



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ
ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ
ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΣΤΗΝ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ
ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ
ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ**

Διδακτορική Διατριβή
Βασιλεία Αναγνωστοπούλου

Ηράκλειο 2014

Στον σύζυγο μου Αλέξανδρο
Στους γονείς μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την ολοκλήρωση αυτής της διδακτορικής διατριβής συνέβαλε ένα σύνολο ανθρώπων, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά.

Αρχικά, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή της διατριβής μου, τον κ. Χρήστο Στουρνάρα, για την συνεργασία, την καθοδήγηση, τις παρατηρήσεις, τις προτάσεις και τις ουσιαστικές, πάντοτε, υποδείξεις καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή κ. Αχιλλέα Γραβάνη, ο οποίος με τις συμβουλές, τις ιδέες του και τις εύστοχες παρατηρήσεις του βοήθησε στη θεμελίωση αυτής της εργασίας. Ευχαριστώ επίσης τον καθηγητή κ. Ανδρέα Μαργιωρή για την συνεργασία μας. Τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής καθηγητή κ. Δημήτρη Καρδάση, την επικ. καθηγήτρια Ευαγγελία Παπακωνσταντή και την επικ. καθηγήτρια Σοφία Αγγελάκη ευχαριστώ θερμά για την συνεργασία μας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον λέκτορα Γιάννη Χαραλαμπόπουλο, ο οποίος με τις πολύτιμες παρατηρήσεις του και συμβουλές του, με τις γνώσεις του, το ενδιαφέρον του, τις εποικοδομητικές συζητήσεις του, με στήριξε καθ' όλη τη διάρκεια του διδακτορικού μου.

Ευχαριστώ θερμά όλα τα προηγούμενα μέλη του εργαστηρίου μου και φίλους μου, την Ναταλία Παπαδοπούλου, την Έλσα Παπαδημητρίου και τον Γιώργο Κωνσταντινίδη για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε, για τη συμπαράσταση και την προθυμία τους. Επίσης ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου της Φαρμακολογίας του καθ. κ. Αχιλλέα Γραβάνη και του εργαστηρίου της Βιοχημείας του καθ. κ. Δημήτρη Καρδάση για την συνεργασία που είχαμε. Ιδιαίτερα ευχαριστώ θερμά τον Σήφη Πεδιαδιτάκη για την βοήθεια που μου προσέφερε σε πειραματικό επίπεδο, την καλή διάθεση και την άψογη συνεργασία μας.

Ευχαριστώ τους θείους μου Ζαχαρία και Γιώτα Παναγιωτάκη, τον οικογενειακό μας φίλο κ. Μηνά Παπουτσάκη για την συνεισφορά τους στην αντιμετώπιση ποικίλων πρακτικών ζητημάτων που προέκυψαν κατά τη συγγραφή της διατριβής μου.

Ευχαριστώ από καρδιάς την αγαπημένη μου οικογένεια, τους γονείς μου και τον αδερφό μου, που πάντα με στηρίζουν όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον σύζυγο μου Αλέξανδρο, για την συνεχή στήριξη, την απεριόριστη υπομονή και κατανόηση που έδειξε στις δύσκολες στιγμές και την αισιοδοξία που μου έδωσε όταν πραγματικά την χρειαζόμουν.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Γενικά στοιχεία

Επώνυμο : ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ
Όνομα : ΒΑΣΙΛΕΙΑ
Ημερομηνία γεννήσεως : 29/01/1977
Τόπος γεννήσεως : Ηράκλειο Κρήτης
Τόπος κατοικίας : Ηράκλειο Κρήτης
Οικογενειακή κατάσταση : έγγαμη

Εκπαίδευση

- Πτυχίο Χημείας με βαθμό λίαν καλώς 8,14.
UNIVERSITA DI CAMERINO-ITALIA. Η κανονική διάρκεια του προαναφερόμενου κύκλου σπουδών είναι πέντε (5) έτη. Ο 5^{ος} χρόνος είναι με εξειδίκευση που πραγματοποιήθηκε στην Κλινική Χημεία – Βιοχημεία.
- Εκπόνησης διδακτορικής διατριβής στο Εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης (Επιβλέπων Καθηγητής Χρηστος Στουρνάρας) με θέμα «Διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων ανδρογόνων ορμονων με την οικογένεια των υποδοχέων του νευρικού αυξητικού παράγοντα στην ρύθμιση αποπτωτικής δράσης τους στον καρκίνο του προστάτη και παχέος εντέρου».

Επαγγελματική εμπειρία

- Επιστημονικός συνεργάτης με σύμβαση έργου στο Εργαστήριο Κλινικής Χημείας- Βιοχημείας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠΑΓΝΗ).
- Ιδιαίτερα μαθήματα σε μαθητές Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης.

Επιστημονικές δημοσιεύσεις

1. Anagnostopoulou V, Padiaditakis I, Alkahtani S, Alarifi SA, Schmidt EM, Lang F, Gravanis A, Charalampopoulos I, Stournaras C. Differential Effects of Dehydroepiandrosterone and Testosterone in Prostate and Colon Cancer Cell Apoptosis: The Role of Nerve Growth Factor (NGF) Receptors. **Endocrinology 2013**

2. Schmidt EM, Gu S, Anagnostopoulou V, Alevizopoulos K, Föllner M, Lang F, Stournaras C. Serum- and glucocorticoid-dependent kinase-1-induced cell migration is dependent on vinculin and regulated by the membrane androgen receptor. **FEBS J 2012**

3. Papadopoulou N, Charalampopoulos I, Anagnostopoulou V, Konstantinidis G, Foller M, Gravanis A, Alevizopoulos K, Lang F, Stournaras C. Membrane androgen receptor triggers down-regulation of PI-3K/Akt/NF-kappaB activity and induces apoptotic responses via Bad, FasL and caspase-3 in DU145 prostate cancer cells. **Mol Cancer 2008**

Ανακοινώσεις σε συνέδρια

Poster:

1. Androgens steroids Dehydroepiandrosterone and Testosterone differentially regulate prostate and colon cancer cells apoptosis through Nerve Growth Factor receptors. **Anagnostopoulou V.**, Pediaditakis I., Schmidt E-M., Lang F., Charalampopoulos I., Gravanis A., Stournaras C. 63^ο Πανελλήνιο συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Μοριακής Βιολογίας και Βιοχημείας, ΙΤΕ ,Ηράκλειο-Κρήτης 2012
2. Androgens affect cancer cells fate through interaction with Nerve Growth Factor receptors. **Anagnostopoulou V.**, Charalampopoulos I., Gravanis A., Stournaras C. 62^ο Πανελλήνιο συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Μοριακής Βιολογίας και Βιοχημείας, Ίδρυμα Ευγενίδου, Αθηνά, 2011

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	13
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	16
SUMMARY.....	18
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	20
Γενικά.....	21
Ορμόνες.....	22
Στεροειδείς Ορμόνες-Νευροστεροειδή.....	23
DHEA.....	26
Τεστοστερόνη.....	28
Προγραμματισμένος Κυτταρικός Θάνατος-Απόπτωση.....	30
Τα αποπτωτικά μονοπάτια.....	32
Νευροτροφίνες.....	34
NGF.....	35

Υποδοχείς Νευροτροφινών: p75 ^{NTR} και TrkA.....	37
p75 ^{NTR}	38
Trk.....	40
TrkA.....	41
Ο ρόλος των νευροτροφινών στον καρκίνο.....	42
Ο ρόλος των νευροτροφινών στον καρκίνο του προστάτη και του παχέος εντέρου.....	44
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΩΤΗΜΑ.....	47
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	50
Υλικά.....	51
Μέθοδοι.....	53
1. Καλλιέργεια κυττάρων.....	53
2. Παροδική επιμόλυνση κυττάρων με παλσμιακό DNA.....	54
3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε συνθήκες SDS-αποδιάταξης(SDS-PAGE).....	55
3.1 Προετοιμασία δειγμάτων.....	55

3.2 Προετοιμασία πήκτωματος.....	56
3.3 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων.....	57
4. Ανοσοστύπωση (Western Blot).....	57
4.1 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης από πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.....	57
4.2 Διαδικασία ανοσοανίχνευσης πρωτεϊνών	58
4.3 Αφαίρεση αντισωμάτων για την επανάληψη της ανοσοανίχνευσης (Stripping).....	59
5. Μέτρηση ολικών πρωτεϊνών μετά την λύση των κυττάρων.....	60
6. Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων ολικών κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών.....	60
7. Κλασματοποίηση πρωτεϊνών μέσω εκχύλισης των κυττάρων με Triton X-100: απομόνωση των διαλυτών και αδιάλυτων σε Triton X-100 κλασμάτων.....	61
8. Προσδιορισμός επιπέδων έκφρασης υποδοχέων (TrkA και p75 ^{NTR}) του Νευρικού Αυξητικού Παράγοντα (NGF).....	62
9. Προσδιορισμός απόπτωσης.....	63
9.1 Μέθοδος Apopercantage.....	63

9.2 Κυτταρομετρία Ροής (FACS Analysis).....64

Χρώση με Ανεξίνη V (Annexin V) και Ιωδιούχο Προπίδιο (Propidium Iodide).....65

10.Μεθοδος Αλυσιδωτή Αντίδραση Πραγματικού χρόνου (RT-PCR).....66

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....68

1Α. Η διϋδροεπιαδροστερόνη (DHEA) και ο νευρικός αυξητικός παράγοντας (NGF) μειώνουν την επαγόμενη από στέρηση ορού απόπτωση.....69

1Β. Η τεστοστερόνη αυξάνει την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη και του παχέος εντέρου.....72

2. Η αντί-αποπτωτική δράση της DHEA και του NGF αναστέλλεται παρουσία της Τεστοστερόνης.....76

3. Οι υποδοχείς του Νευρικού Αυξητικού Παράγοντα, συγκεκριμένα TrkA και p75^{NTR} εκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη DU145 και παχέος εντέρου CaCO₂.....78

3.1 Η έκφραση του TrkA υποδοχέα ρυθμίζεται διαφορετικά από DHEA, NGF ή Τεστοστερόνη.....80

4. Οι επιδράσεις των στεροειδών ανδρογόνων DHEA και τεστοστερόνης στην απόπτωση δεν απαιτούν την παρουσία του εκκρινόμενου NGF.....	84
5. Αναστολείς των υποδοχέων του NGF τροποποιούν τα αποτελέσματα της DHEA ή της Τεστοστερόνης στην απόπτωση.....	88
6. Η DHEA και η Τεστοστερόνη επηρεάζουν την ενεργοποίηση των υποδοχέων του NGF.....	91
6.1 Η DHEA και ο NGF επάγουν την φωσφορυλίωση του TrkA.....	91
6.2 Αλληλεπίδραση του υποδοχέα με p75 ^{NTR} με τους τελεστές του (effectors), RIP2 και RhoGDI, ενώ η τεστοστερόνη μπλοκάρει τα αποτελέσματα με αυτούς τους υποδοχείς.....	94
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	97
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	112

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- APS** : ammonium peroxodisulfate (υπερθειϊκό αμμώνιο)
- AR** : androgen receptor (υποδοχέας ανδρογόνων)
- BDNF** : Brain-Derived Neurotrophic Factor (νευροτροφικός παράγοντας προερχόμενος από εγκέφαλο)
- BSA** : bovine serum albumin (αλβουμίνη από ορό βόως)
- DAPI** : 4,6-Diamidino-2-phenylindole (διχλωριούχο 4-6-διαμιδινό-2-Φαινυλινδολη)
- DHEA** : Dihydroepiandrosterone (Διϋδροεπιαδροστερόνη)
- DHEAS** : Dihydroepiandrosterone Sulphate (Θειική Διϋδροεπιαδροστερόνη)
- DHT** : Dihydrosterone (Διϋδροστερόνη)
- DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle Medium (Θρεπτικό Υλικό)
- DMSO** : Dimethyl sulfoxide (Διμεθυλσουλφοξύδιο)
- DNA** : Desoribonucleic acid (Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ)
- EDTA** : Ethylenediaminetetraacetic acid (Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ)
- Erk** : Extracellular signal regulated kinase (πρωτεϊνική κινάση ελεγχόμενη από εξωκυττάριο σήμα)
- EC₅₀** : efficiency concentration (συγκέντρωση δραστηκότητας του 50%)
- FAK** : focal adhesion kinase (κινάση των εστιών πρόσφυσης)
- FBS** : Fetal Bovine Serum (Ορός εμβρύου βοός)
- FITC** : Fluorescein isothiocyanate (Ισοθεικυανιούχος φλουοροσκεΐνη)
- h** : hours (ώρες)
- HEPES** : 4-(2-hydroxy-ethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid
4-(2-υδροξυεθυλο)-πιπεραζίνη-1 αιθανοσουλφονικό οξύ
- HRP** : horseradish peroxidase
- HSA** : human serum albumin (αλβουμίνη ανθρώπινου ορού)
- iAR** : intracellular androgen receptor (ενδοκυττάριος υποδοχέας

ανδρογόνων)

- IgG** : immunoglobulin G (ανοσοσφαιρίνη G)
- IP** : immunoprecipitation (ανοσοκατακρήμνιση)
- IB** : immunoblotting (ανοσοστύπωση)
- JNK** : Jun N-terminal kinase
- ΚΝΣ** : Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
- M** : Molar (Μοριακότητα)
- mAR** : membrane androgen receptor (μεμβρανικός υποδοχέας ανδρογόνων)
- MARK** : mitogen activated protein kinase
- min** : minutes (λεπτά)
- NGF** : Nerve Growth Factor (Νευρικός Αυξητικός Παράγοντας)
- NF-κB** : Nuclear factor κB (Πυρηνικός παράγοντας κB)
- NTs** : Neurotrophins
- NP40** : nonionic Detergent P-40 (μη ιονικό απορρυπαντικό P-40)
- OD** : Optical density (οπτική πυκνότητα)
- P** : στατιστική απόκλιση
- PBS** : phosphate buffered saline (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών)
- PCA** : perchloric acid (υπερχλωρικό οξύ)
- PCR** : Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμέρασης)
- PI** : Propidium iodide (προπιδιούχο ιώδιο)
- PI3-K** : phosphatidylinositol-3 kinase (κινάση φωσφατιδυλινωσιτόλης-3)
- PKB** : protein kinase B (πρωτεϊνική κινάση B)
- PLC** : phospholipase C (φωσφολιπάση C)
- PSA** : prostate specific antigen (ειδικό αντιγόνο του προστάτη)
- p75** : pan-neurotrophin receptor
- ΠΚΣ** : Περιφερικό κεντρικό σύστημα
- RhoGDI** : Rho GDP-dissociation inhibitor
- RIP2** : receptor-interacting protein 2
- RPMI** : RPMI Medium1640

SDS : sodium dodecyl sulfate (δωδεκυλοθειϊκό νάτριο)

SE : standard error of mean (τυπικό σφάλμα μεσων ορών)

TBT-T : Tris buffered saline-Tween (ρυθμιστικό διάλυμα Tris με Tween)

TEMED :N,N,N,N-Tetramethyl-ethylenediamine (N,N,N,N-
Τετραμεθυλενο-αιθυλοδιαμίνη)

Testo-HSA :Testosterone-HSA (Σύμπλοκο τεστοστερόνης με HSA)

TNF :Tumor necrosis factor (παράγοντας νέκρωσης όγκων)

TRAF :TNF receptor-associated factor

Triton :t-octylphenoxy-polyethoxy-ethanol (t-οκτυλ-φαινοξυ
Πολυαιθοξυ-αιθανόλη)

Trk : Tropomyosine-related kinase

TrkA : Tropomyosine-related kinase A

TrkB : Tropomyosine-related kinase B

ΤΛ : Τυπικό λάθος

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κύρια ιδιότητα των καρκινικών κυττάρων είναι να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και να επεκτείνονται, μειώνοντας τα επίπεδα του φυσιολογικού κυτταρικού θανάτου. Η διαδικασία αυτή οδώνεται κυρίως από την δεκτικότητα του όγκου στο μικροπεριβάλλον του και την επίδραση των αυξητικών παραγόντων και των ορμονικών συστατικών. Πιο συγκεκριμένα, ο καρκίνος του προστάτη θεωρείται μια ορμονο-εξαρτώμενη ασθένεια, ενώ για τον καρκίνο του παχέος εντέρου αυτή η σχέση δεν έχει ακόμα εδραιωθεί. Πρόσφατα, έχει αποδειχτεί ότι το ανδρογόνο τεστοστερόνη ασκεί ισχυρές προ-αποπτωτικές επιδράσεις και στους δυο τύπους καρκίνων μέσω ειδικών μεμβρανικών θέσεων δέσμευσης (specific membrane binding sites). Επιπλέον, έχει πρόσφατα περιγραφεί ότι ένα άλλο ανδρογόνο, η διϋδροεπιαδροστερόνη (DHEA), μπορεί να ενεργοποιήσει τους υποδοχείς του Νευρικού Αυξητικού Παράγοντα, συγκεκριμένα τους TrkA και p75^{NTR}, στα νευρικά κύτταρα. Ο νευρικός αυξητικός παράγοντας (Nerve Growth Factor, NGF) ως νευροτροφίνη έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει σε μεγάλο βαθμό στον πολλαπλασιασμό και στη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Πρόσφατα μελετήθηκε ότι οι υποδοχείς του NGF, συγκεκριμένα ο TrkA και p75^{NTR} συμβάλλουν στον καρκίνο, ασκώντας πλειοτροπικές επιδράσεις στον πολλαπλασιασμό, μετανάστευση ή στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι επιδράσεις των ανδρογόνων που αποτελούν βασικούς παράγοντες για την ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη, στην ρύθμιση της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη (DU145 και LNCaP), αλλά επίσης και στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (CaCO2), εστιάζοντας στην αλληλεπίδρασή τους με τους υποδοχείς του αυξητικού παράγοντα NGF, οι οποίοι επίσης εκφράζονται στα κύτταρα αυτά

και διαμεσολαβούν σημαντικές δράσεις στην επιβίωση και διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι οι DHEA και NGF αναστέλλουν ισχυρά την επαγόμενη από στέρηση ορού απόπτωση, ενώ η τεστοστερόνη επάγει την κυτταρική απόπτωση παρουσία ορού σε όλες τις καρκινικές κυτταρικές σειρές. Επιπλέον, η αντι-αποπτωτική δράση των DHEA και NGF αναστέλλεται πλήρως, αφού προηγηθεί επώαση των κυττάρων με τεστοστερόνη. Επίσης δείξαμε ότι όλες οι καρκινικές κυτταρικές σειρές του προστάτη (DU145 και LNCaP) και παχέος εντέρου (CaCO2) εκφράζουν τους υποδοχείς του NGF, συγκεκριμένα τους TrkA και p75^{NTR}, ενώ παράλληλα διαπιστώσαμε ότι η τεστοστερόνη μειώνει την έκφραση του TrkA υποδοχέα, ενώ οι DHEA και NGF αυξάνουν την έκφραση του. Η παρουσία του αναστολέα του TrkA αναστέλλει την αντι-αποπτωτική δράση των DHEA και NGF στις καρκινικές σειρές προστάτη (DU145) και παχέος εντέρου (CaCO2). Αντίθετα αποτελέσματα έχουμε με την χρήση του αναστολέα του p75^{NTR} και συγκεκριμένα, στην καρκινική σειρά του προστάτη DU145, η αντί-αποπτωτική δράση των DHEA και NGF μειώθηκε σημαντικά με την παρουσία του αναστολέα, ενώ σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου CaCO2, η προστατευτική δράση των DHEA και NGF είναι ίδια σε σύγκριση με την απουσία του αναστολέα. Τέλος, η παρούσα μελέτη κατέδειξε ότι οι DHEA και NGF επάγουν την φωσφορυλίωση του TrkA υποδοχέα και την αλληλεπίδραση του υποδοχέα p75^{NTR} με τα ενδοκυττάρια μόρια όπως οι RhoGDI και RIP2, ενώ η τεστοστερόνη δεν έδειξε καμία ικανότητα να ενεργοποιήσει κανέναν από τους υποδοχείς TrkA και p75^{NTR}.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας μας δείχνουν ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των ανδρογόνων ορμονών και των νευροτροφινών σε ορμονο-εξαρτώμενους καρκινικούς όγκους ρυθμίζει βασικές παραμέτρους της επιβίωσης των κυττάρων αυτών και προσφέρει νέες γνώσεις στην παθοφυσιολογία αυτών των νεοπλασιών.

SUMMARY

The main property of cancer cells is to proliferate and expand by limiting cell death. This procedure involves the receptiveness of tumor to its microenvironment and the use of growth factors and hormonal components. Prostate cancer consists a classical hormone-dependent cancer while for colon cancer not such association is well established. We have recently shown that androgen steroid Testosterone exerts pro-apoptotic effects in both cancer types through a rapid, membrane-initiated mechanism. In addition, we have recently described that another androgen, Dehydroepiandrosterone (DHEA) can activate Nerve Growth Factor receptors, namely TrkA and p75^{NTR} in neural cells. NGF as a growth factor has been shown to participate in cancer cells proliferation and migration. Recent data show that NGF receptors, TrkA and p75^{NTR} play important role in cancer, exerting pleiotropic effects in proliferation, migration or apoptosis of cancer cells.

In the present study, we evaluated the effects of androgens, Testosterone and DHEA that are key players for the development of prostate cancer, in the NGF receptors-mediated regulation of apoptosis in prostate but also colon cancer cells. Specifically, we investigated the effects of Testosterone and DHEA in apoptosis of prostate cancer cell lines, DU145 and LNCaP and the colon cancer cell line CaCO2.

Conclusively, our results show that DHEA and NGF strongly reversed serum-deprivation-induced apoptosis while Testosterone induces cell apoptosis in the presence of serum of all cancer cell lines. The anti-apoptotic effect of both DHEA and NGF was completely reversed after priming of the cells with Testosterone. We also indicate that all cancer cell lines of prostate (DU145 and

LNCaP) and colon (CaCO2) express both of the NGF receptors, namely TrkA and p75^{NTR} and also we show that Testosterone treatment reduces the expression of TrkA receptor while DHEA and NGF increase receptor's expression. The effects of androgens were abolished in both cell lines in the presence of TrkA inhibitor. The use of p75^{NTR} inhibitor had different effects on prostate versus colon cancer, specifically in prostate cell line DU145, the anti-apoptotic effect of DHEA and NGF was significantly decreased in the presence of the inhibitor, while in colon cancer cell line CaCO2, the protective effect of DHEA was similar compared to the absence of the inhibitor. Finally, we tested the functional effects of Testosterone and DHEA in the activation of TrkA and p75^{NTR} receptors. DHEA, as NGF, induces the phosphorylation of TrkA and interaction of the p75^{NTR} receptor with intracellular molecules like RhoGDI and RIP2, while Testosterone did not show any ability to activate neither TrkA nor p75^{NTR} receptors.

Our findings suggest that the interplay between steroid hormone and neurotrophins signaling in hormone-dependent tumors offers new insights in the pathophysiology of these neoplasias.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Γενικά

Είναι γνωστό ότι το μικροπεριβάλλον ρυθμίζει την ανάπτυξη και την αύξηση των περισσότερων νεοπλασιών, και καθορίζει την απαραίτητη ισορροπία μεταξύ των παραγόντων που ενεργούν για να διευκολύνουν την αύξηση και την κυτταρική επιβίωση και εκείνων που εμποδίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και οδηγούν στην απόπτωση (Hanahan and Weinberg, 2000). Το μικροπεριβάλλον επηρεάζεται από συστηματικούς παράγοντες και ο ίδιος ο καρκινικός όγκος προκαλεί τοπικές και ενδοκρινείς αλλαγές μέσω της παρακρινικής σηματοδότησης και τις αλληλεπιδράσεις με το ανοσοποιητικό και νευρικό σύστημα (Darnell and Posner, 2006).

Τέτοιοι σημαντικοί παράγοντες που έχουν εμπλακεί στην ρύθμιση διαφόρων τύπων καρκίνου είναι οι στεροειδείς ορμόνες και οι αυξητικοί παράγοντες, που συμμετέχουν σε αυτό/παρα-κρινική ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της ικανότητας μετανάστευσης και της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων.

Για τον καρκίνο του προστάτη, τον πλέον ορμονο-εξαρτώμενο μεταξύ όλων των καρκίνων, οι δύο κύριες ανδρογόνες ορμόνες, η τεστοστερόνη και η διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA), μεσολαβούν τις περισσότερες από τις καρκινικές επιδράσεις. Μια θεμελιώδης παρατήρηση είναι ότι η συγκέντρωση ορού της τεστοστερόνης εκφράζει μόνο την ποσότητα της τεστοστερόνης που παράγεται στα γεννητικά όργανα, η οποία κι απελευθερώνεται στο αίμα και καταλήγει σε άλλους ιστούς. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι μία περίπου ίση ποσότητα της τεστοστερόνης δημιουργείται από τον μεταβολισμό της DHEA στους περιφερικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του προστάτη, χωρίς να εμφανίζονται στο αίμα. Κατά συνέπεια μετά τον ευνουχισμό, η μεγάλη πτώση (95-97%) της τεστοστερόνης του ορού δεν αντανακλά την μικρότερη ποσότητα (40-50%) της τεστοστερόνης και της διϋδροτεστοστερόνης (DHT) που ανιχνεύεται τοπικά στον προστάτη από τον μεταβολισμό της DHEA. Στην πραγματικότητα, ενώ η εξάλειψη των ανδρογόνων στους όρχεις με ευνουχισμό

μόνο δεν έχει ποτέ αποδειχθεί ότι παρατείνει τη ζωή στο μεταστατικό καρκίνο του προστάτη, ο συνδυασμός του ευνουχισμού (χειρουργικός ή φαρμακευτικός με GnRH) με ένα καθαρό αντιανδρογόνο μπορεί να εμφανίσει καλύτερο προσδόκιμο επιβίωσης (Labrie, 2010).

Πρόσφατες μελέτες του εργαστηρίου μας έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση των μεμβρανικών υποδοχέων ανδρογόνων (mAR) σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη από το ανδρογόνο τεστοστερόνη προκαλεί απόπτωση (Paradoulou et al, 2008, Gu et al, 2009). Ίδια απόκριση προκαλεί και ο ενεργός μεταβολίτης της τεστοστερόνης, διϋδροτεστοστερόνη (DHT). Επίσης η επίδραση με ανδρογόνα οδηγεί σε ταχεία αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη (DU145 και LNCaP) (Paradoulou et al, 2008).

Στον καρκίνο του παχέος εντέρου επίσης, έχει αποδειχθεί ότι οι ορμόνες όπως η βιταμίνη D3 και οιστραδιόλη είναι σημαντικοί παράγοντες στην πρόληψη του καρκίνου, ενώ έχει αποδειχθεί ότι ο καρκίνος του παχέος εντέρου εκφράζει επίσης υποδοχείς ανδρογόνων (AR) (Slattery et al, 2005).

Έχει παρατηρηθεί επίσης, ότι μετά την εμμηνόπαυση η θεραπεία υποκατάστασης ορμονών μειώνει τον κίνδυνο του καρκίνου του παχέος εντέρου μεταξύ των γυναικών (Hebert-Croteau, 1998), οπότε και η DHEA έχει προταθεί ως ένας προστατευτικός παράγοντας ενάντια στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Nyce et al, 1984, Aoki et al, 2003).

Ορμόνες

Οι ορμόνες παράγονται στον οργανισμό από ειδικά ανατομικά μορφώματα που ονομάζονται ενδοκρινείς αδένες. Πρόκειται για την υπόφυση, την επίφυση, τα επινεφρίδια, το θυρεοειδή αδέν, τους παραθυρεοειδείς αδένες, τις ωοθήκες και τους όρχεις . Ωστόσο, σε πολλά όργανα παρατηρούνται κυτταρικές αθροίσεις

που έχουν εξειδικευτεί στην παραγωγή ορμονών. Για παράδειγμα, τα νησίδια του παγκρέατος παράγουν ινσουλίνη, γλυκογόνο και σωματοστατίνη, ενώ η παρασπειραματική συσκευή του νεφρού εκκρίνει την ορμόνη ρενίνη. Εξάλλου και περιοχές του κεντρικού συστήματος, όπως ο υποθάλαμος, έχουν την ικανότητα παραγωγής, ουσιών με ορμονική δράση. Τέλος, ουσίες που προσλαμβάνονται με τη διατροφή, όπως η βιταμίνη D, διακινούνται και δραστηριοποιούνται στον οργανισμό, σαν να επρόκειτο για ορμόνες.

Οι ορμόνες, μετά την έκκριση τους, μεταφέρονται με την κυκλοφορία του αίματος στους ιστούς ή τα όργανα που εμφανίζουν ειδικότητα για αυτές και εκεί ασκούν την ορμονική τους δράση. Βάσει της χημικής τους σύστασης γίνεται διάκριση μεταξύ πεπτιδικών ορμονών, που απαρτίζονται από αλυσίδες αμινοξέων, στεροειδών ορμονών, που έχουν ως πρόδρομη ουσία τη χοληστερόλη, και ορμονών αμινών, που αποτελούν παράγωγα αμινοξέα (θυροειδικές ορμόνες, κατεχολαμίνες και μελατονίνη) (Stryer, L. Biochimica, 4 edizione, 1995).

Στεροειδείς ορμόνες- Νευροστεροειδή

Πρόδρομος όλων των στεροειδών ορμονών είναι η χοληστερόλη, η οποία προσλαμβάνεται από το πλάσμα με την βοήθεια ενός ειδικού, για τις λιποπρωτεϊνές χαμηλής πυκνότητας, μεμβρανικού υποδοχέα. Μετά την μεταφορά μέσα στο κύτταρο, η χοληστερόλη εστεροποιείται κατά μεγάλο μέρος και εναποτίθεται σε κυστίδια μέσα στο κυτταρόπλασμα. Υπό βασικές συνθήκες, η χοληστερόλη που προσλαμβάνεται από το πλάσμα χρησιμοποιείται αμέσως για τη σύνθεση ορμονών. Ωστόσο όταν διεγερθεί η παραγωγή ορμόνης η εναποθηκευμένη χοληστερόλη κινητοποιείται αμέσως και μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια για το πρώτο στάδιο της σύνθεσης των στεροειδών ορμονών. Κύρια πηγή στεροειδών ορμονών στο σώμα είναι οι περιφερικοί ενδοκρινείς

αδένες. Αυτές οι ορμόνες συνθέτονται κυρίως στα επινεφρίδια, στις γονάδες και τον πλακούντα (Lieberman et al, 1981). Ο γονάδες (ωοθήκες και όρχεις) και ο πλακούντας παράγουν τις γεννητικές ορμόνες. Ο φλοιός των επινεφριδίων παράγει τρεις τύπους στεροειδών:

α) Ανδρογόνα, οιστρογόνα και προγεστίνες όπου η κύρια λειτουργία τους είναι ο έλεγχος του γεννητικού συστήματος, καθώς επίσης ρυθμίζουν την λειτουργία του νευρικού συστήματος και τον έλεγχο της συμπεριφοράς των συναισθημάτων

β) Αλατοκορτικοειδή, όπου το κύριο αλατοκορτικοειδές είναι η αλδοστερόνη που ρυθμίζει την αρτηριακή πίεση, τον όγκο των υγρών του σώματος, καθώς και την απορρόφηση ιόντων Na^+

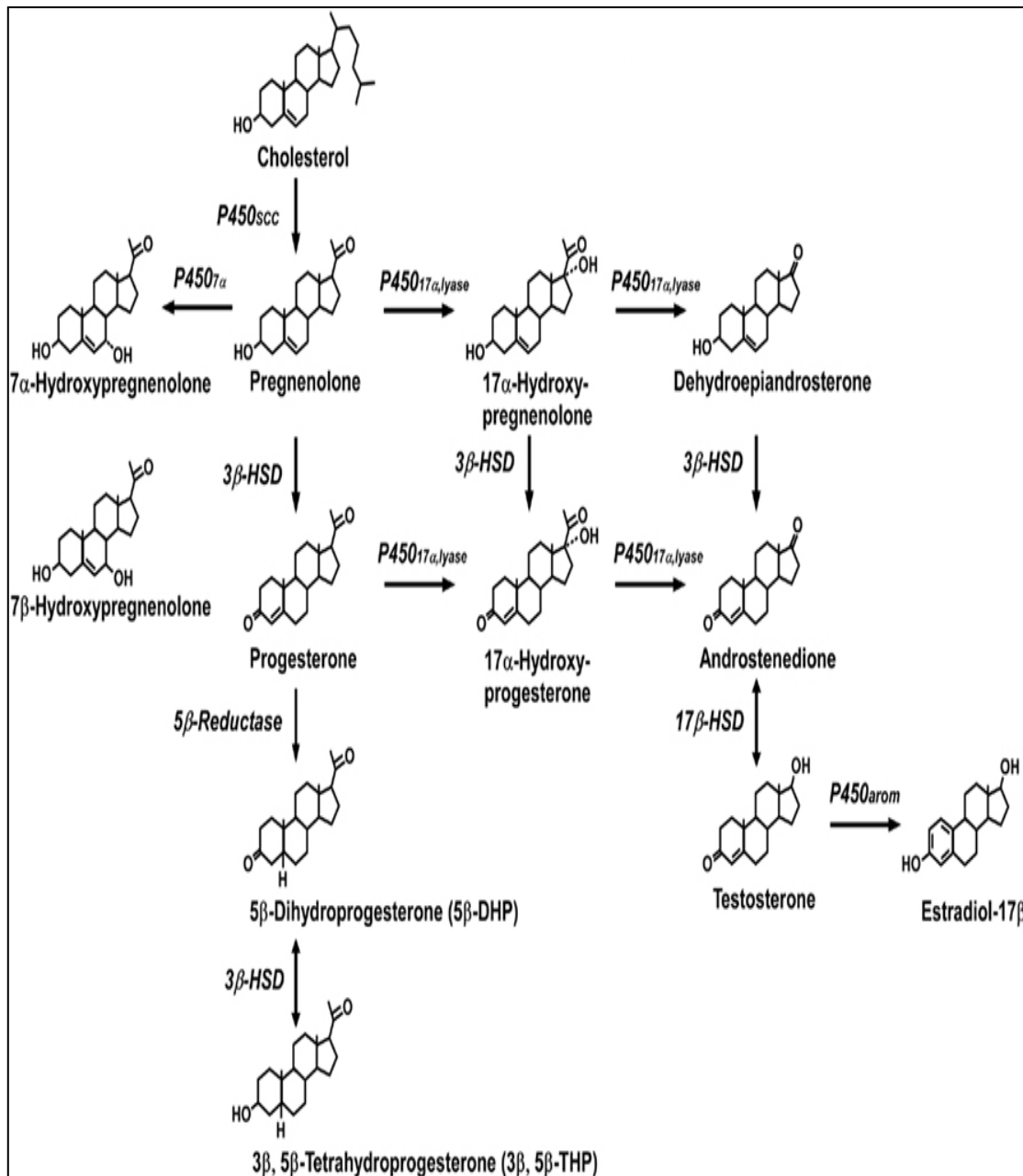
γ) Γλυκοκορτικοειδή, με κύριο γλυκοκορτικοειδές την κορτιζόλη που ρυθμίζει την απόκριση στο στρες και έχει πολλαπλές δράσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα.

