

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΚΑΙ
ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Μεταπτυχιακή διατριβή τίτλου ειδίκευσης

**Επίδραση των CRF πεπτιδίων στον πολλαπλασιασμό, στην απόπτωση και στην
κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων**

**Πραγματοποιήθηκε στο
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ,
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΗ ΕΥΘΥΜΙΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2006

Επιβλέποντες:

Τσατσάνης Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής Κλινικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής

Μαργιωρήs Ανδρέας, Καθηγητής Κλινικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής

Στην οικογένειά μου

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Χημείας, του τομέα Εργαστηριακής Ιατρικής, του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Κλινικής Χημείας, Χρήστου Τσατσάνη, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την υπόδειξη του θέματος, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του που έκαναν δυνατή την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Ανδρέα Μαργιωρή, Καθηγητή Κλινικής Χημείας για την αξιολόγηση της πορείας της παρούσης εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Αριάδνη Ανδρουλιδάκη για την υπομονή της, τις συζητήσεις μας επιστημονικές και μη, και τη συμπαράστασή της σε όποιες δυσκολίες προέκυπταν. Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα τη Ρένα Δερμιτζάκη και τη Μαρία Βενιχάκη για τις χρήσιμες συμβουλές και παρατηρήσεις τους όποτε χρειάστηκα τη βοήθειά τους.

Ευχαριστώ πολύ τη Νάνσυ Μαστοράκη και Νίνα Χρήστου για τη βοήθειά τους στο τεχνικό κομμάτι της εργασίας αυτής καθώς και για την καλή και ευχάριστη συνεργασία μας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω για την συνεργασία τους τη Λίνα Βαρδούλη, τη Ναταλία Παπαδοπούλου, τη Γαλάτεια Καλλέργη, τη Μαριλένα Καμπά, τη Δέσποινα Βάσσου, τη Φοίβη Νιφλή, την Έλσα Παπαδημητρίου, τη Βάσω Ζαχαριουδάκη και την Όλγα Ρασούλη.

Ευχαριστώ πολύ τους φίλους μου Βασίλη, Μαρία, Κάσση, Λάμπρο Αλέξανδρο, Νίκη και Κώστα που ήταν δίπλα μου στις καλές αλλά και δύσκολες στιγμές.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου που είναι δίπλα μου σε κάθε βήμα της ζωής μου. Η ηθική και οικονομική στήριξη που μου προσέφεραν ήταν καθοριστικής σημασίας για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
ABSTRACT.....	10
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	12
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	15
Οικογένεια των CRF πεπτιδίων.....	16
<i>Εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (CRF)</i>	16
<i>Ουροκορτίνες (Urocortins, UCNI,UCNII και UCNIII)</i>	17
Υποδοχείς των CRF πεπτιδίων.....	18
<i>Έκφραση των CRF υποδοχέων</i>	18
<i>Σηματοδότηση CRF υποδοχέων</i>	19
<i>Ανταγωνιστές των CRF πεπτιδίων</i>	21
CRF πεπτίδια και καρκίνος.....	22
<i>Έκφραση των υποδοχέων των CRF πεπτιδίων στα καρκινικά κύτταρα</i>	23
<i>Δράσεις των CRF πεπτιδίων και των υποδοχέων τους στα καρκινικά κύτταρα</i>	23
<i>Δράσεις των CRF πεπτιδίων και των υποδοχέων τους στον πολλαπλασιασμό</i> <i>των κυττάρων</i>	24
<i>Δράσεις των CRF πεπτιδίων και των υποδοχέων τους στην απόπτωση των</i> <i>καρκινικών κυττάρων</i>	25
<i>Δράσεις των CRF πεπτιδίων και των υποδοχέων τους στη κινητικότητα των</i> <i>καρκινικών κυττάρων</i>	25
Κυκλοοξυγενάσες (Cox).....	26
Ρόλος της Cox-1 στον Καρκίνο.....	27
Μηχανισμοί που επηρεάζουν την κινητικότητα καρκινικών κυττάρων.....	28
<i>Ρόλος του κυτταροσκελετού της ακτίνης στη κινητικότητα και</i> <i>μεταστατικότητα των καρκινικών κυττάρων</i>	28
<i>Ρόλος των Cox ενζύμων (κυκλοοξυγενάσες) στην κινητικότητα και</i> <i>μεταστατικότητα καρκινικών κυττάρων</i>	29
<i>Ρόλος του VEGF (Vascular endothelial growth factor) στον καρκίνο</i>	30
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	32
Κυτταρικές σειρές.....	33
Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών.....	34
Υλικά –Συσκευές Καλλιέργειών.....	34
Μέθοδος καλλιέργειας.....	34
Μέτρηση και Επίστρωση κυττάρων για πείραμα.....	35
Απομόνωση RNA από Κυτταρικά Εκχυλίσματα.....	36
Μέθοδος εκλεκτικής ενίσχυσης του RNA με χρήση ειδικής πολυμεράσης (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR).....	37
Αντίστροφη μεταγραφή (RT).....	38
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	38
Μελέτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων με τη τεχνική του μεταβολισμού του MTT.....	41
Ποσοτική εκτίμηση της απόπτωσης.....	42
Κλασματοποίηση πρωτεϊνών με εκχύλιση των κυττάρων με:.....	44
Ανοσοαποτύπωση (Western Blot).....	45
Συλλογή δειγμάτων.....	45
Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση.....	46
Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτική πολυακρυλαμίδης (SDS- PAGE).....	47

Μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	48
Ανοσοπροσδιορισμός πρωτεϊνών με υβριδοποίηση σε νιτροκυτταρίνη	49
Ενζυμοσύνδετη Ανοσοπροσοφητική Μέτρηση (Enzyme Linked Immuno-Sorbent- Assay, ELISA)	50
<i>In vitro</i> ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων του ανθρώπινου VEGF σε υπερκείμενα κυτταρικών καλλιιεργειών μετά από επίδραση με CRF.....	51
<i>In vitro</i> ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων του TGF-β (Transforming Growth Factor- beta) σε υπερκείμενα κυτταρικών καλλιιεργειών μετά από επίδραση με CRF	51
Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικού διαλύματος.....	51
Ανοσοφθορισμός με μικροσκοπία συνεστίασης (Confocal Laser Scanning Microscopy)	52
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	53
Προσδιορισμός του mRNA των CRFRs στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και του προστάτη.....	54
Επίδραση των εξωγενών πεπτιδίων CRF, UCNI και UCNIΙ στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού και του προστάτη ..	57
Επίδραση του CRF πεπτιδίου στην απόπτωση των MCF7 κυττάρων	66
Επίδραση του CRF στη κινητικότητα των MCF7 κυττάρων παρουσία και απουσία ορού	67
Επίδραση του CRF πεπτιδίου στην έκφραση της Cox-1 και στην έκκριση του VEGF	71
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	73
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	78

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα νευροπεπτίδια της οικογένειας του CRF ανήκουν στα νευροπεπτίδια του στρες. Έχουν χαρακτηριστεί έτσι λόγω του κυρίαρχου ρόλου που έχουν στην απόκριση του οργανισμού στο στρες. Πέρα από αυτή τη κύρια δράση, έχει βρεθεί πως τα CRF πεπτίδια εκφράζονται και εκκρίνονται από καρκινικά κύτταρα και μέσω των υποδοχέων τους που εκφράζονται είτε στα κύτταρα αυτά είτε σε γειτονικούς ιστούς (πχ ενδοθηλιακά), επάγουν διαδικασίες που επηρεάζουν τη φυσιολογία του όγκου. Στη συγκεκριμένη έρευνα μελετήθηκε ο ρόλος των CRF πεπτιδίων στο πολλαπλασιασμό, στην απόπτωση και στη κινητικότητα των κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού (MCF7 και MDA MB 231) και του προστάτη (LnCaP και PC3). Σε πρώτη φάση διαπιστώθηκε η έκφραση των CRF υποδοχέων σε αυτές τις κυτταρικές σειρές, επομένως τα CRF πεπτίδια που βρίσκονται στο μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων θα μπορούσαν δυνητικά να επηρεάσουν τον πολλαπλασιασμό τους, την απόπτωση ή την κινητικότητα/μεταστατικότητα τους. Σε ό,τι αφορά τον πολλαπλασιασμό, τα CRF πεπτίδια επάγουν τη μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και των τεσσάρων κυτταρικών σειρών. Επειδή η πιο έντονη δράση παρατηρήθηκε στα MCF7, τα υπόλοιπα πειράματα έγιναν σε αυτή τη κυτταρική σειρά. Επίσης, στα κύτταρα αυτά εκφράζεται σε πολύ μεγάλο βαθμό ο CRFR1a γι' αυτό μελετήθηκε μονάχα η δράση του CRF σε συνθήκες με και χωρίς ορό. Στη συνέχεια βρέθηκε πως η μείωση του πολλαπλασιασμού των MCF7 κυττάρων συνοδεύεται από αυξημένη απόπτωση, οπότε φαίνεται μία πιθανή δράση του CRF σε κύτταρα χαμηλής μεταστατικότητας, όπως τα MCF7. Πέρα από το πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, μελετήθηκε και η δράση του CRF στη κινητικότητα των MCF7 κυττάρων. Από τα δικά μας αποτελέσματα προκύπτει πως ο CRF μπορεί να επάγει ή να μειώνει τη κινητικότητα των MCF7 κυττάρων ανάλογα με το μέσο στο οποίο αναπτύσσονται. Είναι γνωστό πως η αναδιοργάνωση των μικροϊνιδίων της ακτίνης σχετίζεται με την ικανότητα που αποκτούν τα καρκινικά κύτταρα να πολλαπλασιάζονται άναρχα, να έχουν αυξημένη διεισδυτικότητα και να μεταναστεύουν δημιουργώντας μεταστάσεις. Σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του όγκου παίζουν και οι κυκλοοξυγενάσες (Cox-1 και Cox-2). Ο CRF επάγει την έκφραση της Cox-1 στις έξι ώρες επίδρασης στα MCF7. Επιπλέον, ο CRF αναστέλλει την έκκριση του VEGF στα ίδια κύτταρα. Αν και έχει βρεθεί πως οι κυκλοοξυγενάσες επηρεάζουν την έκκριση του VEGF σε διάφορα συστήματα, τα παραπάνω αποτελέσματα πιθανόν να αφορούν σε διαφορετικά μονοπάτια δράσης του CRF στην έκφραση των Cox ενζύμων και στη έκκριση του VEGF.

ABSTRACT

Neuropeptides of the CRF family belong to stress neuropeptides. They have been characterized as stress peptides because of their main role in stress response. Despite this action, it has been found that CRF peptides are expressed and secreted by cancer cells and through their receptors (CRFRs), which are expressed by cancer cells or by neighboring cells (such as endothelial cells), they induce actions that affect the physiology of the tumor. In this study the role of CRF peptides in proliferation, apoptosis and cell motility of four cancerous cell lines was studied. Two cell lines of breast cancer, MCF7 and MDA MB 231, and two of prostate cancer, LnCaP and PC3, were used. In the beginning the expression of CRFRs was defined, thus CRF peptides that are found in the microenvironment of cancer cells could affect their proliferation, programmed cell death and movement/metastasis. As far as proliferation is concerned, CRF peptides (specifically h/rCRF, hUCNI and mUCNII) inhibited the proliferation of all four cell lines. Because the most intense action was found in MCF7 cell line, in all the experiments this cell line was used. In addition, in these cells CRFR1a is highly expressed, so the actions of this peptide were further studied in conditions with or without serum. Next it was found that CRF highly induced the apoptosis of MCF7 in conditions with or without serum. Apart from proliferation and apoptosis, the action of CRF in MCF7 cell motility was studied. Our results show that CRF can induce or reduce the motility of MCF7 cells depending on the growth medium that are maintained. It has already been found that the reorganization of actin microfilaments is connected with their ability to proliferate continuously, to have increased penetration and to migrate and induce metastasis. Significant role in tumor progression play the cyclooxygenases (Cox-1 and Cox-2), enzymes that catalize the conversion of arachidonic acid to prostaglandins, prostacyclin or thromboxane. CRF induces the expression of Cox-1 in MCF7 after 6 hours of incubation. In addition, CRF restrains the secretion of VEGF in these cells. Although it has been found that cyclooxygenases influence the secretion of VEGF in certain cell types, the previous results are likely to involve distinct molecular pathways of CRF action in the expression of Cox enzymes and VEGF secretion.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AA (Arachidonic Acid, αραχιδονικό οξύ)

AC (Adenylate Cyclase)

ACTH (Adenocorticotropin Hormone, αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη)

α- MSH (α- Melanocyte Releasing Hormone, μελανοτροπίνη)

BSA (Bovine Serum Albumin, αλβουμίνη ορού βοός)

cAMP (Cyclic Adenosine Monophosphate, κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη)

Cox (Cyclooxygenase, κυκλοοξυγενάση)

CRF (Corticotropin Releasing Factor, παράγοντας έκλυσης της κορτικοτροπίνης)

CRFR1 (Corticotropin Releasing Factor Receptor 1, υποδοχέας 1 του CRF)

CRFR2 (Corticotropin Releasing Factor Receptor 2, υποδοχέας 2 του CRF)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, θρεπτικό υλικό)

DMSO (Dimethyl sulfoxide, διμεθυσουλφοξείδιο)

DNA (desoribonucleic acid, δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ)

DTT (Dithiothreitol, διθειοθρεϊτόλη)

ECL (Enhanced Chemiluminescence, ενισχυμένη χημειοφωταύγεια)

EDTA (Ethylene diamine tetraacetic acid, αιθυλενο διαμινο τετραοξικό οξύ)

EGF (Epidermal Growth Factor, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας)

EGTA (Ethyleneglycol-bis (beta- aminoethyl ether) tetracetic acid, αιθυλενο γλυκολ- δις (β- αμινοαιθυλαιθέρας)- N,N, N', N' τετραοξικό οξύ)

