0.1 % SDS

1 % μη ιονικό απορρυπαντικό P-40 (NP40)

0.02 % αζίδιο του νατρίου

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 8 μόνο με Tris και NaCl. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4° C. Πριν τη χρήση προστίθενται οι ειδικοί αναστολείς πρωτεασών 0.1 μg/100 ml φαινυλο-μεθυλ-σουλφονυλο φθορίδιο (PMSF), 200 μg/ml Bacitracin, 10 μg/ml Leupeptin

###### **Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης 2x (Sample buffer 2x)**

Tris.HCl (0,125M)

SDS 4% (w/v)

β-μερκαπτοαιθανόλη 4% (w/v) (Sigma, ΗΠΑ)

Γλυκερόλη 10% (w/v)

Κυανούν της βρωμοφαινόλης 0,02% (w/v) (Sigma, ΗΠΑ) (pH 6,8)

Αρχικά πραγματοποιείται συλλογή των δειγμάτων με το διάλυμα λύσης. Τα δείγματα υφίστανται έπειτα κατεργασία με υπερήχους (sonication) για 2 δευτερόλεπτα σε πάγο ώστε να ολοκληρωθεί η λύση και να σπάσουν όσα κύτταρα δεν έχουν σπάσει με το διάλυμα λύσης. Στη συνέχεια στα δείγματα προστίθεται ίσου όγκου διάλυμα μετουσίωσης 2x. Ακολουθεί για 2'-3' βράσιμο τους στους 100°C, φυγοκέντρηση τους στις 10.000 στροφές ανά λεπτό για 1 λεπτό στους 4°C και έπειτα φόρτωμα των δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

## **2. 2.3b. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης**

### **Υλικά και συσκευές**

#### **Διάλυμα ακρυλαμίδης 30%**

Ακρυλαμίδιο 29.2% (w/v), Δισ-ακρυλαμίδιο 0.8% (w/v)

#### **Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10x (1λίτρο)**

Tris/HCl 30.3g, Γλυκίνη 144.2g, SDS 10g, pH 8.3

#### **Διάλυμα διαχωρισμού**

Tris.HCl 1.5M, SDS 0.4 (w/v), pH 8.8

#### **Διάλυμα επιστοιβαξης**

Tris.HCl 0.5M, SDS 0.4% (w/v), pH 6.8

Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδιου :

#### **> Πήκτωμα διαχωρισμού 12% (30ml)**

Διάλυμα ακρυλαμίδης 30% 12 ml

Διάλυμα διαχωρισμού 7.5 ml

Απεσταγμένο νερό 9.9 ml

APS 10% 300μl

TEMED 12μl

SDS 10% 300μl



**> Πήκτωμα επιστοιβάξης (10ml)**

Διάλυμα ακρυλαμίδης 30% 1.7ml

Διάλυμα επιστοιβάξης 1.25 ml

Απιονισμένο νερό 6.8ml

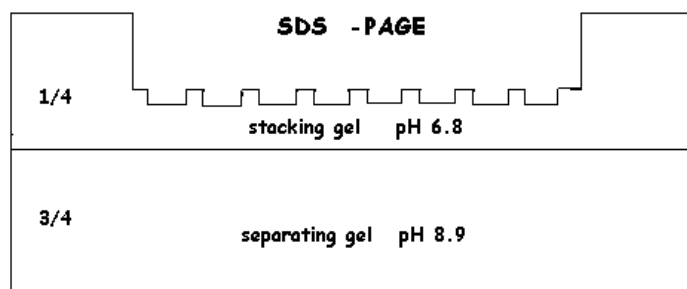
APS 10% 100μl

TEMED 10μl

SDS 10% 100μl

Η πήκτη πολυακρυλαμίδης αποτελείται από δύο τμήματα: το πήκτωμα διαχωρισμού (separating ή running gel) και το πήκτωμα κατακάθισης (stacking gel), που χρησιμεύει στο να εισέλθουν όλες οι πρωτεΐνες ταυτόχρονα στο πήκτωμα διαχωρισμού όπου τρέχουν με βάση το μέγεθός τους.

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα διαχωρισμού, το οποίο αφήνεται να πήξει στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και για να μην αφυδατωθεί αλλά και για να ευθυγραμμιστεί το διάλυμα προστίθεται στη επιφάνειά του ελάχιστη ποσότητα ισοπροπανόλης. Στη συνέχεια αφαιρείται η ισοπροπανόλη, προστίθεται το πήκτωμα κατακάθισης και πριν πήξει τοποθετείται το κατάλληλο 'χτένι' με τον αντίστοιχο αριθμό εσοχών όπου φορτώνονται τα δείγματα των πρωτεϊνών καθώς και ένα δείγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους.



Τέλος τα δείγματα ηλεκτροφορούνται στα 110V. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα εξαρτάται από το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης διότι το φορτίο/μονάδα μάζας είναι σταθερό.

### 2.2.3c. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

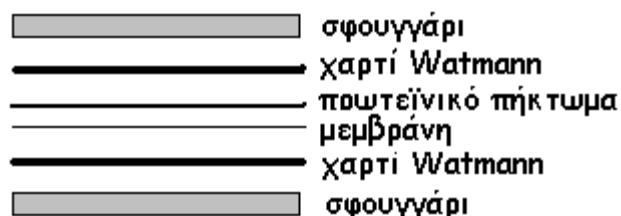
#### Υλικά και συσκευές

Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών (LKB, Bromma, Σουηδία)  
Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Schleicher & Schuell)  
Χαρτί Wattman 3MM (Amersham ΗΠΑ)  
Μεθανόλη, Tween-20 (Merk, Γερμανία)

#### Διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών

500ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης 10x προστίθενται σε 1lt μεθανόλης και ο όγκος ρυθμίζεται στα 5lt

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (transfer). Λαμβάνεται η πηκτή διαχωρισμού που περιέχει τις πρωτεΐνες και τοποθετείται στο διχτυωτό πλέγμα της συσκευής μεταφοράς πρωτεϊνών σε μορφή 'σάντουιτς' ως εξής : χαρτί wattman, πηκτή πολυακρυλαμίδιου, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ξανά χαρτί wattman.



Το πλέγμα τοποθετείται στην συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών και εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο 350 mA για περίπου 1.5 ώρα. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης τοποθετείται προς τον θετικό πόλο, για να μεταφερθούν

σε αυτήν από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου, οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες.

## **2. 2.3d. Υβριδοποίηση της μεμβράνης με αντίσωμα ειδικό για την επιθυμητή πρωτεΐνη και ανίχνευσή της**

### **Υλικά και συσκευές**

Ξηρό γάλα (Regilait) χωρίς λιπαρά  
Πρώτο αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης που θα μελετηθεί κάθε φορά  
Δεύτερο αντίσωμα κατά του πειραματόζωου στο οποίο έχει αναπτυχθεί το πρώτο αντίσωμα  
Συστημα χημειοφωταύγιας ECL (Amersham USA)  
Φίλμ εμφάνισης υψηλής ευαισθησίας (Kodak)

### **Διαλύμα TBS-T (10x)**

Tris/HCl 20mM  
NaCl 137mM  
Tween-20 0.1%  
(pH 7.6)

### **Διάλυμα αφαίρεσης πρωτεϊνών (Stripping buffer)**

Tris/HCl 62.5mM  
β-μερκαπτοαιθανόλη  
100mM SDS 2%  
(pH 6.7 )

### **Αντισώματα**

Actin (Chemicon, MAB1501) σε αραιώση 1:1000

Cox-1, (Santa Cruz, sc-7950 ) σε αραιώση 1:500

Anti- mouse (IM0817),(Immunotech, Γαλλία) δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με υπεροξειδάση του ραπτανιού (HRP).

Αφού πραγματοποιηθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ακολουθεί επώαση της για μία ώρα με ξηρό γάλα 5% σε TBS-T 1X (blocking solution), ώστε να δεσμευθούν οι μη ειδικές θέσεις και να αποφευχθεί η μη ειδική δέσμευση του αντισώματος. Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με TBS-T 1X και επώασή της ο/η στους 4°C υπό ανάδευση με το πρώτο αντίσωμα, ειδικό για την επιθυμητή πρωτεΐνη. Έπειτα πραγματοποιείται έκπλυση της μεμβράνης με TBS-T 1X και επώασή της για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το δεύτερο αντίσωμα, κατά του πειραματόζωου στο οποίο έχει αναπτυχθεί το πρώτο αντίσωμα και το οποίο είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο HRP (υπεροξειδάση του ραπανιού).

Κατόπιν η μεμβράνη ξεπλένεται με TBS-T 1X και τελικά επωάζεται με το σύστημα χημειοφωταύγιανς ECL, το οποίο αποτελεί υπόστρωμα για το ένζυμο HRP. Ακολουθεί έκθεση της μεμβράνης σε φιλμ και εμφάνιση σε εμφανιστικό μηχάνημα. Η ένταση της ζώνης που αποτυπώνεται στο φιλμ, και αντιστοιχεί στην συγκεκριμένη πρωτεΐνη, είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης. Κάθε φορά χρησιμοποιείται και ένα γονίδιο αναφοράς, για παράδειγμα η ακτίνη, και με τη χρήση του λογισμικού Tina Scan εκτός του γεγονότος ότι μετράται η ένταση της ζώνης της επιθυμητής πρωτεΐνης, πραγματοποιείται και κανονικοποίηση των τιμών με βάση το γονίδιο αναφοράς.

Η ίδια μεμβράνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση περισσότερων από μία πρωτεϊνών. Πριν από την προσθήκη του πρώτου αντισώματος, ειδικού για την επιθυμητή κάθε φορά πρωτεΐνη, πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης για 30 περίπου λεπτά στους 50°C με το διάλυμα αφαίρεσης των συνδεδεμένων πρωτεϊνών (αντισωμάτων) (stripping). Ακολουθεί ξέπλυμα της μεμβράνης με TBS-T 1X, επώασή της για μία ώρα με 5% γάλα και έπειτα επανάληψη της όλης παραπάνω διαδικασίας (προσθήκη του πρώτου αντισώματος, έπειτα του δεύτερου και τέλος εμφάνιση σε φιλμ).

**2. 2.4. Prostaglandin Screening EIA Kit** (Cayman Chemical Company, Prostaglandin Screening EIA kit, Cat No 514012)

Η μέθοδος βασίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ ελεύθερων προσταγλανδινών (PGs) και προσταγλανδινών συνδεδεμένων με το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση -PG tracer. Η συγκέντρωση των προσταγλανδινών δεσμευμένων με ακετυλοχολινεστεράση (PG tracer) είναι σταθερή ενώ η συγκέντρωση των ελεύθερων προσταγλανδινών αλλάζει οπότε η ποσότητα της ακετυλοχολινεστεράσης δεσμευμένης με προσταγλανδίνες θα είναι αντιστρόφως ανάλογη της ποσότητας της ελεύθερης προσταγλανδίνης.