Οι στεροειδείς ορμόνες ανιχνεύονται και στο νευρικό σύστημα όπου ονομάζονται νευροστεροειδή (ή νευροενεργά στεροειδή). Τα νευροστεροειδή παράγονται από την χοληστερόλη στο κεντρικό και το περιφερικό νευρικό σύστημα, τόσο από νευρικά όσο κι από γλοιακά κύτταρα. Διακρίνονται σε δυο κατηγορίες:

α) Τα νευροστεροειδή που βιοσυντίθενται και σε περιφερικούς αδένες (επινεφρίδια και γονάδες) εκτός της παραγωγής τους στο Νευρικό Ιστό, τα οποία ως λιπόφιλες ενώσεις διαπερνούν τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό και δρουν στα νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου ελέγχοντας τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν η τεστοστερόνη και η δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) (McEwen, 1992).

β) Τα νευροστεροειδή που συντίθενται εκ νέου (de novo) ή με τροποποίηση των περιφερειακών στεροειδών στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ)

(Comragnone et al, 2000). Σε αυτήν την κατηγορία ανήκει η αλλοπρεγνενολόνη.



Εικόνα 1: Μονοπάτι βιοσύνθεσης των νευροστεροειδών (Pisu et al, 2004)

DHEA

Η δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) συντίθεται από την πρεγνενολόνη, που παράγεται με τη διάσπαση της χοληστερόλης από το ένζυμο του κυτοχρώματος P450_{scc}. Είναι από τα σπουδαιότερα νευροστεροειδή που κυκλοφορούν στον ανθρώπινο οργανισμό καθώς έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση από τα υπόλοιπα, και έτσι έχει μεγάλη βιολογική σημασία, παρόλη την ασθενή δραστηριότητά της. Η ανδρογονική ισχύς της είναι τουλάχιστο 20 φορές πιο ασθενής από αυτήν της τεστοστερόνης.

Στον ανθρώπινο οργανισμό, η DHEA και το θειϊκό παράγωγό της, DHEAS, αποτελούν τα πλέον άφθονα νευροστεροειδή κατά την διάρκεια της ανάπτυξης, ενώ τα επίπεδα τους φθίνουν με τη γήρανση του οργανισμού (Orentreich et al, 1992, Maninger et al, 2009). Έχει προταθεί ότι τα μειωμένα επίπεδα της DHEA που παρατηρούνται κατά την ανθρώπινη γήρανση ίσως συνεπικουρούν στην αυξημένη ευαισθησία των νευρικών κυττάρων. Μερικοί τύποι ασθενειών καθώς και το stress, αποτελούν επιπλέον παράγοντες που μειώνουν τα επίπεδα των παραπάνω δυο νευροστεροειδών. Πρόσφατες μελέτες έχουν συνδέσει την ελάττωση ορισμένων ενδογενών ουσιών όπως τα νευροστεροειδή, με τις διαδικασίες γήρανσης του ΚΝΣ και την συνεπαγομένη έκπτωση της μνήμης και διανοητικής λειτουργίας (McEwen, 1999).

Η γνώση αυτή έχει οδηγήσει στην λήψη νευροστεροειδών όπως η DHEA ως θεραπεία υποκατάστασης ή ως διαιτητικό συμπλήρωμα (Baulieu et al, 2000). Όμως η χρόνια χορήγηση αυτού του στεροειδούς ενέχει σημαντικούς κινδύνους. Πράγματι η DHEA αποτελεί πρόδρομο μόριο βιοσύνθεσης των οιστρογόνων και ανδρογόνων ορμονών οι οποίες ως γνωστό αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης ορμονο-εξαρτώμενων νεοπλασμάτων όπως αυτών του μαστού, της μήτρας ή του προστάτη αντίστοιχα. Η δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) παράγεται από το φλοιό των επινεφριδίων και είναι το πιο άφθονο στεροειδές στους ανθρώπους. Επίπεδα ορού της DHEA και του θειϊκού

παραγωγού (DHEAS), κορυφώνονται σε άνδρες και γυναίκες στην τρίτη δεκαετία (δεκαετία του 20 και 30) και μειώνουν σταδιακά και σε βάθος με την αύξηση της ηλικίας (Arnold et al, 2008, Aoki et al, 2003). Οι άνθρωποι και άλλα πρωτεύοντα θηλαστικά είναι μοναδικά μεταξύ των ζωικών ειδών, καθώς τα επινεφρίδια τους εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες DHEA και DHEAS.

Ο μεταβολισμός της DHEA σε ανδρογόνα και σε οιστρογόνα από τις υδροξυστεροειδοδεϋδρογενάσες, 3β-HSD και 17β-HSD, μπορεί να δράσει ογκοκατασταλτικά ή αντίθετα να έχει μιτογόνο αποτέλεσμα (Labrie et al, 2001). Το αποτέλεσμα της δράσης των νευροστεροειδών ορμονών στον καρκίνο του προστάτη εξαρτάται τελικά από μια σειρά παραγόντων όπως τον κυτταρικό τύπο και τον ιστό, το αναπτυξιακό στάδιο, ή την ενεργότητα των ενζύμων, κ.λ.π.

Η DHEA συνήθως χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής και μπορεί να επηρεάσει την παθοφυσιολογία του προστάτη όταν μεταβολίζεται σε ανδρογόνα και/ή οιστρογόνα. Έχει μελετηθεί ότι αυξάνει την έκφραση του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA) σε ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά του προστάτη LAPC-4 (Gray et al, 2009), ή σε συγκαλλιέργεια (co-culture) με στρωματικά κύτταρα που προέρχονται από καρκίνο του προστάτη (6S). Η DHEA ή οι μεταβολίτες της επάγουν την έκφραση του IGF-I (insulin-like growth factor I) και/ή την ανάπτυξη στα 6S ή LNCaP κύτταρα (Le et al, 2006, Arnold et al, 2005, 2008) με σύνδεση με τον ενδοκυττάριο υποδοχέα ανδρογόνων (AR). Οι οιστρογονικοί μεταβολίτες της DHEA, 3β-οιστραδιόλη και E2, συνδέονται με τον υποδοχέα οιστρογόνων (ER), αλλά όχι τον υποδοχέα ανδρογόνων (AR) (Kruiper et al, 1997, Nilson et al, 2001).

Από την άλλη πλευρά, η DHEA εμφανίζει ισχυρή προστατευτική, αντι-αποπτωτική δράση στην κυτταρική σειρά PC12 (που προέρχεται από

φαιοχρωμοκύττωμα επινεφριδίων) (Charalampopoulos et al, 2004) η οποία αύξησε την φωσφορυλίωση των προεπιβιωτικών κινασών Src, PKA, MEK1/2/ERK1/2, και PI3K/Akt σε κύτταρα PC12. Η ενεργοποίηση των κινασών Src/PKCa/b/MEK1/2/ERK1/2 επάγει την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων CREB και NF-kB, οι οποίοι με την σειρά τους αυξάνουν τα επίπεδα έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 (Charalampopoulos et al, 2008). Αυτές οι επιδράσεις της DHEA διαμεσολαβούνται μέσω ειδικών μεμβρανικών θέσεων δέσμευσης (Charalampopoulos et al, 2006).

Τεστοστερόνη

Τα ανδρογόνα χαρακτηρίζονται χημικώς από την ύπαρξη του στεροειδούς σκελετού με 19 άτομα άνθρακα (C-19). Φέρουν και στα δυο άκρα τους άτομα οξυγόνου και συγκεκριμένα μια οξοομάδα στη θέση C-3 και μια υδροξυλομάδα στο C-17. Το κυριότερο ανδρογόνο των αρσενικών σπονδυλωτών είναι η τεστοστερόνη, η οποία εκκρίνεται από τα κύτταρα του Leydig των όρχεων (Brooks, 1975). Η βιοσύνθεση των ανδρογόνων στους όρχεις ελέγχεται από την ωχρινοτρόπο ορμόνη (LH) που εκκρίνεται από την υπόφυση (Swerdloff et al, 1992). Μια άλλη πηγή προέλευσης ανδρογόνων εξίσου σημαντική αποτελεί ο φλοιός επινεφριδίων, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Η σύνθεση τους διεγείρεται από την φλοιοεπινεφριδιοτρόπο ορμόνη, αδρενοκορτικοτροπίνη (ACTH). Οι σημαντικότερες ορμόνες του φλοιού των επινεφριδίων που παρουσιάζουν ανδρογονική δράση είναι η δεϋδροεπιαδροστερόνη (DHEA) όπως επίσης και η Δ4-ανδροστενδιόνη. Η DHEA παράγεται επίσης συνδεδεμένη με τη θεική ρίζα, DHEA-S. Μετά την έκκριση τους μπορούν να μετατραπούν στους περιφερικούς ιστούς σε τεστοστερόνη, γεγονός που πολλαπλασιάζει την ανδρογονική τους ισχύ και αποκτά ιδιαίτερη σημασία στα

θηλυκά άτομα όπου μαζί με τα αντίστοιχα ανδρογόνα των ωοθηκών, παίζουν ρόλο στη διαμόρφωση αρρενοποιητικών χαρακτηριστικών.

Η τεστοστερόνη μεταφέρεται στο πλάσμα του αίματος συνδεδεμένη με μια μεταφορική πρωτεΐνη, την SHBG (Sex Hormone Binding Globulin). Δραστικό είναι το ελεύθερο κλάσμα της ορμόνης, το οποίο βρίσκεται σε δυναμική ισορροπία με το συνδεδεμένο. Η ελεύθερη τεστοστερόνη έχει την ικανότητα να διεγείρει τους αντίστοιχους ανδρογονικούς υποδοχείς στα όργανα-στόχους. Η αναγωγή της ορμόνης σε 5α-διϋδροτεστοστερόνη (DHT) αυξάνει τη δραστηριότητα της ορμόνης, αυξάνοντας την ικανότητα σύνδεσης της με τον αντίστοιχο υποδοχέα (Bratoeff et al, 2005). Το ένζυμο για την αναγωγή αυτή ονομάζεται 5α-ρεδουκτάση (ή αναγωγάση) και βρίσκεται σε ορισμένους μόνο ιστούς (Randall, 1994). Σε μερικές περιπτώσεις, για την άσκηση της βιολογικής δράσης της ορμόνης είναι απαραίτητη η μετατροπή της σε οιστραδιόλη (αρωματοποίηση). Αυτό παρατηρείται κυρίως στα οστά και το κεντρικό νευρικό σύστημα (Tsutsui et al, 2000). Με την μετατροπή της τεστοστερόνης σε οιστραδιόλη στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ασκείται ανασταλτική επίδραση στην έκκριση GnRH από τον υποθάλαμο και την επακόλουθη έκκριση γοναδοτροπινών από την υπόφυση, δημιουργώντας ένα κύκλωμα αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης (feedback).

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η ορμόνη τεστοστερόνη αποτελεί κύριο ρυθμιστή της αποπτωτικής διεργασίας στον καρκίνο του προστάτη (Kampa et al, 2006, Papadopoulou et al, 2008) και του παχέος εντέρου (Gu et al, 2008, Lang et al, 2011) μέσω της ρύθμισης προ-επιβιωτικών κινασών PI3K/Akt και την ρύθμιση των μικρών GTPασών όπως η RhoA, καθώς και την επακόλουθη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού. Επιπλέον, η τεστοστερόνη ρυθμίζει τις πρωτεΐνες Bad και caspase-3 που εμπλέκονται στο μονοπάτι της απόπτωσης (μέσω υποδοχέων θανάτου) μέσω της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού

της ακτίνης και τον μεταγραφικό παράγοντα NF-kB (Papadopoulou et al, 2008).

Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος-Απόπτωση

Ο κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση αποτελεί μια ακριβή, σύνθετη και καλά οργανωμένη κυτταρική λειτουργία που έχει φυσιολογικό ρόλο τόσο κατά την ανάπτυξη ενός οργανισμού, όσο και κατά την διάρκεια της ενήλικης ζωής του, και δεν είναι ένα τυχαίο συμβάν που διακόπτει τη ζωή του κυττάρου. Υπάρχουν τρία είδη κυτταρικού θανάτου: η νέκρωση, η απόπτωση κι η αυτοφαγία. Ως νέκρωση αναφέρεται ο τρόπος θανάτου των κυττάρων μετά από αιφνίδια και δριμεία προσβολή από ένα ερέθισμα όπως η υπερϊώδης ακτινοβολία ή οι τοξικές ουσίες. Σε αντίθεση με την νέκρωση, η απόπτωση χαρακτηρίζεται από μια αυστηρά ελεγχόμενη σειρά μορφολογικών και βιοχημικών αλλαγών που επιτρέπουν την απομάκρυνση του κυττάρου μέσω φαγοκύτωσης χωρίς να προκληθεί τοπική φλεγμονή και βλάβη στα γειτονικά κύτταρα.

Με την διαδικασία της απόπτωσης απομακρύνονται κύτταρα, δομές ή τμήματα ιστών, που δεν είναι απαραίτητα πλέον ή που δημιουργούν ακόμη και προβλήματα. Διατηρείται έτσι σταθερός ο αριθμός των κυττάρων στους ιστούς που τα κύτταρα τους αντικαθίστανται γρήγορα, όπως στην περίπτωση του αίματος, και απομακρύνονται κύτταρα που έχουν επιτελέσει το ρόλο τους κατά την ανάπτυξη, όπως οι μη σωστά προσδεμένοι νευρώνες κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Περίπου οι μισοί από το σύνολο των νευρώνων στους νευράξωνες και περισσότερα από το 99.9% των κυττάρων που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου οδηγούνται στο θάνατο μέσω της διαδικασίας της απόπτωσης (Vaux, 1999).

Η διαδικασία της απόπτωσης λειτουργεί επίσης ως αμυντικός μηχανισμός στα κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη στο γενετικό τους υλικό ή έχουν μολυνθεί

με ιούς. Παρεμποδίζει τέλος την εξάπλωση βλαβερών μεταλλαγών, συμπεριλαμβανόμενων και εκείνων που οδηγούν σε καρκινογένεση, απομακρύνοντας τα συγκεκριμένα κύτταρα.



Εικόνα 2: Χαρακτηριστική μορφολογία της απόπτωσης: Παρατηρείται διαίρεση του κυττάρου σε μικρότερα μέρη, τα αποπτωτικά σωματίδια. Στη συνέχεια παρατηρείται πυρηνική και κυτταροπλασματική συμπύκνωση, συμπύκνωση της χρωματίνης και ακολουθεί φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα ή τα γειτονικά επιθηλιακά κύτταρα.

Τα αποπτωτικά μονοπάτια

Από βιοχημικής σκοπιάς, η απόπτωση διεξάγεται κυρίως μέσω δυο μονοπατιών: α) του ενδογενούς ή μιτοχονδριακού μονοπατιού, και β) του εξωγενούς μονοπατιού.

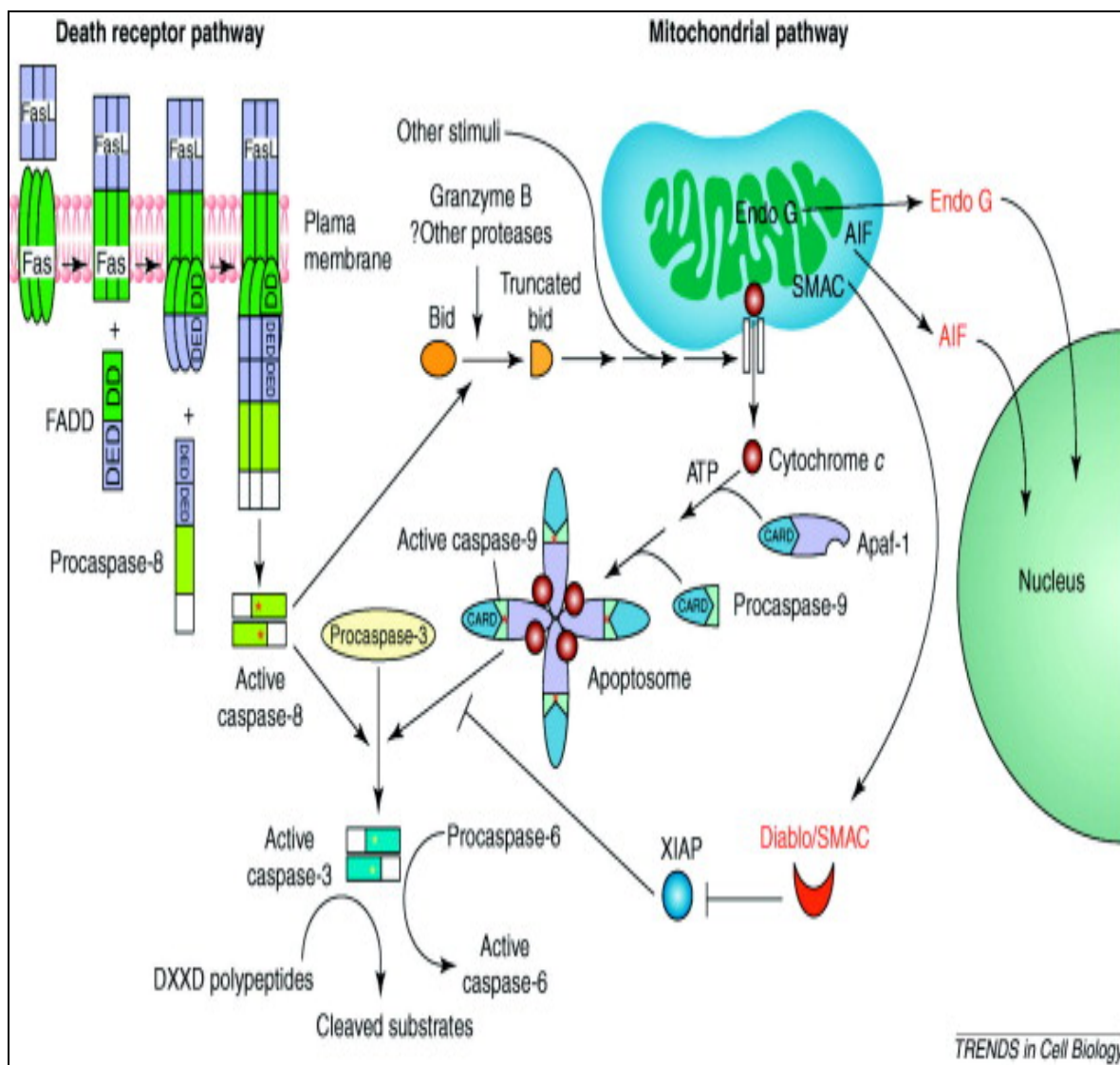
Το ενδογενές μονοπάτι κυτταρικού θανάτου ενεργοποιείται συνήθως από το κυτταρικό στρες, κυρίως μιτοχονδριακό, προκαλούμενο από παράγοντες όπως η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, βλάβες στο DNA και το θερμικό σοκ που έχουν αποτέλεσμα τη διαταραχή της ενδοκυτταρικής ομοιόστασης (Rich et al, 2000). Στο μονοπάτι αυτό τα μιτοχόνδρια έχουν κρίσιμο ρόλο στην εκτέλεση του κυτταρικού θανάτου. Διάφορες αποπτωτικές πρωτεΐνες που βρίσκονται στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων, απελευθερώνονται από αυτά, όταν ένα αποπτωτικό σήμα δώσει το ερέθισμα. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι το κυτόχρωμα C, οι Smac/Diablo (Du et al, 2000; Verhagen et al, 2000), οι κασπάσες 2,3 και 9 (Loeffler and Kroemer, 2000) και ο παράγοντας επαγωγής της απόπτωσης AIF (apoptosis inducing factor) ο οποίος μεταναστεύει στον πυρήνα και προκαλεί την αποδόμηση του DNA (Lorenzo et al, 1999).

Το εξωγενές μονοπάτι σηματοδοτείται από την ενεργοποίηση- μέσω του καταλλήλου μορίου -προσδέτη (ligand)- διαμεμβρανικών υποδοχέων θανάτου (death receptors, DR) της υπεροικογένειας του υποδοχέα TNF (Tumor necrosis factor). Τα καλύτερα μοντέλα εξωγενούς μονοπατιού είναι το σύστημα του υποδοχέα Fas με τον προσδέτη FasL (Fas Ligand) και του υποδοχέα TNFR (υπεροικογένεια των υποδοχέων του TNF, όπου συμπεριλαμβάνονται κι οι υποδοχείς p75NTR, DR4,5,6 and TRAIL) με τον αντίστοιχο προσδέτη TNF. Για παράδειγμα, στο ανοσοποιητικό σύστημα ο προσδέτης FasL εντοπίζεται στην επιφάνεια των T-τοξικών κυττάρων (Csipo et al, 1998). Η σύνδεση του εκάστοτε προσδέτη προκαλεί, σε σύντομο χρονικό διάστημα, την ενεργοποίηση

μορίων στο εσωτερικό του κυττάρου (προκασπάσες, IKK-inhibitor of kB kinase complex) και την έναρξη αποπτωτικών σηματοδοτικών μονοπατιών.

Επίσης φαίνεται να συμμετέχει στα μονοπάτια της απόπτωσης και το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53, αφού η ενεργοποίηση του μετά από καταστροφή του DNA προκαλεί την περαιτέρω ενεργοποίηση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax και κατά συνέπεια τον κυτταρικό θάνατο (Wood and Youle, 1995). Επιπλέον, μια σειρά γονιδίων που κωδικοποιούν ρυθμιστικά για την απόπτωση γονίδια βρίσκονται υπό τον έλεγχο του p53 (Polyak et al, 1997).

Αξίζει να σημειωθεί ότι τις περισσότερες φορές τα δυο αποπτωτικά μονοπάτια δρουν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο (Gross et al, 1999, Yin et al, 1999). Τέλος υπάρχουν ενδείξεις για την ύπαρξη άλλων μονοπατιών επαγωγής της απόπτωσης καθώς η αποπτωτική διαδικασία κατά την ανάπτυξη του οργανισμού διεξάγεται ομαλά σε μεταλλαγμένα ποντίκια με δυσλειτουργία στα εξαρτώμενα από τις κασπάσες-8 και -9 μονοπάτια (Earnshaw et al, 1999, Wang and Lenardo, 2000).



Εικόνα 3: Τα κύρια αποπτωτικά μονοπάτια

Νευροτροφίνες

Οι νευροτροφίνες αποτελούν μια οικογένεια ομοδιμερών πολυπεπτιδίων (homodimeric polypeptides)- αυξητικών παραγόντων απαραίτητων για την ανάπτυξη και τη διατήρηση του νευρικού συστήματος των σπονδυλωτών. Πιο συγκεκριμένα οι δράσεις των νευροτροφινών είναι η κυτταρική επιβίωση, η διαφοροποίηση και η κυτταρική αύξηση, η νευρωνική πλαστικότητα, οι μεταβολές του κυτταρικού κύκλου, η απόπτωση καθώς επίσης η έκφραση και

ενεργότητα σημαντικών πρωτεϊνών, όπως ιοντικών καναλιών και νευροδιαβιβαστικών υποδοχέων. Οι νευροτροφίνες συντίθενται αρχικά ως προ-νευροτροφίνες.

Ο νευρικός αυξητικός παράγοντας (nerve growth factor, NGF) είναι το πρωτότυπο μέλος της οικογένειας των νευροτροφινών. Άλλα μέλη της οικογένειας αυτής είναι οι : νευροτροφικός παράγοντας προερχόμενος από τον εγκέφαλο (brain derived neurotrophic factor, BDNF), νευροτροφίνη-3 (neurotrophin-3, NT-3), νευροτροφίνη-4/5 (neurotrophin -4/5, NT-4/5), νευροτροφίνη-6 (neurotrophin-6, NT-6) και νευροτροφίνη-7 (neurotrophin-7, NT-7) (Dechant G and Neumann H, 2002).

NGF

Ο νευρικός αυξητικός παράγοντας, NGF, ανακαλύφθηκε από την Rita Levi-Montalcini και τον Viktor Hamburger ενώ μελετούσαν τις ιδιότητες ενός σαρκώματος *in vitro*. Ο NGF αναγνωρίστηκε ως ένα μόριο που ρυθμίζει την επιβίωση και την ωρίμανση των αναπτυσσομένων νευρώνων στο ΠΝΣ. Ο ρόλος του NGF για πολλά χρόνια βασιζόταν στο κλασικό πρότυπο του προερχόμενου από τα κύτταρα –στόχους νευροτροφικού παράγοντα, κατά το οποίο ο NGF που απελευθερώνεται από μετασυναπτικούς στόχους δρα σε προσυναπτικούς νευρώνες προκειμένου να δημιουργήσει και να διατηρήσει συναπτικές επαφές και να ενισχύσει τη λειτουργία των σαφώς καθορισμένων νευρωνικών κυκλωμάτων. Όμως αυτό δεν αποτελεί τον μοναδικό ρόλο του NGF. Οι δράσεις του NGF σήμερα γνωρίζουμε ότι εκτείνονται πέρα από την περίοδο ανάπτυξης, πέρα από τα νευρικά κύτταρα και από το νευρικό σύστημα. Ο NGF και οι υποδοχείς του παράγονται καθ'ολη την ενήλικη ζωή και κατά την γήρανση από πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Η δυναμικά ρυθμιζόμενη έκφραση του NGF και των υποδοχέων του κατά την ενήλικη ζωή

υποδεικνύει πολλαπλές λειτουργίες για την σηματοδότηση μέσω NGF, πολλές από τις οποίες είναι ελλιπώς κατανοητές. Η έκφραση του NGF και των υποδοχέων του μπορεί να αυξηθεί ως απάντηση σε τραυματισμό του ΠΝΣ και του ΚΝΣ, ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι, μεταξύ άλλων ρόλων, η ενδογενής σηματοδότηση μέσω του NGF σε νευρώνες και μη νευρικά κύτταρα επιτελεί νευροπροστατευτικές λειτουργίες και διευκολύνει τη νευρωνική αποκατάσταση (Aloe et al, 2012). Η δομή, η βιοσύνθεση και βιολογική ενεργότητα του NGF έχει μελετηθεί εκτενώς στον υπογνάθιο αδένα μύς, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης του στο συγκεκριμένο ιστό.

Ο NGF είναι κρίσιμος για την επιβίωση και συντήρηση των συμπαθητικών και αισθητήριων νευρώνων. Η απουσία του οδηγεί σε εκτεταμένη απόπτωση αυτών των νευρώνων. Ο νευρικός αυξητικός παράγοντας προκαλεί αξονική ανάπτυξη. Μελέτες έχουν δείξει ότι επάγει την αξονική διακλάδωση και την νευρωνική επιμήκυνση. Ο NGF δεσμεύεται με τουλάχιστον δύο τάξεις υποδοχέων: Τον $p75^{NTR}$ (χαμηλής συγγένεια υποδοχέα του νευρικού αυξητικού παράγοντα) και πιο ειδικά με τον TrkA, μια κινάση τυροσίνης. Ο NGF δεσμεύεται με υψηλή συγγένεια με τον υποδοχέα TrkA. Η σύνδεση αυτή φωσφορυλιώνει τον TrkA, κι οδηγεί στην ενεργοποίηση των κινασών PI3K, Ras και PLC.

Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι το πρόδρομο μόριο του NGF, ο pro-NGF, μπορεί επίσης να παίζει σημαντικό ρόλο μέσω της αυξημένης συνδεσής του με τον υποδοχέα $p75^{NTR}$. Ο υποδοχέας $p75^{NTR}$ δημιουργεί σύμπλοκα με άλλα μόρια όπως με την διαμεμβρανική πρωτεΐνη που εκφράζεται στο ΚΝΣ κατά την ανάπτυξη και την ενήλικη ζωή, την Sortilin. Η Sortilin συμπεριφέρεται ως συν-υποδοχέας του $p75^{NTR}$ για την δέσμευση pro-NGF που είναι σημαντική για την απόπτωση (Dechant et al, 2002, Chen et al, 2008).

Υποδοχείς νευροτροφινών: p75^{NTR} και TrkA

Οι νευροτροφίνες για να δράσουν πρέπει να δεσμευθούν στους υποδοχείς τους. Οι υποδοχείς των νευροτροφινών ανήκουν σε δυο διαφορετικούς δομικά τύπους. Αυτοί είναι ο p75^{NTR} που ανήκει στην TNF (Tumor necrosis factor) υπερικογένεια υποδοχέων, και η οικογένεια των Trk υποδοχέων, όπου διακρίνουμε τρεις υποδοχείς, τους TrkA, TrkB, TrkC, που έχουν δράση κινάσης τυροσίνης. Οι δυο οικογένειες υποδοχέων δεν εμφανίζουν καμία ομολογία ούτε στα ενδοκυττάρια, ούτε στα εξωκυττάρια τμήματα τους. Διαφέρουν ακόμα και ως προς την εξειδίκευση και στη δέσμευση των νευροτροφινών. Ο p75^{NTR} δεσμεύει όλες τις νευροτροφίνες με την χαμηλότερη συγγένεια (low-affinity receptor), ενώ το κάθε ένα μέλος της οικογένειας των Trk υποδοχέων δεσμεύει ειδικά μια νευροτροφίνη με υψηλότερη συγγένεια (high affinity receptor).

Ο TrkA είναι υποδοχέας όπου προσδέεται ο NGF, ο TrkB είναι ο υποδοχέας όπου προσδέτετε ο BDNF και η NT-4, και ο TrkC είναι ο υποδοχέας της NT-3. Ωστόσο, η νευροτροφίνη NT-3 μπορεί επίσης να προσδεθεί στον TrkA και TrkB, αλλά με χαμηλότερη συγγένεια σε σχέση με τον TrkC και τους κύριους προσδέτες τους. Παρόμοια, η NT-4 προσδέτετε και στον TrkC, αλλά με χαμηλότερη συγγένεια (Neeta et al, 2001).