ELISA (Enzyme- linked Immunoabsorbent Assay, ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοφητική μέτρηση)

ERK (Extracellular signal Regulated Kinase, πρωτεϊνική κινάση που ελέγχεται από εξωκυττάριο σήμα)

FBS (Foetal Bovine Serum, ορός εμβρύου βοός)

FITC (Fluorescein isothiocyanate, ισοθειακυανιούχος φλουοροσκεΐνη)

GDP (διφωσφορική γουανοσίνη)

GH (growth hormone-releasing hormone, εκλυτική ορμόνη της αυξητικής ορμόνης)

GPCR (G- protein Coupled Receptor, υποδοχέας που συνδέεται με G- πρωτεΐνες)

GTP (τριφωσφορική γουανοσίνη)

HRP (Horseradish Peroxidase, υπεροξειδάση του ραπανιού)

IP3 (tri- phosphate inositol, τριφωσφορική ινοσιτόλη)

JNK (c-Jun n-terminal kinase)

ΚΝΣ (Κεντρικό νευρικό σύστημα)

LPS (lipopolysaccharide, λιποπολυσακχαρίτης)

LHRH (luteinizing hormone-releasing hormone, εκλυτική ορμόνη της ωχρινοτρόπου ορμόνης)

MAPK (Mitogen-activated protein kinase, πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνο σήμα)

MEK (Mitogen- activated and extracellular signal-regulated kinase)

MSH (melanocyte- stimulating hormone, μελανοτροπική ορμόνη)

MTT (3- (4,5 dimethylthiazol- 2,5- diphenyl tetrazolium) bromide, βρωμιούχο 3-(4,5 διμεθυλθιαζολ- 2,5 διφαινυλ τεταζόλιο)

NO (Nitric oxide, μονοξείδιο του αζώτου)

PBS (Phosphate Buffer Saline, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών)

PGE₂ (Prostaglandin E₂, προσταγλανδίνη E₂)

PI3K (Phospho Inositol 3 Kinase, κινάση της φωσφοινοσιτόλης)

PKA (Protein kinase A, πρωτεϊνική κινάση A)

PKC (Protein kinase C, πρωτεϊνική κινάση C)

PLC (Phospholipase C, φωσφολιπάση C)

PMSF (Phenylmethylsulfonyl, φαινυλο μεθυλ σουλφονυλο φθορίδιο)

POMC (Proiomelanocortin, προοπιομελανοκορτίνη)

RNA (Ribonucleic acid, ριβονουκλεϊκό οξύ)

RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

SDS (Sodium dodecyl sulfate, μετα νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου)

TEMED (N,N,N',N'- Tetryramethyl- ethylenediamine, N,N,N',N'-τετραμεθυλενο αιθυλοδιαμίνη)

TNF- α (Tumor Necrosis Factor – α , ογκονεκρωτικός παράγοντας α)

TBS-T (Tris Buffered saline- Tween, ρυθμιστικό διάλυμα Tris με Tween)

UCN I,II, III (Urocortin, ουροκορτίνη I, II, III)

VEGF (Vascular endothelial growth factor)

YYE (Υποθάλαμο- υποφυσσιο- επινεφριδιακός άξονας)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οικογένεια των CRF πεπτιδίων

Η οικογένεια των CRF πεπτιδίων περιλαμβάνει τον εκλυτικό παράγοντα της κορτικοτροπίνης (Corticotropin releasing factor, CRF), τις Ουροκορτίνες (UCNI,UCNII και UCNIII) των θηλαστικών, καθώς και τη Sauvagine από τα αμφίβια και την Ουροτενσίνη I (Urotensin I) των ιχθύων. Τα πεπτίδια αυτά εμφανίζουν αρκετά συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία.

Εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (CRF)

Ο εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (**CRF**) είναι ένα πεπτίδιο που αποτελείται από 41 αμινοξέα που απομονώθηκε πρώτη φορά από τον Vale και τους συνεργάτες του το 1981 στον υποθάλαμο του προβάτου(1). Πέρα από το πρόβατο, το πεπτίδιο αυτό έχει ανιχνευθεί και σε άλλα είδη (άνθρωπο, αρουραίο, χοίρο κτλ). Οι αλληλουχίες των CRF πεπτιδίων στον άνθρωπο και στον αρουραίο είναι όμοιες και διαφέρουν από αυτή του προβάτου κατά 7 αμινοξικά κατάλοιπα.

Αρχικά ο CRF αναγνωρίστηκε ως υποθαλαμικό νευροπεπτίδιο και κύριος ρυθμιστής του Υποθαλαμο-Υποφυσιο-Επινεφριδιακού (ΥΥΕ) άξονα. Ωστόσο, πέρα από τον υποθάλαμο, CRF έχει ανιχνευθεί και σε άλλες περιοχές του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) (μεταιχμιακό σύστημα εγκεφάλου, υπόφυση, φλοιό εγκεφάλου, βασικά γάγγλια, ιππόκαμπο, γέφυρα, παρεγκεφαλίδα, νωτιαίο μυελό) όπου η δράση του σχετίζεται με το μηχανισμό απόκρισης στο στρες. Στο ΚΝΣ τα CRF πεπτίδια δρουν ως νευροδιαβιβαστές/νευρορρυθμιστές. Κατά την απόκριση στο στρες ο CRF εκκρίνεται από το παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου και προσδένεται σε υποδοχείς στα κορτικοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης όπου επάγει τη παραγωγή και έκκριση της κορτικοτροπίνης (ACTH). Η ACTH με τη σειρά της επάγει τη παραγωγή γλυκοκορτικοειδών από τον επινεφριδιακό αδένα. Τα γλυκοκορτικοειδή στη συνέχεια μεσολαβούν ποικίλες μεταβολικές αντιδράσεις που σχετίζονται με το μηχανισμό απόκρισης στο στρες.

mRNA του CRF έχει εντοπιστεί και σε περιφερικούς ιστούς όπως στους πνεύμονες, στο πάγκρεας, στον γαστρεντερικό σωλήνα, στα επινεφρίδια, στο πλακούντα, στον σπλήνα (2, 3), στο θύμο αδένα (4) και στο δέρμα (5).

Ουροκορτίνες (Urocortins, UCNI,UCNII και UCNIII)

Η UCNI (6) αποτελείται από 40 αμινοξικά κατάλοιπα και παρουσιάζει ομολογία με τον ανθρώπινο CRF της τάξης του 45%. Ωστόσο, εμφανίζει μεγαλύτερη ομολογία με την ουροτενσίνη I των ιχθύων.

Στη περιφέρεια η UCNI εντοπίζεται στον γαστρεντερικό σωλήνα, στους όρχεις, στα μυοκύτταρα της καρδιάς, στο θύμο αδένα, στον σπλήνα, στους νεφρούς (7), στο δέρμα (8) και στο λιπώδη ιστό (9).

Η UCNII ή **stresscopin- related peptide** {Reyes, 2001 #9}, ένα πεπτίδιο 38 αμινοξέων, εκφράζεται σε πολύ συγκεκριμένες περιοχές στον εγκέφαλο. Στην περιφέρεια, mRNA της UCNII ανιχνεύεται στην καρδιά, στους επινεφριδιακούς αδένες, σε περιφερικά κύτταρα του αίματος {Hsu, 2001 #10; Reyes, 2001 #9} στο δέρμα (10) και στο σκελετικό μυ (11).

Η UCNIII ή **stresscopin** (12) αποτελείται επίσης από 38 αμινοξέα. Εκφράζεται σε περιοχές του ΚΝΣ όπως (13)). Στην περιφέρεια mRNA της UCNIII ανιχνεύτηκε στον γαστρεντερικό σωλήνα (14), στον σκελετικό μυ, στον επινεφριδιακό αδένα και στο δέρμα {Hsu, 2001 #10; Reyes, 2001 #9}, και στον λιπώδη ιστό (9).

h/r CRF	SEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMEII
o CRF	SQEPPIISLDLTFHLLREVLEMTKADQLAQQAHSNRKLDDIA
urotensin 1	NDDPPISIDLTFHLLRNMIEMARIENEREQAGLNRYLDEV
sauvagine	QGPPISIDLSLELLRKMIEIEKQEKEKQQAANNRLLDI
h urocortin 1	DNPSLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAEQNRIIFDSV
m/r urocortin 1	DDPPLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAEQNRIIFDSV
h urocortin 2	VILSLDVPIGILLQILLEQARARAAREQATTNARILARV (GHC)
m urocortin 2	VILSLDVPIGILLRILLEQARYKAARNQAATNAQILAHV (GRR)
r urocortin 2	VILSLDVPIGILLRILLEQARNKAARNQAATNAQILARV (GRR)
h urocortin 3	FTLSLDVPTNIMNLLFNIAKAKNLRAQAAANAHLMAQI
m urocortin 3	FTLSLDVPTNIMNIFNIDKAKNLRAKAAANAQQLMAQI

Εικόνα 1. Τα μέχρι σήμερα γνωστά μέλη της οικογένειας των CRF πεπτιδίων

Υποδοχείς των CRF πεπτιδίων

Τα CRF πεπτίδια δρουν μέσω της πρόσδεσής τους σε ειδικούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς, CRFR1 και CRFR2, οι οποίοι εμφανίζουν 70% αμινοξική ομολογία. Ωστόσο, πρόσφατα προσδιορίστηκε στους ιχθείς και ένας τρίτος τύπος υποδοχέα, CRFR3, ο οποίος παρουσιάζει μεγαλύτερη δομική ομολογία με τον CRFR1 (85%) σε σχέση με τον CRFR2 (80%), στο ίδιο μοντέλο (15).

Οι υποδοχείς CRFR1 και CRFR2 κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια και ο κάθε ένας χαρακτηρίζεται από διάφορους υπότυπους που προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα. Το γονίδιο του CRFR1 εκφράζει οχτώ υπότυπους, R1a, R1b, R1c, R1d, R1e, R1f, R1g και R1h, όμως μόνο ένας έχει βρεθεί να είναι λειτουργικός (16). Σε ό,τι αφορά τον CRFR2 έχουν βρεθεί μονάχα τρεις ισομορφές, R2a, R2b και R2c. Καθένας τους παρουσιάζει διαφορετική έκφραση στους διάφορους ιστούς και έχει διαφορετικές φαρμακολογικές ιδιότητες σε ό,τι αφορά τους προσδέτες του.

Οι CRFR1 υποδοχείς εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια για τον CRF, την UCNI, τη Sauvagine και την ουροτενσίνη I, ενώ δε παρουσιάζουν καμία συγγένεια για τις UCNII και UCNIII. Αντίθετα, οι CRFR2 υποδοχείς προσδένουν με μεγαλύτερη συγγένεια τις ουροκορτίνες, καθώς και τη Sauvagine. Ο CRF προσδέεται και στον CRFR2 αλλά ασθενέστερα απ'ότι στον CRFR1.

Έκφραση των CRF υποδοχέων

Ο CRFR1 εκφράζεται σε διάφορες περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος (κυρίως φλοιό, στέλεχος, ιππόκαμπο, αμυγδαλή, υπόφυση). Στην περιφέρεια ο CRFR1 εντοπίζεται, με χαμηλότερο βαθμό έκφρασης, στους όρχεις, στις ωοθήκες, στα επινεφρίδια (17), στο δέρμα (10), στον γαστρεντερικό σωλήνα (18) και στο λιπώδη ιστό (9).

Ο CRFR2 υποδοχέας εκφράζεται κυρίως σε περιφερικούς ιστούς όπως στη καρδιά, στο σκελετικό μυ (19), στο γαστρεντερικό σωλήνα (18), στις ωοθήκες (20) αλλά και στο δέρμα (10) και στο λιπώδη ιστό (9). Συγκεκριμένα, ο CRFR2a εκφράζεται στον εγκέφαλο και στην υπόφυση (21), ενώ ο CRFR2b ανιχνεύεται πέρα από το ΚΝΣ, σε καρδιακούς και σκελετικούς μύες, στην επιδιδυμίδα και στον γαστρεντερικό σωλήνα (22). Ο CRFR2c έχει εντοπιστεί μόνο σε μεταιχμιακές περιοχές του ΚΝΣ του ανθρώπου (23).