Σε μία πλάκα 96 οπών επιστρωμένη με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού προστίθεται το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση, αντιορός προσταγλανδινών και το δείγμα μας. Ακολουθεί πλύσιμο της πλάκας με διάλυμα πλύσης ώστε να απομακρυνθούν τα μη-δεσμευμένα αντιδραστήρια. Έπειτα προστίθεται το αντιδραστήριο Ellman's το οποίο περιέχει το υπόστρωμα της ακετυλοχολινεστεράσης. Το προϊόν αυτής της ενζυμικής αντίδρασης έχει ένα ευκρινές κίτρινο χρώμα που απορροφά στα 412nm. Η ένταση του χρώματος που καθορίζεται με φασματοφωτόμετρο είναι ανάλογη της ποσότητας των προσταγλανδινών δεσμευμένων με ακετυλοχολινεστεράση που είναι αντιστρόφως ανάλογη με την ποσότητα των ελεύθερων προσταγλανδινών.

**2. 2.5. Ενζυμοσύνδετη Ανοσοπροσοφητική Μέτρηση (Enzyme Linked Immuno-Sorbent- Assay, ELISA (R&D Systems, Human TIMP-1 immunoassay, Cat No DTM100)**

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για να προσδιορίσουμε την ποσότητα του αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών TIMP1 στα δείγματά μας, και πιο συγκεκριμένα στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργειών που είχαν συλλεχθεί ύστερα από διέγερση των κυττάρων με τα CRF πεπτίδια.

Χρησιμοποιείται πλάκα 96 οπών επιστρωμένη με μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την προς ανίχνευση ουσία (*human* TIMP1). Στη συνέχεια, προστίθεται το δείγμα και εάν υπάρχει το αντιγόνο, προσδέεται στο προσκολλημένο αντίσωμα. Ακολουθεί πλύσιμο της πλάκας με διάλυμα πλύσης ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια αντισώματος και να απελευθερωθούν οι μη ειδικές θέσεις.

Έπειτα προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα, που είναι πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό για το αντιγόνο συνδεδεμένο με ένα ένζυμο, και το οποίο προσδέεται στο αντιγόνο. Τέλος εισάγεται το υπόστρωμα του ενζύμου που είναι συνδεδεμένο με το δεύτερο αντίσωμα. Με τη βοήθεια φωτομέτρου μετριέται η ένταση του χρώματος που παράγεται και η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντιγόνου (TIMP1) στο δείγμα μας.

### 2.2.7. Ανοσοφθορισμός

Για τον έλεγχο της επίδρασης που πιθανά να έχουν τα πεπτίδια της CRF οικογένειας στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της κινάσης FAK–Focal Adhesion Kinase, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του ανοσοφθορισμού.

Τα κύτταρα αρχικά στρώνονται σε καλυπτρίδες διαμερισματοποιημένες 8 οπών (chamber slides). Στο τέλος του πειράματος απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με PBS 1X, που περιέχει NaF και PMSF. Έπειτα, για τη μονιμοποίηση των κυττάρων, προστίθεται 4% φορμαλδεΰδη (PFA) που περιέχει PMSF και NaF για περίπου δέκα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί ξέπλυμα των κυττάρων με PBS 1X και προσθήκη διαλύματος που περιέχει 0,1% Triton X-100, 0,1% FCS και PBS με PMSF και NaF για περίπου 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται πλύσιμο των κυττάρων με PBS 1X και προσθήκη του πρώτου αντισώματος, του αντισώματος για τη φωσφορυλιωμένη μορφή της κινάσης FAK (mouse anti-phospho FAK), σε αραιώση 1:50. Τα κύτταρα αφήνονται με το αντίσωμα ο/η σε θερμοκρασία 4°C. Ταυτόχρονα, χρησιμοποιούνται κύτταρα αναφοράς που επωάζονται με ορό (1% FCS σε PBS) αντί αντισώματος

Την επόμενη μέρα τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS και επωάζονται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, σε υγρό και σκοτεινό περιβάλλον με το δεύτερο αντίσωμα που είναι σημασμένο με FITC και ανεπτυγμένο σε ποντικό,. Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται ως κύτταρα αναφοράς επωάζονται επίσης με το δεύτερο αντίσωμα. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ξέπλυμα του δεύτερου αντισώματος με PBS και προσθήκη του υλικού συγκόλλησης (mounting medium). Τέλος ακολουθεί παρατήρηση και φωτογράφιση των κυττάρων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**



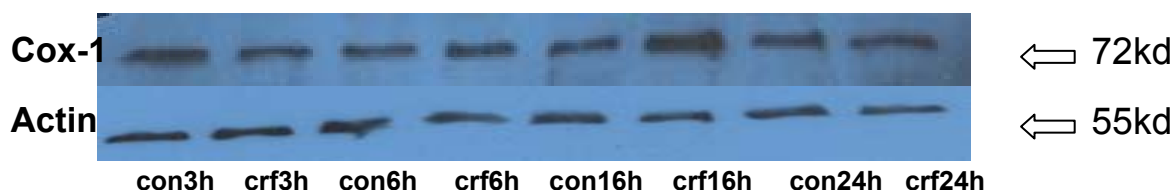
Έχει δειχθεί ότι τα πεπτίδια της CRF οικογένειας παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου και γενικά επηρεάζουν πολλά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων. Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά που αποκτούν τα καρκινικά κύτταρα είναι η αύξηση της κινητικότητάς τους, δίνοντάς τους την ικανότητα να απομακρυνθούν από το αρχικό τους περιβάλλον και να δημιουργούν μεταστάσεις σε άλλα σημεία του σώματος.

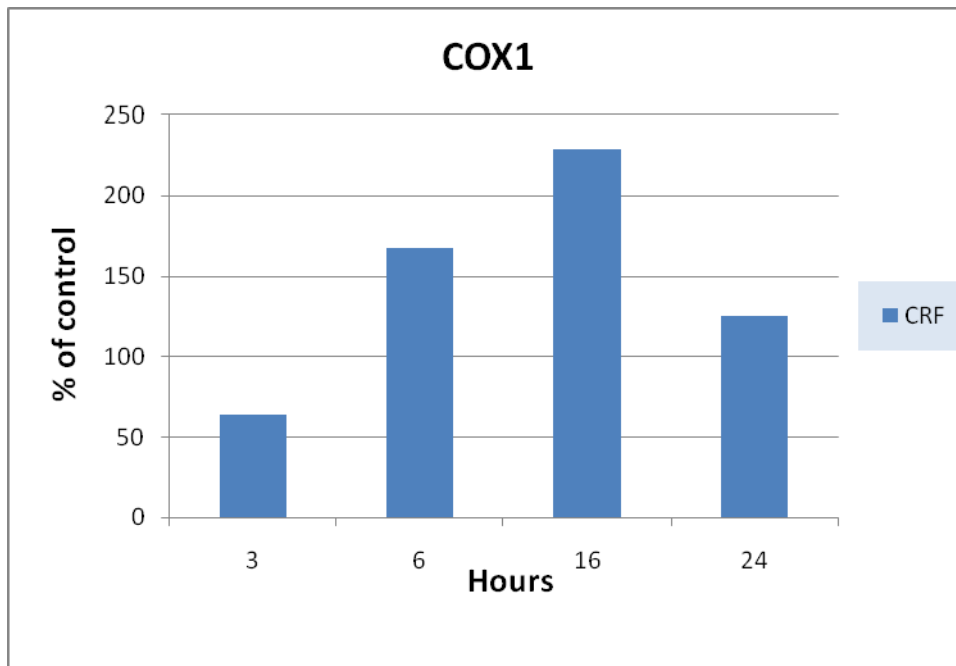
Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να ελεγχθεί η επίδραση που πιθανά τα πεπτίδια της CRF οικογένειας να έχουν στην κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων του στήθους και πιο συγκεκριμένα στην κυτταρική σειρά MCF7.

### 3.1. Επίδραση του CRF πεπτιδίου στην έκφραση της COX1

Αρχικά εξετάστηκε η επίδραση που πιθανά ο CRF να έχει στην έκφραση της κυκλοξυγενάσης Cox1. Η κυκλοξυγενάση Cox1 είναι ένα ένζυμο που η δράση του, και κατά συνέπεια η παραγωγή προσταγλανδινών, έχει δειχθεί να συνδέεται άμεσα με την αύξηση της κινητικότητας και την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να δημιουργούν μεταστάσεις.

Ελέγχθηκε η επίδραση που πιθανά τα CRF πεπτίδια να έχουν στην έκφραση της Cox1 στην κυτταρική σειρά MCF7, με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (western blotting).





**Εικόνα 1.** Κύτταρα MCF7 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 24 οπών σε συγκέντρωση 500.000 κύτταρα/ml και επωάστηκαν με CRF σε συγκέντρωση  $10^{-8}M$  για 3, 6, 16 και 24 ώρες. Ακολούθησε λύση των κυττάρων και με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (Western Blot) έγινε ο προσδιορισμός των επιπέδων της Cox1. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με την μέτρηση του ποσού της ακτίνης σε κάθε δείγμα

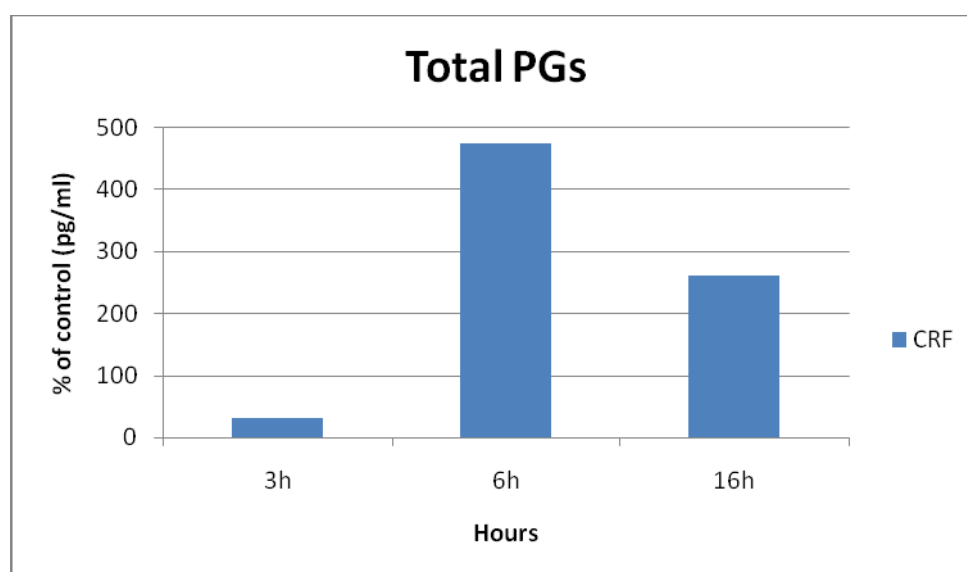
Όπως φαίνεται στις παραπάνω εικόνες, ο CRF αυξάνει την έκφραση της κυκλοξυγενάσης Cox1 στις 6 και 16 ώρες. Οπότε φαίνεται ο CRF να επάγει την Cox1 σε επίπεδο πρωτεΐνης.

### 3. 2. Ανίχνευση των επιπέδων των προσταγλανδινών ύστερα από διέγερση των κυττάρων σε διάφορες χρονικές στιγμές με τα CRF πεπτίδια

Επόμενος στόχος είναι η επιβεβαίωση του πιο πάνω αποτελέσματος ελέγχοντας τη δράση της κυκλοοξυγενάσης Cox1 και πιο συγκεκριμένα, μετρώντας τα επίπεδα των προσταγλανδινών που απελευθερώνονται ύστερα από τη δράση της Cox1.