NEUROTROPHINS	RECEPTORS
• Nerve growth factor (NGF)	TrkA, p75 ^{NTR}
• Brain-derived neurotrophin factor (BDNF)	TrkB, p75 ^{NTR}
• Neurotrophin-4/5(NT-4/5)	TrkB, p75 ^{NTR}
• Neurotrophin -3(NT-3)	TrkC, p75 ^{NTR}

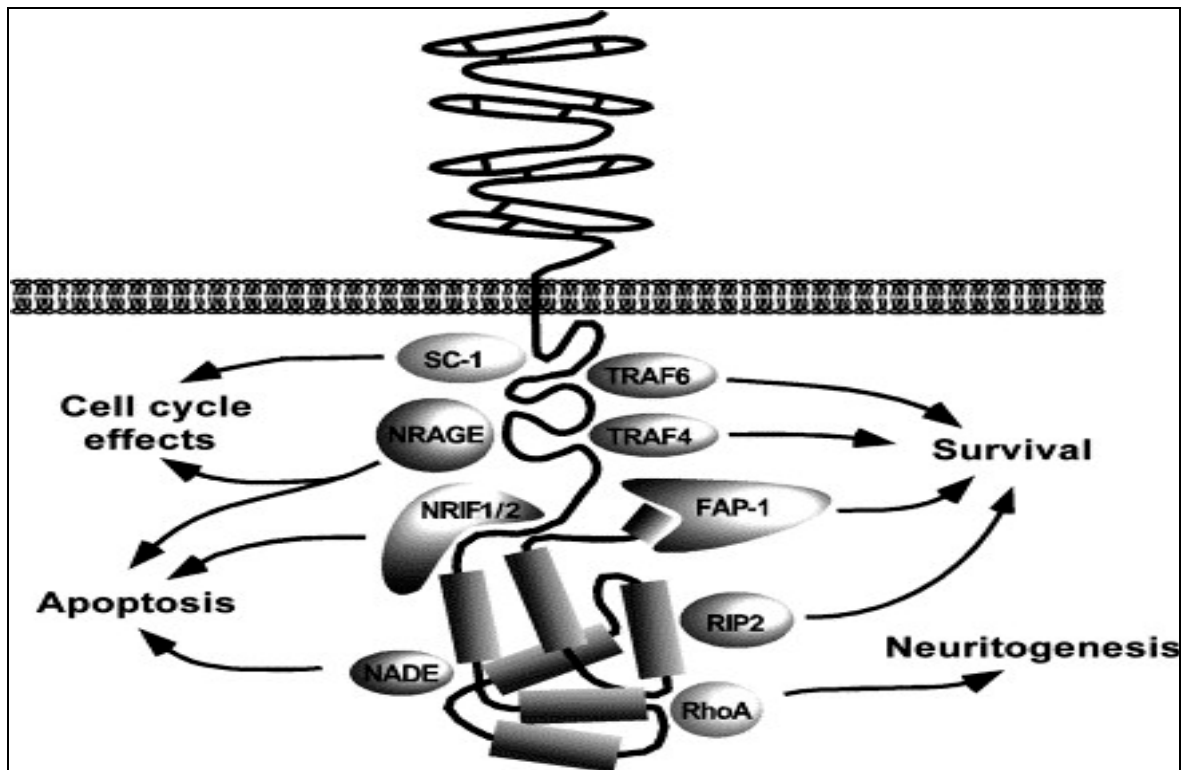
Πίνακας 1: Οι νευροτροφίνες και οι υποδοχείς τους

p75^{NTR}

Ο p75^{NTR} έχει μια εξωκυττάρια περιοχή με τέσσερις περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη αρνητικά φορτισμένες, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυττάρια περιοχή θανάτου (death domain) που είναι καλά συντηρημένη ανάμεσα στα είδη. Αν και ο p75^{NTR} δεν εμφανίζει ενδοκυττάρια ενζυμική δραστηριότητα, αλληλεπιδρά με πολλές πρωτεΐνες επάγοντας σημαντικά τη σηματοδότηση για τη ρύθμιση της νευρωνικής επιβίωσης, διαφοροποίησης και συναπτικής πλαστικότητας. Η εξωκυττάρια περιοχή του p75^{NTR} αποτελεί την περιοχή δέσμευσης των νευροτροφινών (Roux et al, 2002). Στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου παίζει ρόλο ο p75^{NTR} όταν διαντιδρά με διάφορες πρωτεΐνες. Σε πολλές περιπτώσεις, αυτές οι πρωτεΐνες είναι νέες και μέχρι σήμερα, η ταυτοποίησή τους τείνει να αυξήσει την πολυπλοκότητα γύρω από τον p75^{NTR} αντί να τοποθετηθούν εντός των καθορισμένων οδών σηματοδότησης (Kaplan et al, 2000)

Μερικές από αυτές τις πρωτεΐνες είναι:

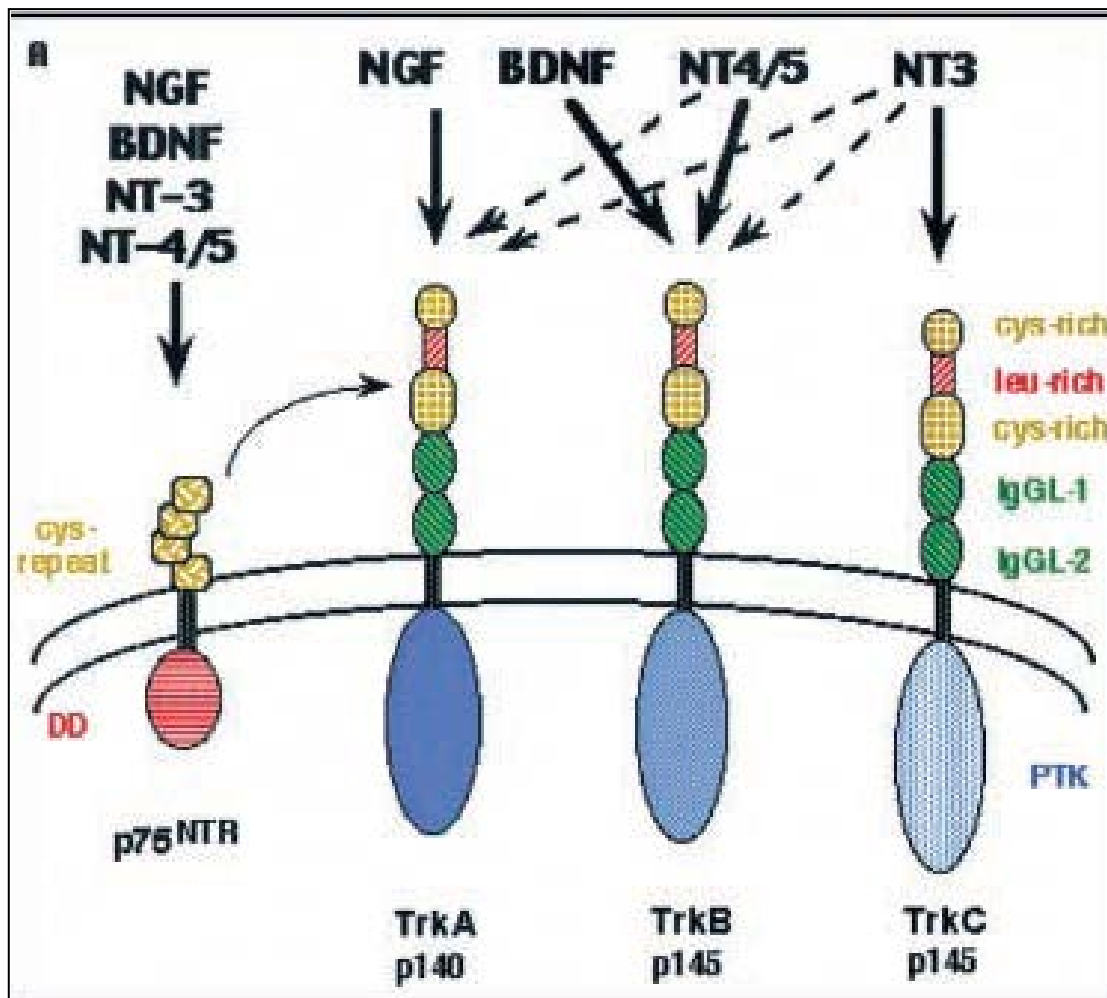
- TRAF (Tumor necrosis factor receptor-associated factor) είναι πρωτεΐνες προσαρμογείς που συνδέουν TNF υποδοχέα και μελών της υπερικογένειας του υποδοχέα ιντερλευκίνης στο JNK (c-Jun amino-terminal kinase) και NF-κB(nuclear factor-kappa B) μονοπατιών σηματοδότησης. Έξι TRAF πρωτεΐνες έχουν ταυτοποιηθεί σε θηλαστικά και αυτά έχουν εξεταστεί για την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με $p75^{NTR}$.
- RIP2 (Receptor-interacting protein-2) είναι μία πρωτεΐνη προσαρμογέας που περιέχει μια κινάση σερίνης / θρεονίνης και μια περιοχή πρόσληψης κασπάσης (Caspase Recruitment Domain, CARD), και δεσμεύεται με την περιοχή θανάτου του $p75^{NTR}$ στο NGF, μέσω της περιοχής CARD.
- Rho/RhoGDI όπου είναι μέρος μιας οικογένειας των μικρών GTPάσων που εμπλέκονται σε διάφορες πτυχές της νευρωνικής μορφογένεσης, συμπεριλαμβανομένης της μετανάστευσης, πολικότητα, νευραξονική αύξηση και καθοδήγηση, πλαστικότητα δενδρίτη και σχηματισμό συνάψεων, και έχει πρόσφατα βρεθεί να αλληλεπιδρά με τον ενδοκυτταρικό τομέα του $p75^{NTR}$.



Εικόνα 4: Αναπαράσταση διαφορετικών πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με $p75^{NTR}$.

Trk

Οι Trk υποδοχείς παρουσιάζουν ένα εξωκυτταριο τμήμα τους με τρεις περιοχές πλούσιες σε λεύκινη, ανάμεσα σε δυο περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη. Αυτές βρίσκονται, μια στο αμινοτελικό τους άκρο και οι άλλες κοντά σε δύο immunoglobulin-like περιοχές στο εγγύτερα της μεμβράνης τμήμα τους (Benito - Gutierrez et al, 2006). Οι Trk υποδοχείς αντιδρούν με τις νευροτροφίνες μέσω της δεύτερης immunoglobulin-like περιοχής ($IgGC_2$). Οι Trk υποδοχείς εμφανίζουν διαφορετική ειδικότητα έναντι των νευροτροφινών λόγω του διαφορετικού εξωκυττάριου τμήματός τους. Το ενδοκυττάριο τμήμα τους εμφανίζει δραστικότητα κινάσης τυροσίνης.



Εικόνα 5: Δομή των Trk υποδοχέων και του p75^{NTR}

TrkA

Ο υποδοχέας TrkA είναι μια διαμεμβρανική πολυπεπτιδική αλυσίδα και ανακαλύφθηκε ως μια ογκογονική πρωτεΐνη σύντηξης, η οποία απομονώθηκε από καρκίνωμα του παχέος εντέρου στον άνθρωπο. Γενετικές αναλύσεις έδειξαν ότι σε φυσιολογικά κύτταρα το πρώτο-ογκογονίδιο κωδικοποιεί μια γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη 140-kDa. Όπως αναφέραμε έχει δράση κινάσης τυροσίνης, αρχικά πραγματοποιείται πρόσδεση του NGF στον υποδοχέα, ακολουθεί διμερισμός αυτού, φωσφορυλιώνονται οι τυροσίνες του και στη συνέχεια φωσφορυλιώνονται και ενεργοποιούνται τα σηματοδοτικά μόρια που

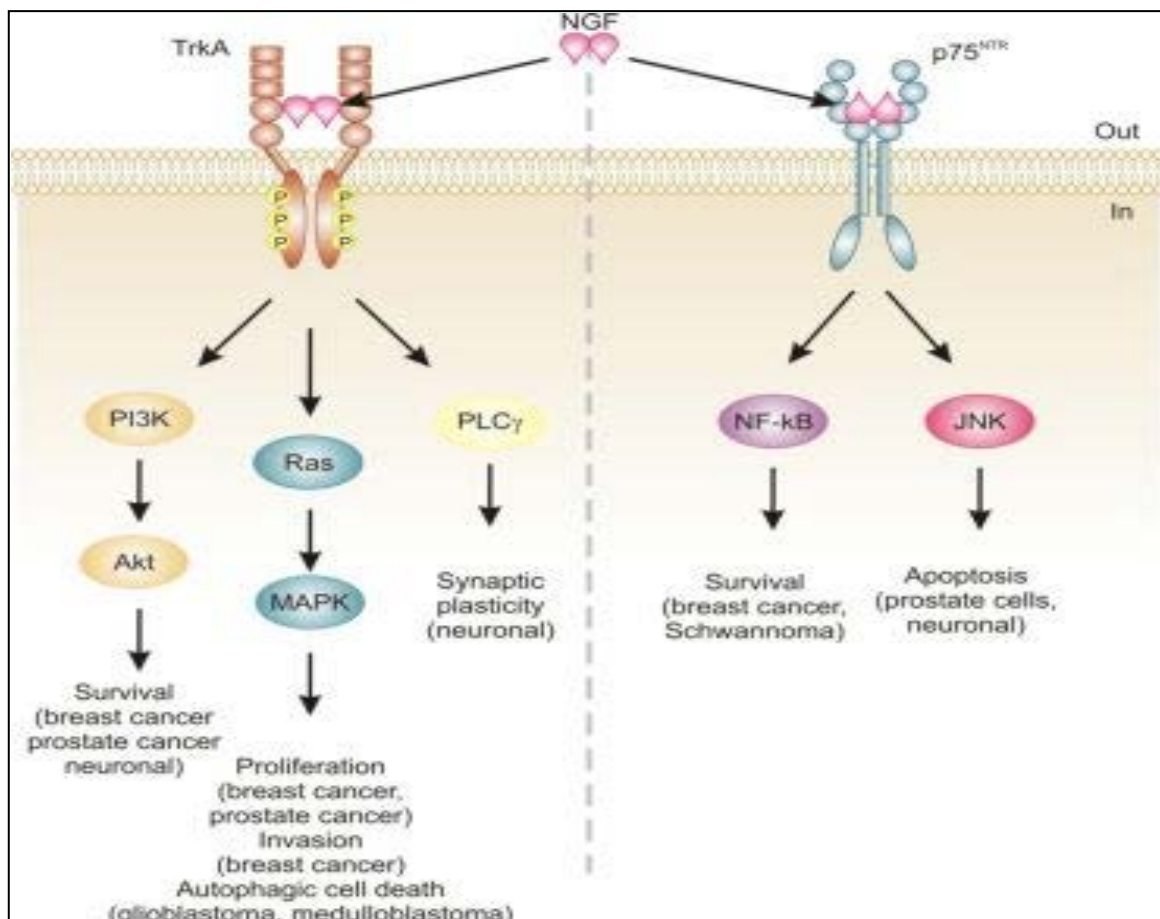
προσδένονται στον υποδοχέα TrkA. Κάθε φωσφορυλιωμένη τυροσίνη λειτουργεί ως ειδική θέση πρόσδεσης για μια διαφορετική ενδοκυττάρια σηματοδοτική πρωτεΐνη, η οποία μεταβιβάζει το σήμα στο εσωτερικό του κυττάρου. Μετά την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών πρωτεϊνών ακολουθούν τρεις διαφορετικές οδοί μεταγωγής σήματος με διαφορετικά ενδιάμεσα μόρια και διαφορετική έκβαση για το κύτταρο. Αυτές οι οδοί μεταγωγής σήματος περιλαμβάνουν το μονοπάτι της Ras/ERK (extracellular regulated kinase) κινάσης, της PI3K (phosphatidylinositol-3-OH kinase)/Akt κινάσης και της φωσφολιπάσης C- γ 1 (PLC- γ 1).

Ο ρόλος των νευροτροφινών στον καρκίνο.

Διαφορετικά μέλη νευροτροφινών εκφράζονται κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του καρκίνου, γεγονός που υποδηλώνει τη συμμετοχή τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κακοήθεια. Η πολυπλοκότητα αυτή τεκμηριώνεται περαιτέρω στην αλληλεπίδραση μεταξύ του κεντρικού νευρικού, ενδοκρινικού και ανοσοποιητικού συστήματος. Ο ρόλος του NGF και των υποδοχέων του, συμπεριλαμβανομένου της υψηλής συγγένειας υποδοχέα TrkA και της χαμηλής συγγένειας υποδοχέα, p75^{NTR} στον καρκίνο παραμένει αμφιλεγόμενη. Είναι αξιοσημείωτο ότι ο NGF ανακαλύφθηκε αρχικά από ένα σάρκωμα, ο TrkA ανακαλύφθηκε σε βιοψία ανθρώπινου καρκινώματος του παχέως εντέρου και ο p75^{NTR} ανακαλύφθηκε από μια ανθρώπινη κυτταρική σειρά μελανώματος. Επίσης είναι σημαντικό ότι ο NGF και οι υποδοχείς του έχουν ισχυρή προγνωστική αξία για τον καρκίνο του παγκρέατος (Dang et al, 2006, Zhu et al, 2001). Όλα αυτά τα γεγονότα συσχετίζονται έντονα και αιτιολογούν τη σημασία των νευροτροφινών στον καρκίνο (Levi-Montalcini, 1987, Chao et al, 1986, Klein et al, 1991, Hempstead et al, 1991).

Η σηματοδότηση των νευροτροφινών στην παθογένεση καρκίνου έχει συνδεθεί με την διέγερση της μιτογένεσης, της προώθησης της μετάστασης και ικανότητα εισβολής και αναστολή της απόπτωσης (Gschwind et al, 2004, Segal et al, 1996).

Επιπλέον η σηματοδότηση των νευροτροφινών στον καρκίνο παρέχει ένα παράδειγμα πώς οι ίδιες συνδέτη / υποδοχέα αλληλεπιδράσεις μπορούν να διεγείρουν διαφορετικά κυτταρικά αποτελέσματα ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου (Molloy et al, 2011).



Εικόνα 7: Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τον νευρικό αυξητικό παράγοντα (NGF). Ο NGF προσδένεται στον TrkA υποδοχέα, προάγει τον πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαφοροποίηση και την επιβίωση μέσω της ενεργοποίησης μονοπατιών της PI3K/Akt κινάσης, της Ras/MARK

(mitogen activated protein kinase) και της φωσφολιπάσης PLCγ. Ενώ η πρόσδεση του NGF στον υποδοχέα p75^{NTR} επιστρατεύει διάφορες πρωτεΐνες-προσαρμογείς, οι οποίες ενεργοποιούν NF-kB(nuclear factor-kB) και JNK (c-Jun N –terminal kinase) (Molloy et al, 2011).

Ο ρόλος των νευροτροφινών στους καρκίνους του προστάτη και παχέος εντέρου

Ο καρκίνος του προστάτη είναι σήμερα ο συχνότερος καρκίνος που διαγιγνώσκειτε στους άνδρες, αποτελεί την δεύτερη αιτία θανάτου από κακοήθεια μετά τον καρκίνο του πνεύμονος (Jemal et al, 2010). Κλινικές μελέτες δείχνουν μία αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης προστατικού καρκίνου με την πάροδο της ηλικίας (Bostwick et al, 2004). Είναι πιθανή επίσης μια γενετική προδιάθεση στην ανάπτυξη του προστατικού καρκίνου. Άνδρες με συγγενή πρώτου βαθμού με προστατικό καρκίνο έχουν 2-8% μεγαλύτερο κίνδυνο να τον αναπτύξουν και αυτοί, από ότι ο γενικός πληθυσμός. Έχουν επίσης μελετηθεί περιβαλλοντικοί και διαιτητικοί παράγοντες, η επαγγελματική απασχόληση, η κοινωνικοοικονομική στάθμη και διάφοροι λοιμωξιογόνοι παράγοντες χωρίς όμως να έχουν βρεθεί επαρκή στοιχεία για κανέναν από αυτούς.

Μετά το κεντρικό νευρικό σύστημα, ο προστάτης του ανθρώπου είναι η επόμενη πιο άφθονη πηγή του NGF, όπου παίζει ρόλο στην φυσιολογική ανάπτυξη του προστάτη (Murphy et al, 1984, Delsite et al, 1999, Thomson et al, 2002). Στρωματικά κύτταρα εκκρίνουν NGF που δεσμεύεται στους υποδοχείς TrkA και p75^{NTR} που υπάρχουν στα επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη διεγείροντας την ανάπτυξη τους. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι ο BDNF, που μπορεί να δεσμευτεί με το p75^{NTR}, έχει επίσης δειχθεί ότι

εκφράζεται από φυσιολογικό προστάτη στρωματικών κυττάρων (Dalal et al, 1997).

Η πρόοδος του καρκίνου του προστάτη συνοδεύεται με τροποποιήσεις στην έκφραση των νευροτροφινών, όπως του NGF, και στους υποδοχείς των νευροτροφινών. Η πιο εντυπωσιακή και σημαντική αλλαγή στο πλαίσιο αυτό είναι η μείωση της έκφρασης του $p75^{NTR}$ στα επιθηλιακά κύτταρα. Ενώ δεν υπάρχει καμία αλλαγή στην έκφραση του NGF ή TrkA, η επιθηλιακή στιβάδα επιδεικνύει μία μείωση στην έκφραση του $p75^{NTR}$ (Krygiel et al, 2001). Η έκφραση του $p75^{NTR}$ χάνεται κατά τη διάρκεια της προόδου του όγκου, ενδεχομένως υποδεικνύοντας ένα ογκοκατασταλτικό ρόλο για τον υποδοχέα $p75^{NTR}$ στον αδένα του προστάτη (Krygiel et al, 2002). Αυτή η υπόθεση πράγματι υποστηρίζεται από λειτουργικά δεδομένα. Έκφραση του $p75^{NTR}$ αύξησε την αδράνεια σε μια σειρά καρκινικών κυττάρων του προστάτη *in vitro* με έναν δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, ενώ η ρυθμιζόμενη έκφραση του συσχετίζεται με μια δοσο-εξαρτώμενη αύξηση στην καρκινική κυτταρική απόπτωση (Delsite et al, 1999).

Σε αντίθεση με τις επιδράσεις του $p75^{NTR}$, οι υποδοχείς Trk φαίνεται να εμπλέκονται σε κακοήγη πρόοδο καθώς τα επίπεδα τους φαίνεται να αυξάνουν με την αύξηση κακοήθειας του καρκίνου του προστάτη. Μοντέλα τρωκτικών έχουν δείξει ότι η αναστολή της σηματοδότησης των trk υποδοχέων μέσω του μικρού μορίου αναστολέα trk επάγει τον αποπτωτικό θάνατο των κακοηθών κυττάρων του προστάτη (Rende et al, 2010).

Στον καρκίνο του παχέος εντέρου γνωρίζουμε ότι ο νευροτροφικός παράγοντας BDNF (brain derived neurotrophin factor) οδηγεί σε ενεργοποίηση της συμπαθητικής νεύρωσης του λευκού λιπώδους ιστού, η οποία με τη σειρά της μέσω των β-αδρενεργικών υποδοχέων οδηγεί σε καταστολή της έκφρασης λεπτίνης και έκκρισης. Αυτή η αισθητή μείωση λεπτίνης στα επίπεδα ορού

μπορεί να έχει θεραπευτική σημασία για την πρόληψη καρκίνου του παχέος εντέρου (Cao et al, 2010).

Επιπλέον, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο νευρικός αυξητικός παράγοντας-NGFI-BA, γνωστός ως Nur77, ο οποίος είναι ένας ορφανός πυρηνικός υποδοχέας με αγνώστους ενδογενείς συνδέτες, εκφράζεται σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου (RKO, HCT-116, SW480, HCT15). Παρατηρείται ότι ο Nur 77 υπερεκφράζεται σε όγκους παχέος εντέρου σε σύγκριση με φυσιολογικό ιστό παχέος εντέρου (Cho et al, 2007). Nur77 αγωνιστές επάγουν την πρωτεΐνη παράγοντα νέκρωσης όγκου (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) σε RKO κύτταρα, τα οποία είναι καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου, και έχει χρησιμοποιηθεί αυτή η κυτταρική σειρά ως ένα μοντέλο για να διερευνηθούν οι επιδράσεις των Nur77 αγωνιστών [DIM-C-pPhOCH₃ (1,1-bis(3'-indolyl)-1-(p-anisyl)methane) και DIM-C-Ph(1,1-bis(3'-indolyl)-1-(phenyl)methane)]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι Nur77 αγωνιστές αναστέλλουν την ανάπτυξη και επάγουν την απόπτωση μέσω της πρωτεΐνης TRAIL των RKO κυττάρων, και αυτές οι δράσεις αναστέλλονται από ένα μικρό ανασταλτικό RNA για Nur77 (iNur77). Ο DIM-C-pPhOCH₃ αναστολέας εμποδίζει την ανάπτυξη του όγκου σε αθυμικούς γυμνούς ποντικούς τα οποία φέρουν ξενομοσχεύματα RKO κυττάρων. Μελέτες κυτταροκαλλιέργειων δείχνουν επίσης ότι το DIM-C-pPhOCH₃ επάγει τα προ-αποπτωτικά γονίδια, συμπεριλαμβανομένων των *programmed cell death gene 1* (PDCD1-Nur77 dependent), *cystathionase γ-lyase* (CSE) και *activating transcription factor 3* (ATF3-Nur77 independent). Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που αποδεικνύει ότι το Nur77 υπερεκφράζεται σε ανθρώπινους όγκους και ότι Nur77-ενεργό με C-DIMs ενώσεις επάγουν απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου, και αντιπροσωπεύουν μία νέα κατηγορία φαρμάκων κατά του καρκίνου παχέος εντέρου μέσω πυρηνικών μονοπατιών(Cho et al, 2007).

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΩΤΗΜΑ

Η ανάπτυξη ενός όγκου επιτυγχάνεται με την αναστολή του κυτταρικού θανάτου, η οποία εξαρτάται εν πολλοίς από την υποδεκτικότητα του όγκου σε παρακρινείς δράσεις αυξητικών παραγόντων κι ορμονών. Είναι γνωστό ότι τα ανδρογόνα στεροειδή, όπως η Τεστοστερόνη και η DHEA, μπορούν να ενισχύουν ή να μειώνουν τον κίνδυνο καρκίνου του προστάτη και του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Έχουμε πρόσφατα δείξει ότι η Τεστοστερόνη εμφανίζει προ-αποπτωτικές δράσεις σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη και του παχέος εντέρου, μέσω μηχανισμών που εκκινούν από την κυτταρική μεμβράνη (Papadopoulou et al, 2008, Gu et al, 2008, 2011). Επιπροσθέτως, έχουμε δείξει ότι η Διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) μπορεί να ενεργοποιήσει τους υποδοχείς TrkA και p75^{NTR} του Νευρικού Αυξητικού Παράγοντα (NGF) σε νευρικά κύτταρα και στα καρκινικά κύτταρα PC12 (Lazaridis et al, 2011). Ο NGF επίσης εμπλέκεται ενεργά στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων.

Βάσει των προαναφερθέντων δεδομένων, το ερευνητικό ερώτημα της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση των επιδράσεων των ορμονών Τεστοστερόνης και Διϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA) στον κυτταρικό θάνατο των αποπτωτικών κυττάρων. Μελετήθηκε η δράση τους σε σχέση με τον νευρικό αυξητικό παράγοντα (NGF) και τους υποδοχείς του, συγκεκριμένα τους TrkA και p75^{NTR}, σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη και του παχέος εντέρου.

Τα κυτταρικά μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι καρκινικές κυτταρικές σειρές του προστάτη DU145 και του παχέος εντέρου CaCO2.

Οι στόχοι της παρούσας εργασίας είναι:

1. Η μελέτη της επίδρασης της DHEA και της Τεστοστερόνης στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων DU145 και CaCO2.
2. Επιπλέον εξετάστηκε η δράση των DHEA (και NGF) από την ταυτόχρονη χορήγηση Τεστοστερόνης και στις δύο καρκινικές σειρές.

3. Η ανίχνευση και η μέτρηση των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων του νευρικού αυξητικού παράγοντα (NGF), TrkA και p75^{NTR} και στις δυο καρκινικές κυτταρικές σειρές του μετά από επώαση τους με τις στεροειδείς ορμόνες.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι οι TrkA και / ή p75^{NTR} μπορεί να είναι οι βασικοί υποδοχείς στις επιδράσεις των DHEA και / ή της τεστοστερόνης στην απόπτωση, χρησιμοποιήσαμε ειδικούς αναστολείς για να αξιολογήσουμε τον ακριβή ρόλο αυτών των υποδοχέων σε επιδράσεις των στεροειδών. Οποτε το επόμενο τελικό ερώτημα σε συμφωνία με τα παραπάνω ήταν:

4. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων TrkA και p75^{NTR} από τα δυο αυτά στεροειδή και συγκεκριμένα :

- η φωσφορυλίωση του υποδοχέα TrkA
- Η αλληλεπίδραση του υποδοχέα p75^{NTR} με τους τελεστές του, RIP2 και RhoGDI.

Σκοπός είναι να συσχετισθεί η δράση των σημαντικών αυτών ορμονών του καρκίνου με τους επίσης σημαντικούς ρόλους των αυξητικών παραγόντων και πως τελικά οι αλληλεπιδράσεις αυτές ελέγχουν χωροχρονικά την εξέλιξη ή την αναστολή ενός καρκίνου.

Η παρούσα μελέτη αποκαλύπτει νέους μηχανισμούς δράσεις των στεροειδών και αυξητικών παραγόντων για τον καρκίνο, με στόχο την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών σχημάτων.

ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ

Η κυτταρική σειρά DU145 προέρχεται από την American Type Culture Collection (ATCC, MANASSAS VA, USA). Η κυτταρική σειρά LNCaP προέρχεται από την German Collection of Microorganics and Cell Cultures (Braunschweig, Germany). Τέλος, η κυτταρική σειρά CaCO2 προέρχεται από την American Type Culture Collection (ATCC, MANASSAS VA, USA).

Για την καλλιέργεια των κυττάρων DU145 και LNCaP χρησιμοποιήθηκαν ως θρεπτικό μέσο καλλιέργειας RPMI 1640 (2mM-glutamine και 25mM HEPES), ενώ για την καλλιέργεια των κυττάρων CaCO2 χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό DMEM (4.5g/L Glucose, L-glutamine και 25mM HEPES), ορός εμβρύου βόου (FBS) από την εταιρεία Invitrogen-Gibco (Carlsbad CA, USA), αντιβιοτικό διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης από την Gibco (Carlsbad CA, USA) και η τρυψίνη ήταν από την εταιρεία Biochrom KG (Berlin, Germany).

Το ανάλογο της τεστοστερόνης που έχει σταθερά δεσμευμένη την ομάδα της Αλβουμίνης Ανθρώπινου Ορού (Human Serum Albumin, HSA), Τεστοστερόνη-HSA, είναι ευγενική χορηγία της εταιρείας Medexis AEBE. Το νευροστεροειδές διϋδροεπιανδροστερόνη, DHEA, από την Sigma Aldrich, και ο νευρικός αυξητικός παράγοντας, NGF, είναι από την εταιρεία Invitrogen Inc., MD, USA.

Για τις παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων με πλασμίδια χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Turbofect 2000 της εταιρείας Fermentas, Germany.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα απόπτωσης, ανοσοαποτύπωσης και ανοσοκατακρήμνισης είναι: TrkA των εταιρειών Cell signaling (MA, USA) και Upstate (USA), p75^{NTR} των Promega (USA) και

Millipore (USA), p-Tyr της Santa Cruz Biotechnology Inc., RIP2 της Enzo Life Sciences (NY, USA), RhoDGI της εταιρείας Sigma (St. Louis, MO, USA), ERK1/2 και phospho-ERK1/2 της εταιρείας Cell Signaling (MA, USA), FAK της Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) και το αντίσωμα της ακτίνης (actin) είναι από την εταιρεία της Chemicon International (CA, USA). Τα IgG κατά αντιορού ποντικού (anti-mouse-HRP) ή κουνελιού (anti-rabbit-HRP) σημασμένα με υπεροξειδάση (Horseradish Peroxidase, HRP) που χρησιμοποιήθηκαν ως δεύτερα αντισώματα ανάλογα με την προέλευση των πρώτων αντισωμάτων, είναι από τις εταιρείες Chemicon (USA) και Sigma (St. Louis, MO, USA) αντίστοιχα. Τα σφαιρίδια αγαρόζης προσδεμένα σε πρωτεΐνη G (G-protein PLUS-agarose beads) που χρησιμοποιήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση προέρχονται από την εταιρεία Santa Cruz Biotechnology Inc.(CA, USA), ενώ τα σφαιρίδια σεφαρόζης προσδεμένα σε πρωτεΐνη A (protein –A-sepharose beads) είναι από την Amersham Biotech (USA).

Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών σε φιλμ, χρησιμοποιήθηκαν ECL (Western Blotting detection kit), φιλμ υψηλής ευαισθησίας Hyperfilm ECL και κασέτα εμφάνισης φιλμ της εταιρείας Amersham Biosciences (UK).

Για το προσδιορισμό της απόπτωσης χρησιμοποιήθηκαν: α) το APOPercentage apoptosis assay της Biocolor Ltd. (Belfast, Ireland) και β) το Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit I της εταιρείας BD Pharmigem TM (San Diego, CA, USA).

ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Καλλιέργεια κυττάρων

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα κυτταρικά μοντέλα:

- 1) η επιθηλιακή καρκινική σειρά του προστάτη DU145 που προέρχεται από εγκεφαλική μετάσταση αδενοκαρκινώματος του προστάτη.
- 2) η επιθηλιακή καρκινική σειρά του προστάτη LNCaP που προέρχεται από μετάσταση ενός προστατικού αδενοκαρκινώματος στους λεμφαδένες.
- 3) η επιθηλιακή καρκινική σειρά του πάχους εντέρου CaCO2 που προέρχεται από αδενοκαρκίνωμα πάχους.

Όλες οι κυτταρικές σειρές διατηρούνται σε μονοστοιβάδες μέσα σε πλαστικές φλάσκες επιφάνειας 75cm², σε επωαστήρα (Forma Scientifica, Ohio, USA) με υγρή ατμόσφαιρα συστάσεως 5% CO₂, 95% αέρας και 37°C θερμοκρασία. Το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ανανεώνεται κάθε 48 ώρες ή 72 ώρες. Για την καλλιέργεια των κυττάρων DU145 και LNCaP χρησιμοποιείται ως θρεπτικό μέσο καλλιέργειας RPMI 1640 που περιέχει 2mM L-γλουταμίνη και 25mM HEPES, ενώ για την καλλιέργεια των κυττάρων CaCO₂ χρησιμοποιείται το θρεπτικό υλικό DMEM που περιέχει 5g/L γλυκόζη, L-γλουταμίνη και 25mM HEPES, εμπλουτισμένα και τα δυο είδη θρεπτικών με 10% αδρανοποιημένο (μέσω θέρμανσης στους 56°C για 30 λεπτά) ορό εμβρύου βόου (FBS) με προσθήκη αντιβιοτικών 1% διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης. Για την ανακαλλιέργεια, όταν οι καλλιέργειες φτάνουν σε πλήρη ανάπτυξη (100% πληρότητα στην επιφάνεια καλλιέργειας), εκτίθονται σε διάλυμα τρυψίνης

(0.25% τρυψίνη, 5mM EDTA σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS (1.8 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl , 2.7 mM KCl , PH: 7.2) για 2-5 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα παραλαμβάνονται με θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και μοιράζονται σε νέες φλάσκες στην επιθυμητή αραιώση και σύμφωνα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος. Πριν από την επίδραση των διαφόρων ουσιών τα κύτταρα καλλιεργούνται για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού με εξαίρεση τα πειράματα που αφορούν στην διερεύνηση του κυτταρικού θανάτου. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σε εύρος δέκα γενεών από τη στιγμή απόψυξης και εισαγωγής των κυττάρων σε καλλιέργεια.