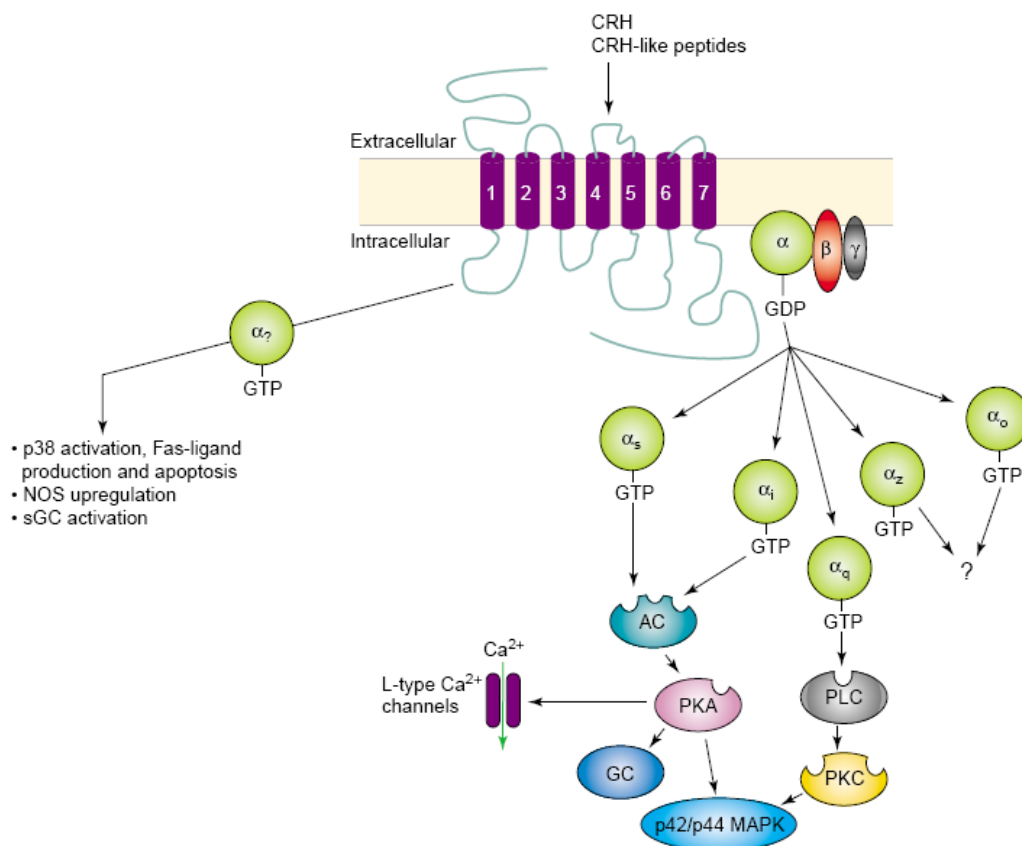
Σηματοδότηση CRF υποδοχέων

Οι υποδοχείς των CRF πεπτιδίων ανήκουν στην ομάδα των υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες (G-protein coupled receptors, GPCRs) (Εικόνα 2). Όπως προαναφέρθηκε έχουν το χαρακτηριστικό μοτίβο των 7 διαμεμβρανικών α-ελίκων. Οι πρωτεΐνες G είναι ετεροτριμερικά συμπλέγματα πρωτεϊνικών υπομονάδων γνωστών ως α-, β- και γ- υπομονάδες. Στα διάφορα συστήματα των θηλαστικών έχουν εντοπιστεί πάνω από 15 Ga υπομονάδες οι οποίες ανήκουν σε τέσσερις κλάσεις: Gai/0, Gas, Gaq και Ga12. Η δέσμευση των CRF πεπτιδίων με κάποιον από τους υποδοχείς τους προκαλεί αλλαγή στην δομή των υποδοχέων γεγονός που οδηγεί στη δέσμευσή τους με τις G-πρωτεΐνες. Στην ανενεργή τους κατάσταση οι G-πρωτεΐνες, και συγκεκριμένα η υπομονάδα α, δεσμεύουν GDP. Η αλληλεπίδραση των υποδοχέων με την πρωτεΐνη έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των G-πρωτεϊνών με ταυτόχρονη ανταλλαγή της GDP με GTP. Η με GTP συνδεδεμένη μορφή της α-υπομονάδας αποδεσμεύεται από το σύμπλεγμα των β/γ υπομονάδων. Τέλος, τόσο η ελεύθερη α- υπομονάδα όσο και το ελεύθερο σύμπλεγμα των β/γ υπομονάδων αλληλεπιδρούν με εκτελεστικά συστήματα (effector systems) του κυττάρου στόχου. Συγκεκριμένα, η υπομονάδα α που φέρει το GTP μετατοπίζεται σε ένα μεμβρανικό ένζυμο-τελεστή (effector enzyme), όπως η αδενυλική κυκλάση και η φωσφολιπάση C (PLC), και διεγείρει την έναρξη της καταλυτικής του δραστηριότητας. Η καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου αυτού παράγει τα λεγόμενα 'δεύτερα μηνύματα'. Τα δεύτερα μηνύματα μπορεί να είναι c-AMP, c-GMP, 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3), διακυλογλυκερόλη (DAG), ή Ca^{+2} .

Αυξημένη συγκέντρωση ενός ή περισσότερων από τα δεύτερα μηνύματα των ορμονών, διεγείρει την αλλαγή στη δραστηριότητα ενός ή περισσότερων ενζύμων ή μη ενζυματικών πρωτεϊνών. Κύριος στόχος των δεύτερων μηνυμάτων είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες (κινάσες τυροσίνης ή κινάσες σερίνης/θρεονίνης). Την ενεργοποίηση της πρώτης πρωτεϊνικής κινάσης συνήθως ακολουθεί ένας καταρράκτης φωσφορυλιώσεων και αποφωσφορυλιώσεων (από φωσφατάσες) σε διάφορα υποστρώματα (ένζυμα, κανάλια ιόντων, μικροσωληνίσκους, ιστόνες, μεταγραφικούς παράγοντες κ.α.). Τελικός στόχος του μπορεί να είναι η μεταβολή της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης, η αλλαγή της πολικότητας μεμβρανών, η δραστηριοποίηση ενζύμων, η μεταγραφή γονιδίων και σύνθεση πρωτεϊνών, η έκκριση ουσιών από το κύτταρο και άλλες διαδικασίες.

Συνήθως οι CRFR1 και CRFR2 υποδοχείς αλληλεπιδρούν με την Gs υπομονάδα η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση με συνέπεια

την αύξηση των επιπέδων ενδοκυττάριου cAMP (24, 25). Ωστόσο, ο CRFR1 αλληλεπιδρά και με την Gq υπομονάδα, ενεργοποιώντας την φωσφολιπάση C (PLC). Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη παροδική μεταβολή των επιπέδων του ενδοκυττάριου ασβεστίου (Ca^{+2}). Στον φλοιό του εγκεφάλου του αρουραίου ο CRF μπορεί να ενεργοποιήσει τις Gas, Ga, Gaq, Ga0 και Gz πρωτεΐνες (26). Επίσης, η UCN μέσω των υποδοχέων μπορεί να ενεργοποιεί τη παραγωγή της MAPK (Mitogen Activating Protein Kinase) μέσω του μονοπατιού Gq/phospholipase C/IP3/PKC (24).



Εικόνα 2. Οι υποδοχείς CRF ανήκουν στους υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες και σηματοδοτούν μέσω Gq και Gs πρωτεϊνών.

Ανταγωνιστές των CRF πεπτιδίων

Ο πρώτος ανταγωνιστής που περιγράφηκε ήταν ο **α -helical CRF₍₉₋₄₁₎** (27). Ακολούθησαν διάφορες μοριακά τροποποιημένες μορφές του α -helical CRF₍₉₋₄₁₎ μέχρι τη δημιουργία της **astressin** (28), η οποία ήταν 30 φορές πιο ικανή από τους προηγούμενους ανταγωνιστές στην αναστολή της έκκρισης ACTH. Μια μικρή μοριακή τροποποίηση της τελευταίας έδωσε την **Astressin B** έναν ισχυρό ανταγωνιστή μακράς διάρκειας και των δύο υποδοχέων CRF, και στη συνέχεια την **Astressin₂- B**, η οποία προσδέεται αποκλειστικά στον CRFR2 (29). Παράλληλα, περιγράφηκε από ένα άλλο εργαστήριο η δημιουργία ενός ειδικού για τον υποδοχέα CRFR2 ανταγωνιστή, η **anti-sauvagine-30** (30).

Πέρα των πεπτιδικών ανταγωνιστών των υποδοχέων CRF, οι οποίοι εξελίσσονται συνεχώς, υπάρχουν και αρκετοί μη πεπτιδικοί ανταγωνιστές όπως η **antalarmin** και το ανάλογο **CP-154,526** (CRFR1 ανταγωνιστές). Η μη πεπτιδική φύση των τελευταίων παρέχει κάποια πλεονεκτήματα στη χρήση τους, καθώς δεν έχουν τη δυνατότητα να επάγουν βιολογικές δράσεις από μόνοι τους.

CRF πεπτίδια και καρκίνος

Τα CRF πεπτίδια εκφράζονται και εκκρίνονται σε καρκινικά κύτταρα και μέσω των υποδοχέων τους επάγουν διαδικασίες που επηρεάζουν τη φυσιολογία του όγκου.

Καρκίνος του μαστού

Σε μία μελέτη που έγινε σε βιοψίες καρκίνου του μαστού εντοπίστηκε, μεταξύ άλλων ορμονών όπως εκλυτική ορμόνη της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LHRH), εκλυτική ορμόνη της αυξητικής ορμόνης (GHRH), και σωματοστατίνη, η έκφραση του CRF στο 30% των δειγμάτων (31).

Καρκίνοι του δέρματος

Στο δέρμα έχει εντοπιστεί η ύπαρξη ενός συστήματος ανάλογου με τον ΥΥΕ άξονα. Τα μελανοκύτταρα του δέρματος εκφράζουν CRF και με τη σειρά του ο CRF επάγει την έκφραση του mRNA των CRF υποδοχέων είτε στα μελανοκύτταρα (αυτοκρινής δράση) είτε στα κερατινοκύτταρα (παρακρινική δράση) με αποτέλεσμα τη παραγωγή της POMC (προ-οπιομελανοκορτικοτροπίνη) (32). Η POMC αποτελεί το πρόδρομο μόριο της ACTH, MSH και β-ενδορφίνης. Το σύστημα αυτό λειτουργεί ως ένας μηχανισμός απάντησης στους διάφορους στρεσογόνους παράγοντες του περιβάλλοντος.

Σε καρκίνους του δέρματος, μελάνωμα και λεπιδοειδές επιθηλιακό καρκίνωμα (scuamous cell carcinoma), έχει εντοπιστεί η έκφραση του CRF και του CRFR1 υποδοχέα (33). Αυξημένα επίπεδα POMC συνδέονται με καρκινογένεση. Βρέθηκε συνεντοπισμός του CRF με τη POMC σε κύτταρα μελανώματος και καταστολή της παραγωγής του POMC mRNA παρουσία CRF ανταγωνιστή (34).

Καρκίνοι του ενδομήτριου

Ο CRF έχει βρεθεί να εκφράζεται τόσο στα επιθηλιακά κύτταρα της φυσιολογικής μήτρας (σε περίοδο εγκυμοσύνης ή όχι) όσο και επιθηλιακούς όγκους του ενδομήτριου (35). Μάλιστα η σταθερή έκφρασή του στη μήτρα σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις σημαίνει πως ο CRF πρέπει να παίζει έναν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία της μήτρας.

Άλλοι όγκοι

Ο CRF έχει βρεθεί να εκφράζεται επιπλέον, σε μικροκυτταρικούς όγκους του πνεύμονα, σε ενδοκρινείς όγκους του παγκρέατος, σε καρκίνους του μυελού του θυρεοειδούς αδένου και σε ενδοκρινείς καρκίνους του προστάτη (36). Η υπερέκφραση του CRF σε κάποια από αυτά τα καρκινώματα μπορεί να συνδέεται με την εμφάνιση του συνδρόμου Cushing. Επίσης, ο CRF έχει βρεθεί να εκφράζεται σε φαιοχρωμοκυττώματα των επινεφριδίων και όχι σε εξω- επινεφριδιακά φαιοχρωμοκυττώματα (37). Τέλος, σε καρκίνους του προστάτη έχει εντοπιστεί η έκφραση της UCNI για πρώτη φορά το 2002 από τον Arcuri και τους συνεργάτες του(38).

Έκφραση των υποδοχέων των CRF πεπτιδίων στα καρκινικά κύτταρα

Μεγάλη έκφραση των CRF υποδοχέων έχει βρεθεί σε αδενώματα της υπόφυσης και γενικά σε περιοχές του νευρικού συστήματος (ACTH- producing adenomas, GH- producing adenomas, medulloblastomas, meningiomas κτλ) (39, 40) καθώς και σε φαιοχρωμοκυττώματα (41). Οι υποδοχείς των CRF πεπτιδίων εκφράζονται ακόμη σε μελανώματα (42), σε ρετινοβλαστώματα (43, 44) καθώς και σε νευροβλαστώματα (σαρκώματα νευρικής προελεύσεως) (45, 46). Τέλος, οι CRF υποδοχείς εκφράζονται σε κυτταρικές σειρές μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (47) καθώς και σε ιστούς και κυτταρικές σειρές καρκίνου του ενδομήτριου (48).

Δράσεις των CRF πεπτιδίων και των υποδοχέων τους στα καρκινικά κύτταρα

Όπως είναι γνωστό, στα φυσιολογικά κύτταρα η κυτταρική διαίρεση μαζί με την ανάπτυξη του κυττάρου δρουν για τη διατήρηση του σωστού μεγέθους του κυττάρου. Ο **πολλαπλασιασμός** βασίζεται στη παρουσία και δράση μιτογόνων και αυξητικών παραγόντων που δρουν τοπικά καθώς και σε παράγοντες επιβίωσης οι οποίοι καταστέλλουν τους μηχανισμούς της **απόπτωσης**. Στη περίπτωση ενός όγκου ωστόσο, τα καρκινικά κύτταρα παύουν να εξαρτώνται από εξωτερικούς αυξητικούς παράγοντες και ενεργοποιούν ενδοκυττάρια μονοπάτια επιβίωσης και πολλαπλασιασμού και μπορούν πια να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα. Παράλληλα αναστέλλονται οι μηχανισμοί απόπτωσης καθώς και οι μηχανισμοί διαφοροποίησης. Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά ενός όγκου είναι οι ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να "ξεφεύγουν" από το περιβάλλον τους και να δημιουργούν νέους όγκους- **μεταστάσεις**.

Τα CRF πεπτίδια έχουν βρεθεί να δρουν σε καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν έναν ή περισσότερους υποδοχείς στην επιφάνειά τους. Η δράση αυτή εξαρτάται μεταξύ άλλων, από το κυτταρικό τύπο, τον τύπο του υποδοχέα που εκφράζουν καθώς και το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται. Στη συνέχεια, αναφέρονται οι δράσεις των CRF πεπτιδίων στο πολλαπλασιασμό, στην απόπτωση και στη κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων, μηχανισμοί που μελετήθηκαν και στη συγκεκριμένη έρευνα.