#### 3. 2.1. ΕΠΩΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MCF7 ΜΕ ΤΟΝ CRF

Χρησιμοποιώντας το kit- Prostaglandin Screening EIA kit από την εταιρεία Cayman μετρήθηκαν τα επίπεδα των προσταγλανδινών στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών.

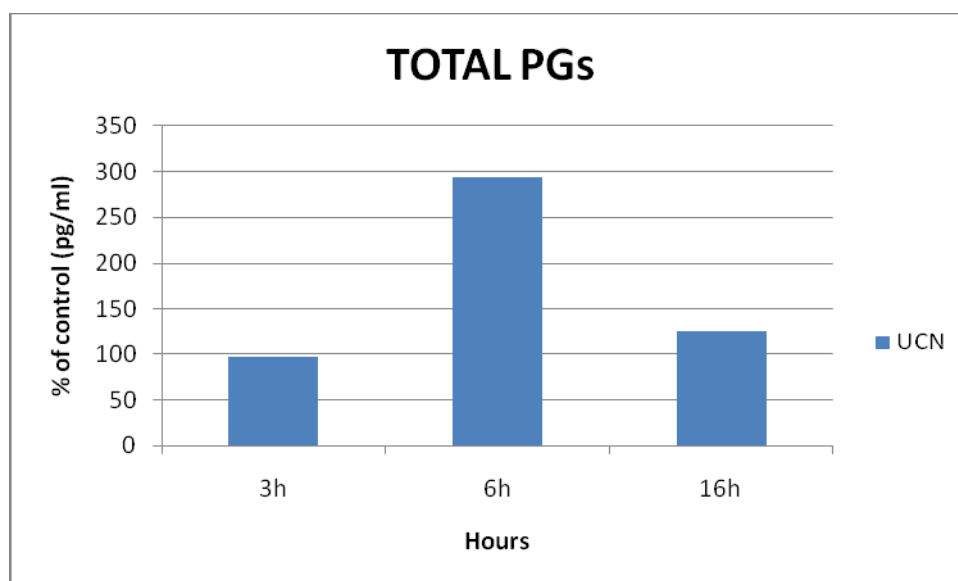


**ΕΙΚΟΝΑ 2.** Συγκεντρώσεις (pg/ml) των ολικών προσταγλανδινών ύστερα από επίδραση των MCF7 κυττάρων με CRF. Κύτταρα MCF7 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 24 οπών σε συγκέντρωση 500.000 κύτταρα/ml και επώαστηκαν με CRF σε συγκέντρωση  $10^{-8}M$  για 3, 6 και 16 ώρες. Τα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση των επιπέδων των προσταγλανδινών με το συγκεκριμένο kit

Παρατηρείται αύξηση των συγκεντρώσεων των προσταγλανδινών 6 και 16 ώρες μετά την επίδραση των κυττάρων MCF7 με τον CRF. Πολύ πιο έντονη είναι η αύξηση της συγκέντρωσης των προσταγλανδινών στις 6 ώρες.

### 3. 2.2. ΕΠΩΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MCF7 ΜΕ ΤΗ UCN1

Χρησιμοποιώντας το ίδιο kit μετρήθηκαν τα επίπεδα των ελεύθερων προσταγλανδινών ύστερα από επίδραση (stimulation) των MCF7 κυττάρων με ένα άλλο πεπτιδίδιο της CRF οικογένειας, την **UCN1**.



**ΕΙΚΟΝΑ 3.** Συγκεντρώσεις των ολικών προσταγλανδινών (pg/ml) ύστερα από επίδραση με UCN1. Κύτταρα MCF7 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 24 οπών σε συγκέντρωση 500.000 κύτταρα/ml και επωάστηκαν με UCN1 σε συγκέντρωση  $10^{-8}M$  για 3, 6 και 16 ώρες. Τα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση των επιπέδων των προσταγλανδινών με το συγκεκριμένο kit

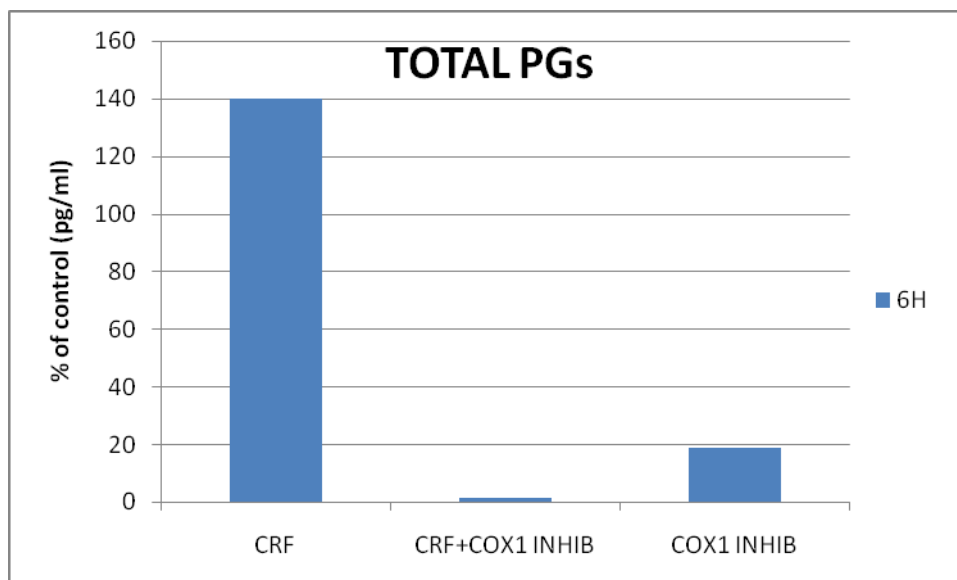
Παρατηρείται αύξηση των επιπέδων των προσταγλανδινών 6 και 16 ώρες μετά την επίδραση των κυττάρων MCF7 με το πεπτίδιο UCN. Πολύ πιο έντονη είναι η αύξηση της συγκέντρωσης τους στις 6 ώρες επίδρασης με το συγκεκριμένο πεπτίδιο.

### 3. 2.3. Ανίχνευση των επιπέδων των προσταγλανδινών ύστερα από διέγερση των κυττάρων σε διάφορες χρονικές στιγμές με τον CRF παρουσία του αναστολέα Cox1 inhibitor

Έχοντας τα παραπάνω αποτελέσματα από τα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργειών σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα από τα εκχυλίσματα των κυττάρων , θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η αύξηση των επιπέδων των προσταγλανδινών που παρατηρείται στις 6 και 16 ώρες επίδρασης με τα CRF πεπτίδια, οφείλεται στην αύξηση της έκφρασης του ενζύμου Cox1 που παρατηρείται στις ίδιες χρονικές στιγμές.

Για να ελεγχθεί αυτή η υπόθεση πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη επίδραση των κυττάρων MCF7 με τον CRF και με τον αναστολέα της κυκλοοξυγενάσης Cox1. Χρησιμοποιήθηκε το kit – Prostaglandin Screening EIA kit για να μετρηθούν τα επίπεδα των ελεύθερων προσταγλανδινών στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργειών.

### 3. 2.3.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΟΝ CRF ΓΙΑ 6 ΩΡΕΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ COX1



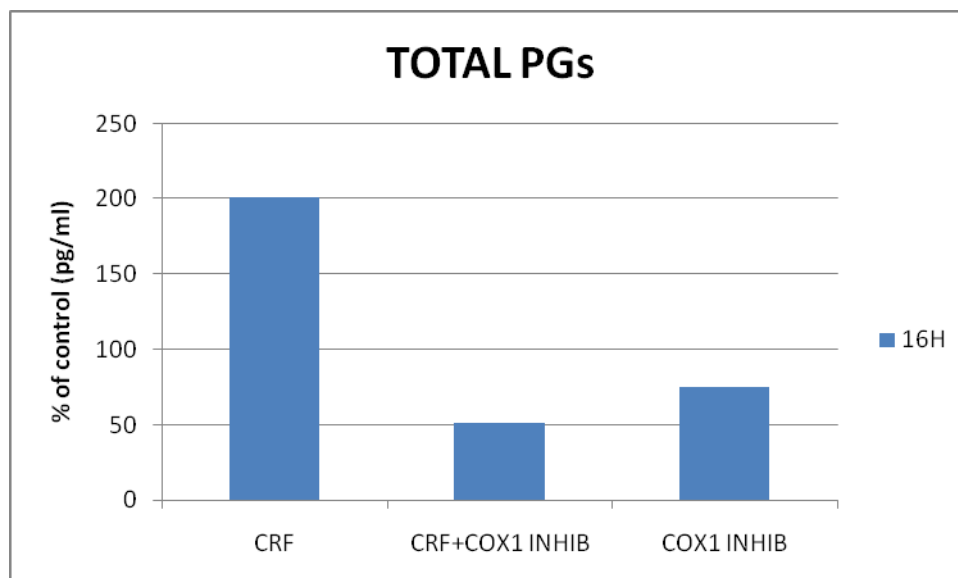
**ΕΙΚΟΝΑ 4.** Συγκεντρώσεις των ολικών προσταγλανδινών (pg/ml) ύστερα από επίδραση των κυττάρων MCF7 με CRF και με COX1 Inhibitor. Κύτταρα MCF7 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 24 οπών σε συγκέντρωση 500.000 κύτταρα/ ml και επωάστηκαν για 6 ώρες με CRF σε συγκέντρωση  $10^{-8}$ . Μία ώρα πριν την επίδραση με το πεπτίδιο CRF τα κύτταρα επωάστηκαν με ειδικό αναστολέα της Cox-1 (SC-560) σε συγκέντρωση  $10^{-7}$ . Τα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση των επιπέδων των προσταγλανδινών με το παραπάνω kit

Παρατηρείται αύξηση των συγκεντρώσεων των ελεύθερων προσταγλανδινών 6 ώρες μετά την επίδραση των κυττάρων MCF7 με τον CRF. Η ταυτόχρονη όμως επώαση των κυττάρων με τον CRF και με τον αναστολέα της κυκλοοξυγενάσης COX1 οδηγεί σε μείωση των επιπέδων τους. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι ο CRF δρα μέσω της Cox1, αφού αναστολή της δράσης της Cox1 αναστέλλει και την επαγωγική δράση του CRF στα επίπεδα των προσταγλανδινών.

### 3. 2.3.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΟΝ CRF ΓΙΑ 16 ΩΡΕΣ

#### ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ COX1

Τα επίπεδα των ελεύθερων προσταγλανδινών ελέγχθηκαν και ύστερα από 16 ώρες επίδρασης των κυττάρων με τον CRF και με τον Cox1 Inhibitor.



**ΕΙΚΟΝΑ 5.** Συγκεντρώσεις των ολικών προσταγλανδινών (pg/ml) ύστερα από επώαση με CRF και με COX1 Inhibitor. Κύτταρα MCF7 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 24 οπών σε συγκέντρωση 500.000 κύτταρα/ml και επώαστηκαν για 16 ώρες με CRF σε συγκέντρωση  $10^{-8}$ . Μία ώρα πριν την επίδραση με τα πεπτιδία τα κύτταρα επώαστηκαν με ειδικό αναστολέα της Cox-1 (SC-560) σε συγκέντρωση  $10^{-7}$ . Τα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργειών συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση των επιπέδων των προσταγλανδινών με το παραπάνω kit

Ύστερα από 16 ώρες επίδρασης των κυττάρων MCF7 με τον CRF παρατηρείται αύξηση των επιπέδων των προσταγλανδινών. Αντίθετα προσθήκη του αναστολέα της Cox1 οδηγεί σε μείωση των επιπέδων τους.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται ότι ο CRF δρα μέσω επαγωγής της κυκλοοξυγενάσης Cox1 και προκαλεί αύξηση των επιπέδων των προσταγλανδινών, η δράση των οποίων έχει δειχθεί να

σχετίζεται με την αύξηση της κινητικότητας και την ικανότητα μετάστασης των καρκινικών κυττάρων.