Η διατήρηση των κυττάρων στο εύρος αυτό των γενεών (passage) έγινε με κατάψυξη τους σε τακτά χρονικά διαστήματα. Συγκεκριμένα κυτταρικό αιώρημα (1×10^6 κύτταρα/ml σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας) συμπληρώνεται με 5% DMSO (Sigma, USA) και κλάσματα του 1 ml τοποθετούνται αμέσως σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσονται στους -80°C . Για την απόψυξη των κυττάρων, ένα από τα κατεψυγμένα κλάσματα θερμαίνεται στους 37°C και αμέσως μετά φυγοκεντρείται σε 1500 rpm για 5 λεπτά. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας και ακολουθεί η καλλιέργεια τους όπως περιγράφεται παραπάνω.

2.Παροδική επιμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλάκες 12 οπών σε συγκέντρωση 50.000-70.000 κύτταρα/οπή και για 12-16 ώρες πριν την επιμόλυνση σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας χωρίς αντιβιοτικό. Η επιμόλυνση των κυττάρων γίνεται με την χρήση του αντιδραστηρίου Turbofect 2000. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο αναμιγνύονται 2μg DNA ανά οπή με 100 μl θρεπτικό υλικό RPMI 1640 για τα

καρκινικά κύτταρα DU145 και LNCaP ή DMEM για τα καρκινικά κύτταρα CaCO₂. Σε ένα δεύτερο αποστειρωμένο σωληνάριο αναμιγνύονται 100 μl θρεπτικό υλικό RPMI 1640 (ή DMEM) με 4 μl Turbofect 2000. Τα περιεχόμενα των δυο σωληνάρων αναμιγνύονται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Στο μίγμα προστίθενται 800 μl θρεπτικό υλικό με το οποίο τελικά επωάζονται τα κύτταρα για 4 ώρες στους 37°C. Μετά την πάροδο των 4 ωρών προστίθεται 1 ml/οπή θρεπτικού μέσου καλλιέργειας συμπληρωμένο με 10% FBS χωρίς αντιβιοτικά. Την επόμενη μέρα απομακρύνεται το θρεπτικό που περιέχει DNA-Turbofect και τα κύτταρα επωάζονται με το θρεπτικό μέσο που εξυπηρετεί την επιλεγμένη πειραματική διαδικασία που θα ακολουθήσει για επιπλέον 24 ώρες.

3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε συνθήκες SDS-αποδιάταξης (SDS-PAGE)

Η διαδικασία περιλαμβάνει την προετοιμασία δειγμάτων, τα στάδια παρασκευής πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου, η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων και η μεταφορά των πρωτεϊνών στην νιτροκυτταρίνη από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Στην συνέχεια η νιτροκυτταρίνη επωάζεται με το αντίστοιχο πρώτο και δεύτερο αντίσωμα και τέλος ακολουθεί εμφάνιση σε φιλμ υψηλής ευαισθησίας.

3.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Στα πρωτεϊνικά δείγματα προστίθεται ίσος όγκος 2X αποδιατακτικού διαλύματος, Sample buffer: 0.125M Tris-HCl, pH:6.8, 4% w/v SDS, 0.57M β-μερκαπτοαιθανόλη, 1%v/v γλυκερόλη, 0.02%w/v bromophenol blue και ακολουθεί θέρμανση στους 95°C για 5 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η πλήρης

μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών και η κάλυψη τους από μόρια SDS έχει σαν συνέπεια η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα μέσα στο πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης να εξαρτάται μόνο από το μοριακό βάρος με αποτέλεσμα το διαχωρισμό τους κατά μήκος του πηκτώματος.

3.2 Προετοιμασία πηκτώματος

Για την προετοιμασία των πηκτωμάτων αναμιγνύονται όλα τα συστατικά του διαλύματος, πήκτωμα διαχωρισμού (running gel) εκτός APS (διάλυμα υπερθειικού Αμμωνίου) και TEMED, τα οποία λειτουργούν ως καταλύτες για την έναρξη και την διατήρηση του πολυμερισμού αντίστοιχα, οπότε προστίθενται λίγο πριν την έκχυση. Το πήκτωμα εκχύνεται στον κενό χώρο που δημιουργείται μεταξύ δυο γυάλινων πλακών που διαχωρίζονται με κομμάτια πλαστικού (spacers) πάχους 1.5mm. Αρχικά εκχύνεται το πήκτωμα διαχωρισμού (running gel: όγκος διαλύματος πολυακρυλαμιδίου ανάλογα με την επιθυμητή πυκνότητα 10%w/v (ή 12%w/v) , 0.375M Tris-HCl, pH: 8.8, 0.1%w/v SDS, 0.1%w/v APS, 0.03%v/v TEMED) και αφού πολυμεριστεί προστίθεται το πήκτωμα επιστοιβάξης (stacking gel: 4.5%w/v διάλυμα πολυακρυλαμιδίου, 0.125M Tris-HCl, pH:6.8, 0.1%w/v SDS, 0.1%w/v APS, 0.05%v/v TEMED) μέσα στο οποίο τοποθετείται το <<χτένι>> για το σχηματισμό θέσεων (πηγάδια). Αφού πολυμερισθεί και το πήκτωμα επιστοιβάξης, το <<χτένι>> αφαιρείται και τα δείγματα τοποθετούνται με σύριγγα Hamilton στις θέσεις που έχουν δημιουργηθεί.

3.3 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων

Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων γεμίζουμε τα δοχεία των ηλεκτροδίων της συσκευής (Biorad) με διάλυμα ηλεκτροφορησης 1X (διάλυμα ηλεκτροφορησης 10X: 1.92M γλυκίνης, 0.25M Tris-HCl, 1% w/v SDS, pH:8.3). Τα δείγματα κινούνται αρχικά σε σταθερή τάση 80V έως ότου να εισέλθουν στο πήκτωμα διαχωρισμού, όπου η τάση αυξάνεται στα 130V και παραμένει σταθερή μέχρι το τέλος της ηλεκτροφόρησης.

4. Ανοσοστύπωση (Western Blot)

4.1 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης από πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

Για την μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης συναρμολογείται το <<σάντουιτς>> μεταφοράς ως εξής: μεταξύ δύο σφουγγαριών της συσκευής τοποθετούνται κατά σειρά ένα χαρτί Whatman, το πήκτωμα, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και μετά δεύτερο χαρτί Whatman. Το <<σάντουιτς>> τοποθετείται στην ειδική συσκευή μεταφοράς των πρωτεϊνών (Biorad) στην οποία έχει ήδη τοποθετηθεί το διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer: 10% v/v διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10X, 10% v/v μεθανόλη) με το πήκτωμα προς την κάθοδο. Εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο 400mA για 1-1½ ώρα. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς το διάλυμα διατηρείται στους 4° C.

- *Anti-p75* 1:1000 σε TBS-T, 1ώρα RT
- *Anti-Erk1/2* 1:500 σε TBS-T, 1ώρα RT
- *Anti-phospho Erk1/2* 1:500 σε TBS-T, 1ώρα RT
- *Anti-FAK* 1:1000 σε TBS-T, 1ώρα RT

Ακολούθως η μεμβράνη εκπλένεται 3 φορές, όπως αναφέρεται παραπάνω και επώάζεται με το δεύτερο αντίσωμα στην κατάλληλη αραίωση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Συγκεκριμένα τα δεύτερα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- *Anti-mouse-HRP* 1:1000 σε TBS-T
- *Anti-rabbit-HRP* 1:20.000 σε TBS-T

Στην συνέχεια η μεμβράνη εκπλένεται 3 φορές όπως περιγράφεται παραπάνω και επώάζεται με το αντιδραστήριο εμφάνισης ECL για 1 λεπτό. Ακολουθεί η έκθεση στο φιλμ, όπου το χρονικό διάστημα της έκθεσης ποικίλει ανάλογα με την πρωτεΐνη. Η μέτρηση της έντασης της κάθε μάντας γίνεται με την χρήση Image Analysis Inc.(Canada).

4.3 Αφαίρεση αντισωμάτων για την επανάληψη της ανοσοανίχνευσης (Stripping)

Σε πολλές περιπτώσεις είναι αναγκαίο να γίνει ανίχνευση περισσότερων από μια πρωτεϊνών στην ίδια νιτροκυτταρίνη. Αυτό γίνεται με επώαση της μεμβράνης για 30 λεπτά στους 50°C με το διάλυμα αφαίρεσης (stripping

buffer: 62.5mM Tris-HCl, pH: 6.7, 2% w/v SDS, 100mM β-μερκαπτοαιθανόλη). Ακολουθούν 2 εκπλύσεις των 10 λεπτών με TBS-T και ακολουθείται η διαδικασία ανοσοανίχνευσης πρωτεϊνών όπως περιγράφεται παραπάνω.

5. Μέτρηση ολικών πρωτεϊνών μετά την λύση των κυττάρων

Για τον προσδιορισμό ολικών πρωτεϊνών στα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιείται το σύστημα DC Bio-rad protein assay (Bio-rad Laboratories CA, USA), το οποίο βασίζεται στην τεχνική Lowry (Lowry et al, 1951). Συγκεκριμένα 10 μl από κάθε δείγμα τοποθετούνται σε σωληνάρια erpendorf όπου προστίθενται 190ml νερό. Τα δείγματα φτιάχνονται εις διπλούν προκειμένου να γίνει ακριβέστερος υπολογισμός των ολικών πρωτεϊνών. Το τυφλό δείγμα περιλαμβάνει αντί της ποσότητας του κυτταρικού εκχυλίσματος 10 μl διαλύματος λύσης. Προστίθεται ακολούθως 100 ml από διάλυμα που περιλαμβάνει: 20 μl Bio-rad S σε 1 ml Bio-rad A και προστίθεται 800 ml διάλυμα Bio-rad B. Τα δείγματα επώάζονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Γίνεται μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων στο φωτόμετρο σε μήκος κύματος 750 nm. Οι τιμές της οπτικής πυκνότητας ανάγονται από την πρότυπη καμπύλη σε μικρογραμμάρια ολικής πρωτεΐνης.

6. Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων ολικών κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλάκες 6 οπών ή σε τρυβλία διαμέτρου 60mm. Μετά την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας και την έκπλυση

των κυττάρων 2 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (1.8mM KH_2PO_4 , 8mM Na_2HPO_4 , 137mM NaCl, 2.7mM KCl, pH: 7.2) ή με διάλυμα TBS-T (20mM Tris-HCl, pH:7.6, 137mM NaCl, 0.1% v/v Tween-20) τα κύτταρα λύνονται σε 500-1000 μl (ανάλογα τον αριθμό των κυττάρων και την επιθυμητή τελική συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών στο δείγμα) σε ρυθμιστικό διάλυμα 1% Nonidet lysis buffer (1% Nonidet P-40, 20mM Tris, pH: 7.4, 137mM NaCl, 25mM NaF, 1mM PMSF, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 1mM Na_3VO_4). Το κυτταρικό εκχύλισμα αναδεύεται για 15 λεπτά στους 4°C και στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε επιτραπέζια φυγόκεντρο για 10 λεπτά στις 12.000 rpm στους 4°C. Στο υπερκείμενο, το οποίο περιέχει τις πρωτεΐνες, αφού γίνει ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών όπως περιγράφεται παραπάνω χρησιμοποιείται άμεσα για την προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφορηση και Western Blot είτε φυλάσσεται στους -80°C για μετέπειτα χρήση.

7. Κλασματοποίηση πρωτεϊνών μέσω εκχύλισης των κυττάρων με Triton X-100: απομόνωση των διαλυτών και αδιάλυτων σε Triton X-100 κλασμάτων

Η απομόνωση των δυο κλασμάτων με Triton X-100, του διαλυτού (που περιλαμβάνει τη μονομερή ακτίνη) και του αδιάλυτου (που περιλαμβάνει την πολυμερή ακτίνη), γίνεται σύμφωνα με την μέθοδο των Golenhofen (Golenhofen et al, 1995). Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλάκες 6 οπών. Μετά τις κατάλληλες επώσεις ανάλογα με τον σκοπό του πειράματος με NGF ή/και DHEA σε τελική συγκέντρωση 100ng/ml και 10^{-7}M αντίστοιχα, απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και τα κύτταρα εκπλενονται 2 φορές με PBS. Ακολουθεί εκχύλιση των κυττάρων στον πάγο με 500 μl διαλύματος εκχύλισης

(0.3% Triton X-100, 5mM Tris-HCl, pH:7.4, 2mM EGTA, 300 μ M σουκρόζη, 400 μ M PMSF, 2 μ M φαλλοϊδίνη, 10 μ M λευπεπτίνη) για 5 λεπτά. Στη συνέχεια το διαλυτό σε Triton X-100 πρωτεϊνικό κλάσμα (Triton soluble fraction, TS) μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο όγκου 1.5ml και οι πρωτεΐνες κατακρημνίζονται με την προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος υπερχλωρικού οξέος 6% (Perchloric acid, PCA). Το αδιάλυτο σε Triton X-100 πρωτεϊνικό κλάσμα (Triton insoluble fraction, TI), το οποίο παραμένει στο τρυβλίο μετά την απομάκρυνση του διαλύματος εκχύλισης, λαμβάνεται με απόξεση με την βοήθεια πλαστικού ξέστρου μέσα σε 1ml διαλύματος PCA 3%. Τα ιζήματα που προκύπτουν μετά από φυγοκέντρηση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο στις 12.000 rpm για 10 λεπτά επαναδιαλύονται σε 100 ή 200 μ l διαλύματος NaOH 0.1N. Ίσοι όγκοι από το κάθε κλάσμα χρησιμοποιείται για ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση.

8. Προσδιορισμός επιπέδων έκφρασης υποδοχέων (TrkA και p75^{NTR}) του Νευρικού Αυξητικού Παράγοντα (NGF)

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλάκες 12 οπών σε συγκέντρωση 200.000 κύτταρα ανά οπή. Προ-επωάζονται ανάλογα με τον σκοπό του πειράματος με NGF 100 ng/ml, DHEA 10^{-7} M και Testosterone-HSA 10^{-7} M για 24 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης συλλέγονται με φυγόκεντρηση σε 12.000 rpm στους 4°C και επωάζονται με 50 μ l πρώτου αντισώματος έναντι του TrkA (Cell signaling) ή/και p75^{NTR} (Promega) για 30 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια αφού εκπλυθούν τρεις φορές με παγωμένο διάλυμα PBS (1.8mM KH₂PO₄, 8mM Na₂HPO₄, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, PH: 7.2), επωάζονται με 50 μ l δεύτερου αντισώματος κατά αντιορού κουνελιού σημασμένο με φυκοερυθρίνη (anti-rabbit-R-phycoerythrin conjugated) ή/και κατά αντιορού ποντικού σημασμένο

με φλουορεσκίνη (anti-mouse –fluorescein conjugated) για 30 λεπτά στον πάγο. Ακολουθούν 2 πλύσεις των 2 λεπτών με PBS και επαναδιαλύονται σε 500 μl του παραπάνω ρυθμιστικού διαλύματος (PBS) και τα δείγματα εξετάζονται εντός 1 ώρας με την βοήθεια FACSArray Apparatus (BD, Franklin Lakes, NJ).

9. Προσδιορισμός απόπτωσης

9.1 Μέθοδος Apopercantage

Η μέτρηση της κυτταρικής απόπτωσης γίνεται με την βοήθεια της μεθόδου Apopercantage (Apopercantage Apoptosis assay kit, Biocolor Ltd, UK) σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευαστικής εταιρείας. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην χρώση των αποπτωτικών κυττάρων με ειδική ουσία που σημαίνει τη φωσφατιδυλοσερίνη της κυτταρικής μεμβράνης στην εξωκυττάρια επιφάνεια μετά την αναστροφή και μεταφορά του φωσφολιπιδίου από το εσωτερικό στο εξωτερικό στρώμα λιπιδίων στα αποπτωτικά κύτταρα (membrane flip-flop event).

Στα πειράματα που έγιναν, μελετήθηκε η χρόνο-εξαρτώμενη και δοσό-εξαρτώμενη επίδραση των ανδρογόνων και νευροστεροειδών στο φαινόμενο της απόπτωσης.

Το πειραματικό μέρος της μεθόδου στηρίζεται στην καλλιέργεια των κύτταρων σε πλάκες 96 οπών σε συγκέντρωση 50.000-70.000 κύτταρα ανά οπή. Η χρωστική που χρησιμοποιείται έχει ένα ισχυρό κόκκινο χρώμα, έτσι ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση των κυττάρων και η φωτογράφιση τους ακόμα και με ένα κοινό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης. Ο προτεινόμενος χρόνος παραμονής της χρωστικής στα κύτταρα είναι μίση ώρα. Τα κύτταρα επώαστηκαν ανάλογα με τον σκοπό του πειράματος με NGF και DHEA

απουσία ορού (serum free) σε τελική συγκέντρωση 100ng/ml και 10^{-7} M αντίστοιχα για 12 ή 24 ώρες. Σε παρουσία ορού (serum) τα κύτταρα επώαστηκαν με Testosterone-HSA σε τελική συγκέντρωση 10^{-7} M για 12 ή 24 ώρες. Στα πειράματα που ελέγχθηκε η απόκριση των κυττάρων σε βαθμίδωση συγκεντρώσεων των στεροειδών Testosterone-HSA και DHEA, τα συγκεκριμένα διαλύονται και πάλι σε θεραπευτικό υλικό παρουσία ορού και απουσία ορού αντίστοιχα σε συγκεντρώσεις από 10^{-4} M έως 10^{-11} M.

Τα αποπτωτικά κύτταρα χρώζονται κόκκινα ενώ τα ζώντα κύτταρα παραμένουν λευκά. Τελικώς, τα κύτταρα εκπλένονται με Dye Release Reagent (παρέχεται από το kit), το οποίο εκλύει την χρωστική από τα κύτταρα και έπειτα μετράται σε μήκος κύματος $\lambda=550\text{nm}$ σε φωτόμετρο πλακών Elisa Reader που διαθέτει αντίστοιχο φίλτρο.

9.2 Κυτταρομετρία Ροής (FACS Analysis)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται στον διαχωρισμό κυττάρων σε ομάδες με κοινά χαρακτηριστικά, όπως το μέγεθος, ο όγκος και το δυναμικό ή το pH των κυττάρων (φυσικοχημικές ιδιότητες). Επίσης, χρησιμοποιείται για την κατάταξη των κυττάρων σε πρωτεΐνες, ένζυμα ή νουκλεϊκά οξέα, ανάλογα με το κυτταρικό περιεχόμενο. Ο κυτταρομετρητής ροής λειτουργεί ως εξής:

Τα κύτταρα περνάνε ένα-ένα μπροστά από μια δέσμη φωτός, συνήθως από ένα laser, και κατατάσσονται ανάλογα με δύο παραμέτρους:

- α) Τα μορφολογικά, δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των κυττάρων που προκαλούν διασκόρπιση της δέσμης φωτός.
- β) Την εκπομπή φθορισμού από χημικές ενώσεις που υπάρχουν μέσα στα κύτταρα. Με την ανάπτυξη αντισωμάτων συνδεδεμένων με φθορίζουσες

ενώσεις είναι η δυνατή η μέτρηση πρωτεϊνών που βρίσκονται μέσα στα κύτταρα.

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry) είναι η τεχνολογία που επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση πολλαπλών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών ενός κυττάρου. Οι μετρήσεις αυτές γίνονται σε κάθε κύτταρο που βρίσκεται σε ροή και περιβάλλεται από ένα σύστημα περιρροής.

Χρώση με Ανεξίνη V (Annexin V) και Ιωδιούχο Προπίδιο (Propidium Iodide)

Για τον προσδιορισμό της απόπτωσης και της νέκρωσης, τα κύτταρα σημάνθηκαν με την βοήθεια του Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit I (Pharmingen TM, BD Biosciences, San Diego, USA) με τον αποπτωτικό δείκτη Ανεξίνη V συνδεδεμένο με ισοθειοκυανούχο φλουορεσκίνη (Annexin V-FITC) και με τον δείκτη ζωτικότητας προπιούχο ιώδιο (Propidium iodide, PI) σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευαστικής εταιρείας. Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα της Ανεξίνης V να δεσμεύεται στα φωσφολιπίδια φωσφατιδυλοσερίνης, τα οποία κατά την κυτταρική απόπτωση μεταφέρονται από το εσωτερικό στρώμα λιπιδίων της μεμβράνης στο εξωτερικό (membrane flip-flop event). Η έκθεση των μορίων φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια των κυττάρων συμβαίνει κατά τα αρχικά στάδια της απόπτωσης, επομένως το σύμπλοκο Annexin V-FITC σημαίνει τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα. Τα κύτταρα που βρίσκονται στα τελικά στάδια της απόπτωσης, όπως και τα ήδη νεκρά κύτταρα σημαίνονται από τον δείκτη ζωτικότητας προπιούχο ιώδιο (PI), επειδή η μεμβράνη τους είναι διαπερατή, επιτρέποντας έτσι να εισέλθει το μόριο αυτό στον πυρήνα, όπου προσδένεται και βάφει το γενετικό υλικό.

Για την εκτέλεση της μεθόδου τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλάκες 12 οπών σε συγκέντρωση 80.000-100.000 κύτταρα ανά οπή. Επώάζονται ανάλογα με

τον σκοπό του πειράματος με NGF 100 ng/ml, DHEA 10^{-7} M και Testosterone-HSA 10^{-7} M για 24 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης απομακρύνονται τα κύτταρα από τα δοχεία καλλιέργειας μη ένζυματικά (χωρίς τη χρήση τρυψίνης), αλλά με απόξεση. Σε σύντομο διάστημα γίνεται έκπλυση μια φορά με PBS (1.8mM KH_2PO_4 , 8mM Na_2HPO_4 , 137mM NaCl, 2.7mM KCl, pH: 7.2) που περιέχει 1% αλβουμίνη ορού βόου (BSA) στους 4°C και μεταφέρονται σε σωλήνες σήμανσης (staining tubes). Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγόκεντρος σε 1200 rpm για 10 λεπτά στους 4°C και επαναδιαλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα με σύσταση 10mM HEPES, 140mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl_2 , 2.5mM CaCl_2 , pH :7.4. Τα κύτταρα επωάζονται με 2 μg/ml Annexin V-FITC και 1 μg/ml PI σε τελικό όγκο 100μl/δείγμα για 10 λεπτά σε σκοτεινό περιβάλλον. Ακολούθως προστίθενται 400 μl εκ του παραπάνω ρυθμιστικού διαλύματος και τα δείγματα εξετάζονται εντός 1 ώρας με την βοήθεια κυτταρομετρία ροής του τύπου Beckton-Dickinson FACSArray (BD, Franklin Lakes, NJ) και αναλύονται με το πρόγραμμα CellQuest (BD) και ModFit LT (Verify software, Topham, MN).

10. Μέθοδος Αλυσιδωτή Αντίδραση Πραγματικού χρόνου (RT-PCR)

Η απομόνωση του ολικού RNA από τα DU145 κύτταρα πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο του Trizol (Invitrogen, USA). Το συμπληρωματικό DNA (cDNA) συντέθηκε από ίσες ποσότητες (300 ng) του ολικού RNA με ένα τυχαίο εξαμερές πρωταρχικό τμήμα (primer) με την βοήθεια του συστήματος Thermo-script RT-PCR (Invitrogen, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες. Η μέθοδος αυτή (RT-PCR) διεξήχθη με τη χρήση του ViiTM 7 Real-time PCR σύστημα (Applied Biosystems, USA). Τα μίγματα αντίδρασης 15μl περιέχουν 7.5μl

φθορίζουσας χρωστικής SYBR green σαν δείκτη του ποσού DNA (η SYBR green παρέχεται με το SYBR green Master Mix), 0.5μl από κάθε ειδικό ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή και 1μL μη-αραιωμένου cDNA που συντίθεται από 300ng συνολικού RNA. Οι συνθήκες για την αντίδραση είναι: 95°C για 10 λεπτά, 40 κύκλους στους 95°C για 15 sec και 64°C για 1 λεπτό ακολουθώντας τις καμπύλη τήξης θερμοκλών συνθηκών. Χρησιμοποιηθήκαν εκκινητές (primers) για:

Human TrkA

sense 5'-TCCGCCTCCATCATGGCTGCCTT-3'

Antisense 5'-CCCAAACCTTGTCTTCTCCGTCCACA-3'

Human GAPDH

Sense 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

Antisense 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

Οι καμπύλες διαχωρισμού προέκυψαν για κάθε αντίγραφο προϊόν στο τέλος της αντιγραφής. Κάθε μεμονωμένο δείγμα έγινε εις τριπλό και ο μέσος κύκλος (Ct) χρησιμοποιείται για την ανάλυση των δεδομένων. Οι τιμές Ct των γονιδίων στόχων κανονικοποιήθηκαν από την τιμή Ct του συστήματος εσωτερικού ελέγχου (γονίδιο human GAPDH).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1Α. Η διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) και ο νευρικός αυξητικός παράγοντας (NGF) μειώνουν την επαγόμενη από στέρηση ορού απόπτωση.

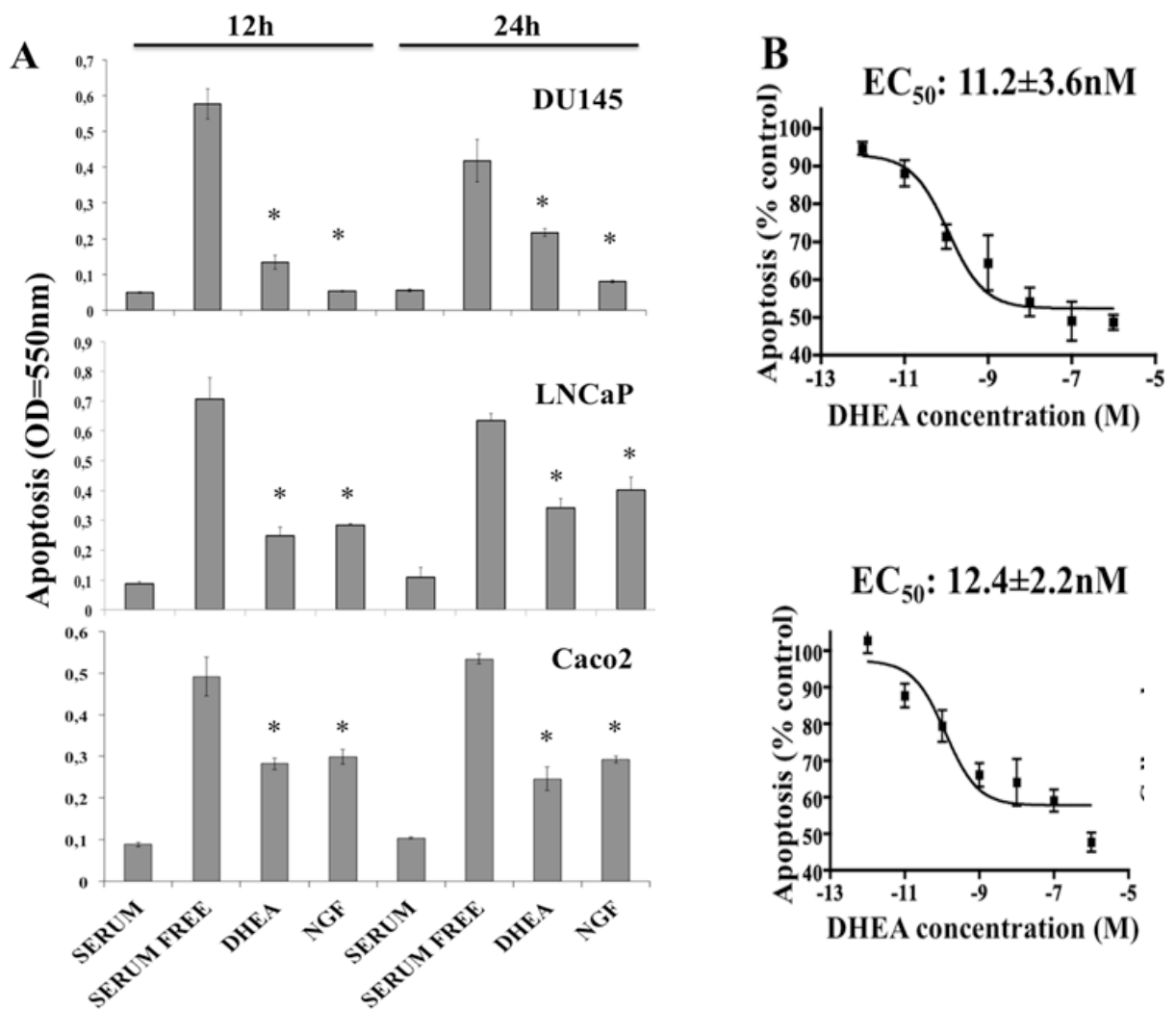
Έχει ήδη δειχθεί από προηγούμενη εργασία μας ότι η τεστοστερόνη ασκεί σημαντικές ρυθμιστικές επιδράσεις απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη και του παχέος εντέρου (Paradouroulou et al, 2008, Gu et al, 2009, 2011). Αυτοί οι καρκινικοί τύποι είναι ευρέως γνωστό ότι είναι ορμονο-εξαρτώμενες νεοπλασίες, και επομένως η μελέτη των ανδρογόνων ως μεσολαβητών της βιωσιμότητας του καρκίνου δείχνει ένα αυξημένο ενδιαφέρον.

Από την άλλη πλευρά, οι ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων εξαρτώνται από την παρουσία ορισμένων αυξητικών παραγόντων που επάγουν την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα και αυξάνουν το μεταναστευτικό δυναμικό τους. Με βάση αυτό, διερευνήσαμε τη συμμετοχή του ανδρογόνου στεροειδούς DHEA και του νευρικού αυξητικού παράγοντα, NGF, σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη (DU145 και LNCaP), καθώς και σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (CaCO2). Η καρκινική σειρά του προστάτη DU145 είναι γνωστό ότι εκφράζει μόνο μεμβρανικούς υποδοχείς ανδρογόνων (mAR) (Paradouroulou et al, 2008), ενώ η καρκινική σειρά LNCaP εκφράζει τόσο μεμβρανικούς υποδοχείς όσο και κλασσικούς ενδοκυτταρικούς υποδοχείς ανδρογόνων (iAR). Η διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) και ο νευρικός αυξητικός παράγοντας (NGF) μειώνουν σημαντικά την επαγόμενη από στέρηση ορού απόπτωση και στους τρεις τύπους καρκινικών κυττάρων (Εικόνες 1,2), όπως αυτό φαίνεται με ApoPercentage Assay (Εικόνα 1) και με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής (FACS analysis) για τα DU145 κύτταρα (Εικόνα 2). Όπως φαίνεται με ApoPercentage Assay (Εικόνα 1) η απόπτωση μειώθηκε από $0,587 \pm 0,053$ σε $0,142 \pm 0,016$ ή $0,059 \pm 0,002$ μετά από επώαση με DHEA

ή NGF αντιστοίχως για 12h και με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής (FACS) για τα DU145 κύτταρα (Εικόνα 2).

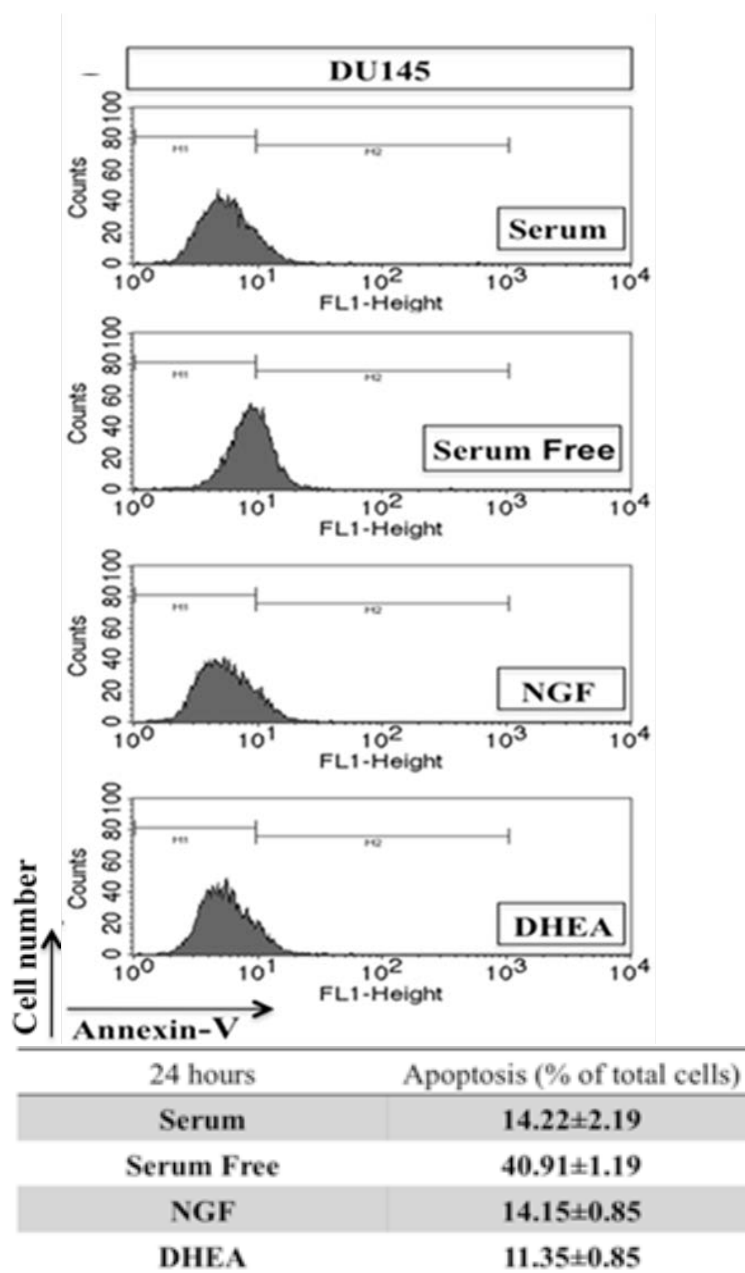
Τα κύτταρα ήταν υπό στέρηση ορού για 12h ή 24h, υπό την παρουσία ή απουσία της DHEA ή NGF και η απόπτωση αξιολογήθηκε σε λύματα κυττάρων με μέτρηση OD στα 550nm (Apopcentage assay kit) ή με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής (FACS analysis) σε καρκινικά κύτταρα προστάτη DU145, όπου τα κύτταρα σημάνθηκαν με την βοήθεια της Annexin-V συνδεδεμένη με το χρωμοφόρο FITC. Στο πίνακα παρουσιάζεται το ποσοστό (%) των αποπτωτικών κυττάρων για κάθε συνθήκη.