Δράσεις των CRF πεπτιδίων και των υποδοχέων τους στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων

Οι δράσεις των CRF πεπτιδίων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό εξαρτώνται από τον κυτταρικό τύπο καθώς και από το θρεπτικό μέσο στο οποίο αναπτύσσονται τα κύτταρα (5). Έτσι, χρησιμοποιώντας διαφορετικούς τύπους κυττάρων του δέρματος οι οποίοι εκφράζουν τον CRFR1a υποδοχέα, αποδείχθηκε πως οι δράσεις του CRF μέσω του ίδιου τύπου υποδοχέα, ποικίλλουν. Για παράδειγμα σε ινοβλάστες του δέρματος απουσία ορού και αυξητικών παραγόντων στο θρεπτικό μέσο υπήρχε επαγωγή του πολλαπλασιασμού, ενώ παρουσία των παραπάνω η επίδραση αυτή χανόταν. Σε κερατινοκύτταρα παρατηρήθηκε αναστολή του πολλαπλασιασμού παρουσία ή απουσία ορού (49). Στα μελανοκύτταρα, φυσιολογικά ή αθανατοποιημένα, σε συνθήκες με ορό παρατηρείται αναστολή του πολλαπλασιασμού, ενώ απουσία ορού επάγεται ο πολλαπλασιασμός (ο CRF δρα ως αντι-αποπτωτικός παράγοντας). Σε ό,τι αφορά το μελάνωμα, χρησιμοποιώντας τη κυτταρική σειρά SKMEL-188, η οποία εκφράζει αποκλειστικά τον CRFR1, ο CRF (συγκεκριμένα το UCW πεπτίδιο ειδικό για τον CRFR1 υποδοχέα) βρέθηκε να αναστέλλει το κυτταρικό πολλαπλασιασμό μειώνοντας τη μετάβαση από την G1/G0 στην S φάση (5). Επιπλέον, σε κυτταρική σειρά καρκίνου του ενδομήτριου (Ishikawa, IK κυτταρική σειρά) ο CRF βρέθηκε να αναστέλλει το πολλαπλασιασμό των κυττάρων με δόσο-εξαρτώμενο και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο δρώντας μέσω του CRFR1 υποδοχέα και ενεργοποιώντας το σηματοδοτικό μονοπάτι του cAMP/PKA (50). Μία μελέτη που έγινε σε καρκινική σειρά κορτικοτρόφων κυττάρων ποντικού, έδειξε πως ο CRF αναστέλλει το πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών (51). Για να αποφευχθεί η δράση της CRF binding πρωτεΐνης, τα κύτταρα αυτά αναπτύχθηκαν σε μέσο με μονάχα 0.2% ορό. Παρουσία του CRF(9-41) ανταγωνιστή η επίδραση αναστελλόταν. Ωστόσο, παρουσία αναστολέων της αδενυλικής κυκλάσης ή του cAMP η αναστολή του πολλαπλασιασμού δεν επηρεαζόταν. Επιπλέον, βρέθηκε πως η αναστολή του πολλαπλασιασμού συνδεόταν με την αύξηση του όγκου του κυττάρου καθώς και με μορφολογικές αλλαγές.

Δράσεις των CRF πεπτιδίων και των υποδοχέων τους στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων

Σε κυτταρική σειρά φαιοχρωμοκυτώματος αρουραίου, PC12, ο CRF επάγει την έκφραση του Fas ligand και την απόπτωση των κυττάρων. Η δράση αυτή γίνεται μέσω του CRFR1 υποδοχέα, ο οποίος εκφράζεται από τα κύτταρα αυτά και οδηγεί στην ενεργοποίηση της p38MAPK η οποία είναι αναγκαία για την απόπτωση μέσω του συστήματος Fas/Fas ligand (52). Στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά ρετινοβλαστώματος Y79 ο CRF προστατεύει ενάντια στις δράσεις της καμπτοθεκίνης, δηλαδή σε απόπτωση εξαιτίας βλάβης στο DNA, καταστέλλοντας την προ-κασπάση-3, μέσω PKA, σε κάποιο στάδιο πριν την ενεργοποίησή της (53).

Μελέτη που έγινε σε κυτταρική σειρά μακροφάγων, RAW 264.7, έδειξε για πρώτη φορά επαγωγή απόπτωσης από τις UCNI και UCNIΙ μέσω του CRFR2 υποδοχέα (54). Μάλιστα η απόπτωση επάγεται μέσω της άμεσης επίδρασης στις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax και Bad και όχι μέσω της ενεργοποίησης της p38MAPK, των JNK και της παραγωγής του NO, χαρακτηριστικά μονοπάτια της απόπτωσης των μακροφάγων μέσω LPS. Οι UCNs, μεταξύ άλλων, προστατεύουν τα μυοκύτταρα της καρδιάς από αποπτωτικό ή νεκρωτικό θάνατο που επάγεται από ισχαιμία μέσω ενεργοποίησης MAP κινασών (MEK/ERK), Akt και επαγωγή της έκφρασης καναλιών K(ATP) (55, 56).

Δράσεις των CRF πεπτιδίων και των υποδοχέων τους στη κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων

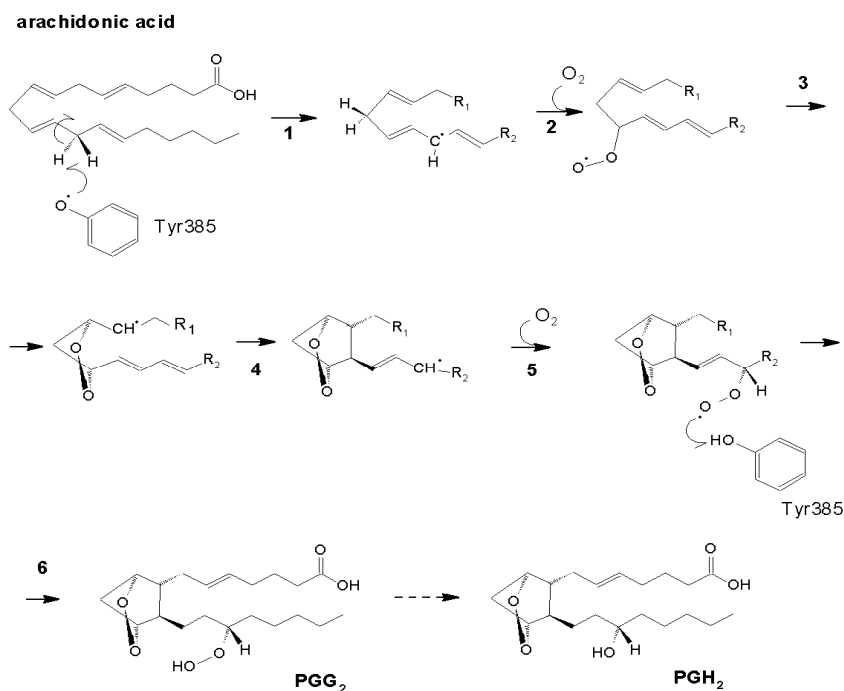
Για τη δράση των CRF πεπτιδίων στη κινητικότητα των κυττάρων υπάρχουν ελάχιστες πληροφορίες στη βιβλιογραφία. Σε μελέτη που έγινε σε μονοπύρηννα κύτταρα απευθείας απομονωμένα από το αίμα ανθρώπων φάνηκε πως ο CRF επάγει μία μικρή, αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση της κινητικότητας των κυττάρων αυτών (57). Επίσης, έχει δειχθεί πως ο CRF επάγει την αγγειογένεση και την ανάπτυξη επιθηλιακών όγκων στο δέρμα (58). *In vitro* μελέτες αυτής της έρευνας έδειξαν πως ο CRF είναι ένας πιθανός παράγοντας επαγωγής της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, ένα σημαντικό στάδιο της διαδικασίας της αγγειογένεσης. Παράλληλα ο CRF ευνοεί την *in vivo* ανάπτυξη όγκου και την αγγειογένεση όταν ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα (κυτταρική σειρά 293) διαμολυνθούν με πλασμίδιο που φέρει το ανθρώπινο γονίδιο του CRF ή με κενό πλασμίδιο. Οι όγκοι που αναπτύχθηκαν από CRF+ κύτταρα είχαν μεγαλύτερο μέγεθος αλλά τα κύτταρα είχαν μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης από τα CRF- κύτταρα. Πειράματα που έγιναν έδειξαν πως το

πλεονέκτημα που είχαν τα CRF+ κύτταρα να δημιουργούν μεγαλύτερους όγκους οφειλόταν στην ικανότητά τους να επάγουν αγγειογένεση. Αυτό προκύπτει εάν λάβουμε υπόψη την ικανότητα του CRF να δρα ως χημειοτακτικός παράγοντας στα ενδοθηλιακά κύτταρα δρώντας άμεσα στους υποδοχείς του στην επιφάνεια των κυττάρων. Έχει βρεθεί πως τα αρτηρίδια εκφράζουν CRFR2 (59).

Κυκλοοξυγενάσες (Cox)

Η κυκλοοξυγενάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή του αραχιδονικού οξέως σε προσταγλανδίνες, προστακυκλίνη ή θρομβοξάνιο (προστανοϊδή). Το αραχιδονικό οξύ (5, 8, 11, 14- εικοσιτετρανοϊκό οξύ) (AA) είναι ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ το οποίο βρίσκεται αποθηκευμένο σε μορφή εστέρα στα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης. Απελευθερώνεται στον ενδοκυττάριο χώρο μέσω της δράσης των φωσφολιπασών (PLC), οι οποίες διεγείρονται από πλήθος νευροδιαβιβαστών (π.χ. σεροτονίνη, ισταμίνη) και νευροπεπτιδίων. Το ελεύθερο αραχιδονικό αποτελεί υπόστρωμα για το ένζυμο της κυκλοοξυγενάσης (Cox) (prostaglandin G/H synthase) το οποίο καταλύει τις αντιδράσεις μετατροπής του AA σε προσταγλανδίνες ή θρομβοξάνιο (60) (Εικόνα 3).

Υπάρχουν δύο ισομορφές του ενζύμου της κυκλοοξυγενάσης, η Cox-1 και η Cox-2 (65% ομολογία). Η Cox-1 ισομορφή βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και έχει μοριακό βάρος 67kD, ενώ η Cox-2 εντοπίζεται περιπυρηνικά και έχει μοριακό βάρος 72kD. Λειτουργικά τα δύο ισοένζυμα διαφέρουν ελάχιστα. Πρόκειται για ένζυμα με δράση οξυγενάσης και υδροϋπεροξειδάσης, τα οποία ενεργοποιούνται από την παρουσία υποστρώματος, σε αντίθεση με τις περισσότερες οξυγενάσες. Μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε PGG₂ και PGH₂, ενδιάμεσα παράγωγα με μικρό χρόνο ζωής, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε προσταγλανδίνες (PGD₂, PGE₂, PGF_{2a} και PGI₂) ή θρομβοξάνιο (TXB₂) (61). Τα καταλυτικά τους κέντρα μοιάζουν πάρα πολύ και η σημαντικότερη διαφορά των δύο ισοενζύμων είναι η αντικατάσταση της ισολευκίνης 523 στην Cox-1 με βαλίνη στην Cox-2. Εξαιτίας αυτής της αλλαγής έχουν αναπτυχθεί και εκλεκτικοί αναστολείς της Cox-2.



Εικόνα 3. Η μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε προσταγλανδίνες ή θρομβοξανίνο διαμεσολαβείται από τις κυκλοοξυγενάσες, οι οποίες καταλύουν διαδοχικά μία αντίδραση κυκλοοξυγενάσης και μία αντίδραση υπεροξειδάσης.

Ρόλος της Cox-1 στον Καρκίνο

Γενικά, η Cox-1 εκφράζεται σταθερά σε πολλούς ιστούς και φαίνεται να σχετίζεται με τις φυσιολογικές λειτουργίες των κυττάρων, ωστόσο, παρατηρείται αλλαγή της έκφρασής της σε διάφορες καταστάσεις όπως αυτή του καρκίνου. Έτσι, επιθηλιακοί όγκοι των ωοθηκών έχουν βρεθεί να χαρακτηρίζονται από υψηλότερα επίπεδα Cox-1 απ'ότι Cox-2 (62). Επίσης, παρουσία του ειδικού αναστολέα της Cox-1, **sc-560**, παρατηρείται μείωση της παραγωγής της προστακυκλίνης PGI(2), κυριότερη προσταγλανδίνη που επάγεται από την Cox-1, καθώς και σμίκρυνση του όγκου σε ποντίκια που έχουν μολυνθεί με καρκινικά κύτταρα OSE (Ovarian Surface Epithelial cells). Η μείωση του μεγέθους του όγκου είναι αποτέλεσμα της μείωσης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της αύξησης της απόπτωσης. Σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινου ηπατοκυτταρικού καρκινώματος αναστολέας και των δύο ενζύμων Cox-1 και Cox-2, indometacin, επάγει την απόπτωση των κυττάρων πιο αποτελεσματικά από τους ειδικούς για την Cox-2 αναστολείς (63). Αυτό δείχνει το σημαντικό ρόλο της Cox-1 σε αυτόν τον τύπο καρκίνου.

Πέρα από το ρόλο της Cox-1 στον καρκίνο, που παραμένει ακόμα σχετικά αδιευκρίνιστος, ο ρόλος της Cox-2 είναι πιο ξεκάθαρος. Η παρουσία του mRNA της Cox-2 σχετίζεται με την έκφραση και έκκριση του VEGF σε καρκινικές σειρές. Παρουσία αναστολέων των Cox-1 και Cox-2 ενζύμων οδηγεί σε αναστολή της έκφρασης του VEGF. Ανταγωνιστές των EP1 και EP4 υποδοχέων επάγουν το ίδιο αποτέλεσμα, πράγμα το οποίο δείχνει τη συμμετοχή της PGE2 (64). Η Cox-2 εκφράζεται στο 40% των καρκίνων του μαστού (65). Επίσης, η αναστολή της Cox-2 σχετίζεται με μειωμένη μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων (μοντέλο μεταστατικού καρκίνου του μαστού σε ποντίκια). Παρουσία EP4 ανταγωνιστών επάγεται μείωση της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων (66). Παρόμοια δράση επάγεται από την indomethacin (Cox-1 και Cox-2 αναστολέας).