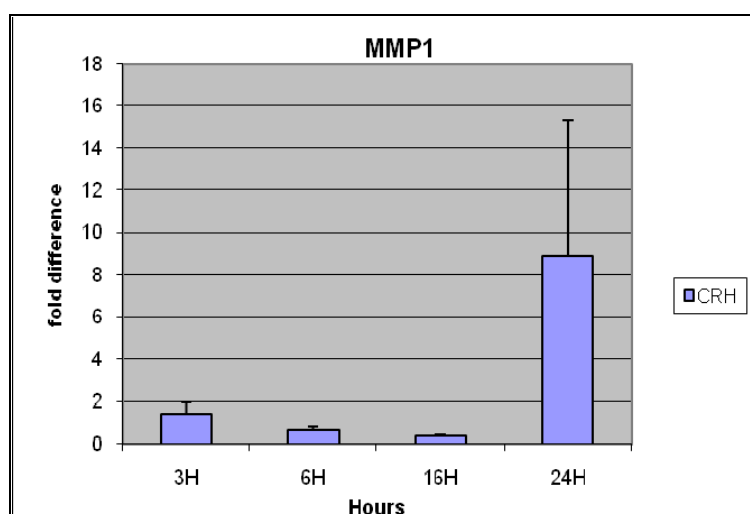
### 3. 3. Έλεγχος με PCR πραγματικού χρόνου (REAL-TIME PCR) των επιπέδων mRNA των μεταλλοπρωτεϊνών MMP9, MMP1 και του αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών TIMP1

Έχει δειχθεί ότι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες σε διάφορους τύπους καρκίνου παίζουν σημαντικό ρόλο και επηρεάζουν την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων. Επόμενος στόχος είναι να μελετηθεί η επίδραση που πιθανά τα CRF πεπτίδια έχουν στα επίπεδα τόσο των μεταλλοπρωτεϊνών όσο και των αναστολέων τους.

Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της REAL TIME PCR για να ελεγχθεί ποσοτικά αν υπάρχουν διαφορές στην έκφραση του mRNA των μεταλλοπρωτεϊνών, συγκεκριμένα της MMP1 και MMP9, και του αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών TIMP1 ύστερα από επίδραση των κυττάρων με τα πεπτίδια της CRF οικογένειας.

#### 3. 3.1. ΕΠΙΠΕΔΑ mRNA ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗΣ MMP1

##### 3. 3.1.a. ΕΠΩΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MCF7 ΜΕ ΤΟΝ CRF



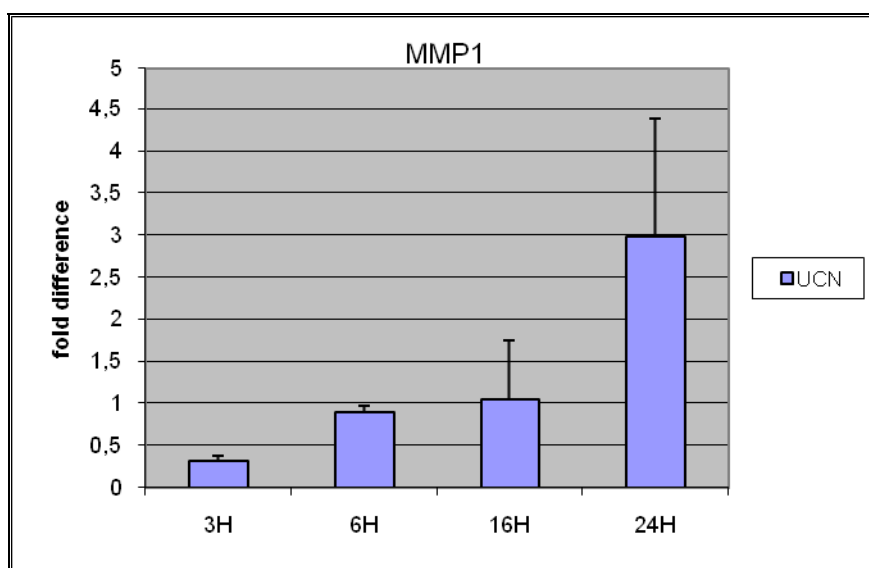


**ΕΙΚΟΝΑ 6.** Επίπεδα της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP1 ύστερα από επίδραση των κυττάρων MCF7 με το πεπτίδιο CRF σε διάφορες χρονικές στιγμές. Κύτταρα MCF7 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 24 οπών σε συγκέντρωση 500.000 κύτταρα/ml και επωάστηκαν με CRF σε συγκέντρωση  $10^{-8}M$  για 3, 6, 16 και 24 ώρες. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν κατόπιν και με τη μέθοδο της real-time PCR μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA της MMP1. Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί με GAPDH, ως γονίδιο αναφοράς

Παρατηρείται αύξηση στα επίπεδα έκφρασης της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP1 σε μεταγραφικό επίπεδο, 24 ώρες μετά από την επίδραση των πεπτιδίων της CRF οικογένειας.

### 3. 3.1.b. ΕΠΩΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MCF7 ΜΕ ΤΗΝ UCN1

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος των επιπέδων του mRNA της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP1 ύστερα από επίδραση των κυττάρων με ένα άλλο πεπτίδιο της οικογένειας CRF, της UCN1.

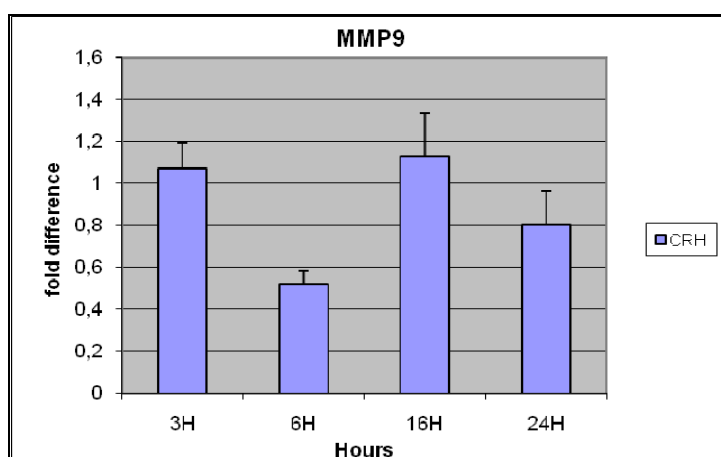


**ΕΙΚΟΝΑ 7.** Επίπεδα της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP1 ύστερα από επίδραση των κυττάρων MCF7 με το πεπτίδιο UCN1. Κύτταρα MCF7 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 24 οπών σε συγκέντρωση 500.000 κύτταρα/ml και επωάστηκαν με UCN1 σε συγκέντρωση  $10^{-8}M$  για 3, 6, 16 και 24 ώρες. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν κατόπιν και με τη μέθοδο της real-time PCR μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA της MMP1. Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί με GAPDH

Αύξηση των επιπέδων του mRNA της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP1 παρατηρείται 24 ώρες μετά από την επίδραση με τη UCN1.

### 3. 3.2. ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΟΥ mRNA ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗΣ MMP9

#### 3. 3.2.a. ΕΠΩΑΣΗ ΤΩΝ MCF7 ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΟΝ CRF

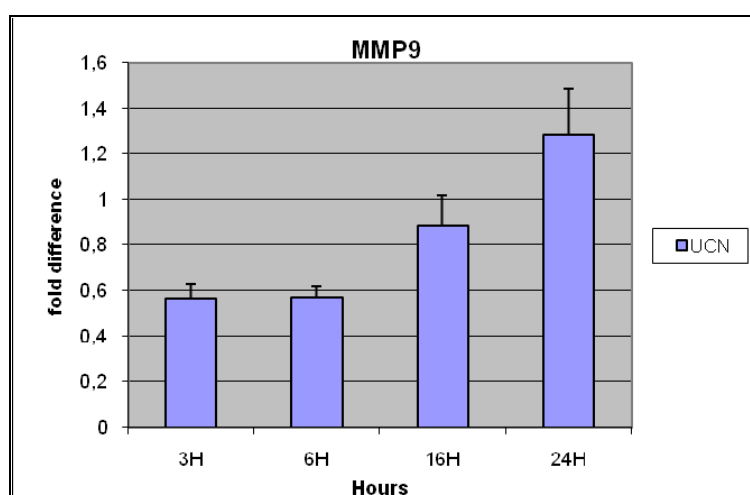


**ΕΙΚΟΝΑ 8.** Επίπεδα της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP9 ύστερα από επίδραση των κυττάρων MCF7 με το πεπτίδιο CRF. Κύτταρα MCF7 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 24 οπών σε συγκέντρωση 500.000 κύτταρα/ml και επωάστηκαν με CRF σε συγκέντρωση  $10^{-8}M$  για 3, 6, 16 και 24 ώρες. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν κατόπιν και με τη μέθοδο της real-time PCR μετρήθηκαν τα επίπεδα

mRNA της MMP9. Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί με GAPDH, ως γονίδιο αναφοράς

Μία μικρή αύξηση των επιπέδων του mRNA της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP9 παρατηρείται 16 ώρες μετά την επίδραση των κυττάρων με τον CRF.

### 3. 3.2.b. ΕΠΩΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MCF7 ΜΕ ΤΗΝ UCN1



**ΕΙΚΟΝΑ 9.** Επίπεδα της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP9 ύστερα από επίδραση των κυττάρων MCF7 με το πεπτίδιο της UCN1. Κύτταρα MCF7 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 24 οπών σε συγκέντρωση 500.000 κύτταρα/ml και επωάστηκαν με UCN σε συγκέντρωση  $10^{-8}M$  για 3, 6, 16 και 24 ώρες. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν κατόπιν και με τη μέθοδο της real-time PCR μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA της MMP1. Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί με GAPDH, ως γονίδιο αναφοράς

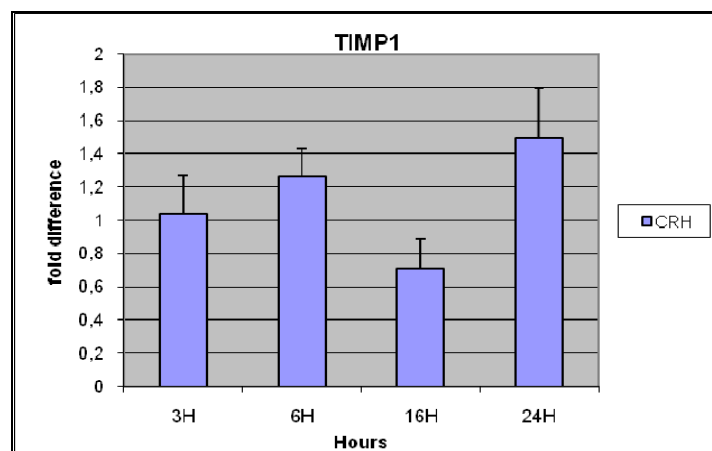
Ύστερα από επίδραση των κυττάρων με την UCN1 μία μικρή αύξηση των επιπέδων του mRNA της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP9 παρατηρείται 24 ώρες μετά.