Ενδιαφέρον είναι να αναφέρουμε από πειράματα που έγιναν (Εικόνα 1B) με τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη DU145 και παχέος εντέρου CaCO₂, ότι η αντι-αποπτωτική δράση της DHEA είναι δόσο-εξαρτωμένη με EC₅₀ σε νανομοριακές συγκεντρώσεις (EC₅₀: 11.2±3.6nM και 12.4±2.2nM σε DU145 και CaCO₂ κύτταρα αντίστοιχα).



Εικόνα 1: Τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη (DU145 και LNCaP) και παχέος εντέρου (CaCO₂) επώαστηκαν για 12h και 24h σε συνθήκες απουσία ορού (serum free conditions) με 10⁻⁷M DHEA ή 100ng/ml NGF (A). Η απόπτωση προσδιορίστηκε με την μέθοδο του ApoPercentage assay kit. Κάθε ράβδος στο γράφημα εκφράζει την μέση τιμή ± ΤΛ της οπτικής πυκνότητας (OD₅₅₀), όπως αυτή προέκυψε από την ανάλυση τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων. Οι στατιστικά σημαντικές αποκλίσεις από τα κύτταρα ελέγχου (serum free) σημειώνονται με αστερίσκους (*P<0.01).

Μείωση της απόπτωσης από την DHEA μετρήθηκε για διάφορες συγκεντρώσεις της DHEA, που κυμαίνονται από 10⁻¹²M έως 10⁻⁶M σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη DU145 και παχέος εντέρου CaCO₂ (B).



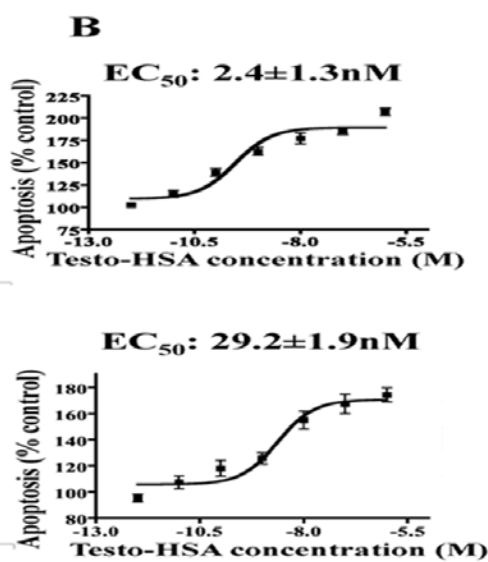
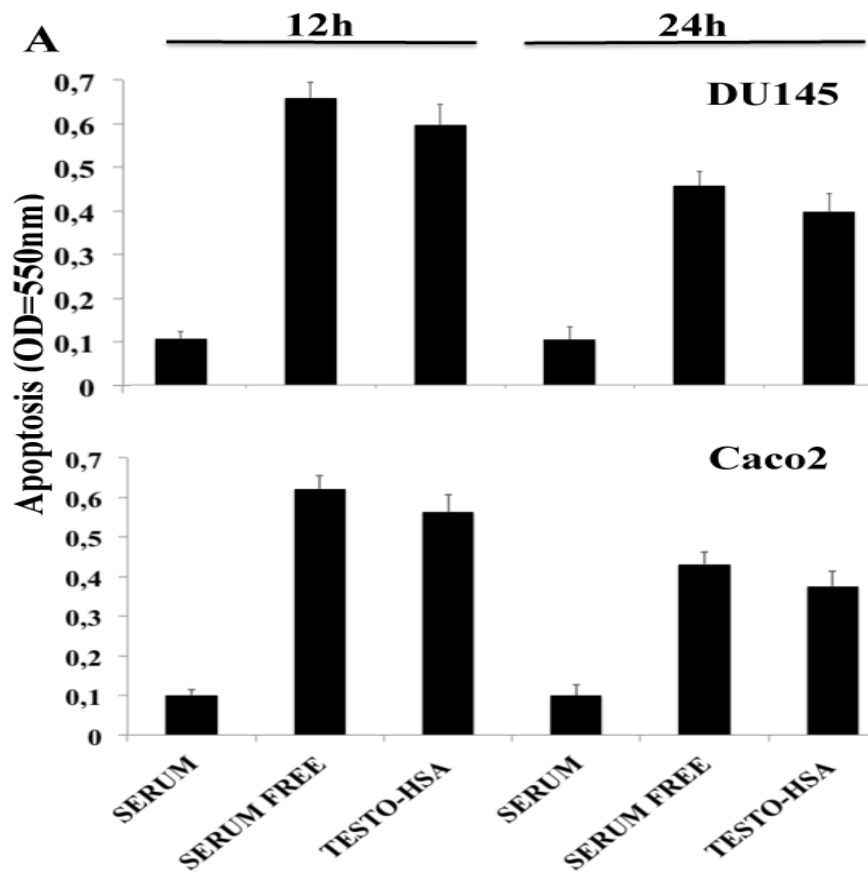
Εικόνα 2: Τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη DU145 επώαστηκαν για 24h σε συνθήκες απουσία ορού (serum free conditions) με 10^{-7} M DHEA ή 100ng/ml NGF. Η απόπτωση προσδιορίστηκε με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής (FACS analysis). Στον πίνακα αναφέρονται τα ποσοστά (%) των αποπτωτικών κυττάρων στην κάθε συνθήκη. Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (FACS) δείχνει το ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων Ανεξίνης-V/θετικά

κύτταρα σε σύγκριση με το μάρτυρα (ορός) μετά από μέτρηση 10.000 κύτταρων.

1B. Η τεστοστερόνη αυξάνει την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη και του παχέος εντέρου.

Τα κύτταρα DU145 και CaCO₂ επώαστηκαν με το σύμπλοκο της τεστοστερόνης, Testosterone-HSA (τεστοστερόνη συζευγμένη σε αλβουμίνη ανθρώπινου ορού, HSA, όπου η σύνδεση του με την πρωτεΐνη καθιστά αδύνατη την είσοδο στο κύτταρο και εξασφαλίζει την μεσολάβηση της σηματοδότησης αποκλειστικά μέσω μεμβρανικών υποδοχέων) σε παρουσία ορού (RPMI+ορός). Προηγούμενες μελέτες μας έχουν δείξει ότι η τεστοστερόνη-HSA επάγει την απόπτωση σε αυτές τις καρκινικές κυτταρικές σειρές μόνο σε παρουσία ορού (Paradopolou et al, 2008, Gu et al, 2009). Τα αποτελέσματά μας σαφώς επιβεβαιώνουν ότι η τεστοστερόνη αυξάνει την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη DU145 και του παχέος εντέρου CaCO₂ μετά από 12h και 24h επώαση του όπως μετρήθηκε με Apoptpercentage assay (Εικόνα 3) ή με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής (FACS analysis) για τα DU145 κύτταρα (Εικόνα 4).

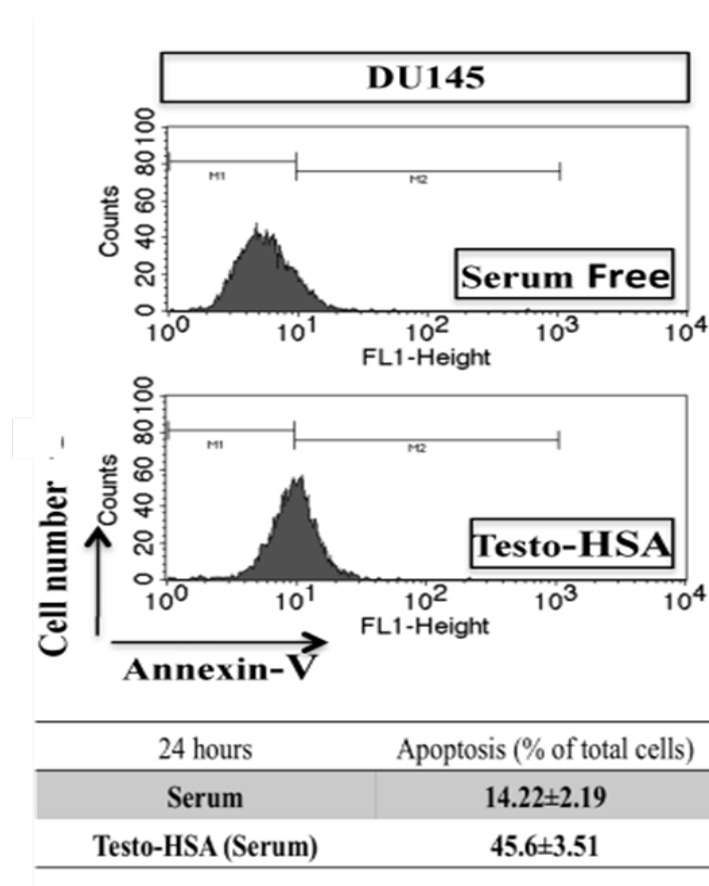
Η τεστοστερόνη αυξάνει τον κυτταρικό θάνατο με έναν δόσο-εξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα 3B) με EC₅₀: 2.4±1.3nM και 29.2±1.9nM για τα κύτταρα DU145 και CaCO₂ αντίστοιχα.



Εικόνα 3: Τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη DU145 και παχέος εντέρου CaCO₂ επώαστηκαν για 12h και 24h σε συνθήκες παρουσίας ή απουσίας ορού,

παρουσίας Testosterone-HSA 10^{-7} M. Η απόπτωση μετρήθηκε με το APoPercentage assay (**A**). Κάθε ράβδος στο γράφημα εκφράζει την μέση τιμή \pm ΤΛ της οπτικής πυκνότητας (OD_{550}) που μετρήθηκε σε κάθε συνθήκη, όπως αυτή προέκυψε από την στατιστική ανάλυση τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων. Οι στατιστικά σημαντικές αποκλίσεις από τα κύτταρα ελέγχου (serum) σημειώνονται με αστερίσκους (* $P < 0.01$).

Αύξηση του κυτταρικού θανάτου από την τεστοστερόνη-HSA μετρήθηκε για διάφορες συγκεντρώσεις από 10^{-12} M έως 10^{-6} M σε DU145 και παχέος εντέρου CaCO₂ (**B**).



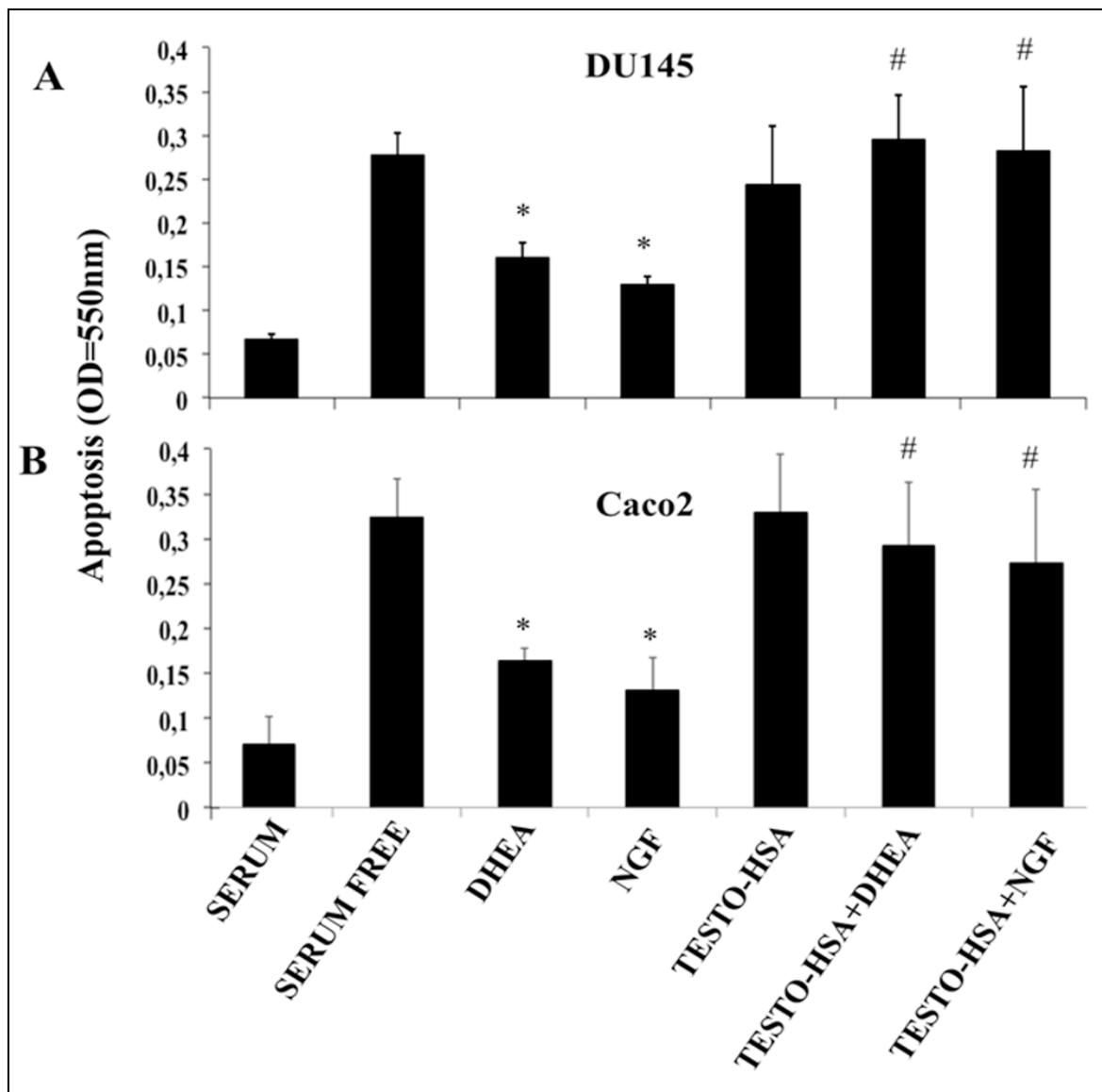
Εικόνα 4: Τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη DU145 επώαστηκαν για 24h σε συνθήκες παρουσίας ή απουσίας ορού, παρουσίας Testosterone-HSA 10^{-7} M. Η απόπτωση προσδιορίστηκε με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής (FACS analysis). Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (FACS) δείχνει το ποσοστό

αποπτωτικών κυττάρων Αννεξίνης-V/θετικά κύτταρα σε σύγκριση με το μάρτυρα (ορός) μετά από μέτρηση 10.000 κυττάρων.

2. Η αντί-αποπτωτική δράση της DHEA και του NGF αναστέλλεται παρουσία της Τεστοστερόνης.

Δεδομένου ότι η DHEA ή ο NGF και η Τεστοστερόνη ασκούν διαφορετικές/αντίθετες επιδράσεις στην κυτταρική απόπτωση σε κύτταρα DU145 και CaCO₂, ελέγξαμε τις επιδράσεις τους μετά την ταυτόχρονη επώαση τους στα κύτταρα αυτά. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 5, το σύμπλοκο της τεστοστερόνης, Τεστοστερόνη-HSA, παρουσία της DHEA ή του NGF σε κύτταρα CaCO₂ ή DU145 καταργεί την αντι-αποπτωτική δράση των τελευταίων. Αυτό αποτελεί την πρώτη απόδειξη ότι η τεστοστερόνη και άλλα στεροειδή ή αυξητικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν καρκινικά κύτταρα κατά έναν αντίθετο τρόπο και επομένως ρυθμίζοντας ιδιότητες του καρκίνου, ανάλογα με την ορμονικό μικροπεριβάλλον. Αποδεικνύει επίσης ότι η τεστοστερόνη διαμεσολαβεί την προ-αποπτωτική της δράση μέσα από ένα κοινό με την DHEA και τον NGF προ-επιβιωτικό μονοπάτι.

Πράγματι, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5, προ-επώαση των κυττάρων με τεστοστερόνη (Testosterone-HSA) αντιστρέφει αποτελεσματικά τις προ-επιβιωτικές δράσεις της DHEA και του NGF και στις δυο καρκινικές σειρές, του προστάτη DU145 (5A) και του παχέος εντέρου CaCO₂ (5B).

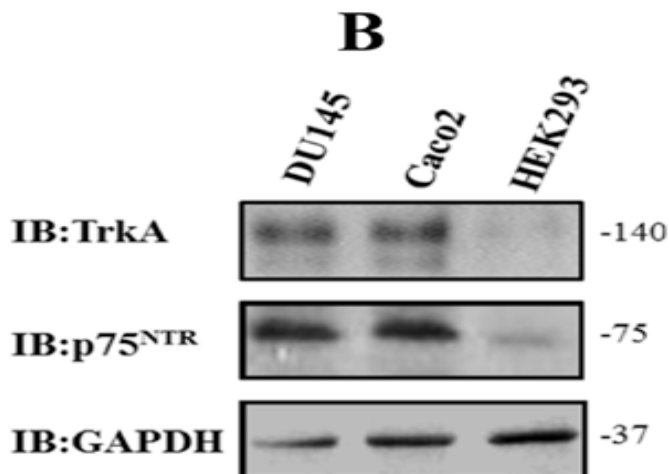
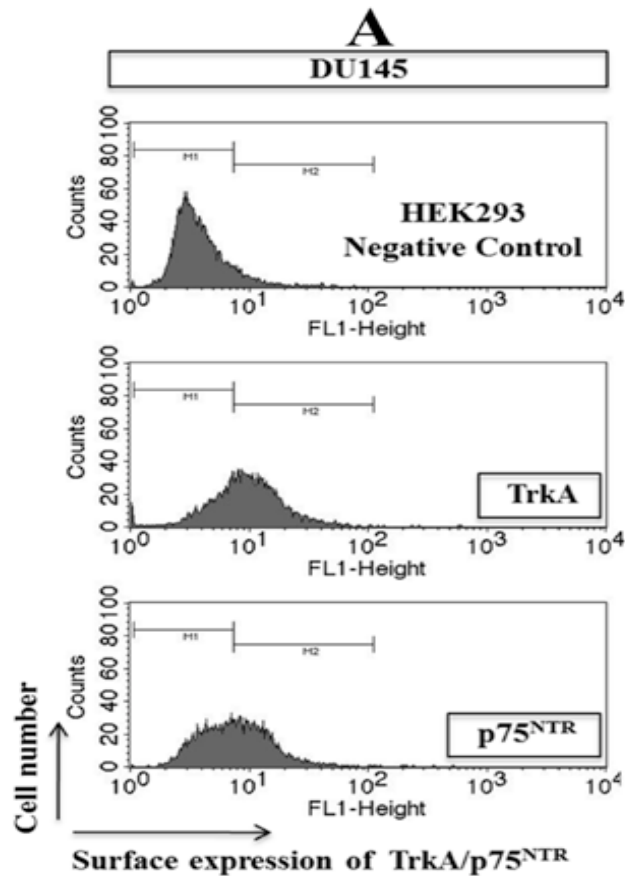


Εικόνα 5: Οι καρκινικές σειρές του προστάτη (DU145)(A) και του παχέος εντέρου (CaCO₂) (B) καλλιεργηθήκαν απουσία ορού για 24h με την παρουσία ή απουσία 10⁻⁷M DHEA, 10⁻⁷M τεστοστερόνη-HSA και 100ng/ml NGF ή ταυτόχρονα με 10⁻⁶M Τεστοστερόνη -HSA και 10⁻⁷M DHEA ή 100ng/ml NGF. Η απόπτωση μετρήθηκε με το APoPercentage assay kit. Κάθε ράβδος στο γράφημα εκφράζει την μέση τιμή ± ΤΛ της οπτικής πυκνότητας (OD₅₅₀) που μετρήθηκε σε κάθε συνθήκη, όπως αυτή προέκυψε από την στατιστική ανάλυση τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων. Οι στατιστικά σημαντικές αποκλίσεις από τα κύτταρα ελέγχου (serum free) σημειώνονται με αστερίσκους (*#P<0.01).

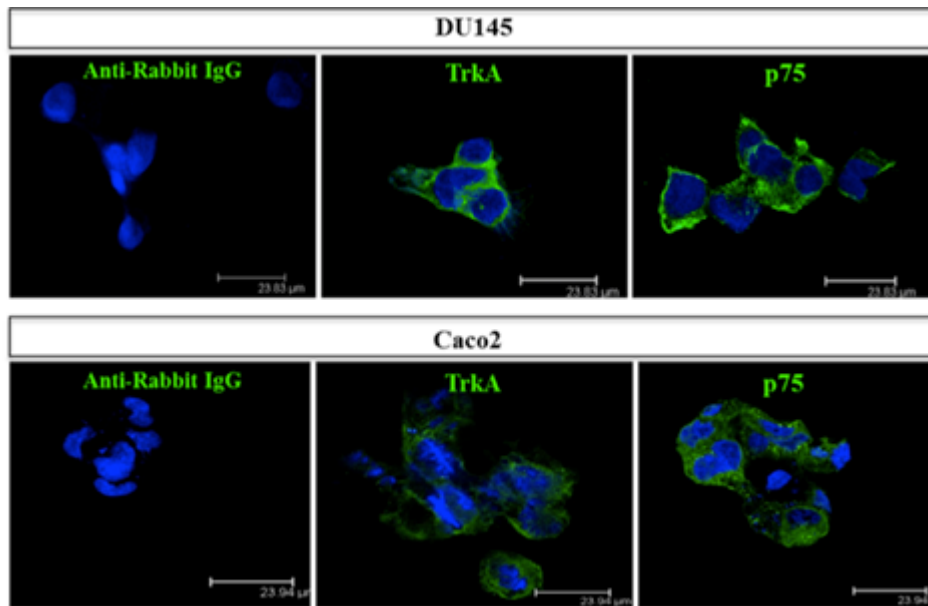
3. Οι υποδοχείς του Νευρικού Αυξητικού Παράγοντα, συγκεκριμένα TrkA και p75^{NTR} εκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη DU145 και παχέος εντέρου CaCO2.

Είναι γνωστό ότι τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες όπως τον NGF, τα οποία ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό και τη διευκόλυνση της διαφυγής από τον κυτταρικό θάνατο (Rubin et al, 2004, Molloy et al, 2011). Διερευνήσαμε τα επίπεδα έκφρασης και την πιθανή ρύθμιση της έκφρασης των υποδοχέων του NGF, συγκεκριμένα των TrkA και p75^{NTR}, στην κυτταρική σειρά του προστάτη DU145 και του παχέος εντέρου CaCO2.

Όπως φαίνεται από την ανάλυση με αντίχνευση φθορισμού (FACS analysis, Εικόνα 6.1A) ή με Western blot (Εικόνα 6.1B) ή με την μέθοδο ανοσοϊστοχημείας (Εικόνα 6.2) και οι δύο κυτταρικές σειρές, DU145 και CaCO2, εκφράζουν έντονα και τους δύο υποδοχείς του NGF, TrkA και p75^{NTR}, σε σύγκριση με την κυτταρική σειρά HEK293 που είναι γνωστό ότι δεν εκφράζει κανέναν από αυτούς τους υποδοχείς (Εικόνα 6.1).



Εικόνα 6.1: Ανάλυση κυτταρομετρία ροής (FACS analysis, **A**) και ανάλυση ανοσοστύπωσης (Western blot analysis, **B**) χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα για TrkA και p75^{NTR} δείχνουν την έκφραση και των δύο υποδοχέων TrkA και p75^{NTR} σε DU145 και CaCO2 κύτταρα, όπου HEK293 κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός μάρτυρας.

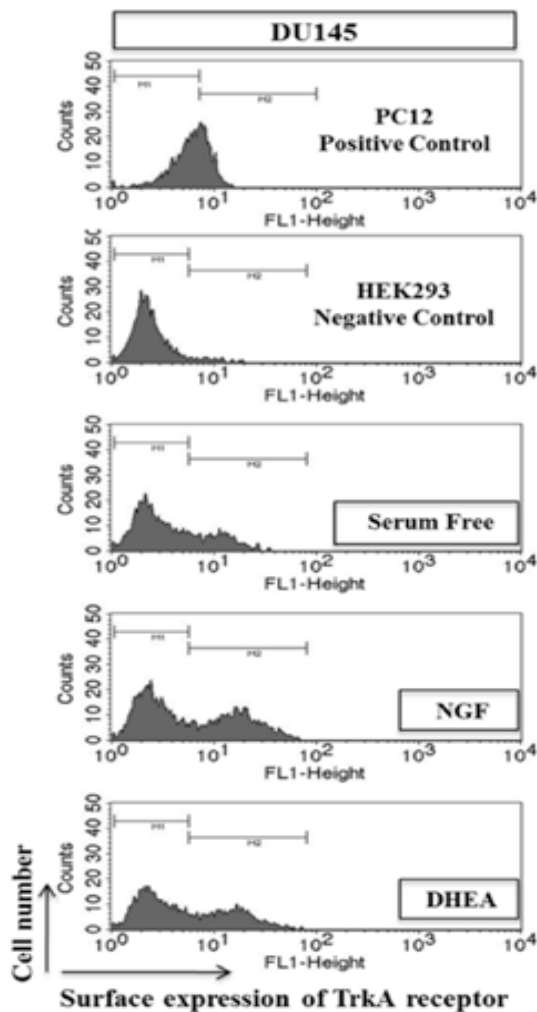


Εικόνα 6.2: Ανάλυση φθορισμού σε DU145 ή CaCO₂ κύτταρα για TrkA (χρώση πράσινο) ή p75^{NTR} (χρώση πράσινο) και DAPI (χρώση μπλε) δείχνουν τους υποδοχείς να εντοπίζονται στην μεμβράνη.

3.1 Η έκφραση του TrkA υποδοχέα ρυθμίζεται διαφορετικά από DHEA, NGF ή Τεστοστερόνη.

Μελετήσαμε τις επιδράσεις της DHEA και του NGF σε σύγκριση με την Τεστοστερόνη στη ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης των TrkA και p75^{NTR} υποδοχέων στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη DU145 (Εικόνα 7.1).

Ενώ τα επίπεδα έκφρασης του p75^{NTR} υποδοχέα δεν έδειξαν διαφορές μετά από 24h επώασης με το στεροειδές DHEA, η έκφραση του TrkA υποδοχέα επάγεται σημαντικά μετά την επώαση των κυττάρων DU145 με DHEA ή NGF για 24h (Εικόνα 7.1), υποδεικνύοντας σαφώς ένα σημαντικό ρόλο αυτού του υποδοχέα ως μεσολαβητής των επιδράσεων της DHEA σε άμεση αναλογία με το κύριο πρόσδεμα (ligand) για τον υποδοχέα αυτό, τον NGF.



24 hours	TrkA Expression %
PC12	51.41±6.4
HEK293	3.16±0.83
Serum Free	25.5±3.6
NGF	48.11±2.82
DHEA	42.07±0.8

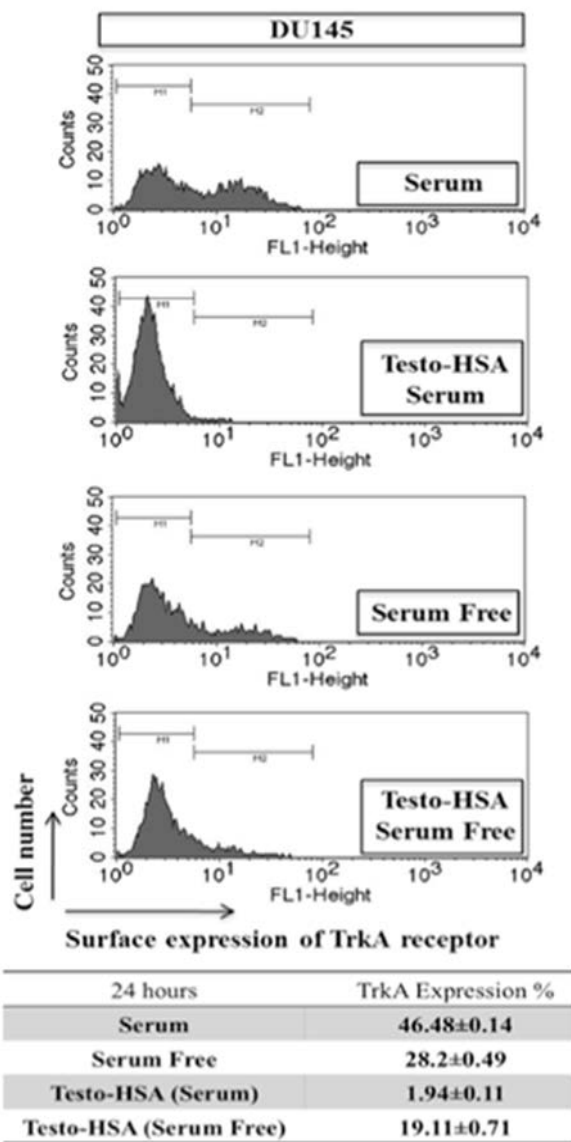
Εικόνα 7.1: Κυτταρομετρία ροής (FACS analysis) σε κύτταρα DU145 που επωάζονται για 24h με $10^{-7}M$ DHEA και 100ng/ml NGF σε συνθήκες στέρησης ορού είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση του επιπέδου της έκφρασης του TrkA υποδοχέα. Έγινε σύγκριση με την κυτταρική σειρά HEK293 που είναι γνωστό ότι δεν εκφράζει τον υποδοχέα αυτό και με την κυτταρική σειρά PC12 που εκφράζει τον TrkA υποδοχέα. Στον πίνακα αναφέρονται τα ποσοστά (%) της έκφρασης του TrkA υποδοχέα σε κάθε συνθήκη.

Αντιθέτως, η επώαση των κυττάρων DU145 με τεστοστερόνη, σε συνθήκες παρουσίας ορού ή σε συνθήκες στέρησης ορού, μείωσε τα επίπεδα έκφρασης

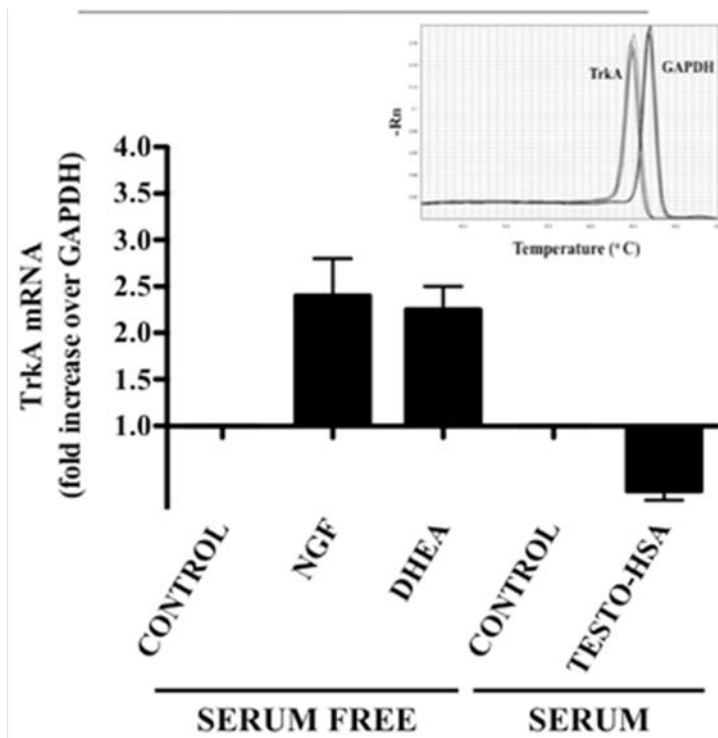
του υποδοχέα TrkA (Εικόνα 7.2Α). Είναι αξιοσημείωτο να πούμε ότι σε συνθήκες παρουσία ορού, η τεστοστερόνη έδειξε μια πιο έντονη μείωση της έκφρασης του υποδοχέα TrkA. Αυτό το αποτέλεσμα εξηγεί τις προ-αποπτωτικές επιδράσεις της τεστοστερόνης, οι οποίες δεικνύονται μόνο κάτω από συνθήκες παρουσίας ορού (Papadopoulou et al, 2008).