Μηχανισμοί που επηρεάζουν την κινητικότητα καρκινικών κυττάρων

(α) Ρόλος του κυτταροσκελετού της ακτίνης στη κινητικότητα και μεταστατικότητα των καρκινικών κυττάρων

Η ακτίνη μαζί με τα μυοσίνη αποτελούν τα κύρια δομικά στοιχεία του κυτταροσκελετού της ακτίνης και βρίσκονται ανάμεσα στις πιο διαδεδομένες πρωτεΐνες στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η ακτίνη είναι μία πρωτεΐνη με σχετικά μικρό μοριακό βάρος (42kD). Πολλά μόρια μονομερούς ακτίνης (G ακτίνη), σε συγκεκριμένες συνθήκες ιονικής ισχύος πολυμερίζονται μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών σε συνθετικά ινίδια διαμέτρου 5-7 nm και μήκους αρκετών μm δημιουργώντας την πολυμερή ακτίνη ή F ακτίνη. Μάλιστα, τα μόρια μονομερούς ακτίνης τοποθετούνται στα μικροϊνίδια σε συγκεκριμένες θέσεις, με αποτέλεσμα τα ινίδια ακτίνης να αποκτούν πολικότητα. Τα ινίδια ακτίνης βρίσκονται συνεχώς σε δυναμική ισορροπία ή κοντά σε αυτήν. Οποιαδήποτε μεταβολή στη συγκέντρωση της G ακτίνης ή στη συγκέντρωση των διαθέσιμων άκρων για πολυμερισμό επάγει τη μετατόπιση του συστήματος προς μία νέα σταθερή κατάσταση μέσω πολυμερισμού ή αποπολυμερισμού με αποτέλεσμα η συνολική συγκέντρωση της ακτίνης να διατηρείται. Αυτός ο μηχανισμός ρύθμισης του πολυμερισμού της ακτίνης εξασφαλίζει την άμεση απάντηση του κυττάρου σε καταστάσεις που απαιτούν την ταχεία αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης όπως είναι **η κίνηση του κυττάρου** και κατ'επέκταση **η μετανάστευσή του**, η διατήρηση του όγκου, της πολικότητας και του σχήματος, η πρόσφυση στην εξωκυττάρια ουσία (ECM), η ανάπτυξη δύναμης σύσπασης ή κινητήριας δύναμης, η κυττοκίνηση, η ενδοκύττωση και εξωκύττωση.

Η αναδιοργάνωση των μικροϊνιδίων της ακτίνης σχετίζεται με την ικανότητα που αποκτούν τα καρκινικά κύτταρα να πολλαπλασιάζονται άναρχα, να έχουν αυξημένη διεισδυτικότητα και να μεταναστεύουν δημιουργώντας μεταστάσεις. Κατά το μετασχηματισμό των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά κύτταρα η δυναμική ισορροπία του λόγου της G προς την F ακτίνη αλλάζει δραματικά. Γενικά, αυτό που παρατηρείται στις διάφορες μορφές νεοπλασιών (λευχαιμίες, καρκίνους ενδομητρίου, μαστού, δέρματος) είναι ότι στα καρκινικά κύτταρα υπάρχει μείωση της ολικής και της F ακτίνης σε σχέση με τα φυσιολογικά (67-69) και μάλιστα η μεταβολή του όγκου σχετίζεται με το βαθμό διαφοροποίησης των νεοπλασματικών κυττάρων. Μελέτες που έγιναν για τη σχέση που υπάρχει μεταξύ της οργάνωσης της ακτίνης και της ικανότητας των κυττάρων να μεταναστεύουν ποικίλουν ως προς τα αποτελέσματά τους. Σύμφωνα με μία μελέτη που έγινε σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται από BW5147 T-λέμφωμα με μικρή μεταστατική ικανότητα, φάνηκε πως αυξημένα ποσοστά πολυμερισμού της ακτίνης είναι απαραίτητη για τη δημιουργία ψευδοποδίων και την διείσδυση αυτών στο γειτονικό ιστό, και τελικά για την αποτελεσματική μετάσταση (70). Αντίθετα, επιμόλυνση της κυτταρικής σειράς B16-B16, με cDNA που εκφράζει τη βm-ακτίνη, έδωσε κύτταρα χαμηλότερης μεταστατικής ικανότητας και αύξηση του ποσοστού των ινιδίων του στρες (71).

(β) Ρόλος των Cox ενζύμων (κυκλοοξυγενάσες) στην κινητικότητα και μεταστατικότητα καρκινικών κυττάρων.

Αρκετές μελέτες έχουν ασχοληθεί με τη δράση των κυκλοοξυγενασών (Cox-1 και Cox-2) στα καρκινικά κύτταρα. Για να δημιουργηθεί μία μετάσταση πρέπει να λάβουν χώρα πολλές διαδικασίες που θα βοηθήσουν τα καρκινικά κύτταρα να φύγουν από το περιβάλλον τους και να επιβιώσουν σε κάποιο άλλο σημείο του σώματος. Σε αυτές τις διαδικασίες που δεν είναι άλλες από την αγγειογένεση, την αποκόλληση από το περιβάλλον, τη πρωτεόλυση της εξωκυττάριας ουσίας και τη μετακίνηση, εμπλέκονται και οι κυκλοοξυγενάσες. Σε μελέτη που έγινε σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς της Cox-2 (NS-398, NA) για να μελετηθεί η δράση της στη μεταστατική ικανότητα αυτών των κυττάρων. Πράγματι βρέθηκε πως η έκφραση της Cox-2 είναι απαραίτητη για το πολλαπλασιασμό, τη κινητικότητα και την διεισδυτικότητα των κυττάρων καρκίνου του μαστού (72). Σημαντικό είναι πως τόσο η Cox-1 όσο η Cox-2 εκφράζονται σε καρκίνους του μαστού. Συγκεκριμένα η Cox-1 εκφράζεται από τα κύτταρα του στρώματος, ενώ η Cox-2 από

τα καρκινικά (73). Η έκφρασή τους, και κατά συνέπεια η παραγωγή προσταγλανδινών, συνδέεται με την ικανότητα άμεσης μετακίνησης των καρκινικών κυττάρων, αλλά και με την ικανότητά τους να δημιουργούν μεταστάσεις μέσω της ενεργοποίησης της διαδικασίας της αγγειογένεσης (74). Για παράδειγμα σε μοντέλο μεταστατικού καρκίνου του μαστού σε ποντικό, αναστολείς των κυκλοοξυγενασών επιβραδύνουν την εξέλιξη του όγκου μέσω της καθυστέρησης της μετανάστευσης, της ικανότητας εισβολής και αγγειογένεσης (75). Σε μία άλλη μελέτη βρέθηκε πως ανθρώπινα κύτταρα επιδερμοειδούς καρκίνου μετά από διαμόλυνση με Cox-2 cDNA παρατηρήθηκε αυξημένη ικανότητα κίνησης, διείσδυσης και ογκογένεσης (76). Τέλος, η Cox-2 μέσω της παραγωγής των προσταγλανδινών, φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση στον γαστρεντερικού σωλήνα. Η δράση αυτή πρέπει να επιτυγχάνεται με επαγωγή του πολλαπλασιασμού και της ικανότητας μετανάστευσης των κυττάρων και της αγγειογένεσης ενώ ταυτόχρονα αναστέλλεται η απόπτωση (77).

γ) Ρόλος του VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) στον καρκίνο

Ο VEGF είναι μια πολυλειτουργική γλυκοπρωτεΐνη που δρα ως μιτογόνο των ενδοθηλιακών κυττάρων και ως αγγειογενετικός παράγοντας *in vivo*. Πρόκειται για μία ομοδιμερή πρωτεΐνη 40-45 kD που εκκρίνεται από μία ποικιλία φυσιολογικών κυττάρων και τη πλειονότητα των καρκινικών και δρα άμεσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία εκφράζουν τους υποδοχείς του. Η ανάπτυξη συμπαγών καρκίνων απαιτεί την ύπαρξη επαρκούς αγγειακού συστήματος στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Ο όγκος μπορεί να χρησιμοποιεί τα ήδη υπάρχοντα αγγεία ή νέα αγγεία (αγγειογένεση). Ο πιο καλά χαρακτηρισμένος **προ-αγγειογενετικός παράγοντας** είναι ο **VEGF**. Ο VEGF εκφράζεται σε πολλούς ανθρώπινους καρκίνους, όπως σε καρκίνους του μαστού, του εντέρου, του νεφρού, του γαστρεντερικού σωλήνα και άλλους (78, 79). Η έκφρασή του συνδέεται με τον ταχύ πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στο σημείο του όγκου (80), την αύξηση της διαμέτρου των αγγείων καθώς και με την αποικοδόμηση της του υποστρώματος μέσω της ενεργοποίησης πρωτεολυτικών ενζύμων που βοηθούν στην διεισδυτικότητά του και στην ανάπτυξη νέων αγγείων.

Ο ρόλος του VEGF στην αγγειογένεση συνδέεται με τη δράση των κυκλοοξυγενασών στο καρκίνο. Η παρουσία του mRNA της Cox-2 σχετίζεται με την έκφραση και έκκριση του VEGF σε καρκινικές σειρές. Για παράδειγμα, σε ιστούς από καρκίνο του στομάχου η έκφραση του VEGF συμπίπτει σε μεγάλο βαθμό με αυτή της Cox-2 (81). Επίσης, συνεντοπισμός στη έκφραση του VEGF με την Cox-2 βρέθηκε και σε ιστούς

από καρκίνο του παχέως εντέρου και σε επιθηλιακούς όγκους ωοθηκών (82, 83). Έχει βρεθεί πως η αναστολή της Cox-2 οδηγεί σε μειωμένη αναστολή της αγγειογένεσης σε μοντέλο μεταστατικού καρκίνου του μαστού σε ποντίκια (84). Η ίδια μελέτη έδειξε πως μετά τη χορήγηση του αναστολέα (celecoxib) παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα του VEGF. Ωστόσο, μία άλλη μελέτη έδειξε πως η δράση του αναστολέα μειώνει τα επίπεδα του VEGF σε σύντομα χρονικά διαστήματα, ενώ η συγκέντρωσή του αυξάνεται με τη πάροδο του χρόνου, δείχνοντας έτσι πως η δράση των αναστολέων δε παραμένει σταθερή σε ό,τι αφορά τη ρύθμιση των αγγειογενετικών παραγόντων (85).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού (MCF7 και MDA MB 231) και καρκίνου του προστάτη (LnCaP και PC3).

α) PC3

Πρόκειται για κυτταρική σειρά η οποία προέρχεται από μετάσταση προστατικού αδενοκαρκινώματος στο μυελό των οστών και παρουσιάζει χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης (86). Σε καλλιέργεια ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων είναι 33 ώρες. Δεν ανταποκρίνονται στη δράση των ανδρογόνων, αν και εκφράζουν τους υποδοχείς τους, οι οποίοι όμως έχουν χάσει τη λειτουργικότητά τους (87).

β) LnCaP

Πρόκειται για κυτταρική σειρά η οποία προέρχεται από μετάσταση προστατικού αδενοκαρκινώματος στους λεμφαδένες (88). Σε καλλιέργεια ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων είναι 60-72 ώρες. Σε αντίθεση με τα PC3, τα κύτταρα αυτά ανταποκρίνονται στα ανδρογόνα με επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (88). Πρόκειται για καλά διαφοροποιημένα κύτταρα τα οποία παράγουν ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA).

γ) MCF7

Η κυτταρική σειρά αυτή προέρχεται από μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα. Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν υποδοχείς οιστρογόνων και έχουν την ικανότητα να δημιουργούν κλώνους(89). Πρόκειται για επιθηλιακά κύτταρα που μεγαλώνουν σε μονοστιβάδα και σε καλλιέργεια ο χρόνος διπλασιασμού τους είναι 45 ώρες.

δ) MDA MB 231

Πρόκειται για επιθηλιακά κύτταρα που προέρχονται από αδενοκαρκίνωμα του μαστού. Τα MDA 231 δεν εκφράζουν υποδοχείς οιστρογόνων και είναι μία ιδιαίτερα μεταστατική κυτταρική σειρά. Επίσης, εμφανίζουν αυξημένη νεοαγγειογενετική δραστικότητα σε αντίθεση με τα MCF7 που εμφανίζει περιορισμένη νεοαγγειογενετική δραστικότητα (90).

ΜΕΘΟΔΟΙ

Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών

Υλικά –Συσκευές Καλλιιεργειών

Κυτταρική σειρά PC3 (European Collection of Animal Cell Cultures 90112714 UK)

Κυτταρική σειρά LnCaP (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures ACC 256 DSMZ Germany)

Κυτταρική σειρά MCF7 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures ACC 115 DSMZ Germany)

Κυτταρική σειρά MDA MB 231(European Collection of Animal Cell Cultures 92020424 UK)

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

RPMI 1640 (Gibco-BRL Co,MD, USA)

Ham's F12K (Gibco)

Ορός εμβρύου βοός: FBS (Foetal Bovine Serum) (Gibco-BRL Co,MD, USA)

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

Δισανθρακικό νάτριο (Sodium bicarbonate) (Sigma)

Πυρουβικό νάτριο (Sodium pyruvate) (Gibco)

Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS, phosphate buffer saline) (Gibco)

Διάλυμα τρυψίνης-EDTA (Gibco)

DMSO (Sigma, USA)

Χρωστική Trypan Blue (Seromed Biochrom, Germany)

Σύριγγες 10 ml

Φλάσκες κυτταροκαλλιιεργειών

Μικροσκόπιο ορατού φωτός: (Olympus, Japan)

Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή (Neubauer)

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

Μέθοδος καλλιιεργειας

Και οι τέσσερις κυτταρικές σειρές καλλιιεργήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37°C και σε υγρή ατμόσφαιρα 5% CO₂/95% αέρα.