Έχοντας τα παραπάνω αποτελέσματα με τη μέθοδο της Real-Time PCR, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι τα πεπτίδια της CRF οικογένειας επηρεάζουν σε επίπεδο μεταγραφής σε κάποιο βαθμό, τα επίπεδα των μεταλλοπρωτεϊνών MMP1 και MMP9. Η επίδραση φαίνεται να συμβαίνει ύστερα από μεγάλα χρονικά διαστήματα επίδρασης των κυττάρων με τα πεπτίδια της CRF οικογένειας.

### 3. 3.3. ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΟΥ mRNA ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ TIMP1

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος των επιπέδων του mRNA του αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών TIMP1 με τη μέθοδο της Real-time PCR. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή ο TIMP1 έχει δειχθεί να εμπλέκεται στην ανάπτυξη και στην εξάπλωση του καρκίνου με δύο διαφορετικούς τρόπους - είτε αναστέλλοντας τη δράση των μεταλλοπρωτεϊνών είτε δρώντας με τρόπο που δεν σχετίζεται με τις μεταλλοπρωτεϊνάσες.

#### 3. 3.3.a. ΕΠΩΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MCF7 ΜΕ ΤΟΝ CRF

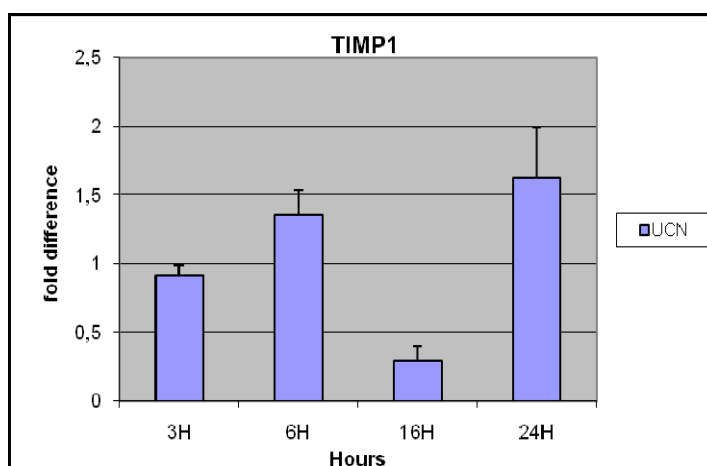


**ΕΙΚΟΝΑ 10.** Επίπεδα της μεταλλοπρωτεϊνάσης TIMP1 ύστερα από επίδραση των κυττάρων MCF7 με το πεπτίδιο CRF. Κύτταρα MCF7 καλλιεργήθηκαν σε

πλάκες 24 οπών σε συγκέντρωση 500.000 κύτταρα/ml και επώαστηκαν με CRF σε συγκέντρωση  $10^{-8}M$  για 3, 6, 16 και 24 ώρες. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν κατόπιν και με τη μέθοδο της real-time PCR μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA της TIMP1. Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί με GAPDH, ως γονίδιο αναφοράς

Από την παραπάνω εικόνα παρατηρείται μείωση των επιπέδων της TIMP1 16 ώρες μετά την επώαση των κυττάρων με τον CRF.

### 3. 3.3.b. ΕΠΩΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MCF7 ΜΕ ΤΗΝ UCN1



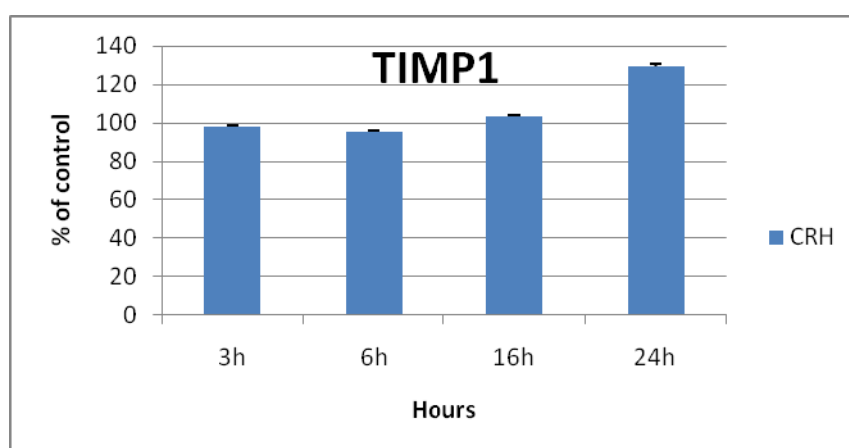
**ΕΙΚΟΝΑ 11.** Επίπεδα της μεταλλοπρωτεϊνάσης TIMP1 ύστερα από επίδραση των κυττάρων MCF7 με το πεπτίδιο UCN1. Κύτταρα MCF7 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 24 οπών σε συγκέντρωση 500.000 κύτταρα/ml και επώαστηκαν με UCN1 σε συγκέντρωση  $10^{-8}M$  για 3, 6, 16 και 24 ώρες. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν κατόπιν και με τη μέθοδο της real-time PCR μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA της TIMP1. Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί με GAPDH, ως γονίδιο αναφοράς

Αξιοσημείωτη είναι η μείωση των επιπέδων mRNA του αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών που παρατηρείται 16 ώρες μετά την επίδραση των κυττάρων με την UCN1.

Για να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω αποτελέσματα μετρήθηκε η παραγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών, MMP1 και MMP9, και του αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών, TIMP1, με μία άλλη μέθοδο - τη μέθοδο της Elisa.

#### 4. 4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ TIMP1 ΜΕ ELISA

Δεν κατέστη τελικά δυνατή η μέτρηση των επιπέδων των μεταλλοπρωτεϊνών MMP1 και MMP9 με τη μέθοδο της Elisa. Αντίθετα για τον αναστολέα TIMP1 υπήρξαν τα παρακάτω αποτελέσματα.



**ΕΙΚΟΝΑ 12.** Συγκεντρώσεις % (ng/ml) του αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών TIMP1 των δειγμάτων σε σχέση με τα controls. Κύτταρα MCF7 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 24 οπών σε συγκέντρωση 500.000 κύτταρα/ml και επώαστηκαν με CRF σε συγκέντρωση  $10^{-8}M$  για 3, 6, 16 και 24 ώρες. Τα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση των επιπέδων του TIMP1 με τη μέθοδο της Elisa

Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά των επιπέδων του αναστολέα στις διάφορες χρονικές στιγμές επώασης των κυττάρων με τον CRF. Σε πολύ μικρό βαθμό παρατηρείται μία αύξηση

των επιπέδων του αναστολέα TIMP1 24 ώρες μετά την επίδραση των κυττάρων με τον CRF.

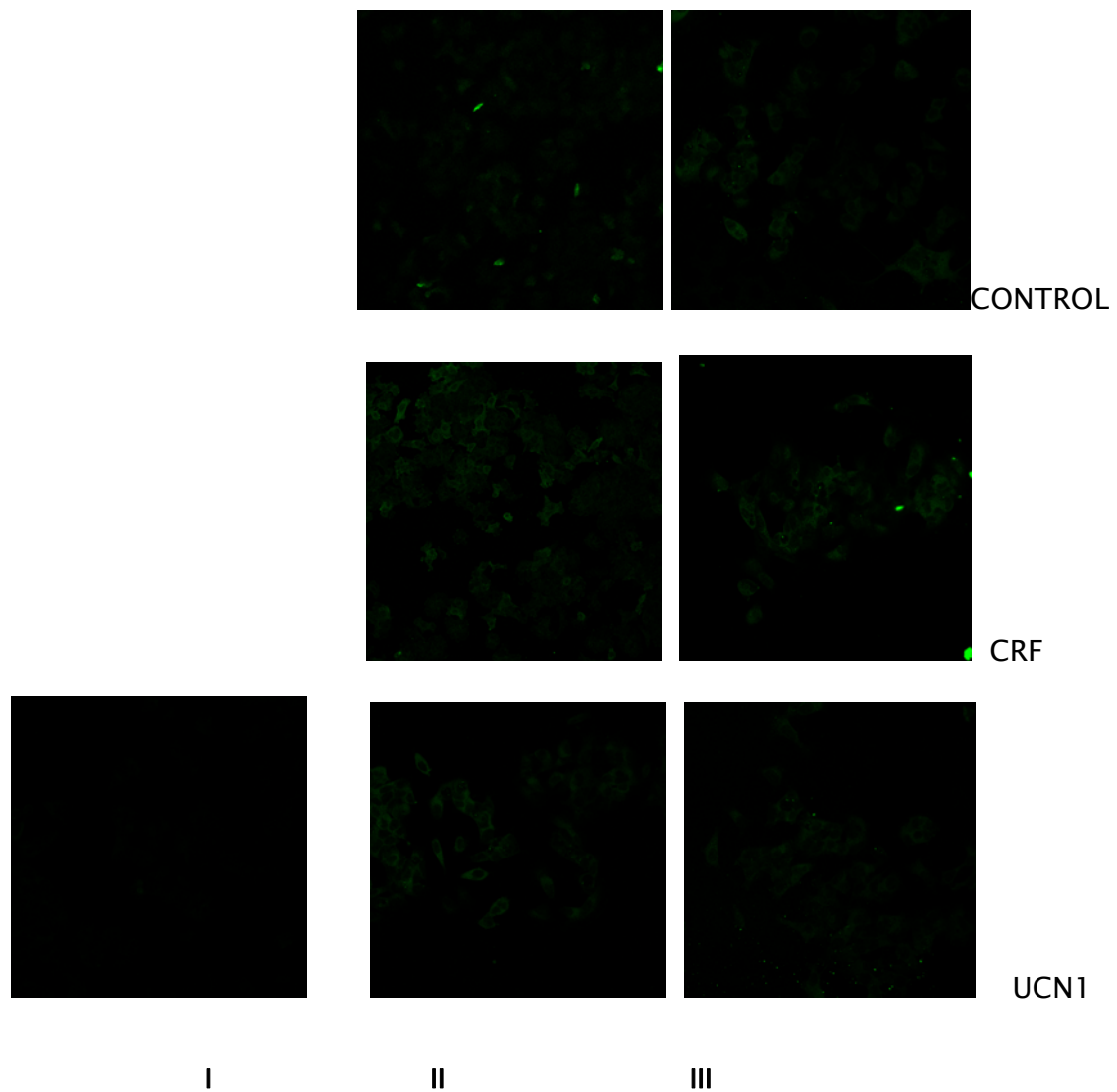
### **3. 5. ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΥΡΥΛΙΩΜΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗΣ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ FAK**

Η μετάσταση είναι μια περίπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει αλλαγές στην κυτταρική προσκόλληση και στην κινητικότητα των κυττάρων, δίνοντας τη δυνατότητα στα καρκινικά κύτταρα να διέρχονται και να μεταναστεύουν μέσω της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.