Επιπλέον, μετρήσαμε τα επίπεδα έκφρασης mRNA του TrkA, χρησιμοποιώντας Real-Time PCR. Ο NGF και η DHEA αύξησαν σημαντικά τα επίπεδα mRNA, ενώ η τεστοστερόνη τα μειώνει (Εικόνα 7.3). Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι τα ανδρογόνα και ο NGF ελέγχουν τα επίπεδα του TrkA τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταφραστικό επίπεδο.

Η μειωμένη ρύθμιση του προ-επιβιωτικού υποδοχέα TrkA μειώνει την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να ανταποκρίνονται σε αυξητικούς παράγοντες και έτσι να διατηρήσει αποτελεσματικά τα σηματοδοτικά μονοπάτια επιβίωσης. Παράλληλα, ενδογενή προσδέματα (endogenous ligands) του υποδοχέα TrkA, όπως ο NGF ή ο πρόδρομος του, ο pro-NGF μπορούν να ασκήσουν προ-αποπτωτικές δράσεις μέσω του υποδοχέα θανάτου p75^{NTR}.



Εικόνα 7.2: Κυτταρομετρία ροής (FACS analysis) σε κύτταρα DU145. Επώαση των κυττάρων για 24h με 10^{-7} M τεστοστερόνη-HSA σε συνθήκες παρουσία ορού μείωσε τα επίπεδα έκφρασης του TrkA υποδοχέα (από $46.48 \pm 0.14\%$ σε $1.94 \pm 0.11\%$ μετά από μέτρηση 10.000 κυττάρων και από την ανάλυση τριών ανεξαρτήτων πειραμάτων. Ενώ σε συνθήκες απουσίας ορού το ποσοστό της έκφρασης του TrkA πριν την επώαση των κυττάρων ήταν $28.2 \pm 0.49\%$ και $19.11 \pm 0.71\%$ μετά την επώαση με Τεστοστερόνη-HSA.



Εικόνα 7.3: Real-Time PCR για TrkA και GAPDH γονίδια, όπου αξιολογήσαμε τα αποτελέσματα των DHEA, NGF και Τεστοστερόνης στα επίπεδα mRNA του TrkA. Με την παρουσία ορού, η Τεστοστερόνη μείωσε (0,8-fold decrease) τα επίπεδα mRNA του TrkA, ενώ η DHEA και ο NGF αύξησαν (2,5-fold increase) τα επίπεδα mRNA του TrkA σε συνθήκες απουσίας ορού.

4. Οι επιδράσεις των στεροειδών ανδρογόνων DHEA και τεστοστερόνης στην απόπτωση δεν απαιτούν την παρουσία εκκρινόμενου NGF.

Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι τα καρκινικά κύτταρα αυξάνουν την έκκριση των αυξητικών παραγόντων όπου με έναν παρακρινή/αυτοκρινή τρόπο δράσης επάγουν την πολλαπλασιαστική και μεταναστευτική ικανότητα του όγκου. Στον

καρκίνο του προστάτη συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι ο NGF έχει εξαιρετικά αυξημένη έκφραση (up-regulation) (Delsite et al, 1999) και η έκκριση του είναι ένας σημαντικός μηχανισμός για τη μείωση κυτταρικού θανάτου των καρκινικών κυττάρων (Molloy et al, 2011; Rubin και Segal, 2004). Ελέγξαμε τις επιδράσεις των ανδρογόνων στεροειδών DHEA και τεστοστερόνης στις δύο κυτταρικές σειρές, DU145 και CaCO₂, υπό την παρουσία ενός ειδικού αντισώματος, anti-NGF, που μπλοκάρει ενδογενώς τον εκκρινόμενο NGF, ώστε να διευκρινίσουμε εάν οι δράσεις των στεροειδών μορίων απαιτούν έστω και σε μικρή συγκέντρωση την παρουσία του εκκρινόμενου από τα καρκινικά κύτταρα NGF.

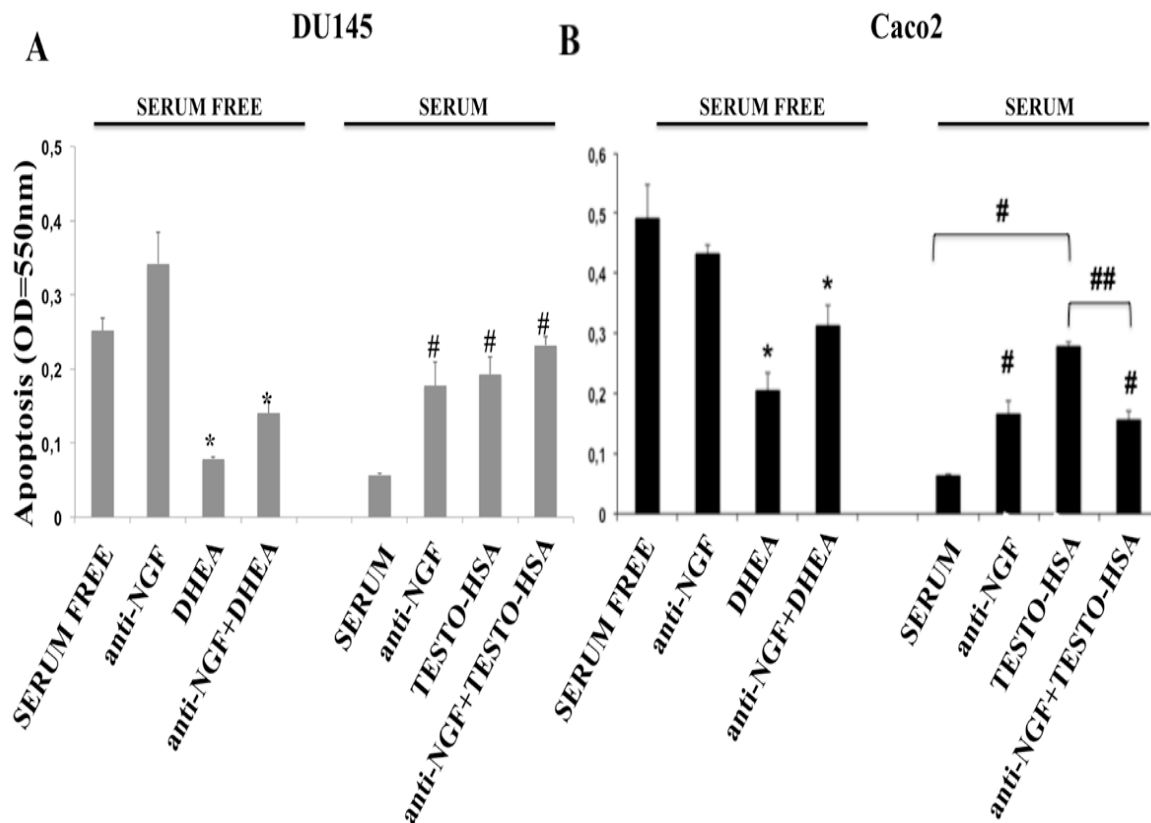
Χρησιμοποιώντας το ειδικό αντίσωμα anti-NGF, καλλιεργήσαμε τα κύτταρα DU145 ή CaCO₂ με DHEA ή τεστοστερόνη-HSA και μετρήσαμε την απόπτωση. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 8, η αντί-αποπτωτική δράση της DHEA ή η προ-αποπτωτική δράση της τεστοστερόνης σε κύτταρα DU145 δεν άλλαξε σημαντικά με την παρουσία του αντισώματος anti-NGF. Όπως παρατηρήσαμε η DHEA μειώνει την επαγόμενη από στέρηση ορού απόπτωση από $0,252 \pm 0,016$ σε συνθήκες απουσίας ορού (serum free conditions) σε $0,07 \pm 0,002$ και από $0,342 \pm 0,042$ υπό την παρουσία του αντισώματος anti-NGF σε $0,14 \pm 0,016$ με την ταυτόχρονη επώαση με DHEA, ενώ σε συνθήκες παρουσία ορού (serum conditions) επάγεται η απόπτωση από $0,057 \pm 0,002$ σε $0,193 \pm 0,023$ μετά από επώαση των κυττάρων με τεστοστερόνη-HSA. Το αντίσωμα κατά του NGF δεν είχε επιπτώσεις σε συνθήκες στέρησης ορού (Εικόνα 8A και 8B, στήλες κάτω από το <serum free >), υποδεικνύοντας ότι σε αυτές τις συνθήκες η απόπτωση έφθασε σε επίπεδα πλατώ.

Κάτω από τις συνθήκες αυτές, η επώαση των κυττάρων με DHEA που ασκεί μία ισχυρή αντι-αποπτωτική δράση, δεν αντιστρέφεται από την παρουσία του anti-NGF, υπονοώντας σαφώς ότι οι προ-επιβιωτικές δράσεις της DHEA δεν εξαρτώνται από την παρουσία του ενδογενούς NGF.

Αντιθέτως, σε συνθήκες παρουσίας ορού (Εικόνα 8Α και 8Β, στήλες κάτω από το <serum>) όπου ο NGF επάγει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, η παρουσία του anti-NGF επάγει την απόπτωση και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές (DU145 και CaCO₂).

Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στην υπόθεση ότι πιθανόν η τεστοστερόνη-HSA ασκεί αντί-αποπτωτικές επιδράσεις υπό συνθήκες παρουσίας ορού και μόνο, πιθανότατα ενεργώντας ως ανταγωνιστής των υποδοχέων του NGF κι εμποδίζοντας έτσι τον συγκεκριμένο αυξητικό παράγοντα να δράσει ευεργετικά στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων.

Όπως βλέπουμε στην Εικόνα 8, στα DU145 κύτταρα (Εικόνα 8Α), η επώαση των κυττάρων με anti-NGF και τεστοστερόνη-HSA είχαν παρόμοια αποτελέσματα όπως κάθε μόριο από μόνο του. Αντιθέτως στα κύτταρα CaCO₂ (Εικόνα 8Β) η ταυτόχρονη επώαση των κυττάρων με anti-NGF με τεστοστερόνη-HSA οδήγησε σε απόπτωση παρόμοια με τον anti-NGF μόνο του, και λιγότερο από τεστοστερόνη-HSA μόνη της, υποδεικνύοντας πιθανώς ότι η στοιχειομετρία των ειδικών υποδοχέων, TrkA και p75^{NTR}, είναι κρίσιμη στην κυτταρική απόπτωση.



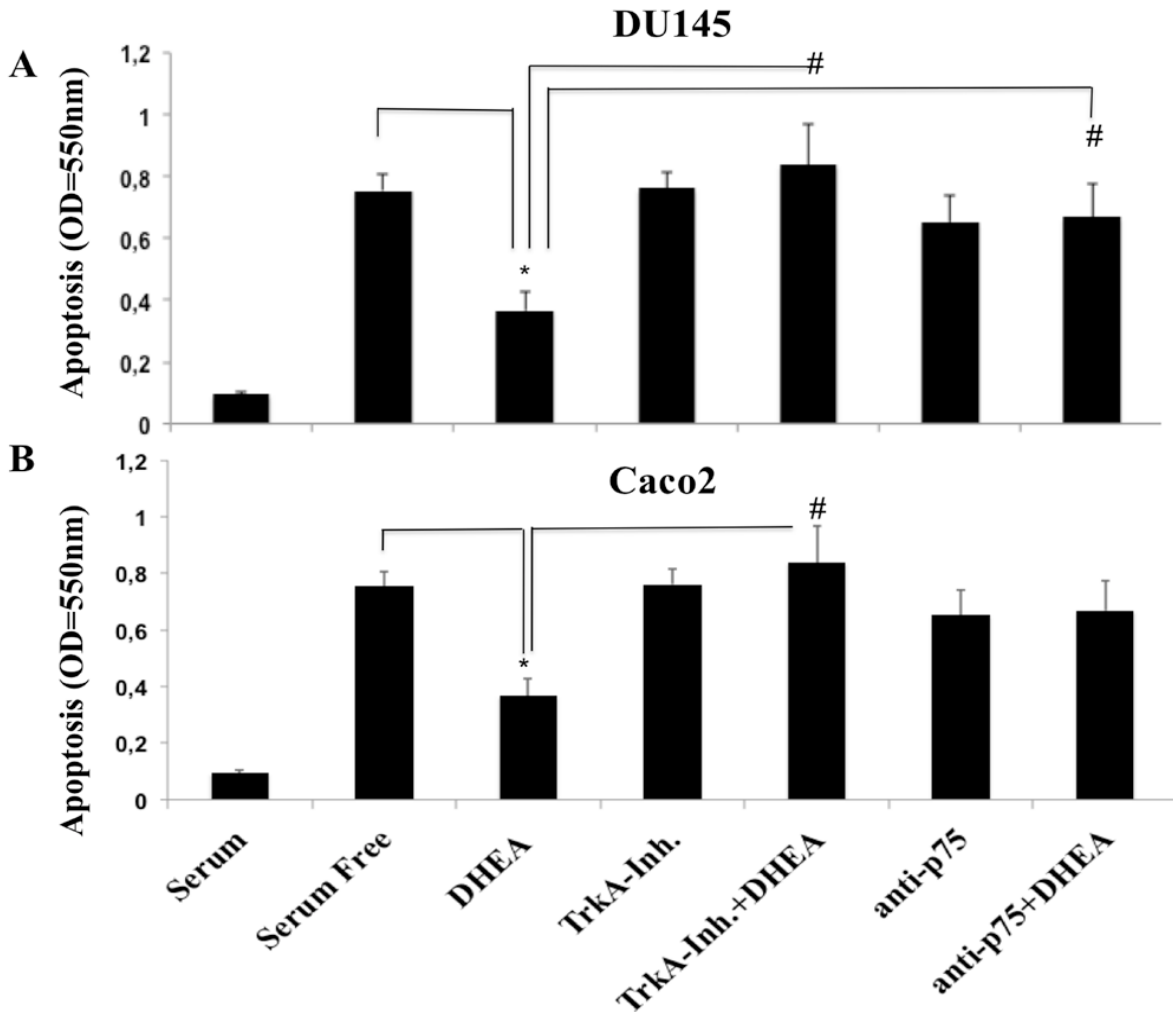
Εικόνα 8: DU145 (A) και CaCO2 (B) κύτταρα επώαστηκαν με την παρουσία ή απουσία της DHEA 10-7M ή τεστοστερόνη-HSA 10-7M σε συνθήκες παρουσίας ή απουσίας ορού για 24h, και τα οποία περιέχουν ή όχι ένα πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού anti-NGF. Η απόπτωση αξιολογήθηκε με το Apoptpercentage assay kit. Κάθε ράβδος στο γράφημα εκφράζει την μέση τιμή ± Τλ της οπτικής πυκνότητας (OD₅₅₀) 550nm που μετρήθηκε σε κάθε συνθήκη, όπως αυτή προέκυψε από την στατιστική ανάλυση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (απουσία ορού για την DHEA, παρουσία ορού για Testosterone-HSA, anti-NGF +/- με DHEA ή με Testosterone-HSA). Οι σημαντικές αποκλίσεις από τα κύτταρα ελέγχου σημειώνονται ως εξής: * # P <0.01 έναντι κύτταρα ελέγχου, + / - anti-NGF αντίστοιχα, # # P <0.01 έναντι Testosterone-HSA).

5. Αναστολείς των υποδοχέων του NGF τροποποιούν τα αποτελέσματα της DHEA ή της Τεστοστερόνης στην απόπτωση.

Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι η DHEA και η τεστοστερόνη ασκούν αντίθετες επιδράσεις στην απόπτωση σε DU145 και σε CaCO₂ κύτταρα. Η DHEA αναστέλλει ισχυρά την επαγόμενη από στέρηση ορού απόπτωση, ενώ η τεστοστερόνη αυξάνει την απόπτωση σε κύτταρα παρουσία ορού με καμία επίδραση σε κύτταρα που στερούνται ορού. Ως μεσολαβητές για αυτά τα αποτελέσματα στην κυτταρική επιβίωση προτείνουμε τους υποδοχείς του νευρικού αυξητικού παράγοντα NGF, τον TrkA και τον p75^{NTR}, όπου και οι δύο εκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα προστάτη (DU145) και του παχέος εντέρου (CaCO₂). Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι οι TrkA και/ή p75^{NTR} μπορεί να είναι οι βασικοί υποδοχείς στις επιδράσεις των DHEA και/ή τεστοστερόνη στην απόπτωση, χρησιμοποιήσαμε ειδικούς αναστολείς για να αξιολογήσουμε τον ακριβή ρόλο αυτών των υποδοχέων σε επιδράσεις των στεροειδών. Χρησιμοποιώντας αυτούς τους αναστολείς ταυτόχρονα με κάθε στεροειδές, μετρήθηκε η απόπτωση υπό τις ίδιες συνθήκες όπου παρατηρήσαμε τις αντι-αποπτωτικές δράσεις της DHEA ή τις προ-αποπτωτικές δράσεις της τεστοστερόνης. Και οι δύο αναστολείς δεν είχαν καμία επίδραση στην κυτταρική απόπτωση όταν αυτοί χρησιμοποιήθηκαν μόνοι τους. Επιπλέον, η χρήση και των δύο αναστολέων σε παρουσία ορού στα κύτταρα DU145 ή CaCO₂ δεν μετέβαλε τα προ-αποπτωτικά αποτελέσματα της τεστοστερόνης, όπου δείχνει ότι η τεστοστερόνη δεν ενεργεί σαν ένας αγωνιστής για αυτούς τους υποδοχείς. Αυτό επιβεβαιώνει επίσης τις ανταγωνιστικές δράσεις της τεστοστερόνης στις δράσεις του NGF (Εικόνα 5) και θα μπορούσε να εξηγήσει εν μέρει τον ρόλο της τεστοστερόνης να ενεργεί προ-αποπτωτικά σε συνθήκες παρουσία ορού και

όχι σε συνθήκες απουσία ορού όπου τα επίπεδα των αυξητικών παραγόντων περιορίζονται .

Αντιθέτως, η χρήση των αναστολέων στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων που επώαστηκαν με DHEA (Εικόνα 9), είχε ως αποτέλεσμα τις τροποποιήσεις των δράσεων του στεροειδούς. Πιο συγκεκριμένα, σε DU145 κύτταρα (Εικόνα 9A) τόσο ο αναστολέας του TrkA όσο και ο αναστολέας του p75^{NTR} υποδοχέα μπλοκάρει τις αντι-αποπτωτικές δράσεις της DHEA, υποδεικνύοντας ότι και οι δύο υποδοχείς είναι απαραίτητοι ως μεσολαβητές των προ-επιβιωτικών δράσεων της DHEA, καθώς είχε πρόσφατα δειχθεί και για τα νευρικά κύτταρα (Lazaridis et al, 2011). Επίσης ο αναστολέας TrkA μπλοκάρει τις αντι-αποπτωτικές δράσεις της DHEA σε κύτταρα καρκίνου του παχέος εντέρου CaCO2 (Εικόνα 9B). Ωστόσο, ο αναστολέας του p75^{NTR} δεν ασκεί ίδια αποτελέσματα στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου CaCO2. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 9B, ο TrkA αναστολέας μπλοκάρει τις αντι-αποπτωτικές δράσεις της DHEA, αλλά ο p75^{NTR} αναστολέας δεν μπορούσε να αντιστρέψει τις αντι-αποπτωτικές δράσεις της DHEA. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν έναν διαφορετικό ρόλο των δύο υποδοχέων του NGF στην απόπτωση διαφορετικών τύπων καρκινικών κυττάρων. Ο σημαντικός ρόλος του p75^{NTR} υποδοχέα στον κυτταρικό θάνατο, όπως έχει μελετηθεί εκτενώς στο παρελθόν για τον καρκίνο του προστάτη, δεν επιβεβαιώνεται στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου, CaCO2. Ωστόσο, ο υποδοχέας TrkA παραμένει ένας βασικός ρυθμιστής της κυτταρικής επιβίωσης και στις δύο κυτταρικές σειρές καρκίνου.



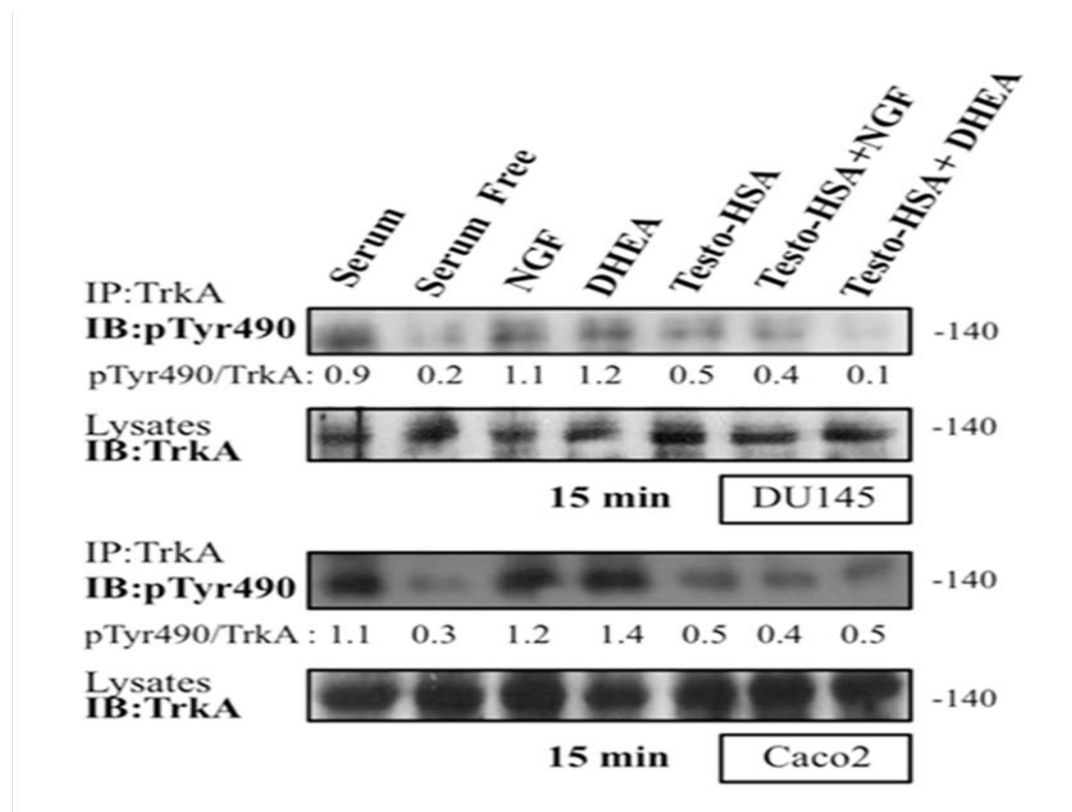
Εικόνα 9: DU145 (**A**) και CaCO₂ (**B**) κύτταρα επώαστηκαν για 24h με 10⁻⁷M DHEA, 10⁻⁷M TrkA αναστολέα (TrkA inhibitor, Calbiochem) ή p75^{NTR} αναστολέα (anti- p75^{NTR}, Millipore) ή ταυτόχρονα αυτούς τους αναστολείς με DHEA 10⁻⁷M σε συνθήκες απουσίας ορού. Η απόπτωση αξιολογήθηκε με το Apoptpercentage assay. Κάθε ράβδος στο γράφημα εκφράζει την μέση τιμή± ΤΛ της οπτικής πυκνότητας (OD₅₅₀) 550nm που μετρήθηκε σε κάθε συνθήκη, όπως αυτή προέκυψε από την στατιστική ανάλυση τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (* P <0,01 έναντι ελεύθερο ορού (serum free), # P <0.01 έναντι TrkA ή p75^{NTR} αναστολέα μόνο του σε συνθήκες απουσίας ορού, serum free).

6. Η DHEA και η Τεστοστερόνη επηρεάζουν την ενεργοποίηση των υποδοχέων του NGF.

6.1 Η DHEA και ο NGF επάγουν την φωσφορυλίωση του TrkA

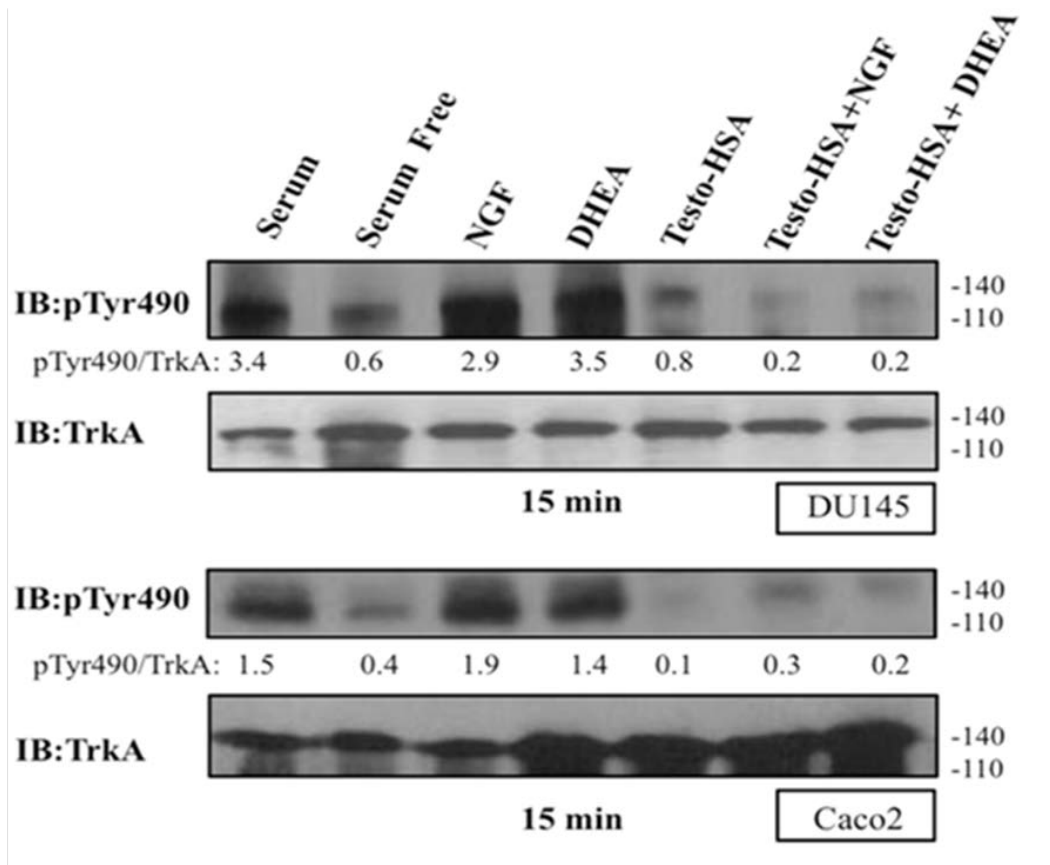
Η συμμετοχή των υποδοχέων του NGF στις επιδράσεις των στεροειδών στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων διερευνήθηκε περαιτέρω με τη μελέτη της ενεργοποίησης τους μετά τη επώαση με DHEA ή με τεστοστερόνη. Η Εικόνα 10.1 παρουσιάζει τα αποτελέσματα των επιδράσεων της DHEA και της τεστοστερόνης στην ενεργοποίηση του TrkA υποδοχέα. Γνωρίζουμε ότι ο TrkA αυτο-φωσφορυλιώνεται μετά από σύνδεση του με τον υψηλής συγγένειας προσδέτη του (NGF) στην διμερή μορφή του. Η αυτο-φωσφορυλίωση του TrkA έχει δείξει επίσης ότι είναι ανεξάρτητη από το πρόσδεμα (Nikolietopoulou et al, 2010) οδηγώντας στην περίπτωση σε κυτταρικό θάνατο νευρικών κυττάρων που εξαρτώνται από τον NGF . Ο μηχανισμός αυτός θα μπορούσε να αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμος στον έλεγχο της ανάπτυξης του όγκου. Με βάση τα στοιχεία αυτά, εξετάσαμε με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης ή με Western Blot, την ικανότητα της DHEA ή της Τεστοστερόνης να επάγουν την φωσφορυλίωση του TrkA σε DU145 και CaCO2 κύτταρα, που καλλιεργούνται σε συνθήκες απουσίας ορού. Τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη DU145 και παχέος εντέρου CaCO2 καλλιεργήθηκαν για 24h απουσία ορού και ύστερα επώαστηκαν για 15 λεπτά με 10^{-7} M DHEA και 100ng/ml NGF όπου και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές ενεργοποιείται ο TrkA υποδοχέας με επαγωγή φωσφορυλίωσης του (Εικόνες 10.1, 10.2). Ενώ αντιθέτως, όταν οι ίδιες καρκινικές κυτταρικές σειρές επώάζονται με 10^{-7} M τεστοστερόνη-HSA, δεν παρατηρείται επαγωγή φωσφορυλίωσης του TrkA (Εικόνες 10.1, 10.2). Επιπλέον, διερευνήσαμε τις πιθανές αλληλεπιδράσεις της τεστοστερόνης με ταυτόχρονη επώαση με DHEA ή NGF, με βάση την προηγούμενη παρατήρηση

μας (Εικόνα 5) όπου διερευνήσαμε επίσης την πιθανή ικανότητα της τεστοστερόνης να αναστρέψει τις επιδράσεις τους στην φωσφορυλίωση του TrkA (Εικόνα 10.2). Πράγματι, η ταυτόχρονη επώαση της DHEA ή του NGF με τεστοστερόνη ανέστειλε πλήρως την φωσφορυλίωση του TrkA υποδοχέα, εξηγώντας τον ανασταλτικό ρόλο της τεστοστερόνης στις επιδράσεις των DHEA ή NGF για την πρόληψη της απόπτωσης στις καρκινικές κυτταρικές σειρές DU145 και CaCO2. Στις Εικόνες 10.1 και 10.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανοσοσύτωσης (IB) των ανοσοκατακρημνισμένων (IP:pTyr) πρωτεϊνών και των αντίστοιχων ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων με ειδικό αντίσωμα κατά του υποδοχέα TrkA, όπου επαληθεύεται η προηγούμενη παρατήρησή μας για την ικανότητα ενεργοποίησης του υποδοχέα από την DHEA στα καρκινικά κύτταρα.



Εικόνα 10.1: DU145 και CaCO2 κύτταρα επώαστηκαν για 15min με 10^{-7} M DHEA ή 10^{-7} M Testosterone-HAS ή 100ng/ml NGF ή ταυτόχρονα 10^{-7} M DHEA ή 100ng/ml NGF με 10^{-6} M Testosterone-HSA και τα κύτταρα

συλλέχθησαν και λύθηκαν όπου ακολούθησε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης με ειδικό αντίσωμα anti-TrkA και ανάλυση με Western Blot χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα phospho-TrkA (p-Tyr490).

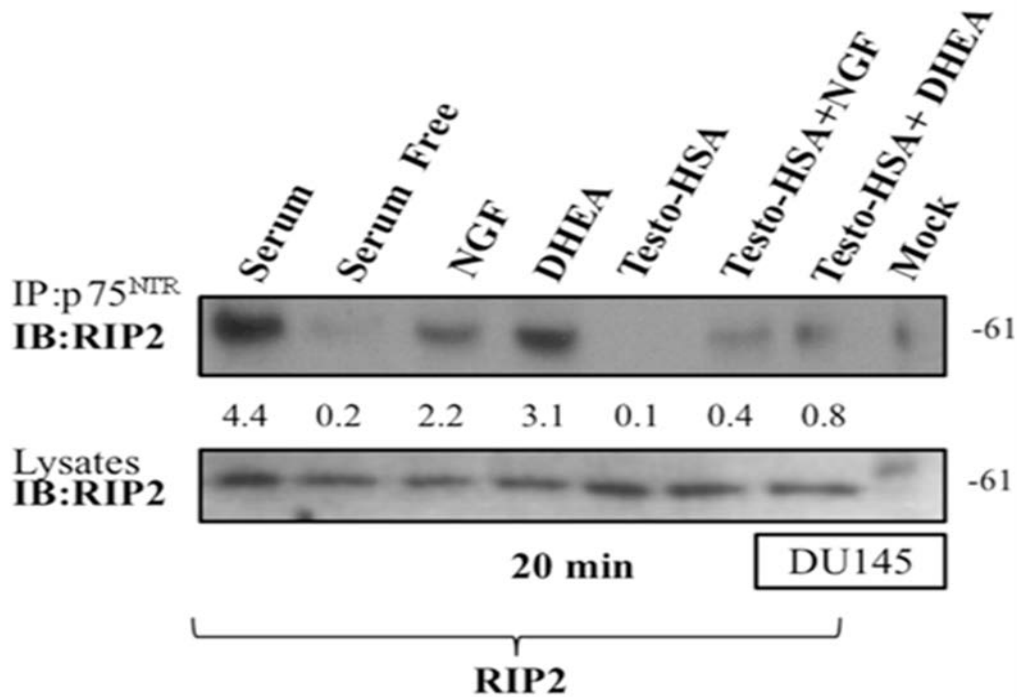


Εικόνα 10.2: DU145 και CaCO₂ κύτταρα επώαστηκαν για 15min με 10⁻⁷M DHEA ή 10⁻⁷M Testosterone-HSA ή 100ng/ml NGF ή ταυτόχρονα 10⁻⁷M DHEA ή 100ng/ml NGF με 10⁻⁶M Testosterone-HSA, όπου συλλέχθησαν και λύθηκαν ακολουθώντας ανάλυση με Western Blot, χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα έναντι του φωσφορυλιωμένου και ολικών πρωτεϊνών του υποδοχέα TrkA.