Τα **MDA MB 231** και **MCF7** κύτταρα καλλιιεργήθηκαν σε DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS και 1% Πενικιλίνη/ Στρεπτομυκίνη. Το FBS που προστίθεντο είχε προηγουμένως απενεργοποιηθεί (στους 57°C για 45 λεπτά), διαδικασία που γινόταν μία φορά πριν χρησιμοποιηθεί και ισχύει για όλες τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν. Το θρεπτικό των καλλιιεργειών ανανεωνόταν κάθε 48 ώρες. Όταν η καλλιιεργεια των κυττάρων κάλυπτε περίπου το 80% της επιφάνειας της φλάσκας, το υπερκείμενο απομακρύνονταν και η

επιφάνεια των κυττάρων εκπλένονταν με PBS. Στη συνέχεια εκτίθεντο σε διάλυμα τρυψίνης-EDTA για 5 περίπου λεπτά και ενώ επανατοποθετούνταν στο κλίβανο. Στο διάλυμα αυτό, αφού τα κύτταρα είχαν αποκολληθεί από τη φλάσκα, προστίθεντο θρεπτικό υλικό για την απενεργοποίηση της τρυψίνης, η οποία είναι τοξική για τα κύτταρα αν παραμείνουν σε αυτή για πολύ χρόνο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε θρεπτικό και είτε ανακαλλιεργούνται είτε επιστρώνονται στις ανάλογες πλάκες για πειράματα.

Τα **LnCaP** κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε RPMI 1640 εμπλουτισμένο με 1.5 g/l δισανθρακικό νάτριο, 1mM πυρουβικό νάτριο, 1% Πενικιλίνη/ Στρεπτομυκίνη και 10% FBS. Τα κύτταρα αυτά έπρεπε να παραμείνουν αμετακίνητα για 48 ώρες πριν την χρησιμοποίησή τους για πείραμα ή την αλλαγή θρεπτικού μέσου. Όταν η καλλιέργεια των κυττάρων κάλυπτε περίπου το 80% της επιφάνειας της φλάσκας, το υπερκείμενο απομακρύνονταν και η επιφάνεια των κυττάρων εκπλένονταν με PBS. Στη συνέχεια εκτίθεντο σε διάλυμα τρυψίνης-EDTA για 5 περίπου λεπτά και ενώ επανατοποθετούνταν στο κλίβανο. Στο διάλυμα αυτό, αφού τα κύτταρα είχαν αποκολληθεί από τη φλάσκα, προστίθεντο θρεπτικό υλικό για την απενεργοποίηση της τρυψίνης. Επειδή τα κύτταρα αυτά δημιουργούν συσσωματώματα ακολουθούσε πέρασμα από σύριγγα (1 με 2 φορές) πριν την ανακαλλιέργειά τους ή την επίστρωσή τους σε πλάκες για τα ανάλογα πειράματα.

Τα **PC3** κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε Ham's F12K θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με διατανθρακικό νάτριο (1,5 gr/lit) καθώς και 1% Πενικιλίνη/ Στρεπτομυκίνη και 10% FBS. Όταν η καλλιέργεια των κυττάρων κάλυπτε περίπου το 80% της επιφάνειας της φλάσκας, το υπερκείμενο απομακρύνονταν και η επιφάνεια των κυττάρων εκπλένονταν με PBS. Στη συνέχεια εκτίθεντο σε διάλυμα τρυψίνης-EDTA για 5 περίπου λεπτά και ενώ επανατοποθετούνταν στο κλίβανο. Στο διάλυμα αυτό, αφού τα κύτταρα είχαν αποκολληθεί από τη φλάσκα, προστίθεντο θρεπτικό υλικό για την απενεργοποίηση της τρυψίνης και είτε ανακαλλιεργούνται είτε επιστρώνονται στις ανάλογες πλάκες για πειράματα.

Μέτρηση και Επίστρωση κυττάρων για πείραμα

Μικρή ποσότητα του διαλύματος των κυττάρων μετά την απενεργοποίηση της τρυψίνης λαμβάνεται για το προσδιορισμό του αριθμού των κυττάρων. Ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων για επίστρωση σε κάθε πείραμα πραγματοποιείται με τη μέθοδο αιμοκυτταρομετρίας. Συγκεκριμένα, 10μl από τα ανασηκωμένα κύτταρα αναμιγνύονται με 90μl Trypan Blue, τοποθετούνται σε πλάκα Neubauer και γίνεται καταμέτρηση των κυττάρων με την βοήθεια μικροσκοπίου ορατού φωτός σε μεγέθυνση 40x. Όλα ή μέρος των κυττάρων στη κατάλληλη συγκέντρωση τοποθετούνταν στις αντίστοιχες πλάκες καλλιέργειας ανάλογα με τις ανάγκες των πειραμάτων.

Τα κύτταρα καταψύχονται σε τακτά χρονικά διαστήματα στους -80°C , έτσι ώστε να διατηρούνται σε χαμηλό αριθμό γενεών και τα πειράματα να πραγματοποιούνται στην ίδια φάση της λογαριθμικής αύξησης των κυττάρων και περίπου στον ίδιο αριθμό γενιάς. Συγκεκριμένα, κυτταρικό εναιώρημα συγκεντρώσεως 5×10^6 κυττάρων τοποθετείται σε σωληνάρια βαθιάς κατάψυξης, και τους προστίθεται στάγδην υπό συνεχή ανάδευση σε αναλογία 1:1 το κατάλληλο για κατάψυξη υλικό (FBS με 20% DMSO για τα MDA 231 και MCF7 και FBS με 5% DMSO για τα LnCaP και PC3). Ενώ η κατάψυξη των κυττάρων πραγματοποιείται σταδιακά ώστε να εξασφαλιστεί η ακεραιότητά τους, η απόψυξη τους είναι γρήγορη κι άμεση. Έτσι, τα παγωμένα κύτταρα θερμαίνονται στους 37°C κι άμεσα διαλύονται σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας ίδιας θερμοκρασίας. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά και επανακαλλιέργεια όπως περιγράφεται παραπάνω.

Απομόνωση RNA από Κυτταρικά Εκχυλίσματα

Υλικά και συσκευές

Trizol (Tri reagentTM, Sigma, USA)

Χλωροφόρμιο (Sigma, USA)

Ισοπροπανόλη, Αιθανόλη (Merck, Germany)

Επιστρώνονται κύτταρα σε φλάσκα (25cm^2) και όταν καλύψουν το 80% της επιφάνειας συλλέγονται και φυγοκεντρώνονται στις 1850 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο αφαιρείται με κενό και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε Trizol (1ml Trizol ανά 5-10 εκατομμύρια κύτταρα) που περιέχει μίγμα θειοκυανιούχου γουανιδίνης και φαινόλης. Παραμένουν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα προστίθενται 200 μl χλωροφόρμιο. Μετά από ισχυρή ανάδευση (15sec), το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ο διαχωρισμός των φάσεων ολοκληρώνεται με φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά. Η φυγοκέντρηση διαχωρίζει το μίγμα σε 3 φάσεις: Στην οργανική φάση (κόκκινου χρώματος) που περιέχει τις πρωτεΐνες, στην μεσόφαση που περιέχει το DNA και στην υδατική φάση (άχρωμη) που περιέχει το RNA. Για την κατακρήμνιση του RNA, η υδατική φάση, η οποία μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο, επωάζεται με 500μl ισοπροπανόλης για 5- 10 λεπτά και κατόπιν φυγοκεντρείται στις 12.000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά. Το RNA εκπλένεται κατόπιν με 1ml αιθανόλης 75%, αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλύεται σε 50μl H_2O . Για καλύτερη διάλυση θερμαίνεται για 5 λεπτά στους 65°C .

Για την εκτίμηση της ποσότητας και της καθαρότητας του RNA μετρούνται οι απορροφήσεις στα 260 nm και στα 280 nm, όπου απορροφούν αντίστοιχα το RNA και το DNA. Ο λόγος των δύο απορροφήσεων δίνει την καθαρότητα του RNA, ενώ η ποσότητα υπολογίζεται βάση της απορρόφησης στα 260nm (τιμή απορρόφησης 1nm αντιστοιχεί σε 40μg/ml RNA). Τα δείγματα του RNA φυλάσσονται στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

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

Υλικά και συσκευές

Thermoscript RT kit (Invitrogen) το οποίο περιέχει:

Τυχαία εξαμερή: random hexamers

Νερό κατεργασμένο με διαιθυλπυροκαρβονικό εστέρα (DEPC- H_2O)

Ρυθμιστικό διάλυμα για cDNA: 5X PCR buffer

Μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων: dNTP mix 10 mM

Διθειοθρεϊτόλη: DTT, 0.1 M

Διάλυμα αναστολέων RNασών: RNaseOUT, 40 U/ μL

Ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης: Thermoscript RT

Μέθοδος

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ανάστροφης μεταγραφής (RT-PCR) είναι μία *in vitro* μέθοδος για τον προσδιορισμό του mRNA στα κυτταρικά εκχυλίσματα. Η μέθοδος χωρίζεται σε δύο μέρη: Στην μετατροπή του mRNA σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) (**αντίδραση RT**) και στην ενίσχυση-σύνθεση μεγάλης ποσότητας του γονιδίου που μας ενδιαφέρει από το cDNA (**αντίδραση PCR**). Η μετατροπή του RNA σε cDNA γίνεται με τη βοήθεια του ενζύμου *αντίστροφη μεταγραφάση*. Το cDNA που προκύπτει χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την αντιγραφή συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που καθορίζεται από εκκινητές (primers) ειδικούς για το γονίδιο που θέλουμε να αντιγραφεί. Η αντίδραση γίνεται παρουσία ειδικής θερμοανθεκτικής πολυμεράσης (Taq polymerase). Αναλυτικά η διαδικασία έχει ως εξής:

Αντίστροφη μεταγραφή (RT)

Αρχικά προετοιμάζεται ένα μείγμα αντίδρασης που περιλαμβάνει: 1 μg ολικού RNA, 1μl εκκινητή (τα τυχαία εξαμερή στην συγκεκριμένη περίπτωση) και DEPC-H₂O σε ποσότητα τέτοια ώστε ο τελικός όγκος του μείγματος να είναι 10 μl. Για κάθε δείγμα παρασκευάζεται και το λεγόμενο No RT δείγμα, το οποίο περιέχει ό,τι και το κανονικό δείγμα αλλά στο επόμενο βήμα δε προστίθεται το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (control). Στη συνέχεια πραγματοποιείται αποδιάταξη του RNA και του εκκινητή με την επώαση του μείγματος για 5 λεπτά στους 65°C και ψύξη στη συνέχεια στους 4°C. Με τη διαδικασία αυτή καταστρέφονται πιθανά συσσωματώματα ή δευτεροταγείς δομές που θα μπορούσαν να εμποδίσουν την έναρξη σχηματισμού του cDNA. Κατόπιν προετοιμάζεται το κύριο μείγμα της αντίδρασης. Για κάθε δείγμα απαιτούνται 4 μl cDNA buffer (5x), 1 μl DTT, 1 μl RNase OUT, 1 μl DEPC-H₂O, 2μl dNTPs και 1μl ενζύμου Thermoscript. Το παραπάνω μείγμα προστίθεται στο αρχικό και στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση του δείγματος για 60 min στους 50°C, οπότε υβριδοποιείται ο εκκινητής και δρα η αντίστροφη μεταγραφάση. Όπως ειπώθηκε παραπάνω, στο No RT δείγμα προστίθενται όλα τα αντιδραστήρια πλην του ενζύμου Thermoscript, οπότε δε περιμένουμε να πάρουμε προϊόν. Η αντίδραση τερματίζεται με επώαση του δείγματος για 5 min στους 85°C όποτε και αποδιατάσσονται τα υβρίδια και απενεργοποιείται η αντίστροφη μεταγραφάση. Το cDNA είτε χρησιμοποιείται αμέσως στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είτε φυλάσσεται στους -20°C.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη παραγωγή πολλών αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας του cDNA. Το ένζυμο-κλειδί στην αντίδραση αυτή είναι μία DNA πολυμεράση (Taq polymerase) η οποία χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Σε υψηλές θερμοκρασίες τα δίκλιωνα μόρια DNA μπορούν να αποδιαταχθούν σε μονόκλιωνα μόρια τα οποία λειτουργούν ως εκμαγείο για τη σύνθεση νέων συμπληρωματικών αλυσίδων. Για να ξεκινήσει η DNA πολυμεράση την αντιγραφή απαιτεί τη παρουσία ενός εκκινητή (αλληλουχία νουκλεοτιδίων) συμπληρωματικού με την αλυσίδα του DNA που πρόκειται να αντιγραφεί. Και οι δύο αλυσίδες του αποδιαταγμένου cDNA αντιγράφονται με τη χρήση ανάλογων εκκινητών. Για κάθε αντίδραση PCR επιλέγονται εκκινητές παρακείμενοι της περιοχής που πρόκειται να ενισχυθεί. Κάθε ζεύγος εκκινητών απαιτεί μία συγκεκριμένη θερμοκρασία (annealing T) για την επικόλληση τους στα συμπληρωματικά κομμάτια DNA. Η διαδικασία αυτή

επαναλαμβάνεται και κάθε νεοσυντιθέμενος κλώνος αποτελεί εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο ενίσχυσης. Το μείγμα της αντίδρασης θερμαίνεται ξανά για να αποχωριστούν παλιοί και νέοι κλώνοι του DNA και επαναλαμβάνεται ο κύκλος υβριδοποίησης των εκκινητών, σύνθεσης DNA και αποχωρισμού των κλώνων.