Η FAK κινάση είναι μια κυτταροπλασματική κινάση τυροσίνης που συνεντοπίζεται με ιντεγκρίνες και θεωρείται σημαντικό μόριο για τη σηματοδότηση μονοπατιών που ενεργοποιούνται από τις ιντεγκρίνες. Ο κυτταρικός του εντοπισμός κατευθύνεται από μια ακολουθία 125 αμινοξέων στο καρβοξυλετικό άκρο που ονομάζεται ακολουθία FAT-Focal Adhesion Targeting. Η δέσμευση των εξωκυττάρων πρωτεϊνών με τις ιντεγκρίνες οδηγεί σε αυτοφωσφορυλίωση της FAK στην τυροσίνη Tyr-397.

Η κινάση FAK έχει βρεθεί να εμπλέκεται και να ρυθμίζει πολλές κυτταρικές διαδικασίες όπως τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την προσκόλληση, την κινητικότητα και την απόπτωση. Σε διάφορους τύπους καρκίνου έχει παρατηρηθεί αύξηση της έκφρασης και αύξηση της φωσφορυλίωσης της κινάσης FAK, όπως σε καρκινώματα στο κεφάλι, στον αυχένα, στις ωοθήκες καθώς και στον καρκίνο του στήθους επηρεάζοντας τη διεισδυτική και μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων (73, 74).

Η μέθοδος του ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί αν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της κινάσης τυροσίνης FAK επηρεάζονται από τα πεπτίδια της CRF οικογένειας. Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα για τη φωσφορυλιωμένη μορφή της κινάσης FAK σε αραιώση 1:50.



**Εικόνα 11.** Κύτταρα MCF7 καλλιεργήθηκαν σε chamber slides σε συγκέντρωση  $5 \times 10^5$  κύτταρα/ml για μία μέρα και επωάστηκαν στη συνέχεια με CRF και UCN1 σε συγκέντρωση  $10^{-8}$  M για 1 ώρα (εικόνα II) και 3 ώρες (εικόνα III). Ακολούθως, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και επωάστηκαν αρχικά με αντίσωμα κατά της φωσφορυλιωμένης μορφής της κινάσης FAK μέχρι την επομένη στους  $4^\circ$  C και στη συνέχεια με δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με FITC. Τα κύτταρα στην εικόνα I έχουν επωαστεί με δεύτερο αντίσωμα μόνο

Από τις παραπάνω εικόνες παρατηρούμε ότι ο CRF αυξάνει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της κινάσης FAK και στις δύο επιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν στις δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (1 ώρα και 3 ώρες επίδρασης). Αντιθέτως, για την UCN1 αύξηση της φωσφορυλιωμένης μορφής της FAK παρατηρείται ύστερα από 1 ώρα επίδρασης στα κύτταρα MCF7.



**ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο συνηθής κακοήθεια και η κύρια αιτία θανάτου για τις γυναίκες. Αν και η πρόωρη διάγνωση του έχει σαν αποτέλεσμα υψηλά ποσοστά θεραπείας, ο καρκίνος του μαστού παραμένει η βασική αιτία θανάτου από καρκίνο στις ενήλικες γυναίκες κάτω των 54 ετών και η δεύτερη πιο συχνή αιτία για τις γυναίκες άνω των 54 ετών. Η νόσος αυτή προσβάλλει και τους άνδρες, αλλά σε ποσοστό μικρότερο από 1% επί του συνόλου όλων των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού.

Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες να βρεθούν οι παράγοντες που μπορεί να επηρεάζουν την εμφάνιση, ανάπτυξη και εξάπλωση του καρκίνου του μαστού. Έχει δειχθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου ότι τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν και εκκρίνουν τα πεπτίδια της CRF οικογένειας τα οποία μέσω των υποδοχέων τους, είτε με αυτοκρινή είτε με παρακρινή τρόπο, επάγουν διαδικασίες που επηρεάζουν τόσο την ανάπτυξη όσο και την εξάπλωση του καρκίνου. Το αποτέλεσμα της επίδρασής τους εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο, τον τύπο του υποδοχέα καθώς και από τα υπόλοιπα ερεθίσματα που δέχονται τα κύτταρα από το περιβάλλον.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι να ελεγχθεί η επίδραση που πιθανά τα CRF πεπτίδια έχουν στην κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων και πιο συγκεκριμένα στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, γι' αυτό το λόγο στα πειράματά μας χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά MCF7 του μαστού.

Έχει βρεθεί ότι η κυτταρική σειρά MCF7 εκφράζει τους υποδοχείς των CRF πεπτιδίων, και πιο συγκεκριμένα βρέθηκε ότι στα κύτταρα αυτά σε μεγάλο βαθμό εκφράζεται ο CRFR1a και σε μικρότερο βαθμό ο CRF2c, κι αυτό οδήγησε στην υποψία ότι τα CRF πεπτίδια που βρίσκονται στο μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων μπορεί να επηρεάζουν τη φυσιολογία του όγκου.

Παλιότερες μελέτες στο εργαστήριό μας έδειξαν ότι στα κύτταρα MCF7 ο CRF εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό τους ενώ ταυτόχρονα φάνηκε να επηρεάζεται και η απόπτωση των κυττάρων. Υπήρξαν και κάποια αποτελέσματα που έδειχναν ότι ο CRF επηρεάζει και την κινητικότητα τους. Με την παρούσα εργασία θέλουμε να μελετήσουμε περισσότερο την επίδραση που τα CRF πεπτίδια έχουν στην ικανότητα των καρκινικών κυττάρων για μετάσταση. Όλες οι παραπάνω δράσεις των CRF πεπτιδίων στην κυτταρική σειρά MCF7 παρατηρήθηκαν σε συνθήκες χωρίς ορό. Οι ίδιες συνθήκες χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα εργασία.

Επειδή η κυκλοοξυγενάση Cox1 και οι προσταγλανδίνες που απελευθερώνονται από τη δράση της, έχουν συσχετιστεί άμεσα με την αύξηση της κινητικότητας των καρκινικών κυττάρων του μαστού και γενικά με το φαινόμενο της μετάστασης, θελήσαμε αρχικά να ελέγξουμε αν τα πεπτίδια της CRF οικογένειας, και πιο συγκεκριμένα ο CRF, επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης της Cox1 στην κυτταρική σειρά MCF7.

Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε επίστρωση των κυττάρων MCF7 και διέγερση τους με τον CRF για 3, 6, 16 και 24 ώρες. Χρησιμοποιήθηκαν τα κυτταρικά εκχυλίσματα και με τη μέθοδο του Western blotting βρέθηκε ότι ο CRF προκαλεί αύξηση των επιπέδων της Cox1. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι ο CRF επάγει την έκφραση της Cox1 κυρίως 6 και 16 ώρες μετά την επίδραση των κυττάρων με αυτό το νευροπεπτίδιο.

Για να ελέγξουμε αυτό το αποτέλεσμα θελήσαμε να μετρήσουμε τα επίπεδα των ελεύθερων προσταγλανδινών. Οι προσταγλανδίνες είναι το αποτέλεσμα της δράσης της κυκλοοξυγενάσης Cox1, ύστερα από το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος. Χρησιμοποιώντας τα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών και με τη βοήθεια του kit Prostaglandin Screening EIA Kit, μετρήσαμε τα επίπεδα των ελεύθερων προσταγλανδινών που παράγονται ύστερα από τη δράση της Cox1. Όντως παρατηρήθηκε αύξηση σε σημαντικό βαθμό των επιπέδων τους, και πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε αύξηση 6 και 16 ώρες μετά από την επίδραση των MCF7 κυττάρων με τον CRF.

Έχοντας τα παραπάνω αποτελέσματα υποθέσαμε ότι ο CRF δρα μέσω της κυκλοοξυγενάσης Cox1 και προκαλεί αύξηση των επιπέδων των προσταγλανδινών, η παραγωγή των οποίων έχει συσχετιστεί άμεσα με την ικανότητα μετακίνησης των καρκινικών κυττάρων. Για να επιβεβαιωθεί η παραπάνω υπόθεση πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη επίδραση των κυττάρων με τον CRF και με τον αναστολέα της κυκλοοξυγενάσης Cox1, για τα χρονικά διαστήματα 6 και 16 ώρες στα οποία και είχε παρατηρηθεί η αύξηση των επιπέδων της Cox1 και των προσταγλανδινών. Ύστερα από μέτρηση των επιπέδων των προσταγλανδινών στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργειών με τη χρήση του παραπάνω kit, παρατηρήθηκε όντως ότι η προσθήκη του αναστολέα της δράσης της Cox1 οδήγησε σε μείωση των επιπέδων τους.

Στη συνέχεια θελήσαμε να ελέγξουμε τι επίδραση έχουν και τα άλλα πεπτίδια της CRF οικογένειας στα επίπεδα των ελεύθερων προσταγλανδινών. Χρησιμοποιώντας το ίδιο kit, ελέχθησαν τα επίπεδα των ελεύθερων προσταγλανδινών ύστερα από επίδραση των κυττάρων MCF7 με το πεπτίδιο UCN1 σε συγκέντρωση  $10^{-8}$ . Παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων των προσταγλανδινών 6 και 16 ώρες μετά την επίδραση με το πεπτίδιο UCN1.

Γενικά διαπιστώθηκε ότι τα πεπτίδια της CRF οικογένειας επηρεάζουν την έκφραση των Cox ισοενζύμων οπότε κατά συνέπεια και τα επίπεδα των ελεύθερων προσταγλανδινών, η δράση των οποίων έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται με την αύξηση της κινητικότητας των καρκινικών κυττάρων καθώς και γενικά με τη διαδικασία της μετάστασης μέσω ενεργοποίησης της διαδικασίας της αγγειογένεσης.

Άλλοι παράγοντες που έχουν άμεσα συνδεθεί με την αύξηση της κινητικότητας των καρκινικών κυττάρων είναι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες είναι πρωτεολυτικά ένζυμα που αποικοδομούν πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης των αιμοφόρων αγγείων δημιουργώντας οπές και επιτρέποντας έτσι στα καρκινικά κύτταρα να διεισδύουν στην κυκλοφορία και να μεταφέρονται σε άλλα όργανα.

Επόμενος στόχος ήταν να διαπιστωθεί αν τα πεπτίδια της CRF οικογένειας επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, με τη μέθοδο της Real-Time PCR θελήσαμε να ελέγξουμε αν υπάρχουν διαφορές ποσοτικά στην έκφραση του mRNA των μεταλλοπρωτεϊνών MMP1 και MMP9 ύστερα από την επίδραση των κυττάρων MCF7 με τα πεπτίδια CRF και UCN1, για 3, 6, 16 και 24 ώρες.

Παρατηρήθηκε ότι, ύστερα από μεγάλα χρονικά διαστήματα επίδρασης των κυττάρων MCF7 με τα πεπτίδια CRF και UCN1, υπήρξε σε κάποιο βαθμό αύξηση των επιπέδων των μεταλλοπρωτεϊνών. Γενικά τα αποτελέσματα από τη Real-Time PCR έδειξαν ότι τα πεπτίδια της CRF οικογένειας επηρεάζουν τα επίπεδα των μεταλλοπρωτεϊνών αλλά δεν κατέστη δυνατό να δώσουν μία πλήρης και σαφή εικόνα για το είδος της επίδρασης.