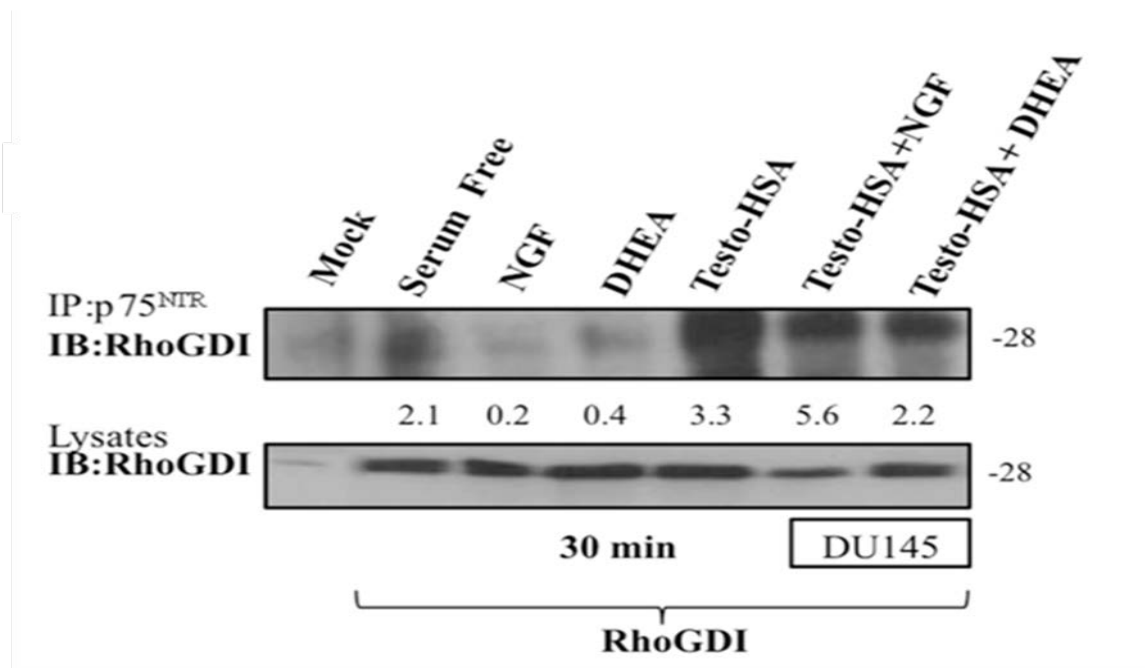
6.2 Αλληλεπίδραση του υποδοχέα με p75^{NTR} με τους τελεστές του (effectors), RIP2 και RhoGDI, κατόπιν επίδρασης της DHEA, ενώ η τεστοστερόνη μπλοκάρει τα αποτελέσματα με αυτούς τους υποδοχείς.

Για τον έλεγχο της ενεργοποίησης του p75^{NTR} μέσω των στεροειδών DHEA και τεστοστερόνης, επικεντρωθήκαμε στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη DU145, δεδομένου ότι, όπως φαίνεται στην Εικόνα 10Α, σε αυτή την κυτταρική σειρά μόνο, ο p75^{NTR} υποδοχέας είναι σημαντικός μεσολαβητής της κυτταρικής επιβίωσης μετά από επώαση με DHEA. Αρχικά, ελέγξαμε τις επιδράσεις της DHEA και της τεστοστερόνης χρησιμοποιώντας έναν ενδοκυτταρικό παράγοντα αλληλεπίδρασης του p75^{NTR}, την RIP2 πρωτεΐνη (Εικόνα 11Α). Ο κλασικός συνδέτης του p75^{NTR}, ο NGF, ενεργοποιεί την πρόσδεση της RIP2 πρωτεΐνης όπως αυτή δείχνεται με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Η DHEA ενεργοποίησε την πρόσδεση της RIP2 στον υποδοχέα, ενώ η τεστοστερόνη δεν έδειξε καμία ικανότητα να επάγει την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών.

Επιπλέον, ελέγξαμε την ικανότητα της DHEA και της τεστοστερόνης στην απελευθέρωση της πρωτεΐνης, RhoGDI, ένας άλλος παράγοντας αλληλεπίδρασης (interactor) του p75^{NTR} υποδοχέα, σημαντικός για την ρύθμιση της δράσης της RhoA. Πράγματι, ο NGF και η DHEA επάγουν την απελευθέρωση της πρωτεΐνης RhoGDI (Εικόνα 11Β), ενώ για την τεστοστερόνη δεν παρατηρούμε το ίδιο αποτέλεσμα. Όταν τα κύτταρα DU145 επωάζονται ταυτόχρονα με την τεστοστερόνη (testosterone-HSA) και με DHEA ή NGF, παρατηρείται ότι η απελευθέρωση της RhoGDI έχει αποκλειστεί, υποδεικνύοντας ότι η τεστοστερόνη δρα ως ανταγωνιστής για την ενεργοποίηση του υποδοχέα p75^{NTR}, όπως και στην περίπτωση για τον υποδοχέα TrkA επίσης.



Εικόνα 11.1: DU145 κύτταρα μετά από παροδική επιμόλυνση με το πλασμίδιο cDNAs του p75^{NTR} και του παράγοντα RIP2. Τα επιμολυσμένα κύτταρα επώαστηκαν για 20 λεπτά με RIP2 και έπειτα ενεργοποιήθηκαν με 10⁻⁷M (ή 100nM) DHEA ή 10⁻⁷M τεστοστερόνης (Testosterone-HAS) ή 100ng/ml NGF ή και ταυτόχρονα με 10⁻⁶M τεστοστερόνης και 10⁻⁷M DHEA ή 100ng/ml NGF και κυτταρικά λύματα ανοσοκατακρημνίσθηκαν με αντισώματα έναντι RIP2 όπου ακολουθεί ανοσοσύτωση με ειδικά αντισώματα του p75^{NTR}.



Εικόνα 11.2: DU145 κύτταρα μετά από παροδική επιμόλυνση με το πλασμίδιο cDNAs του p75^{NTR} και του παραγοντα RhoGDI. Τα επιμολυσμένα κύτταρα επωάστηκαν για 30 λεπτά με RhoGDI και στην συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 10⁻⁷M (ή 100nM) DHEA ή 10⁻⁷M τεστοστερόνης (Testosterone-HAS) ή 100ng/ml NGF ή και ταυτόχρονα με 10⁻⁶M τεστοστερόνης και 10⁻⁷M DHEA ή 100ng/ml NGF και κυτταρικά λύματα ανοσοκατακρημνίσθηκαν με αντισώματα έναντι RhoGDI , όπου ακολουθεί ανοσοσύτωση με ειδικό αντίσωμα του p75^{NTR} .

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ανδρογόνα στεροειδή, όπως η DHEA και η τεστοστερόνη, αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για πολλών τύπων καρκίνου, κυρίως του προστάτη και του παχέος εντέρου (Rau et al, 2005, Labrie et al, 1993).

Ενώ ο ρόλος των ανδρογόνων πιστευόταν ότι είναι μη σημαντικός για τον εξελισσόμενο καρκίνο υπό οποιαδήποτε μορφή ανδρογονικού αποκλεισμού, πρόσφατα στοιχεία έδειξαν αυξημένη έκφραση του υποδοχέα ανδρογόνων (AR) στη νόσο ανθεκτική στην θεραπεία με το πλεονέκτημα επιπλέον ανδρογονικού αποκλεισμού (Labrie, 2010).

Δεδομένου ότι τα διαθέσιμα αντι-ανδρογόνα έχουν χαμηλή συγγένεια για AR και δεν μπορούν να εμποδίσουν εντελώς την δράση ανδρογόνων, ιδιαίτερα με την παρουσία αυξημένων επιπέδων AR, καθίσταται σημαντικό να ανακαλυφθούν πιο ισχυροί κι ειδικοί αναστολείς των AR (Labrie, 2010).

Δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι η ανακάλυψη και ο χαρακτηρισμός των ενδοκυτταρικών υποδοχέων AR, καθώς και βασικών ενζύμων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των στεροειδών, οδήγησαν σε μια πληθώρα ανάπτυξης νέων θεραπευτικών στρατηγικών που είτε αναστέλλουν την βιοσύνθεση στεροειδών ή μπλοκάρουν τη λειτουργία του υποδοχέα (ανταγωνιστές). Δεδομένου ότι πολλές κλινικές μελέτες έχουν ήδη επιβεβαιώσει ότι η τεστοστερόνη είναι μια ασφαλής και αρκετά καλά ανεκτή θεραπεία για τους άνδρες με πρόωρο ορμονοάντοχο καρκίνο του προστάτη (ορμονοάντοχος καρκίνος του προστάτη ονομάζεται ο καρκίνος που συνεχίζει να εξελίσσεται παρά την καταστολή των ανδρογόνων που τροφοδοτούν την ανάπτυξη των προστατικών καρκινικών κυττάρων), πιστεύουμε ότι τα ανδρογόνα μπορεί να είναι μια δυναμική θεραπεία για θετικό στους AR καρκίνο του προστάτη. Στην φαρμακολογική αντιμετώπιση των μεταστάσεων η ορμονική θεραπεία έχει γίνει ένα κριτήριο φροντίδας σε θετικό στους υποδοχείς καρκίνο του προστάτη (Chuu et al, 2011).

Τα ανδρογόνα στεροειδή όπως η τεστοστερόνη ή η DHEA μπορούν να ενισχύουν ή να μειώνουν τον κίνδυνο καρκίνου του προστάτη και του καρκίνου του παχέος εντέρου. Ο F. Labrie έχει εισάγει τον όρο

<Intracrinology> (η βάση για τον ορθολογικό σχεδιασμό της ορμονικής θεραπείας σε όλα τα στάδια του καρκίνου του προστάτη), προσπαθώντας να εξηγήσει τις πολύπλοκες τοπικές αλληλεπιδράσεις των ορμονών σε ορμονοεξαρτώμενους όγκους (Labrie et al, 1993). Η σύνθεση και ο μεταβολισμός των στεροειδών λαμβάνει χώρα σε περιφερικούς ιστούς-στόχους και στη συνέχεια τα κύτταρα του προστάτη ρυθμίζουν το αναγκαίο επίπεδο των ενδοκυτταρικών δραστικών γεννητικών στεροειδών ορμονών χρησιμοποιώντας ένζυμα κατάλυσης όπως 17β-Υδροξυστεροειδο-δευδρογενάση (hydrogysteroid dehydrogenase, 17β-HSD), 3β-Υδροξυστεροειδο-δευδρογενάση (3β-HSD) και 5α-Αναγωγάση (5α-reductase).

Η DHEA είναι μια σημαντική πηγή των ανδρογόνων, η οποία, όταν μεταβολίζεται από τα κύτταρα του προστάτη, συμβάλει σημαντικά στην ποσότητα της διϋδροτεστοστερόνης (DHT) που ανιχνεύεται στον προστάτη (Arnold et al, 2005, Heinlein et al, 2004). Υψηλά επίπεδα της διϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA) ή του θειϊκού εστέρας της, της θειϊκής δεϋδροεπιαδροστερόνης (DHEA-S), βρίσκονται στις υψηλότερες τιμές τους σε νεαρούς ενήλικες. Ωστόσο δεν παρατηρούνται υψηλά ποσοστά καρκίνου σε νέους ανθρώπους. Θα μπορούσε να υποτεθεί ότι η DHEA ή οι μεταβολίτες της, όπως η τεστοστερόνη μπορεί να παίζουν ένα προστατευτικό ρόλο στον προστάτη νεαρών ατόμων. Η μείωση της DHEA με τη γήρανση μπορεί να συμβάλει στην πρόοδο του καρκίνου του προστάτη που συνδέεται με την προχωρημένη ηλικία (Pike et al, 1983). Η DHEA, έχει αποδειχθεί ότι είναι προληπτική του καρκίνου σε καρκινογόνα τρωκτικά με καρκίνο του προστάτη σε *in vivo* και *in vitro* μελέτες. Η σημασία αυτών των μελετών στην ανθρώπινη βιολογία είναι αβέβαιη καθώς σε αντίθεση με τα τρωκτικά, οι ποσότητες των DHEA και DHEA-S είναι πολύ υψηλότερες σε ανθρώπους. (Arnold et al, 2009).

Είναι γνωστό ότι οι καρκινικές κυτταρικές σειρές του προστάτη, όπως οι DU145, LNCaP και PC3, που έχουν διαφορετικές ικανότητες πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης, εκφράζουν τους υποδοχείς TrkA, TrkB και p75^{NTR}. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η έκφραση των υποδοχέων TrkA και TrkB είναι σημαντικά υψηλότερη σε κύτταρα προστάτη που δεν εκφράζουν υποδοχείς ανδρογόνων (AR), σε σύγκριση με κύτταρα που εκφράζουν υποδοχείς ανδρογόνων, κι η έκφρασή τους συσχετίζεται με την ικανότητα εισβολής / κακοήθειας των καρκινικών κυττάρων του προστάτη (Tacconelli et al, 2004). Η κακοήθεια των καρκινικών κυττάρων του προστάτη φαίνεται να συνοδεύεται από αυξημένη σηματοδότηση του TrkA και του TrkB (με μείωση της έκφρασης του p75^{NTR}), και ρυθμιστές αυτών των υποδοχέων θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη μείωση σχηματισμού μετάστασης. Μια νέα παραλλαγή του εναλλακτικού ματίσματος με το κατασταλτικό ογκογόνο δυναμικό έχει πρόσφατα μελετηθεί στο νευροβλάστωμα. Οι σωματικές αναδιατάξεις του γονιδίου του TrkA που παράγουν χιμαιρικά ογκογονίδια με συστατική δραστικότητα κινάσης τυροσίνης, έχουν επίσης ανιχνευθεί σε κλάσμα θηλώδους όγκου του θυρεοειδούς (Pierotti and Greco, 2006). Οι μελέτες αυτές υποδηλώνουν την ανάπτυξη των αυτοκρινών βρόχων κατά την πρόοδο του όγκου προς την κακοήθεια. Ενδιαφέρον είναι ότι η μετανάστευση των κακοηθών κυττάρων εμφανίζεται συχνά κατά μήκος των νεύρων εντός του προστάτη, γεγονός που μπορεί να προβλέπει μια πλούσια πηγή νευροτροφίνων που ενεργεί ως καθοδηγητής για ενδείξεις για μετανάστευση του κυτταρικού όγκου. Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο καρκίνος του προστάτη συνδέεται με την πυκνότητα των νευρικών κυττάρων να αυξάνεται και γύρω από τον όγκο. Ανάλυση δειγμάτων ιστών τόσο από πειραματόζωα όσο και από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη, επικεντρώθηκε στο Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα (ΑΝΣ), το οποίο ελέγχει όλες τις αυτόματες λειτουργίες του οργανισμού [οι δύο κλάδοι του Αυτόνομου Νευρικού Συστήματος είναι το Συμπαθητικό Νευρικό Σύστημα (ΣΝΣ) και το Παρασυμπαθητικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ)].

Το ΣΝΣ συμμετέχει στα πρώτα στάδια του καρκίνου του προστάτη ενώ το ΠΝΣ εμπλέκεται αργότερα, όταν πια ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί. Διαπίστωσαν ότι κατά την προετοιμασία του οργανισμού να αντιμετωπίσει μια απειλή (π.χ. το άγχος) εκκρίνεται η νοραδρεναλίνη, η οποία συγκεντρώνεται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων και συμβάλλει στην απελευθέρωση χημικών ουσιών που επιταχύνουν τη δημιουργία και την αύξηση των καρκινικών όγκων. Κατά την ανάλυση αυτών των δειγμάτων που είχαν προσβληθεί από καρκίνο του προστάτη διαπιστώθηκε ότι μέσα και γύρω από τους επιθετικούς όγκους υπήρχαν περισσότερες νευρικές ίνες σε σχέση με τους μη επιθετικούς όγκους. Οι επιστήμονες έχουν ενδείξεις ότι μία από τις κύριες κατηγορίες φαρμάκων, που μεταξύ άλλων ρυθμίζουν την αρτηριακή πίεση, οι β-αναστολείς θα μπορούσαν να βοηθήσουν στη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη, καθώς φαίνεται ότι μπορούν να μπλοκάρουν τους υποδοχείς της νοραδρεναλίνης. Τα φάρμακα που στοχεύουν στο Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα μπορεί να αποδειχθούν θεραπευτικά για τον καρκίνο του προστάτη (Frenette et al, 2013).

Τα τελευταία χρόνια ο τρόπος δράσης των στεροειδών ορμονών έχει επεκταθεί με την περιγραφή μηχανισμών που εκκινούν από την κυτταρική μεμβράνη, αποκαλύπτοντας ένα μεγάλο αριθμό δράσεων σε καρκινικά κύτταρα (Koukouritaki et al, 1999, Papadopoulou et al, 2009). Έχουμε ήδη μελετήσει τις επιδράσεις του ανδρογόνου τεστοστερόνη στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη και του παχέος εντέρου μέσω μεμβράνικων θέσεων πρόσδεσης (Gu et al 2009, Hatzoglou et al, 2005), το οποίο αναστέλλει στη συνέχεια σημαντικά προ-επιβιωτικά μονοπάτια όπως αυτό των κινασών PI3K και Akt (PI3K/Akt pathway), ρυθμίζει αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 όπως είναι η Bad (Papadopoulou et al, 2008, Gu et al, 2011) και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης μέσω των GTPάσων όπως Cdc-42/Rac1 και RhoA/B (Hatzoglou et al, 2005; Kampa et al, 2006; Papadopoulou et al, 2008; Papakonstanti et al, 2003).

Από την άλλη μεριά, έχει πρόσφατα περιγραφεί ότι ένα άλλο σημαντικό ανδρογόνο στεροειδές, η διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA), μπορεί να δεσμεύει και να ενεργοποιεί τους υποδοχείς του NGF, TrkA και p75^{NTR} (Lazaridis et al, 2011), οι οποίοι με τη σειρά τους παίζουν σπουδαίο ρόλο στις ιδιότητες καρκινικών κυττάρων. Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι η DHEA είναι ένας αντι-αποπτωτικός παράγοντας, αντιστρέφοντας την επαγόμενη από στέρηση ορού απόπτωση στον καρκίνο του προστάτη (DU145 και LNCaP κύτταρα), καθώς και στον καρκίνο του παχέος εντέρου (CaCO2 κύτταρα).

Ο νευρικός αυξητικός παράγοντας (NGF) φαίνεται να ασκεί παρόμοια αντι-αποπτωτική δράση τόσο σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη όσο και σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου. Ο ενδογενής συνδέτης NGF εξασκεί υψηλής συγγενείας επιδράσεις στο υποδοχέα TrkA, αλλά επίσης και τα στεροειδή μπορούν να ενεργοποιήσουν ή να μπλοκάρουν τους ίδιους υποδοχείς, και έτσι ο ακριβής λόγος της συγκέντρωσης κάθε μορίου ρυθμίζει τελικά την συνολική απόκριση του συστήματος.

Στην παρούσα μελέτη, διερευνήσαμε τις πιθανές αλληλεπιδράσεις αυτών των τριών μορίων, των στεροειδών τεστοστερόνη και DHEA με τον NGF, όσο αφορά την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη και του παχέος εντέρου. Επιβεβαιώσαμε τα προηγούμενα αποτελέσματα μας ότι η τεστοστερόνη, επάγει την απόπτωση σε συνθήκες παρουσίας ορού και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές. Αντίθετα το άλλο σημαντικό για τον ιστό στεροειδές, η DHEA, αναστέλλει την επαγόμενη από στέρηση ορού απόπτωση, όπως κι ο NGF επίσης, στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές του προστάτη (LNCaP και DU145) και στην καρκινική κυτταρική σειρά του παχέος εντέρου CaCO2.

Το πρώτο νέο αποτέλεσμα της παρούσας διατριβής είναι επομένως ότι η DHEA διασώζει τα καρκινικά κύτταρα από απόπτωση. Την παρατήρηση αυτή ακολούθησε η ταυτόχρονη επώαση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη DU145 και του παχέος εντέρου CaCO2 με τεστοστερόνη και DHEA ή NGF,

ώστε να διερευνηθεί αν οι αντίθετες δράσεις των στεροειδών μορίων είναι ανταγωνιστικές, μέσω κοινού μηχανισμού. Πράγματι, η τεστοστερόνη μπορεί να ανταγωνιστεί τις κυτταροπροστατευτικές δράσεις της DHEA ή του NGF, που μεσολαβείται από τους υποδοχείς TrkA και p75^{NTR}. Όπως περιγράφηκε σε προηγούμενες μελέτες, η τεστοστερόνη μπορεί να συνδεθεί σε απομονωθείσες μεμβράνες των κυττάρων PC12 ή άλλων νευρωνικών κυττάρων, εκτοπίζοντας την ραδιενεργά σημασμένη DHEA από ειδικές μεμβρανικές θέσεις πρόσδεσης (Charalampopoulos et al, 2006, Lazaridis et al 2011). Ωστόσο, η δέσμευση τεστοστερόνης πραγματοποιήθηκε με μικρότερη συγγένεια από ό, τι η DHEA. Η ίδια δεσμευτική ικανότητα της τεστοστερόνης παρουσιάστηκε σε -TrkA και p75^{NTR}- επιμολυσμένα HEK293 κύτταρα, αλλά χωρίς οποιαδήποτε δυνατότητα ενεργοποίησης αυτών των υποδοχέων. Αυτές οι ενδείξεις είναι τώρα σε πλήρη συμφωνία με την παρατήρηση ότι η τεστοστερόνη δεν μπορεί να διασώσει τα κύτταρα από την απόπτωση (με ενεργοποίηση του προ-επιβιωτικού υποδοχέα TrkA), αλλά θα μπορούσε να μπλοκάρει τις επιδράσεις της DHEA ή του NGF ανταγωνίζοντας τα τελευταία για τους ίδιους υποδοχείς. Επιπλέον, δεν ενεργοποιεί ούτε τον έτερο υποδοχέα του NGF υποδηλώνοντας ότι οι προ-αποπτωτικές επιδράσεις της τεστοστερόνης δεν διαμεσολαβούνται από την ειδική ενεργοποίηση του υποδοχέα θανάτου (death receptor) p75^{NTR} (ο p75^{NTR} υποδοχέας επάγει την απόπτωση όταν ενεργοποιείται μόνος του από ώριμα ή πρόδρομα μόρια των νευροτροφινών, αλλά ενισχύει τις επιδράσεις επιβίωσης του TrkA όταν συν-εκφράζονται σε ορισμένη αναλογία). Είναι ενδιαφέρον να σημειώσουμε, ότι η τεστοστερόνη αναστέλλει την επαγόμενη μέσω της DHEA ή του NGF – ενεργοποίηση και των δύο υποδοχέων (αδρανοποιεί την φωσφορυλίωση του TrkA και αναστέλλει την ενεργοποίηση της RIP2 ή την απελευθέρωση της RhoGDI από τον υποδοχέα p75^{NTR}), επιβεβαιώνοντας τον ανταγωνιστικό ρόλο του (Εικόνες 10.1, 10.2, 11.1 και 11.2). Η τεστοστερόνη φαίνεται να αναστέλλει ακόμη την αυξημένη αυτό-φωσφορυλίωση του TrkA σε απουσία των προσδεμάτων του, ένας μηχανισμός που θα μπορούσε να

αναστείλει την ανεξάρτητη από το πρόσδεμα ενεργοποίηση του TrkA υποδοχέα, μειώνοντας την επιβίωση και την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Επίσης οι επιδράσεις της τεστοστερόνης στην αδρανοποίηση της RhoGDI θα μπορούσε να εξηγήσουν τις προηγουμένως αναφερθείσες επιδράσεις αυτού του στεροειδούς στην ενεργοποίηση της RhoA: η RhoGDI είναι ένας ενδοκυτταρικός παράγοντας αλληλεπίδρασης του υποδοχέα p75^{NTR} που απελευθερώνεται μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα από τον NGF και με τη σειρά της δεσμεύεται στην RhoA αδρανοποιώντας την τελευταία (Yamashita et al, 1999). Δεδομένου ότι, η τεστοστερόνη εμποδίζει την απελευθέρωση της RhoGDI από τον p75^{NTR} υποδοχέα, διατηρεί ενεργή την πρωτεΐνη RhoA προωθώντας την απόπτωση. Η υπόθεση αυτή είναι σύμφωνη με τα προηγούμενα ευρήματα, που δείχνουν την ταχεία ενεργοποίηση της RhoA -σε κύτταρα DU145 που επώαστηκαν με τεστοστερόνη- και ρυθμίζει την πρόωρη αναδιοργάνωση της ακτίνης και την προ-αποπτωτική απόκριση (Papadopoulou et al, 2008).

Τα αποτελέσματα της σχέσης δόσης-απόκρισης της DHEA και της τεστοστερόνης (Εικόνες 1, 3) στην πρόληψη ή την επαγωγή της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα υποδηλώνουν μια δράση μέσω υποδοχέα. Στην παρούσα διατριβή μελετήσαμε τους υποδοχείς του NGF ως πιθανές θέσεις για την αλληλεπίδραση με DHEA και τεστοστερόνη. Πρώτον, επιβεβαιώσαμε ότι και οι δύο κυτταρικές σειρές του καρκίνου του προστάτη DU145 και παχέος εντέρου CaCO2 εκφράζουν τους υποδοχείς TrkA και p75^{NTR} (Εικόνες 6.1, 6.2). Το επόμενο σημαντικό εύρημα αυτής της μελέτης ήταν ότι η DHEA και ο NGF υπερεκφράζουν την έκφραση του υποδοχέα TrkA, ενώ τεστοστερόνη μειώνει την έκφραση του υποδοχέα αυτού (Εικόνες 7.1, 7.2), ιδιαίτερα όταν τα κύτταρα έχουν καλλιεργηθεί υπό συνθήκες ορού (δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές για τον υποδοχέα p75^{NTR} για όλες τις συνθήκες). Το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει εν μέρει την ανικανότητα της τεστοστερόνης να επάγει

απόπτωση σε συνθήκες απουσίας ορού (όπου τα επίπεδα του υποδοχέα TrkA έχουν ήδη μειωθεί και έτσι η απόπτωση έχει φθάσει σε ένα πλατώ). Αποδείχθηκε ότι η τεστοστερόνη μειώνει την έκφραση του υποδοχέα TrkA χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα της έκφρασης του p75^{NTR}, καταλήγοντας σε μία χαμηλότερη αναλογία TrkA/p75^{NTR} και ευνοώντας έτσι την απόπτωση. Αυτό περιγράφεται επίσης στα κύτταρα φαιοχρωμοκύττωματος nnr5 (κλώνος των κυττάρων PC12), όπου τα κύτταρα εκφράζουν μόνο τον p75^{NTR} υποδοχέα. Στα κύτταρα nnr5, η DHEA ή ο NGF επάγουν την απόπτωση, ωστόσο η επιμόλυνση των nnr5 κυττάρων με το cDNA TrkA ανασυνθέτει τις προ-επιβιώτικες δράσεις των δύο παραγόντων (Lazaridis et al ,2011).

Δεδομένου ότι η συμμετοχή του NGF και του υποδοχέα του ήταν προφανής για τις επιδράσεις της τεστοστερόνης και της DHEA, εξετάσαμε τη συμμετοχή του ενδογενούς NGF που παράγεται, στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Αυτό περιγράφεται - τουλάχιστον για τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη- που παράγουν και εκκρίνουν NGF (Molloy et al, 2011;Rubin και Segal, 2004). Καλλιεργήσαμε κύτταρα DU145 και CaCO2 με την παρουσία ενός ειδικού αντισώματος που όταν χρησιμοποιείται σε περίσσεια, αδρανοποιεί πλήρως τον εκκρινόμενο NGF. Παρατηρήσαμε (Εικόνα 8) ότι το μπλοκάρισμα ενδογενούς NGF οδήγησε σε μικρή αύξηση της απόπτωσης μόνο σε συνθήκες συμπληρώματος ορού, ενώ δεν άλλαξε τις επιδράσεις της DHEA ή του NGF στην επιβίωση τόσο σε DU145 όσο και σε CaCO2 κύτταρα. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει σαφώς ότι ο ενδογενής NGF που παράγεται, συμμετέχει στη ρύθμιση της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων (η ικανότητα του anti-NGF να αυξάνει απόπτωση μόνο σε συνθήκες συμπληρώματος ορού, σημαίνει ότι κάτω από συνθήκες στέρησης ορού η απόπτωση έχει περιοριστεί και δεν μπορεί να συμβεί κυτταρικός θάνατος), αλλά δεν μπορεί να τροποποιήσει τα αποτελέσματα της DHEA σε αυτά τα κύτταρα (DU145 και CaCO2), τουλάχιστον στην συγκέντρωση 100nM (10⁻⁷M) που χρησιμοποιήθηκε.

Ωστόσο, για τις επιδράσεις της τεστοστερόνης παρατηρήσαμε διαφορετικά αποτελέσματα. Ενώ σε DU145 κύτταρα η χρήση του anti-NGF οδήγησε σε παρόμοια επίπεδα όπως και η τεστοστερόνη μόνη της ή σε συνδυασμό με anti-NGF, σε κύτταρα CaCO₂ το anti-NGF αυξάνει την απόπτωση σε σύγκριση με τις συνθήκες ορού και η τεστοστερόνη εξασκεί ακόμη ισχυρότερη προ-αποπτωτική δράση, η ταυτόχρονη επώαση με anti-NGF και τεστοστερόνη οδήγησε τα επίπεδα απόπτωσης παρόμοια με εκείνα του anti-NGF μόνο του. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι οι δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές ανταποκρίνονται διαφορετικά σε NGF και τεστοστερόνη, με τα CaCO₂ κύτταρα να είναι περισσότερο εξαρτημένα στις επιδράσεις του NGF από τα DU145 κύτταρα όπου ο NGF και η τεστοστερόνη δρουν με ίση ισχύ (αν και, χρονοχωρικές διακυμάνσεις του κάθε μορίου μπορεί να οδηγήσει σε ορισμένα αποτελέσματα στην απόπτωση και ρυθμίζει την τελική κυτταρική απόκριση).

Επιβεβαιώσαμε περαιτέρω την σημασία των δύο υποδοχέων του NGF ως μεσολαβητές των αποτελεσμάτων της DHEA ή της τεστοστερόνης στην απόπτωση των DU145 και CaCO₂ κυττάρων. Μετρήθηκε η απόπτωση με την παρουσία ειδικών αναστολέων TrkA ή p75^{NTR}. Ενώ οι δύο αναστολείς δεν τροποποιούν κανένα αποπτωτικό αποτέλεσμα της τεστοστερόνης, επιβεβαιώνοντας τον ανταγωνιστικό ρόλο αυτού του στεροειδούς χωρίς οποιαδήποτε ικανότητα για ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων, παρουσιάζουν ενδιαφέρον οι επιδράσεις μετά από επώαση με DHEA. Ο TrkA αναστολέας και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές μπλοκάρει πλήρως τις προστατευτικές δράσεις της DHEA. Ωστόσο, για τον p75^{NTR} υποδοχέα υπάρχουν διαφορετικές επιδράσεις μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών: σε κύτταρα του προστάτη DU145 ο αναστολέας p75^{NTR} εμποδίζει τις προστατευτικές δράσεις της DHEA, αλλά αυτό δεν γίνεται στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου CaCO₂, όπου ο αποκλεισμός του p75^{NTR} δεν είναι επαρκής να αναστρέψει την προστατευτική δράση της DHEA. Η διαφορά αυτή

υποστηρίζει την υπόθεση ότι ο υποδοχέας p75^{NTR} έχει διαφορετικό ρόλο μεταξύ των δύο τύπων καρκίνου. Συγκεκριμένα, στον καρκίνο του προστάτη, ο υποδοχέας είναι αναγκαίος για την προστασία εξαρτώμενη του TrkA από την DHEA. Από την άλλη μεριά, στην κυτταρική σειρά του καρκίνου του παχέος εντέρου CaCO₂, η ενεργοποίηση του TrkA είναι επαρκής για τις αντί-αποπτωτικές δράσεις της DHEA, και ίσως η ενεργοποίηση του p75^{NTR} από την DHEA (Εικόνα 10) επιτυγχάνει άλλες κυτταρικές επιδράσεις, όπως την διαφοροποίηση ή την μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων όπου θα μπορούσε να ρυθμίζεται από αυτόν τον υποδοχέα.

Μελλοντικά πειράματα χρησιμοποιώντας *in vivo* μοντέλα για συγκεκριμένους τύπους του καρκίνου του προστάτη ή του παχέος εντέρου (Harel et al, 2010) θα παρέχει πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις των ανδρογόνων και των νευροτροφινών σε αυτούς τους όγκους (Labrie et al, 2000). Χρησιμοποιώντας ξενομοσχεύματα και όγκους που επάγουν καρκινογένεση (π.χ νευροβλάστωμα) όπου εκφράζουν υψηλά επίπεδα αυτών των υποδοχέων θα μπορούσαμε να χρησιμοποιήσουμε τα μικρά, εξαιρετικά λιπόφιλα στεροειδή, όπως την τεστοστερόνη ή την DHEA (ή επίσης συνθετικά ανάλογα αυτών των μορίων που στερούνται οποιασδήποτε μεταβολική διαδικασία με άλλα στεροειδή) (Calogeropoulou et al, 2009) για να εξεταστεί η ανάπτυξη του όγκου ή της καταστολής. Πιο συγκεκριμένα, αρουραίοι R3327 AT 6.3 και H (Weeraratna et al, 2001) *in vivo* μοντέλα ή διαγονιδιακά ποντίκια για τον καρκίνο του προστάτη (Greenberg et al, 1995) θα μπορούσαν να υποβληθούν σε χορήγηση με DHEA ή τεστοστερόνη για την αξιολόγηση των επιδράσεων στεροειδών για τον καρκίνο του προστάτη *in vivo*.