Εκτός από τους εκκινητές, το cDNA και την πολυμεράση απαραίτητα συστατικά για την εξέλιξη της αντίδρασης είναι ένα μίγμα νουκλεοτιδίων (dNTPs), ένα διάλυμα MgCl₂ και το διάλυμα PCR. Για κάθε δείγμα η αναλογία των παραπάνω έχει ως εξής:

2,5 μl 10x PCR BUFFER
1 μl MgCl₂
0,5 μl dNTP mix
x μl sense primer
x μl antisense primer
0,1 μl Platinum Taq Polymerase
x μl DEPC-treated water
1 μl cDNA (από την RT-αντίδραση)

Τα στάδια της αντίδρασης είναι τα εξής:

1. αποδιάταξη του cDNA στους 94 °C,
2. ψύξη του DNA για την επικόλληση των εκκινητών στα συμπληρωματικά κομμάτια DNA σε θερμοκρασία που είναι ειδική για κάθε ζευγάρι εκκινητών.
3. αντιγραφή της αλληλουχίας DNA που καθορίζεται από τους εκκινητές παρουσία ολιγονουκλεοτιδίων (dNTPs) και της πολυμεράσης στους 72°C.

Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται αρκετές φορές, έτσι ώστε να δημιουργηθούν πολλά αντίγραφα του γονιδίου.

Το προϊόν διαχωρίζεται και ταυτοποιείται μετά από *ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης*. Συγκεκριμένα, στα 25μl PCR προϊόντος προστίθενται 4μl διαλύματος φόρτωσης (πορτοκαλί της ακριδίνης 2% και γλυκερόλη 10% σε απιονισμένο νερό) και από αυτό φορτώνονται τα 12μl σε 3.5% πηκτή αγαρόζης στην οποία έχει προστεθεί βρωμιούχο αιθίδιο. Το βρωμιούχο αιθίδιο δεσμεύεται ανάμεσα στις αλυσίδες του DNA και το κάνει ανιχνεύσιμο σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η συσκευή συνδέεται με τροφοδοτικό, εφαρμόζεται σταθερή τάση (100V), και τα κομμάτια DNA διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους του DNA τμήματος γίνεται με τη βοήθεια δεικτών γνωστού μοριακού βάρους που τρέχουν παράλληλα με τα άγνωστα δείγματα.

12μl από το προϊόν της PCR αντίδρασης αναμειγνύεται με το διάλυμα φόρτωσης (προτοκαλί της ακριδίνης 2% και γλυκερόλη 10% σε απιονισμένο νερό) και φορτώνεται σε 2.5% πηκτή αγαρόζης στην οποία έχει προστεθεί βρωμιούχο αιθίδιο. Το βρωμιούχο αιθίδιο

δεσμεύεται και χρωματίζει το DNA, το οποίο ανιχνεύεται με συσκευή υπεριώδους φωτός. Η συσκευή συνδέεται με τροφοδοτικό, εφαρμόζεται σταθερή τάση και αφήνεται να διαχωριστεί το DNA. ο διαχωρισμός πραγματοποιείται ανάλογα με το μοριακό βάρος. Ο υπολογισμός του μοριακού βάρους των ενισχυμένων τμημάτων DNA είναι εφικτός με τη χρήση των δεικτών γνωστού μοριακού βάρους που τρέχουν παράλληλα με τα άγνωστα δείγματα.

Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για την ανίχνευση του mRNA των υποδοχέων των CRF πεπτιδίων, CRFR1a, 1b, CRFR2a, 2b και 2c (Florio et al., 2000) καθώς και για την ενίσχυση του γονιδίου της GAPDH ως γονίδιο αναφοράς.

CRFR1a

Sense 5'-GGCAGCTAGTGGTTCGGCC-3'

Antisense 5'-TCGCAGGCACCGGATGCTC-3'

CRFR1b

Sense 5'-GGCCAGGCTGCACCCATTG-3'

Antisense 5'-TCGCAGGCACCGGATGCTC-3'

CRFR2a

Sense 5'-ATGGACGCGGCACTGCTCCA-3'

Antisense 5'-CACGGCCTCTCCACGAGGG-3'

CRFR2b

Sense 5'-GGGGCTGGCCAGGGTGTGA-3'

Antisense 5'-CACGGCCTCTCCACGAGGG-3'

CRFR2c

Sense 5'-CTGTGCTCAAGCAATCTGCC-3'

Antisense 5'-CACGGCCTCTCCACGAGGG-3'

Οι συνθήκες των αντιδράσεων PCR είναι οι εξής:

CRFR1a, CRFR1b, CRFR2b και CRFR2c

5min 94°C, 45sec 94°C, **45sec 59°C**, 45sec 72°C, 45 κύκλοι, 5min 72°C

CRFR2a

5min 94°C, 45sec 94°C, **45sec 57°C**, 45sec 72°C, 45 κύκλοι, 5min 72°C

Μελέτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων με τη τεχνική του μεταβολισμού του MTT

Υλικά- Συσκευές

Πλάκες καλλιέργειας 96 οπών επίπεδης επιφάνειας

r/hCRF (Tocris)

rUCN1 (Sigma-Aldrich)

mUCN2 (Sigma-Aldrich)

Οξικό οξύ (CH₃COOH) (0,1%, 1% και 10%) (Merck, Germany)

MTT [3-(4,5 dimethylthiazol-2yl)- 2,5 diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma, USA)

Υδροχλώριο (HCl)

Ισοπροπανόλη

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)

Θρεπτικά

Φωτόμετρο ELISA

Διαλύματα

A. Διάλυμα MTT σε PBS (1x) (αποστειρωμένο) συγκέντρωσης 5 mg/ml. Το MTT διαλύεται και διηθείται ώστε να αποστειρωθεί.

B. Διάλυμα 0,04N HCl/ ισοπροπανόλης

Μέθοδος

Πρόκειται για μία μέθοδο η οποία βασίζεται στην ικανότητα των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων να μεταβολίζουν το άλας του τετραζολίου. Διάφορες αφυδρογονάσεις των μιτοχονδρίων μετατρέπουν το κίτρινο χρώμα του τετραζολίου σε μπλε κρυστάλλους οι οποίοι μετά τη διάλυσή τους δίνουν ένα μπλε-μωβ χρώμα το οποίο μπορεί να μετρηθεί σε ένα φωτόμετρο ELISA. Η συγκέντρωση των κρυστάλλων, και επομένως η ένταση του χρώματος, είναι ευθέως ανάλογη της μεταβολικής δραστηριότητας και συνεπώς του αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Έτσι, με τη τεχνική αυτή γίνεται προσδιορισμός του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων καθώς και της επίδρασης διαφόρων ουσιών σε αυτόν.

Για τη πραγματοποίηση των πειραμάτων τα κύτταρα στρώνονται στο κανονικό θρεπτικό (100μl/οπή) σε πλάκες καλλιέργειας 96 οπών με επίπεδη επιφάνεια (15.000 κύτταρα/ οπή). Όταν περάσει το απαιτούμενο χρονικό διάστημα για τη καλή προσκόλληση των κυττάρων στη πλάκα (24 ώρες για τα MCF7 και MDA MB 231, 48 ώρες για τα LnCaP) αφαιρείται το θρεπτικό και προστίθενται 100μl θρεπτικού μέσου με τις επιδράσεις που θέλουμε να μελετήσουμε. Μετά από 24 ώρες προστίθενται σε κάθε οπή 11μl διαλύματος

MTT (5 mg/ml) (τελική συγκέντρωση 0,5 mg/ml). Οι πλάκες επανατοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο (37°C, 5% CO₂) για 3 ώρες. Κατά τη διάρκεια της επώασης σχηματίζονται μπλε κρύσταλλοι μονάχα στα ζωντανά κύτταρα. Μετά το τέλος της επώασης το υπερκείμενο αφαιρείται και προστίθενται 100μl διαλύματος HCl/ ισοπροπανόλης ανά οπή. Στη περίπτωση των LnCaP κυττάρων, επειδή δε προσκολλώνται πολύ καλά στη πλάκα, δε γίνεται αφαίρεση του υπερκείμενου. Η πλάκα παραμένει για περίπου 10 με 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια φωτομετρείται στα 620nm σε φωτόμετρο ELISA. Είναι πολύ σημαντικό να έχουν διαλυθεί τελείως οι κρύσταλλοι για να πάρουμε τις σωστές απορροφήσεις.

Ποσοτική εκτίμηση της απόπτωσης

ApoPercentage

Υλικά- Συσκευές

APOpercentage kit (Biocolor, UK)

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)

Φωτόμετρο ELISA

r/hCRF (Tocris)

rUCN1 (Sigma-Aldrich)

mUCN2 (Sigma-Aldrich)

Οξικό οξύ (CH₃COOH) (0,1%, 1% και 10%) (Merck, Germany)

Θρεπτικά

Μέθοδος

Η μέθοδος αυτή εκμεταλλεύεται τις αλλαγές που υφίσταται η μεμβράνη των αποπτωτικών κυττάρων. Η εξωτερική πλευρά της μεμβράνης των ζωντανών κυττάρων αποτελείται από φωσφολιπίδια φωσφατιδυλοχολίνης και σφιγγομυελίνης. Αντίθετα, η εσωτερική πλευρά αποτελείται από φωσφατιδυλοϊθανολαμίνη και φωσφατιδυλοσερίνη. Η εξασφάλιση αυτής της ασυμμετρίας εξαρτάται από την ομαλή λειτουργία ενός ενζύμου, της φλιπάσης. Στα αποπτωτικά κύτταρα η δράση αυτού του ενζύμου αναστέλλεται από το ένζυμο φλοπάση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης. Η μέτρηση της κυτταρικής απόπτωσης με τη μέθοδο αυτή βασίζεται στη προσθήκη μιας ειδικής χρωστικής που εισέρχεται εκλεκτικά στα κύτταρα που οδεύουν προς απόπτωση. Συγκεκριμένα, η χρωστική εισέρχεται στα κύτταρα στο σημείο της

απόπτωσης, όπου η φωσφατιδυλοσερίνη εξέρχεται στην κυτταρική μεμβράνη, και «παγιδεύεται» εντός των κυττάρων έως την πλήρη λύση τους. Καθώς το κύτταρο συρρικνώνεται, κατά την απόπτωση, η συγκέντρωση της χρωστικής αυξάνεται.

Για τη πραγματοποίηση των πειραμάτων τα κύτταρα στρώνονται στο κανονικό θρεπτικό (100μl/οπή) σε πλάκες καλλιέργειας 96 οπών με επίπεδη επιφάνεια (15.000 κύτταρα/ οπή). Όταν περάσει το απαιτούμενο χρονικό διάστημα για τη καλή προσκόλληση των κυττάρων στη πλάκα (24 ώρες για τα MCF7 και MDA MB 231, 48 ώρες για τα LnCaP) αφαιρείται το θρεπτικό και προστίθενται 100μl θρεπτικού μέσου με τις επιδράσεις που θέλουμε να μελετήσουμε. Μισή ώρα πριν τις 24 ώρες προστίθενται 5μl χρωστικής σε κάθε οπή. Η πλάκα επωάζεται για μισή με μία ώρα στον κλίβανο (37°C, 5% CO₂). Τα αποπτωτικά κύτταρα χρωματίζονται κόκκινα, ενώ τα ζωντανά κύτταρα παραμένουν λευκά. Τα κύτταρα ξεπλένονται κατόπιν με PBS δύο φορές και προστίθεται Dye Release Reagent (παρέχεται από το kit), το οποίο εκλύει την χρωστική από τα κύτταρα μετά από 10 λεπτά ανάδευσης. Το χρώμα μετράται σε φωτόμετρο ELISA σε μήκος κύματος 550nm (με μήκος κύματος αναφοράς τα 620nm).

Δοκιμή επούλωσης πληγής (wound healing assay ή scratch assay)

Υλικά- Συσκευές

Τρυβλία 60 mm (Sarstedt, USA)

Μικροσκόπιο (Leica)

Φωτογραφική κάμερα (Canon Powershot S70)

Μέθοδος

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία διαμέτρου 60 mm μέχρις ότου καλύψουν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου. Στη συνέχεια δημιουργείται μία εγκάρσια τομή (πληγή) στην επιφάνεια της μονοστιβάδας με τη βοήθεια ενός αποστειρωμένου κίτρινου τιπ, και η επούλωση της πληγής παρακολουθείται στη πάροδο του χρόνου. Η παρακολούθηση γίνεται με μικροσκόπιο Leica και φωτογραφίζεται με κάμερα Canon. Σε κάθε χρονική στιγμή φωτογραφήθηκε το ίδιο σημείο για κάθε δείγμα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος τριών αποστάσεων με τη βοήθεια του προγράμματος Image J. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν στατιστικά με τη βοήθεια του προγράμματος Statistica για τα Windows XP.

Κλασματοποίηση πρωτεϊνών με εκχύλιση των κυττάρων με: απομόνωση των διαλυτών και αδιάλυτων στο Triton-X-100 κλασμάτων

Υλικά- Συσκευές

Πλάκες 6 οπών

Εύστρες (Corning Costar)

Ψυχόμενη μικροφυγόκεντρος

Διαλύματα- Ουσίες

Διάλυμα εκχύλισης με Triton-X-100:

Για τη παρασκευή του διαλύματος αναμιγνύεται Triton-X-100 (0,3%) (Sigma, ΗΠΑ) με Tris Base (5mM) (Sharlau, Spain) και το pH ρυθμίζεται στο 7,4. Στη συνέχεια προστίθεται EGTA (2 mM) (Sigma, ΗΠΑ) και σουκρόζη (300 mM) (Sigma, USA). Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C και όταν γίνεται το πείραμα προστίθενται επιπλέον PMSF (400 mM) (Sigma, USA), λευπεπτίνη (10μM) (Sigma, USA) και φαλλοϊδίνη (2μM) (Sigma, USA).

Διάλυμα υπερχλωρικού οξέως (Perchloric acid, PCA) (Merck, Germany)

Διάλυμα NaOH 0,1 N

Μέθοδος

Η μέθοδος αυτή (91) χρησιμοποιείται για την απομόνωση των δύο κλασμάτων, του διαλυτού (που περιλαμβάνει τη μονομερή ακτίνη) και αδιάλυτου (που περιλαμβάνει τη πολυμερή ακτίνη) σε Triton-X-100.