Για να υπάρξει μια πιο σαφή εικόνα για την επίδραση που τα CRF πεπτίδια έχουν στα επίπεδα των μεταλλοπρωτεϊνών, εκτός από τη μέθοδο της Real-Time PCR, χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος της Elisa. Πραγματοποιήθηκε, με τη μέθοδο της Elisa μέτρηση των επιπέδων των μεταλλοπρωτεϊνών στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργειών ύστερα από επίδραση των κυττάρων MCF7 με τα πεπτίδια CRF και UCN1 αλλά δυστυχώς δεν υπήρξαν μετρήσιμα αποτελέσματα.

Εκτός από τις μεταλλοπρωτεϊνάσες, με τη μέθοδο της Real-Time PCR και με τη μέθοδο της Elisa, θελήσαμε να ελέγξουμε αν τα CRF πεπτίδια επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης του αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών, TIMP1. Ο TIMP1 εμποδίζει τη δράση των μεταλλοπρωτεϊνών και κατ' επέκταση εμποδίζει την αύξηση της κινητικότητας των καρκινικών κυττάρων και γενικά την ικανότητα μετάστασης.

Έχει πρόσφατα δειχθεί ότι ο TIMP1 επηρεάζει την ανάπτυξη του καρκινικού όγκου, και με τρόπο ανεξάρτητο από τη δράση του στη λειτουργία των μεταλλοπρωτεϊνών. Ο ρόλος του TIMP1 στην εξέλιξη του καρκίνου δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί και είναι ακόμη υπό μελέτη.

Τα αποτελέσματα από τη Real-Time PCR έδειξαν σημαντική μείωση των επιπέδων σε μεταγραφικό επίπεδο του αναστολέα TIMP1 16 ώρες ύστερα από επίδραση των κυττάρων MCF7 με τα πεπτίδια της CRF οικογένειας. Από την άλλη, ενώ υπήρξαν αποτελέσματα με τη μέθοδο της Elisa, δεν κατέστη δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων από αυτά.

Με ανοσοφθορισμό θελήσαμε να ελέγξουμε αν τα πεπτίδια της CRF οικογένειας επηρεάζουν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της FAK. Η FAK-Focal Adhesion Kinase- είναι μια κυτταροπλασματική κινάση τυροσίνης που εμπλέκεται στα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τις ιντεγκρίνες. Η FAK κινάση σε πολλούς κυτταρικούς τύπους συνεντοπίζεται με τις ιντεγκρίνες, που είναι υποδοχείς μορίων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Η σύνδεση των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας με τις ιντεγκρίνες οδηγεί σε φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της κινάσης FAK. Η ενεργοποίηση της FAK οδηγεί στη ενεργοποίηση πολλών μονοπατιών, όπως του PI3K-AKT, του GRB2/Ras-ERK και άλλων μονοπατιών που επηρεάζουν την απόπτωση, τον πολλαπλασιασμό καθώς και την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων.

Γενικά έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση της φωσφορυλίωσης της FAK κινάσης συνδέεται με αναστολή της απόπτωσης και αύξηση της κινητικότητας των κυττάρων. Πολλές μελέτες έχουν δείξει αύξηση της έκφρασης της κινάσης FAK και αύξηση της φωσφορυλίωσής της στον καρκίνο του μαστού στον άνθρωπο (62,63).

Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για τη φωσφορυλιωμένη μορφή της κινάσης FAK και πιο συγκεκριμένα για την κινάση φωσφορυλιωμένη στην τυροσίνη Y397. Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης μορφής της FAK ελέγχθηκαν ύστερα από επίδραση των κυττάρων MCF7 με τα πεπτίδια CRF και UCN1 για 1 και 3 ώρες. Ύστερα από παρατήρηση σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού φάνηκε το πεπτίδιο της UCN1 να προκαλεί αύξηση της φωσφορυλίωσης της FAK κινάσης ύστερα από 1 ώρα επίδρασης, ενώ ο CRF φαίνεται και στη 1 και στις 3 ώρες επίδρασης να αυξάνει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας φαίνεται τα πεπτιδία της CRF οικογένειας να επηρεάζουν την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων για μετάσταση. Αυτό φαίνεται να επιτυγχάνεται μέσω ενεργοποίησης διάφορων μηχανισμών που εμπλέκουν πολλά και διαφορετικά μόρια. Χρειάζεται περισσότερη έρευνα για να εξακριβωθεί πλήρως η δράση των CRF πεπτιδίων καθώς και οι μηχανισμοί μέσω των οποίων αυτό επιτυγχάνεται.

Ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο συχνή μορφή καρκίνου και μία από τις κύριες αιτίες θανάτου για τις γυναίκες. Ο εντοπισμός του συνόλου των παραγόντων καθώς των μοριακών μονοπατιών μέσω των οποίων αυτοί δρουν θα αποτελέσει ένα σημαντικό βήμα για τη θεραπεία του.

# **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**



1. **Goldstein L. J., Cianfrocca M., von Mehren M., Gradel T., Kilpatrick D., Vaders L., Smolenski-Burke S., Brady D., Vogel L.** Breast cancer research. Fox Chase Cancer Center Scientific Report. Philadelphia: Fox Chase Cancer Center. (2000); 158-162
2. **Vaughan J., Donaldson C., Bittencourt J., Perrin M. H., Lewis K., Sutton S., Chan R., Turnbull A. V., Lovejoy D., Rivier C., Sawchenko P. E., Vale W.** 1995 Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 378:287-292
3. **Reyes T. M., Lewis K., Perrin M. H., Kunitake K. S., Vaughan J., Arias C. A., Hogenesch J. B., Gulyas J., Rivier J., Vale W. W.** 2001 Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2843-2848
4. **Lewis K., Li C., Perrin M. H., Blount A., Kunitake K., Donaldson C., Vaughan J., Reyes T. M., Gulyas J., Fischer W., Bilezikjian L., Rivier J., Sawchenko P. E., Vale W. W.** 2001 Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7570-7575
5. **Lederis K., Letter A., McMaster D., Moore G.** 1982 Complete amino acid sequence of urotensin I, a hypotensive and corticotropin-releasing neuropeptide from *Catostomus*. *Science* 218:162-165
6. **Montecucchi P. C., Henschen A.** 1981 Amino acid composition and sequence analysis of sauvagine, a new active peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei*. *Int J Pept Protein Res* 18:113-120
7. **Suda T., Tomori N., Tozawa F., Mouri T., Demura H., Shizume K.** Distribution and characterization of immunoreactive corticotropin-releasing factor in human tissues. 1984. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59:861-6
8. **De Souza E. B., Grigoriadis D. E.** 1994 Corticotropin-releasing factor: Physiology, pharmacology and role in central nervous system and immune disorders. In: Bloom FE, Kupfer DJ, eds. *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. New York: Raven Press; 505-517
9. **Rivier C., Vale W.** 1983 Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature* 305:325-327
10. **Baigent S. M.,** Peripheral corticotrophin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response. *Peptides* 22(2001) 809-820

11. **Stephanou A., Jessop D.S., Knight R.A., Lightman, S.L.** 1990. Corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity and mRNA in human leukocytes. *Brain Behav. Immun.* 4, 67-73
12. **Ekman, R., Servenius, B., Castro, M.G., Lowry, P.J., Cederlund, A.S., Bergman, O. and Sjogren, H.O.** Biosynthesis of corticotrophin releasing hormone in human T-lymphocytes. 1993. *J. Neuroimmunol.* 44, 7-14
13. **Aird F., Clevenger C. V., Prystowsky M. B., Redei E.** Corticotropin-releasing factor mRNA in rat thymus and spleen. 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90:7104-8
14. **Theoharides T. C., Singh L . K., Boucher W., Pang X., Letourneau R., Webster E., Chrousos G.,** Corticotropin releasing hormone induces skin mast cell degranulation and increased vascular permeability, a possible explanation for its proinflammatory effects. 1998. *Endocrinology* 139;403-413
15. **Singh V. K., Fudenberg H. H.** Binding of [125I] corticotrophin releasing factor to blood monocytes and its reduction in Alzheimer's disease. 1988 *Immunol. Let.* 18:5-8
16. **Baigent S. M.,** Peripheral corticotropin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response. *Peptides* 22 (2001) 809-820
17. **Parkes D. G. Weisinger R. S., May C. N.** 2001 Cardiovascular actions of CRF and urocortin: an update. *Peptides* 22:821-827
18. **Karteris E., Grammatopoulos D. K., Randeva H. S., Hillhouse E. W.** 2001 The role of corticotropin-releasing factor receptors in placenta and fetal membranes during human pregnancy. *Mol Genet Metab* 72:287-296
19. **Majzoub J. A., McGregor J. A., Lockwood C. J., Smith R., Snyder Taggard M., Schulkin J.** A central theory of preterm and term labor: putative role for corticotropin-releasing hormone. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1999 180:S232-S241
20. **Smith R.** 1999 Corticotropin-releasing hormone and the fetoplacental clock: and Australian perspective. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180:S269-S271
21. **Vaughan J., Donaldson C., Bittencourt J., Perrin M., Lewis K., Sutton S., Chan R., Turnbull A., Lovejoy D., Rivier C., Rivier J., Sawchenko P. E., Vale W.** Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin-1 and to corticotropin-releasing factor. 1995. *Nature* 378: 287-92
22. **Kageyama K., Bradbury M. J., Zhao L., Blount A. L., Vale W. W.,** Urocortin messenger ribonucleic acid: tissue distribution in the rat and

- regulation in thymus by lipopolysaccharide and glycocorticoids. 1999 *Endocrinology* 140, 5651–5658
23. **Okosi A., Brar B. K., Chan M., D'Souza E., Smith E., Stephanou A., Latchman D. S., Chowdrey H. S., Knight R. A.,** Expression and protective effects of urocortin in cardiac myocytes. 1998 *Neuropeptides* 32(2):167–71
  24. **Slominski A, Wortsman J, Pisarchik A, Zbytek A, Linton E. A., Mazurkiewicz J., Wei E. T.** Cutaneous expression of corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin, and CRH receptors. 2001. *Faseb. J.* 15:1678–93
  25. **Skelton K. H., Owens M. J., Nemeroff C. B.** The neurobiology of urocortin. 2000. *Regul. Pept.* 93:85–92
  26. **Reyes T. M., Lewis K., Perrin M. H., Kunitake K. S., Vaughan W. W., et al., 2001.** Urocortin II a member of the corticotrophin releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 2843–2848
  27. **Chen A., Blount A., Vaughan J., Brar B., Vale W., 2004.** Urocortin II gene is highly expressed in mouse skin and skeletal muscle tissues: localization, basal expression in corticotrophin-releasing factor receptor (CRFR)1 and CRF2-null mice, and regulation by glucocorticoids. *Endocrinology* 145:2445–57
  28. **Saruta M., Takahashi K., Suzuki T., Fukuda T., Torii A., Sasano H., 2005** Urocortin 3/stresscopin in human colon: possible modulators of gastrointestinal function during stressful conditions. *Peptides* 26: 1196–206
  29. **Grigoriadis D. E., Lovenberg T. W., Chalmers D. T., Liaw C., De Souza E. B.** Characterization of corticotropin-releasing factor receptor subtypes. 1996. *Ann N Y Acad Sci* 780:60–80
  30. **Pisarchik A., Slominski A. T.** Alternative splicing of CRF R1 receptors in human and mouse skin: identification of new variants. 2001. *FASEB J* 15:2754–2756
  31. **Grammatopoulos D. K., Dai Y., Randeve H. S., Levine M. A., Karteris E., Easton A. J., Hillhouse E. W.** A novel spliced variant of the type 1 corticotropin-releasing hormone receptor with a deletion in the seventh transmembrane domain present in the human pregnant term myometrium and fetal membranes. 1999. *Mol Endocrinol* 13:2189–2202
  32. **Ross P. C., Kostas C. M., Ramabhadran T. V.** A variant of the human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: cloning, expression and pharmacology. 1994. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1836–1842