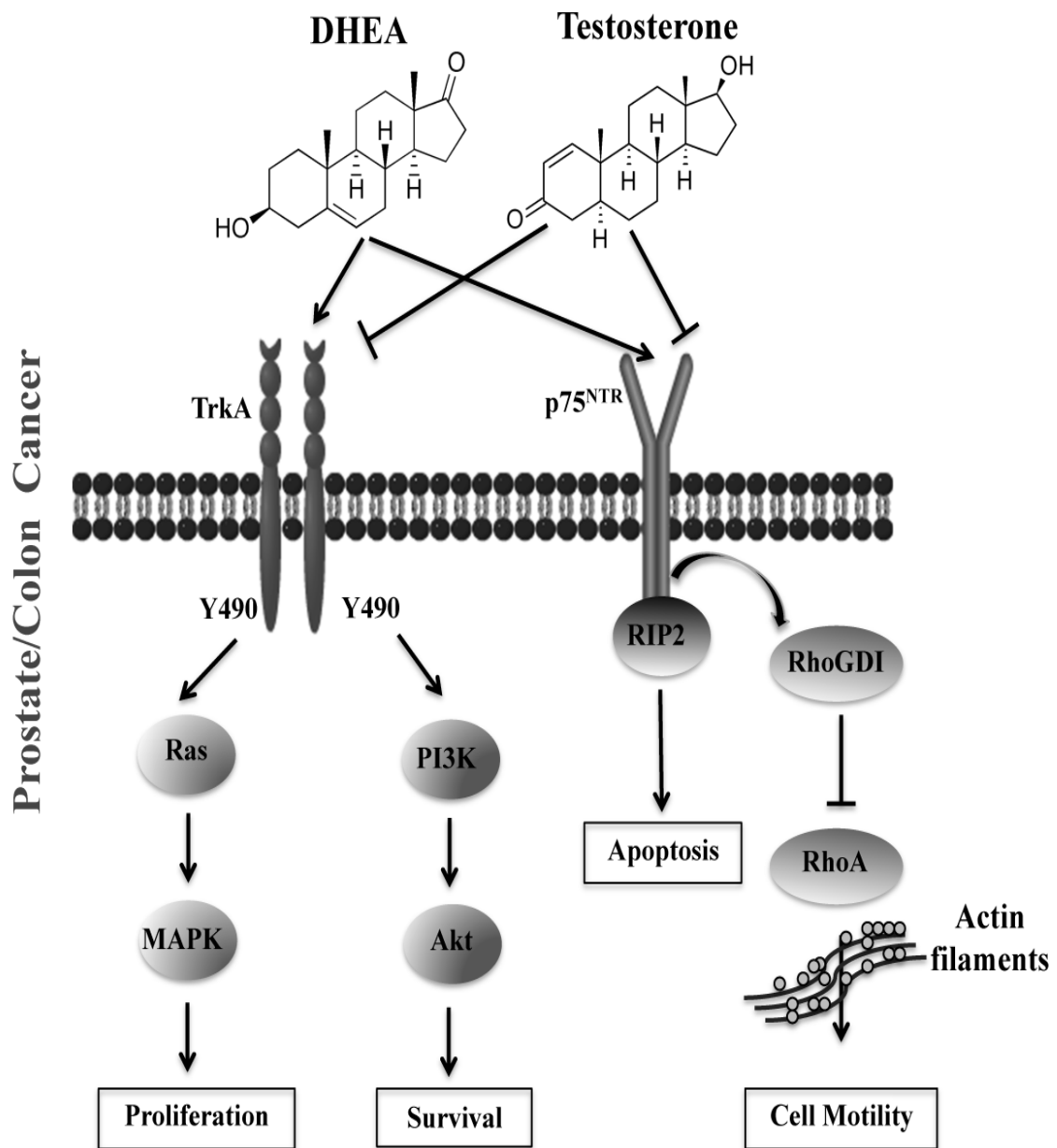
Η μελέτη μας για την δομή και την λειτουργία των υποδοχέων του NGF (Charalampopoulos et al 2012, Vilar et al 2009) με την κατασκευή και τον λειτουργικό χαρακτηρισμό των μεταλλαγμένων υποδοχέων, θα μπορούσε να

αποδειχθεί χρήσιμη για την αποκρυπτογράφηση των πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην ιδιότητες του καρκίνου, και ως εκ τούτου να αναπτύχθουν περισσότερο επιλεκτικές θεραπευτικές μεθόδους για την πρόληψη του καρκίνου.

Η παρούσα ερευνητική εργασία είναι η πρώτη που εμπλέκει επιδράσεις στεροειδών σε καρκινικά κύτταρα μέσω των υποδοχέων του NGF. Δείχνει πιθανές δράσεις δύο μεγάλων κατηγοριών μορίων, στεροειδείς ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες που μπορούν να επικοινωνούν χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα υποδοχέων αλλά με διαφορετικό τρόπο. Αυτά τα μόρια μπορούν να ρυθμίσουν ακριβώς τα ίδια ενδοκυτταρικά μονοπάτια, τα οποία είναι εξαιρετικά σημαντικά για κυτταρικές αποκρίσεις στον καρκίνο. Ωστόσο, δείχνουν ότι δεν δρουν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο, αλλά μπορούν να ανταγωνίζονται ή να αλληλοσυμπληρώνονται. Επιπλέον, είναι σημαντικό ότι τα ίδια στεροειδή μέσω των ίδιων μηχανισμών (αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς του NGF) μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετικές αποκρίσεις ανάλογα με το τύπο του καρκίνου (διαφορετική απόκριση των επιδράσεων της DHEA με τον αναστολέα p75^{NTR} σε CaCO₂ από DU145 κύτταρα, Εικόνα 9) ή την ύπαρξη αυξητικών παραγόντων στο μικροπεριβάλλον του κάθε καρκίνου (η ταυτόχρονη επώαση του anti-NGF με τεστοστερόνη ασκεί διαφορετικές επιπτώσεις στην απόπτωση των κύτταρων CaCO₂ έναντι DU145, Εικόνα 8). Αν λάβουμε υπόψη ότι η DHEA μπορεί να μεταβολιστεί σε τεστοστερόνη τότε τον συνολικό έλεγχο της ανάπτυξης του καρκίνου ρυθμίζεται με έναν πολύ ακριβή τρόπο.

Συμπερασματικά, τα ευρήματά μας εμπλέκουν για πρώτη φορά τους υποδοχείς του NGF ως μεσολαβητές στις δράσεις των ανδρογόνων για τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη και του παχέος εντέρου. Τα ευρήματά μας υποδηλώνουν ότι οι παρακρινείς αλληλεπιδράσεις των ανδρογόνων στεροειδών με το τοπικά παραγόμενο NGF μπορεί να καθορίσει την τύχη των καρκινικών

κυττάρων. Η αλληλεπίδραση μεταξύ στεροειδούς ορμόνης και νευροτροφίνης σε ορμονο-εξαρτώμενους όγκους προσφέρει νέες γνώσεις στην παθοφυσιολογία αυτών των νεοπλασμάτων.



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων των ανδρογόνων στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη και του παχέος εντέρου μέσω των υποδοχέων TrkA και p75^{NTR}.

Η DHEA επάγει τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα TrkA σε συγκεκριμένα υπολείμματα τυροσίνης και στη συνέχεια ενεργοποιεί τα σηματοδοτικά μονοπάτια Ras-MAPK και PI3K-Akt, που ρυθμίζουν την κυτταρική επιβίωση ή τον πολλαπλασιασμό στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη ή του παχέος εντέρου. Επιπλέον, η DHEA ενεργοποιεί τον υποδοχέα του θανάτου, p75^{NTR}, που οδηγεί σε ενεργοποίηση της RIP2 πρωτεΐνης ή την απελευθέρωση της RhoGDI η οποία με τη σειρά μπλοκάρει την RhoA, και ως εκ τούτου προκαλεί αναδιάταξη των ινιδίων της ακτίνης και τον έλεγχο της κινητικότητας των κυττάρων.

Αντιθέτως η τεστοστερόνη ενεργεί ως ανταγωνιστής των DHEA και NGF εμποδίζοντας την δράση των DHEA ή NGF μέσω των υποδοχέων του NGF.

Το τελικό αποτέλεσμα αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι μια ενορχηστρωμένη ρύθμιση της αποπτώσης των καρκινικών κυττάρων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alimirah F, Chen J, Basrawala Z, Xin H, Choubey D. DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Lett* 2006; 580:2294-2300.
2. Aloe L, Rocco ML, Bianchi P, Manni L. Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. *J Transl Med.* 2012; 10:23.
3. Anagnostopoulou V, Pediaditakis I, Alkahtani S, Alarifi SA, Schmidt EM, Lang F, Gravanis A, Charalampopoulos I, Stournaras C. Differential Effects of Dehydroepiandrosterone and Testosterone in Prostate and Colon Cancer Cell Apoptosis: The Role of Nerve Growth Factor (NGF) Receptors. *Endocrinology* 2013; 154(7):2446-56.
4. Aoki K, Nakajima A, Mukasa K, Osawa E, Mori Y, Sekihara H. Prevention of diabetes, hepatic injury, and colon cancer with dehydroepiandrosterone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 85:469-72.
5. Arnold JT, Gray NE, Jacobowitz K, Viswanathan L, Cheung PW, McFann KK, Le H, Blackman MR. Human prostate stromal cells stimulate increased PSA production in DHEA-treated prostate cancer epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008 Sep; 111(3-5):240-6.
6. Arnold JT, Liu X, Allen JD, Le H, McFann KK, Blackman MR. Androgen receptor or estrogen receptor-beta blockade alters DHEA-, DHT-, and E(2)-induced proliferation and PSA production in human prostate cancer cells. *Prostate* 2007;67(11):1152-62.
7. Arnold JT. DHEA metabolism in prostate. For better or worse? *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 301(1-2):83-8.
8. Bassili M, Birman E, Schor NF, Saragovi HU. Differential roles of Trk and p75^{NTR} neurotrophin receptors in tumorigenesis and chemoresistance ex

- vivo and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010 May; 65(6):1047-56.
9. Baulieu EE. Neuroactive neurosteroids: dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulphate. *Acta Paediatrica* 1999; 88 (Suppl) 78–80.
 10. Baulieu EE, Thomas G, Legrain S, Lahlou N, Roger M, Debuire B, Faucounau V, Girard L, Hervy MP, Latour F. Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. *PNAS* 2000; 97 4279–4284.
 11. Baulieu EE, Robel P, Schumacher M. Neurosteroids: beginning of the story. *Int.Rev. Neurobiol* 2001; 46: 1–32.
 12. Benito-Gutierrez E., Garcia-Fernandez J. and Comellab J. X., Origin and evolution of the Trk family of neurotrophic receptors. *Mol Cell Neurosci* 2006; 31 179– 192.
 13. Bratoeff E, Cabeza M, Ramirez E, Heuze Y, Flores E. Recent advances in the chemistry and pharmacological activity of new steroidal antiandrogens and 5 alpha-reductase inhibitors. *Curr Med Chem* 2005. 12 (8): 927–43.
 14. Bronzetti E, Artico M, Forte F, Pagliarella G, Felici LM, D'Ambrosio A, Vespasiani G, Bronzetti B. A possible role of BDNF in prostate cancer detection. *Oncol Rep.* 2008 Apr; 19(4):969-74.
 15. Brooks RV. Androgens. *Clin Endocrinol Metab.* 1975; 4:503-20.
 16. Calogeropoulou T, Avlonitis N, Minas V, Alexi X, Pantzou A, Charalampopoulos I, Zervou M, Vergou V, Katsanou ES, Lazaridis I, Alexis MN, Gravanis A. Novel dehydroepiandrosterone derivatives with antiapoptotic, neuroprotective activity. *J Med Chem.* 2009; 52:6569-87.
 17. Cao L, Liu X, Lin EJ, Wang C, Choi EY, Riban V, Lin B, During MJ. Environmental and genetic activation of a brain-adipocyte BDNF/leptin axis causes cancer remission and inhibition. *Cell.* 2010; 142(1):52-64.

18. Chao MV, Bothwell MA, Ross AH, Koprowski H, Lanahan AA, Buck CR, Sehgal A. Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor, *Science* 1986; 232 :518-52.
19. Charalampopoulos I, Alexaki VI, Lazaridis I, Dermitzaki E, Avlonitis N, Tsatsanis C, Calogeropoulou T, Margioris AN, Castanas E, Gravanis A. G-protein-associated, specific membrane binding sites mediate the neuroprotective effect of dehydroepiandrosterone. *FASEB J.* 2006; 20:577-579.
20. Charalampopoulos I, Alexaki VI, Tsatsanis C, Minas V, Dermitzaki E, Lazaridis I, Vardouli L, Stournaras C, Margioris AN, Castanas E, Gravanis A. Neurosteroids as endogenous inhibitors of neuronal cell apoptosis in aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1088:139-52. Review.
21. Charalampopoulos I, Dermitzaki E, Vardouli L, Tsatsanis C, Stournaras C, Margioris AN, Gravanis A. Dehydroepiandrosterone sulfate and allopregnanolone directly stimulate catecholamine production via induction of tyrosine hydroxylase and secretion by affecting actin polymerization. *Endocrinology* 2005; 146:3309-3318.
22. Charalampopoulos I, Margioris AN, Gravanis A. Neurosteroid dehydroepiandrosterone exerts anti-apoptotic effects by membrane-mediated, integrated genomic and non-genomic pro-survival signaling pathways. *J Neurochem* 2008; 107:1457-69.
23. Charalampopoulos I, Remboutsika E, Margioris AN, Gravanis A. Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19:300-307.
24. Charalampopoulos I, Tsatsanis C, Dermitzaki E, Alexaki VI, Castanas E, Margioris AN, Gravanis A. Dehydroepiandrosterone and allopregnanolone protect sympathoadrenal medulla cells against apoptosis via anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:8209-8214.

25. Charalampopoulos I, Vicario A, Pediaditakis I, Gravanis A, Simi A, Ibanez CF. Genetic dissection of neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Cell Rep.* 2012 2:1563-70.
26. Chen F, Knecht K, Birzin E, Fisher J, Wilkinson H, Mojena M, Moreno CT, Schmidt A, Harada S, Freedman LP, Reszka AA. Direct agonist/antagonist functions of dehydroepiandrosterone. *Endocrinology* 2005; 146:4568-76.
27. Chen LW, Yung KK, Chan YS, Shum DK, Bolam JP. The proNGF-p75NTR-sortilin signalling complex as new target for the therapeutic treatment of Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2008;7(6):512-23.
28. Cho SD, Yoon K, Chintharlapalli S, Abdelrahim M, Lei P, Hamilton S, Khan S, Ramaiah SK, Safe S. Nur77 agonists induce proapoptotic genes and responses in colon cancer cells through nuclear receptor-dependent and nuclear receptor-independent pathways. *Cancer Res.* 2007; 67(2):674-83.
29. Connolly JL, Greene LA, Viscarello RR, Riley WD. Rapid, sequential changes in surface morphology of PC12 pheochromocytoma cells in response to nerve growth factor. *J Cell Biol* 1979; 82:820-7.
30. Csipo I, Montel AH, Hobbs JA, Morse PA, Brahmi Z. Effect of Fas+ and Fas- target cells on the ability of NK cells to repeatedly fragment DNA and trigger lysis via the Fas lytic pathway. *Apoptosis.* 1998;3(2):105-14
31. Dang C, Zhang Y, Ma Q, Shimahara Y. Expression of nerve growth factor receptors is correlated with progression and prognosis of human pancreatic cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21:850-8.
32. Darnell RB, Posner JB. Paraneoplastic syndromes affecting the nervous system. *Semin Oncol.* 2006 Jun; 33 (3):270-98.
33. Dechant G, Barde Y A. The neurotrophin receptor p75NTR: novel Functions and implications for diseases of the nervous system. *Nature neuroscience.* 2002.

34. Dehm SM, Tindall DJ. Androgen receptor structural and functional elements: role and regulation in prostate cancer. *Mol Endocrinol* 2007; 21:2855-63.
35. Delsite R, Djakiew D. Characterization of nerve growth factor precursor protein expression by human prostate stromal cells: a role in selective neurotrophin stimulation of prostate epithelial cell growth. *Prostate* 1999; 41:39-48.
36. Demont Y, Corbet C, Page A, Ataman-Önal Y, Choquet-Kastylevsky G, Fliniaux I, Le Bourhis X, Toillon RA, Bradshaw RA, Hondermarck H. Pro-nerve growth factor induces autocrine stimulation of breast cancer cell invasion through tropomyosin-related kinase A (TrkA) and sortilin protein. *J Biol Chem*. 2012; 287(3):1923-31.
37. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102: 33-42.
38. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 383-424.
39. Evaul K, Li R, Papari-Zareei M, Auchus RJ, Sharifi N. 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase is a possible pharmacological target in the treatment of castration-resistant prostate cancer. *Endocrinology* 2010; 151:3514-20.
40. Festuccia C, Muzi P, Gravina GL, Millimaggi D, Specca S, Dolo V, Ricevuto E, Vicentini C, Bologna M. Tyrosine kinase inhibitor CEP-701 blocks the NTRK1/NGF receptor and limits the invasive capability of prostate cancer cells in vitro. *Int J Oncol*. 2007; 30(1):193-200.
41. Geldof AA, De Kleijn MA, B. Ramanath Rao BR, Newling DW. Nerve Growth Factor stimulates in vitro invasive capacity of DU145 human prostatic cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; 123:107-112.

42. Geller J. Rational for blockade of adrenal as well as testicular androgens in the treatment of advanced prostate cancer. *Semin Oncol* 1985; 12:28-35.
43. Gingras S, Simard J. Induction of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase type 1 expression by interleukin-4 in human normal prostate epithelial cells, immortalized keratinocytes, colon and cervix cancer cell lines. *Endocrinology* 1999; 140:4573-84.
44. Gravanis A, Makrigiannakis A, Stournaras C, Margioris AN. Interaction between steroid hormones and endometrial opioids. *Ann N Y Acad Sci*. 1994; 734:245-56.
45. Gray NE, Liu X, Choi R, Blackman MR, Arnold JT. Endocrine-immune-paracrine interactions in prostate cells as targeted by phytochemicals. *Cancer Prev Res* 2009 (Phila) 2:134-42.
46. Green JE, Shibata MA, Shibata E, Moon RC, Anver MR, Kelloff G, Lubet R. 2-difluoromethylornithine and dehydroepiandrosterone inhibit mammary tumor progression but not mammary or prostate tumor initiation in C3 (1)/SV40 T/t-antigen transgenic mice. *Cancer Res*. 2001; 61(20):7449-55.
47. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13:1899-911.
48. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:361-70.
49. Gu S, Kounenidakis M, Schmidt EM, Deshpande D, Alkahtani S, Alarifi S, Föller M, Alevizopoulos K, Lang F, Stournaras C. Rapid activation of FAK/mTOR/p70S6K/PAK1-signaling controls the early testosterone-induced actin reorganization in colon cancer cells. *Cell Signal*. 2013;25(1):66-73.
50. Gu S, Papadopoulou N, Gehring EM, Nasir O, Dimas K, Bhavsar SK, Föller M, Alevizopoulos K, Lang F, Stournaras C. Functional membrane

- androgen receptors in colon tumors trigger pro-apoptotic responses in vitro and reduce drastically tumor incidence in vivo. *Mol Cancer* 2009; 8:114.
51. Gu S, Papadopoulou N, Nasir O, Foller M, Alevizopoulos K, Lang F, Stournaras C. Activation of membrane androgen receptors in colon cancer inhibits the prosurvival signals Akt/bad in vitro and in vivo and blocks migration via vinculin/actin signaling. *Mol Med* 2011; 17:48-58.
52. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 Jan 7; 100(1):57-70.
53. Harel L, Costa B, Fainziller M. On the death Trk. *Dev Neurobiol.* 2010 70:298-303.
54. Hatzoglou A, Kampa M, Kogia C, Charalampopoulos I, Theodoropoulos PA, Anezinis P, Dambaki C, Papakonstanti EA, Stathopoulos EN, Stournaras C, Gravanis A, Castanas E. Membrane androgen receptor activation induces apoptotic regression of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:893-903.
55. Hebert-Croteau N. A meta-analysis of hormone replacement therapy and colon cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998 7:653, 9.
56. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev* 2004; 25:276-308.
57. Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV. High-affinity NGF binding requires co-expression of the trk protooncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 1991; 350:678-683.
58. Herrup K, Thoenen H. Properties of the nerve growth factor receptor of a clonal line of rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Exp Cell Res*; 121:7, 8.
59. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(4):277-88 Review.
60. Kallergi G, Agelaki S, Kalykaki A, Stournaras C, Mavroudis D, Georgoulas V. Phosphorylated EGFR and PI3K/Akt signaling kinases are

expressed in circulating tumor cells of breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2008; 10(5):80

61. Kallergi G, Agelaki S, Markomanolaki H, Georgoulas V, Stournaras C. Activation of FAK/PI3K/Rac1 signaling controls actin reorganization and inhibits cell motility in human cancer cells. *Cell Physiol Biochem.* 2007; 20(6):977-86.
62. Kallergi G, Tsapara A, Kampa M, Papakonstanti EA, Krasagakis K, Castanas E, Stournaras C. Distinct signaling pathways regulate differential opioid effects on actin cytoskeleton in malignant MCF7 and nonmalignant MCF12A human breast epithelial cells. *Exp Cell Res.* 2003;288(1):94-109.
63. Kampa M, Kogia C, Theodoropoulos PA, Anezinis P, Charalampopoulos I, Papakonstanti EA, Stathopoulos EN, Hatzoglou A, Stournaras C, Gravanis A, Castanas E. Activation of membrane androgen receptors potentiates the antiproliferative effects of paclitaxel on human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5:1342-51.
64. Kampa M, Papakonstanti EA, Alexaki VI, Hatzoglou A, Stournaras C, Castanas E. The opioid agonist ethylketocyclazocine reverts the rapid, non-genomic effects of membrane testosterone receptors in the human prostate LNCaP cell line. *Exp Cell Res.* 2004; 294(2):434-45.
65. Kampa M, Papakonstanti EA, Hatzoglou A, Stathopoulos EN, Stournaras C, Castanas E. The human prostate cancer cell line LNCaP bears functional membrane testosterone receptors that increase PSA secretion and modify actin cytoskeleton. *FASEB J.* 2002; 16(11):1429-31.
66. Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Op Neurobiol* 2000 Jun 10:381-91.
67. Karishma K.K. and Herbert J. Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression. *Eur. J. Neurosci.* 2002 16, 445–453.

68. Klein R, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M. The Trk protooncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 1991; 65:189-197.
69. Klein R. Role of neurotrophins in mouse neuronal development. *FASEB J.* 1994; 8:738-744.
70. Koukouritaki S, Margioris A, Gravanis A, Hartig R, Stournaras C. Dexamethasone induces actin polymerization in human endometrial cells without affecting its synthesis. *J. Cell Biochem* 1997; 65:492-500
71. Koukouritaki SB, Gravanis A, Stournaras C. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin is involved in the rapid non-genomic action of glucocorticoids on actin cytoskeleton. *Mol Med* 1999; 5:731-742.
72. Kruttgen A, Schneider I, Weis J. The dark side of the NGF family: neurotrophins in neoplasias. *Brain Pathol* 2006; 16:304-10
73. Labrie F, Bélanger A, Luu-The V, Labrie C, Simard J, Cusan L, Gomez J, Candas B. Gonadotropin-releasing hormone agonists in the treatment of prostate cancer. *Endocr Rev.* 2005; 26(3):361-79. Review.
74. Labrie F, Dupont A, Simard J, Luu-The V, Belanger A. Intracrinology: the basis for the rational design of endocrine therapy at all stages of prostate cancer. *Eur Urol* 1993; 24:94–105.
75. Labrie F. Hormonal therapy for prostate cancer. *Prog Brain Res.* 2010; 182:321-41.
76. Labrie F. Intracrinology. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 78:C113–8.
77. Lang F, Perrotti N, Stournaras C. Colorectal carcinoma cells regulation of survival and growth by SGK1. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42:1571, 5.
78. Lazaridis I*, Charalampopoulos I*, Alexaki VI, Avlonitis N, Pediaditakis I, Efstathopoulos P, Calogeropoulou T, Castanas E, Gravanis A. Neurosteroid dehydroepiandrosterone interacts with nerve growth factor (NGF) receptors, preventing neuronal apoptosis. *PLoS Biol* 2011.

79. Le H, Arnold JT, McFann KK, Blackman MR. DHT and testosterone, but not DHEA or E2, differentially modulate IGF-I, IGFBP-2, and IGFBP-3 in human prostatic stromal cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290:E952-60.
80. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 1987; 237:1154-1162.
81. Loeffler M, Kroemer G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* 2000; 256(1):19-26. Review.
82. Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6: 516-24.
83. Maninger N, Wolkowitz OM, Reus VI, Epel ES, Mellon SH. Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Front Neuroendocrinol.* 2009; 30(1):65-91.
84. Miknyoczki SJ, Wan W, Chang H, Dobrzanski P, Ruggeri BA, Dionne CA, Buchkovich K. The neurotrophin-trk receptor axes are critical for the growth and progression of human prostatic carcinoma and pancreatic ductal adenocarcinoma xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 8:2002; 1924-31.
85. Miller KK, Al-Rayyan N, Ivanova MM, Mattingly KA, Ripp SL, Klinge CM, Prough RA. DHEA metabolites activate estrogen receptors alpha and beta. *Steroids.* 2013; 78(1):15-25.
86. Mitchell S, Abel P, Ware M, Stamp G, Lalani E. Phenotypic and genotypic characterization of commonly used human prostatic cell lines. *BJU Int* 2000; 85:932-944.
87. Nasir O, Wang K, Föller M, Gu S, Bhandaru M, Ackermann TF, Boini KM, Mack A, Klingel K, Amato R, Perrotti N, Kuhl D, Behrens J,

- Stournaras C, Lang F. Relative resistance of SKG-1 knockout mice against chemical carcinogenesis. *IUBMB Life*. 2009;61(7):768-76.
88. Neeta KE and Campenot RB. Receptor binding, internalization, and retrograde transport of neurotrophic factors. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58 1021–1035.
89. Nikolettou V, Lickert H, Frade JM, Rencurel C, Giallonardo P, Zhang L, Bibel M, Barde YA. Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not. *Nature* 2010; 467:59-63.
90. Nyce JW, Magee PN, Hard GC, Schwartz AG. Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumorigenesis in Balb/c mice by dehydroepiandrosterone. *Carcinogenesis* 1984; 5:57-62.
91. Papadopoulou N, Charalampopoulos I, Alevizopoulos K, Gravanis A, Stournaras C. Rho/ROCK/actin signaling regulates membrane androgen receptor induced apoptosis in prostate cancer cells. *Exp Cell Res* 2008; 314:3162-74.
92. Papadopoulou N, Charalampopoulos I, Anagnostopoulou V, Konstantinidis G, Foller M, Gravanis A, Alevizopoulos K, Lang F, Stournaras C. Membrane androgen receptor triggers down-regulation of PI-3K/Akt/NF-kappaB activity and induces apoptotic responses via Bad, FasL and caspase-3 in DU145 prostate cancer cells. *Mol Cancer* 2008; 7:88.
93. Papadopoulou N, Papakonstanti EA, Kallergi G, Alevizopoulos K, Stournaras C. Membrane androgen receptor activation in prostate and breast tumor cells: Molecular signaling and clinical impact. *IUBMB Life* 2009; 61:56-61
94. Papakonstanti EA, Kampa M, Castanas E, Stournaras C. A rapid, nongenomic, signaling pathway regulates the actin reorganization and PSA secretion induced by membrane testosterone receptors' activation. *Mol Endocrinol* 2003 17:870-881.

95. Pierotti MA, Greco A. Oncogenic rearrangements of the NTRK1/NGF receptor. *Cancer Lett.* 2006; 232(1): 90-8.
96. Pike MC, Krailo MD, Henderson BE, Casagrande JT, Hoel DG. Hormonal risk factors, 'breast tissue age' and the age-incidence of breast cancer. *Nature* 1983; 303:767-70.
97. Pincheria R, Baerwald M, Dundar JD, Donner DB. Sall2 is a novel p75NTR-interacting protein that links NGF signalling to cell cycle progression and neurite outgrowth. *EMBO J.* 2009; 28(3):261-73.
98. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p-53-induced apoptosis. *Nature* 1997; 389: 300-5.
99. Ramaiah SK, Safe S. Nur77 agonists induce proapoptotic genes and responses in colon cancer cells through nuclear receptor-dependent and nuclear receptor-independent pathways. *Cancer Res.* 2007; 67(2):674-83.
100. Randall VA. Role of 5 alpha-reductase in health and disease. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 1994; 8: 405-31
101. Rau KM, Kang HY, Cha TL, Miller SA, Hung MC. The mechanisms and managements of hormone-therapy resistance in breast and prostate cancers. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12:511-32.
102. Rende M, Rambotti MG, Stabile AM, Pistilli A, Montagnoli C, Chiarelli MT, Mearini E. Novel localization of low affinity NGF receptor (p75) in the stroma of prostate cancer and possible implication in neoplastic invasion: an immunohistochemical and ultracytochemical study. *Prostate* 2010; 70:555-561.
103. Rich T, Allen RL, Wyllie AH. Defying death after DNA damage. *Nature* 2000; 407: 777-83.
104. Roux PP, Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Progress in neurobiology* 2002; 67, 203-233.
105. Schmidt EM, Gu S, Anagnostopoulou V, Alevizopoulos K, Föllner M, Lang F, Stournaras C. Serum- and glucocorticoid-dependent kinase-1-

- induced cell migration is dependent on vinculin and regulated by the membrane androgen receptor. *FEBS J.* 2012; 279(7):1231-42.
106. Schumacher M, Weill-Engerer S , Liere P , Robert F, Franklin RJM, Garcia-Segura LM , Lambert J, Mayo W, Melcangi RC, Parducz A , Suter U, Carelli C Baulieu EE, Akwa Y. Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system. *Progress in Neurobiology* 2003; 3–29.
 107. Segal RA, Greenberg ME. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* 1996; 19:463–489.
 108. Sigala S, Bodei S, Missale C, Zani D, Simeone C, Cunico SC, Spano PF. Gene expression profile of prostate cancer cells: effect of nerve growth factor treatment. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 284(1-2):11-20.
 109. Sigala S, Tognazzi N, Rizzetti MC, Faraoni I, Missale C, Bonmassar E, Spano P. Nerve growth factor induces the re-expression of functional androgen receptors and p75 (NGFR) in the androgen-insensitive prostate cancer cell line DU145. *Eur J Endocrinol* 2002; 147(3):407-15.
 110. Slattery ML, Sweeney C, Murtaugh M, Ma KN, Wolff RK, Potter JD, Caan BJ, Samowitz W. Associations between ERalpha, ERbeta, and AR genotypes and colon and rectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14:2936-42.
 111. Snider WD. Functions of the neurotrophins during nervous system development: What the knockouts are teaching us. *Cell.* 1994; 627-638.
 112. Stournaras C, Stiakaki E, Koukouritaki SB, Theodoropoulos PA, Kalmanti M, Fostinis Y, Gravanis A. Altered actin polymerization dynamics in various malignant cell types: evidence for differential sensitivity to cytochalasin B. *Biochem Pharmacol.* 1996;52(9):1339-46.
 113. Swerdloff RS, Wang C, Bhasin S. Developments in the control of testicular function. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.*1992; 6 (2): 451–83.

114. Vaux DL. Caspases and apoptosis- biology and terminology. *Cell Death Differ* 1999; 6:493-4.
115. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Conolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; 102:43-53.
116. Vilar M, Charalampopoulos I, Kenchappa RS, Simi A, Karaca E, Reversi A, Choi S, Bothwell M, Mingarro I, Friedman WJ, Schiavo G, Bastiaens PI, Verveer PJ, Carter BD, Ibanez CF. Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron* 2009; 62:72-83.
117. Wang J, Leonardo MJ. Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J Cell Sci* 2000; 113: 753-7.
118. Webb SJ, Geoghegan TE, Prough RA, Michael Miller KK. The biological actions of dehydroepiandrosterone involves multiple receptors. *Drug Metab Rev* 2006; 38:89-116.
119. Weeraratna AT, Dalrymple SL, Lamb JC, Denmeade SR, Miknyoczki S, Dionne CA, Isaacs JT. Pan-trk inhibition decreases metastasis and enhances host survival in experimental models as a result of its selective induction of apoptosis of prostate cancer cells. *ClinCancerRes*.2001; 7:223.
120. Widstrom RL, Dillon JS. Is there a receptor for dehydroepiandrosterone or dehydroepiandrosterone sulfate? *Semin Reprod Med* 2004; 22:289-98.
121. Wood KA, Youle RJ. The role of free radicals and p53 in neuron apoptosis in vivo. *J Neurosci* 1995; 15: 5851-7.
122. Yamashita T, Tucker KL, Barde YA. Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* 1999; 24:585-93.

123. Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, Roth KA, Korsmeyer SJ. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 1999; 400: 886-91.
124. Zhang L, Li B, Ma W, Barker JL, Chang Y, Zhao W, Rubinow D. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated derivative (DHEAS) regulate apoptosis during neurogenesis by triggering the Akt signaling pathway in opposing ways. *Brain Res.Mol* 2002; 98: 58–66
125. Zhu ZW, Friess H, Wang L, Bogardus T, Korc M, Kleeff J, Buchler MW. Nerve growth factor exerts differential effects on the growth of human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2001; 7:105-12.