33. **Vlandenaire O., Giller T., Breu V., Gottowik J., Kilpatrick G.** A new functional isoform of the human CRF2 receptor for corticotropin-releasing factor. 1997. *Biochim Biophys Acta* 1352:129-132
34. **Dautzenberg F. M., Hauger R. L.** The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. 2002. *Trends Pharmacol Sci* 23:71-7
35. **Dautzenberg F. M., Kilpatrick G. J., Hauger R. L., Moreau J.** Molecular biology of the CRF receptors—in the mood. 2001. *Peptides* 22:753-760
  
36. **Hsu S.Y., Hsueh A.J.** (2001) Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. 2001. *Nat. Med.* 7: 605-611.
37. **Graziani G., Tentori L., Portarena I., Barbarino M., Tringali G., Pozzoli G., Navarra P.** CRF inhibits cell growth of human endometrial adenocarcinoma cells via CRF-receptor 1-mediated activation of cAMP-PKA pathway. 2002. *Endocrinology* 143:807-813
38. **Dieterich K. D., DeSouza E. B.** Functional corticotropin-releasing factor receptors in human neuroblastoma cells. 1996. *Brain Res* 733:113-118
39. **Dieterich K. D., Grigoriadis D. E., De Souza E. B.** Corticotropin-releasing factor receptors in human small cell lung carcinoma cells: radioligand binding, second messenger, and northern blot analysis data. 1994 *Endocrinology* 135:1551-1558
40. **Funasaka Y., Sato H., Chakraborty A. K., Ohashi A., Chrousos G. P., Ichihashi M.** Expression of proopiomelanocortin, corticotropin-releasing hormone (CRF), and CRF receptor in melanoma cells, nevus cells, and normal human melanocytes. 1999. *J Investig Dermatol Symp Proc* 4:105-109
41. **Grino M., Guillaume V., Boudouresque F., Margioris A. N., Grisoli F., Jaquet P., Oliver C., Conte-Devolx B.** Characterization of corticotropin-releasing hormone receptors on human pituitary corticotroph adenomas and their correlation with endogenous glucocorticoids. 1988. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67:279-283
42. **Graziani G., Tentori L., Muzi A., Vergati M., Tringali G., Pozzoli G., Navarra P.** Evidence that corticotropin-releasing hormone inhibits cell growth of human breast cancer cells via the activation of CRF-R1 receptor subtype. 2006. *Molecular and Cellular Endocrinology* 264: 44-49

43. **Asa S. L., Kovacs K., Vale W., Pestrusz P., Vescei P.**, Immunohistologic localization of corticotropin-releasing hormone in human tumors. 1987. *Am. J. Clin. Pathol* 87:327-33
44. **Slominski A. T., Roloff B., Zbytek B., Wei E. T., Fechner K., Curry J., Wortsman J.**, Corticotropin releasing hormone and related peptides can act as bioregulatory factors in human keratinocytes. 2000. *In vitro Cell Dev Biol Anim* 36:211-6
45. **Slominski A., Zbytek B., Pisarchik A., Slominski R. M., Zmijewski M. A., Wortsman J.**, CRF functions as a growth factor/cytokine in the skin. 2006. *J. Cell Physiol* 207:780-91
46. **Schoeffter P., Feuerbach D., Bobirnac I., Gazi L., Longato R.** Functional, endogenously expressed corticotropin-releasing factor receptor type 1 (CRF1) and CRF1 receptor mRNA expression in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. 1999. *Fundam Clin Pharmacol.* 13:484-9.
47. **Dawson D. W., Volpert O. V., Gillis P., Crawford S. E., Xu H., Benedict W., Bouck N. P.** Pigment Epithelium-Derived Factor: A Potent Inhibitor of Angiogenesis. 1999. *Science* 285:245-248
48. **Bale T. L., Giordano F. J., Hickey R. P., Huang Y., Nath A. K., Peterson K. L., Wylie W. V., Lee Kuo-Fen.** Corticotropin-releasing factor receptor 2 is a tonic suppressor of vascularization. 2002. *PNAS* 99:7734-7739
49. **Arbiser J. L., Karalis K., Viswanathan A., Koike C., Anand-Apte B., Flynn E., Zetter B., Majzoub, J. A.** Corticotropin-releasing hormone stimulates angiogenesis and epithelial tumor growth in the skin. 1999. *J. Invest. Dermatol.* 113, 838-842
50. **Yang Y., Park H., Yang Y., Kim T. S., Bang Sa Ik., Cho D.** Enhancement of cell migration by corticotropin-releasing hormone through ERK1/2 pathway in murine melanoma cell line, B16F10. 2006. *Experimental Dermatology* 16:22-27
51. **Daikoku T., Tranguch S., Trofimova I. N., Dinulescu D. M., Jacks T., Nikitin A. Y., Connolly D. C., Dey S. K.** Cyclooxygenase-1 is overexpressed in multiple genetically engineered mouse models of epithelial ovarian cancer. 2006. *Cancer Res* 66:2527-31
52. **Tsatsanis C., Androulidaki A., Alissafi T., Charalampopoulos I., Dermitzaki E., Roger T., Gravanis A., Margioris A. N.** Corticotropin-releasing factor and the urocortins induce the expression of TLR4 in macrophages via activation of the transcription factors PU.1 and AP-1. 2006. *J Immunol.* 1;176(3):1869-77
53. **Chandrasekharan N.V., Dai H., Roos K.L.T., Evanson N. K., Tomsik J., Elton T. S., Simmons D. L.** COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs:

- Cloning, structure, and expression. 2002. Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A.99(21):13926–31
54. **Wang D., Dubois R. N.** Prostaglandins and cancer. 2006. Gut. Jan 55(1):115–22
- Chambers A. E., Matrisian L. M.,** Changing views of the role of the matrix metalloproteinases in metastasis. 1997. J. Natl Cancer Inst 89:1260–1270
55. **Duffy M. J., McCarthy K.,** Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and targets for therapy. 1998. Int. J. Oncol. 12:1343–1348
56. **Guedez L., Stetler–Stevenson W. G., Wolff L., Wang J., Fukushima P., Mansoor A., Stetler–Stevenson M.** In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases–1. 1998. J. Clin. Invest. 102:2002–2010
57. **Ikenaka Y., Yoshiji H., Kuriyama S., Yoshii J., Noguchi R., Tsujinoue H., Yanase K., Namisaki T., Imazu H., Masaki T., Fukui H.** Tissue inhibitor of metalloproteinases–1 (TIMP–1) inhibits tumor growth and angiogenesis in the TIMP–1 transgenic mouse model. 2003. Int. J. Cancer 105 340–346.
58. **Seo D.W., Li H., Guedez L., Wingfield P.T., Diaz T., Salloum R., Wei B.Y., Stetler–Stevenson W.G.** TIMP–2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP–independent mechanism. 2003. Cell 114 :171– 180.
59. **Qi J.H., Ebrahim Q., Moore N., Murphy G., Claessen–Welsh L., Bond M., Baker A., Anand–Apte B.** A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases–3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor–2. 2003. Nat. Med. 9:407– 415.
60. **Dollery C.M., McEwan J.R., Wang M., Sang Q.A., Liu Y.E., Shi Y.E.** TIMP–4 is regulated by vascular injury in rats. 1999. Circ. Res. 84:498– 504.
61. **Hornebeck W., Lambert E., Petitfrère E., Bernard P.** Beneficial and detrimental influences of tissue inhibitor of metalloproteinase–1 (TIMP–1) in tumor progression. 2005. Biochimie 87(3–4):377–83
62. **Kaya M., Yoshida K., Higashino F., Mitaka T., Ishii S., Fujinaga K.** A single ets–related transcription factor, E1AF, confers invasive phenotype on human cancer cells. 1996. Oncogene 12:221–227
63. **Sternlicht M. D., Lochter A., Sympson C. J., Huey B., Rougier J.–P., Gray J. W., Pinkel D., Bissell M. J., Werb Z.** The stromal proteinase MMP3/stromelysin–1 promotes mammary carcinogenesis. 1999. Cell 98:137–146
64. **Rio M.– C., Lefebvre O., Santavicca M., Noël A., Marie–Pierre Chenard M.–P., Anglard P., Byrne J. A., Okada A., Régnier C. H., Masson R., Bellocq J.–P., Basset P.** Stromelysin–3 in the biology of the normal and

- neoplastic mammary gland. 1996. *J. Mam. Gland. Neoplasia* 1:231–240
65. **Masson R., Lefebvre O., Noel A., El Fahime M., Chenard M.-P., Wendling C., Kebers F., LeMeur M., Dierich A., Foidart J.-M., Basset P., Rio M.-C.** In vivo evidence that the stromelysin-3 metalloproteinase contributes in a paracrine manner to epithelial cell malignancy. 1998. *J. Cell Biol.* 1998;140:1535–1541
  66. **Sledge G. W. J., Qulali M., Goulet R., Bone E. A., Fife R.** Effect of matrix metalloproteinase inhibitor batimastat on breast cancer regrowth and metastasis in athymic mice. 1995. *J. Natl. Cancer Inst.* 87:1546–1550
  67. **Stetler-Stevenson W. G.** Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. 1999. *J. Clin. Invest.* 103:1237–1241
  68. **Duffy M. J., Maguire T. M., Hill A., McDermott E., O'Higgins N.** Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. 2000. *Breast Cancer Res.* 2:252–257
  69. **Eccles S. A., Box G. M., Court W. J., Bone E. A., Thomas W., Brown P. D.** Control of lymphatic and hematogenous metastasis of a rat mammary carcinoma by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94). 1996. *Cancer Res.* 56:2815–2822
  70. **Wang M., Liu Y. E., Greene J., Sheng S., Fuchs A., Rosen E. M., Shi Y. E.** Inhibition of tumor growth and metastasis of human breast cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase. 1997. *Oncogene* 14:2767–2774
  71. **Yoneda T., Sasaki A., Dunstan C., Williams P. J., Bauss F., De Clerck Y. A., Mundy G. R.** Inhibition of osteolytic bone metastasis of breast cancer by combined treatment with the bisphosphonate ibadronate and tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-2. 1997. *J. Clin. Invest.* 99:2509–2517
  72. **Levenson A. S., Jordan C. V.** MCF7: The first hormone-responsive breast cancer cell line. 1997. *Cancer Res.* 57:3071–3018
  73. **Owens L. V., Xu L., Craven R. J., Dent G. A., Weiner T. M., Kornberg L., Liu E. T., Cance W. G.** Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. 1995. *Cancer Res.* 55:2752–2755
  74. **Kornberg L. J.** Focal adhesion kinase and its potential involvement in tumor invasion and metastasis. 1998. *Head Neck* 20:745–752