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλάκες 6 οπών (600.000 κύτταρα/οπή) σε κανονικό θρεπτικό μέσο. Μετά τις επιθυμητές επιδράσεις με τους παράγοντες που θέλουμε να μελετήσουμε (3, 6, 12 και 24 ώρες ή 30', 1, 2 και 3 ώρες), απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα πλένονται δύο φορές με PBS. Ακολουθεί εκχύλιση των κυττάρων σε πάγο με 500μl διαλύματος εκχύλισης με Triton-X-100 για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, το διάλυμα εκχύλισης (διαλυτό στο Triton-X-100 πρωτεϊνικό κλάσμα) μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο όγκου 1,5 ml και οι η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών γίνεται με τη προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος PCA 6%. Το αδιάλυτο στο Triton-X-100 κλάσμα παραμένει στο τρυβλίο μετά την απομάκρυνση του διαλύματος εκχύλισης και λαμβάνεται με απόξεση με τη βοήθεια πλαστικού ξύστρου μέσα σε 1 ml διαλύματος PCA 3%. Τα δύο διαφορετικά κλάσματα φυγοκεντρώνται για 5 λεπτά στις 12.000 στροφές σε επιτραπέζια ψυχόμενη μικροφυγόκεντρο και τα ιζήματα που προκύπτουν επαναδιαλύονται σε 120 μl διαλύματος NaOH 0,1 N. Ίσοι όγκοι από κάθε κλάσμα χρησιμοποιούνται για ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση.

Ανοσοαποτύπωση (Western Blot)

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών από κυτταρικά εκχυλίσματα (και όχι μόνο) βάσει του μοριακού τους βάρους. Για το σκοπό αυτό οι πρωτεΐνες είναι απαραίτητο να αποκτήσουν ένα συγκεκριμένο φορτίο (αρνητικό) και να ηλεκτροφορηθούν σε μία πηκτή πολυακρυλαμιδίου (από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο). Αυτό επιτυγχάνεται με τη διάλυσή τους σε διάλυμα δωδεκακυκλοθειικού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας πρωτεΐνης και της προσδίδει ένα αρνητικό φορτίο, και σε μερκαπτοαιθανόλη ή διθειοτριόλη, που ανάγουν δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου είναι προτιμητέες για ηλεκτροφόρηση γιατί αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις και σχηματίζονται εύκολα. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεμβράνη επωάζεται με το ειδικό για την πρωτεΐνη που θέλουμε να ανιχνεύσουμε αντίσωμα, και η υβριδοποιημένη πρωτεΐνη, εάν υπάρχει, εντοπίζεται με σύστημα χημειοφωταύγειας ECL.

Συλλογή δειγμάτων

Υλικά- Συσκευές

Κυτταρική σειρά MCF7

Πλάκες καλλιέργειας 12 οπών

Μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου: SDS (Serva, Γερμανία)

Tris (Sharlau, Spain)

Φαινυλο-μεθυλ-σουλφονυλο φθορίδιο: PMSF (Sigma, USA)

Γλυκερόλη (Sigma, USA)

Διθειοθρεϊτόλη: DTT (Sigma, USA)

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)

Διαλύματα

Διάλυμα λύσης (υψηλής περιεκτικότητας σε SDS)

62.5 mM Tris και προστίθενται

2 % SDS και

10% γλυκερόλη

Ρυθμίζεται το pH διαλύματος στο 6.8 μόνο με το Tris. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

Πριν τη χρήση προστίθενται 10 µg/ml PMSF και 0,5 mM διθειοθρεϊτόλη (DTT)

Μέθοδος

Τα κύτταρα στρώνονται σε πλάκες 12 οπών (300.000-400.000 κύτταρα/οπή, 1ml θρεπτικού/οπή). Μετά τις επιθυμητές επιδράσεις με τους παράγοντες που θέλουμε να μελετήσουμε (3,6,12 και 24 ώρες), απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα πλένονται με PBS. Τα υπερκείμενα φυγοκεντρώνονται για 10 λεπτά στις 10.000 στροφές ανά λεπτό στους 4°C. Στη συνέχεια, τοποθετούνται σε καθαρά σωληνάρια όγκου 1,5 ml και μπορούν να φυλαχτούν στους -80°C για να χρησιμοποιηθούν για ανίχνευση κυτοκινών. Η πλάκα βρίσκεται συνεχώς σε πάγο και τα κύτταρα επωάζονται με 100 µl διαλύματος λύσης για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, μαζεύονται στα αντίστοιχα σωληνάρια όγκου 1,5 ml που απέμειναν μετά τη φυγοκέντρηση των υπερκείμενων (ώστε να μην υπάρχουν απώλειες) και φυλάσσονται στους -80°C. Για να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών πρέπει να προηγηθεί κατεργασία με υπερήχους για 2 δευτερόλεπτα σε πάγο ώστε να ολοκληρωθεί η λύση. Για την απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων, τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στις 12.000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά στους 4°C.

Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Διάλυμα

Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης 2x (Sample buffer 2x)

Tris.HCl (0,125M)

SDS 4% (w/v)

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

Γλυκερόλη 10% (w/v)

Κυανούν της βρωμοφανόλης 0,02% (w/v) (Sigma, USA)

(pH 6,8)

Αναμιγνύονται ίσοι όγκοι δείγματος και *sample buffer* (2x). Ακολουθεί βρασμός για 2 λεπτά και τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο για 3 λεπτά. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στις 10.000 στροφές ανά λεπτό για 1 λεπτό στους 4°C. Τα δείγματα επανατοποθετούνται στο πάγο μέχρι να φορτωθούν στη πηκτή ακρυλαμίδιου ή φυλάσσονται στους -20°C μέχρι την επομένη.

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS- PAGE)

Υλικά- συσκευές

Tris/HCl (Bio-Rad Labs, USA)

Χλωριούχο Νάτριο (NaCl) (Merk, Germany)

Γλυκίνη (Gibco, USA)

Υπερθειικό αμμώνιο (Ammonium PerSulfate, APS): $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Sigma, USA)

Ακρυλαμίδιο (Serva, Γερμανία)

Δισ-ακρυλαμίδιο: N,N-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο (Promega, USA)

Tween-20 (Merk Germany)

SDS (Bio-Rad Labs, USA)

TEMED (N,N,N,N τετρα-μεθυλενο αιθυλοδιαμίνη) (Serva, Germany)

Γλυκερόλη (Merk, Germany)

Ισοπροπανόλη

Πρωτεϊνικοί δείκτες γνωστού μοριακού βάρους (Biorad, USA)

Τροφοδοτικό (Hoefler, USA)

Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Amersham)

Διαλύματα

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

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

Διάλυμα ακρυλαμίδης 30%: Ακρυλαμίδιο 29.2% (w/v), Δισ-ακρυλαμίδιο 0.8% (w/v)

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10x (1λίτρο): Tris/HCl 30.3g, Γλυκίνη 144.2g, SDS 10g, pH 8.3

Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδιου:

Πήκτωμα διαχωρισμού 12% (30ml)

Διάλυμα ακρυλαμίδης 30% 12 ml

Διάλυμα διαχωρισμού 7.5 ml

Απεσταγμένο νερό 9.9 ml

APS 10% 300μl

TEMED 12μl

SDS 10% 300μl

Πήκτωμα επιστοιβαξης (10ml)

Διάλυμα ακρυλαμίδης 30% 1.7ml

Διάλυμα επιστοιβαξης 1.25 ml

Απιονισμένο νερό 6.8ml

APS 10% 100μl

TEMED 10μl

SDS 10% 100μl

Μέθοδος

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα διαχωρισμού και αφήνεται να πήξει στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Για να μην αφυδατωθεί προστίθεται στη επιφάνειά του ελάχιστη ποσότητα ισοπροπανόλης. Στη συνέχεια, και αφού αφαιρεθεί η ισοπροπανόλη, προστίθεται το διάλυμα επιστοιβαξης και αμέσως μετά (προτού πήξει) τοποθετείται το κατάλληλο 'χτένι' με τον αντίστοιχο αριθμό εσοχών όπου φορτώνονται τα δείγματα των πρωτεϊνών καθώς και ένας δείγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Marker), όταν έχει ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός της πολυακρυλαμίδης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου με εφαρμογή σταθερής τάσης 25Volt. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα εξαρτάται από το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης διότι το φορτίο/μονάδα μάζας είναι σταθερό. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων διαρκεί 1-2 ώρες.

Μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Υλικά και συσκευές

Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών (LKB, Bromma, Sweden)

Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Schleicher & Schuell)

Χαρτί Wattman 3MM (Amersham, USA)

Μεθανόλη, Tween-20 (Merk, Germany)

Διάλυμα

Διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών: 500ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης 10x προστίθενται σε 1lt μεθανόλης και ο όγκος ρυθμίζεται στα 5lt.

Όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτροφορητική διαδικασία η πηκτή πολυακρυλαμιδίου απομακρύνεται από την συσκευή. Διαχωρίζεται η πηκτή επιστοίβαξης και λαμβάνεται μόνο η πηκτή διαχωρισμού που εμπεριέχει τις πρωτεΐνες. Τοποθετείται στο διχτυωτό πλέγμα της συσκευής μεταφοράς πρωτεϊνών σε μορφή 'σάντουιτς' που αποτελείται από τα εξής : χαρτί wattman, πηκτή πολυακρυλαμιδίου, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ξανά χαρτί wattman. Όλα τα υλικά της κατασκευής διαβρέχονται πρώτα στο διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών. Το πλέγμα τοποθετείται στην συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών και εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο 0.8mA για 1.5 ώρα. Οι πρωτεΐνες στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπως αναφέρθηκε είναι αρνητικά φορτισμένες. Προς τον θετικό πόλο τοποθετείται η νιτροκυτταρίνη. Οι πρωτεΐνες λόγω του αρνητικού τους φορτίου μεταφέρονται από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Όταν τελειώσει η διαδικασία της μεταφοράς η μεμβράνη μπορεί να φυλαχτεί στους 4° C ή να επωαστεί με το κατάλληλο αντίσωμα για τον προσδιορισμό κάποιας πρωτεΐνης.

Ανοσοπροσδιορισμός πρωτεϊνών με υβριδοποίηση σε νιτροκυτταρίνη

Υλικά και συσκευές

Ξηρό γάλα (Regilait) χωρίς λιπαρά

Πρώτο αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης που θα μελετηθεί κάθε φορά

Δεύτερο αντίσωμα κατά του πειραματόζωου στο οποίο έχει αναπτυχθεί το πρώτο αντίσωμα

Συστημα χημειοφωταύγιας ECL (Amersham USA)

Φίλμ εμφάνισης υψηλής ευαισθησίας (Kodak)

Διαλύματα

Διαλύμα TBS-T (10x): Tris/HCl 20mM, NaCl 137mM, Tween-20 0.1% (pH 7.6)

Διάλυμα αφαίρεσης πρωτεϊνών (Stripping buffer): Tris/HCl 62.5mM, β-μερκαπτοαιθανόλη, 100mM SDS 2% (pH 6.7)

Αντισώματα

Cox-1, (Chemicon) σε αραιώση 1:500

Anti-β-tubulin (Sigma) σε αραιώση 1: 500

Actin (Chemicon) σε αραιώση 1:1000

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

Μέθοδος

Η μέθοδος της ανοσοανίχνευσης βασίζεται στη πρόσδεση ειδικού αντισώματος με τη πρωτεΐνη που θέλουμε να ανιχνεύσουμε και η οποία με τη τεχνική της αποτύπωσης βρίσκεται πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Αρχικά, η μεμβράνη επωάζεται με ξηρό γάλα 5% σε TBS-T για 1 ώρα σε RT (ή ο/η στους 4°C) για να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις. Η μεμβράνη επωάζεται στη συνέχεια με μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για κάθε πρωτεΐνη συνήθως μέχρι την επόμενη ημέρα στους 4°C υπό ανάδευση (οι συνθήκες διαφοροποιούνται ανάλογα με το αντίσωμα που χρησιμοποιείται). Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με TBS-T και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δεύτερα αντισώματα βρίσκονται πάντα διαλυμένα σε ξηρό γάλα 5% σε TBS-T. Η μεμβράνη εκπλένεται με TBS-T και επωάζεται τέλος με το σύστημα χημειοφωταύγιας ECL για 1 λεπτό. Ακολουθεί έκθεση στο φιλμ και εμφάνιση σε εμφανιστικό μηχάνημα. Η ένταση της κάθε ζώνης είναι ανάλογη της ποσότητας της συγκεκριμένης κάθε φορά πρωτεΐνης και μετράται με την χρήση του λογισμικού Tina Scan.

Σε πολλές περιπτώσεις είναι αναγκαίο να γίνει ανίχνευση περισσότερων από μία πρωτεϊνών στην ίδια νιτροκυτταρίνη. Αυτό γίνεται με επώαση της μεμβράνης για 30 λεπτά στους 50°C με το διάλυμα αφαίρεσης των συνδεδεμένων πρωτεϊνών (αντισωμάτων) (stripping). Ακολουθεί έκπλυση με TBS-T και επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας.

Ενζυμοσύνδετη Ανοσοπροσροφητική Μέτρηση (Enzyme Linked Immuno-Sorbent- Assay, ELISA)

Ο συγκεκριμένος τύπος ELISA (sandwich) προσδιορίζει τη ποσότητα της ουσίας που θέλουμε να ανιχνεύσουμε στο δείγμα με βάση την εξής αρχή:

Χρησιμοποιείται πλάκα 96 οπών επιστρωμένη με αντίσωμα ειδικό για την προς ανίχνευση ουσία (*human* VEGF ή TGF-β1). Στη συνέχεια, προστίθεται μέρος από το δείγμα μας και εάν υπάρχει το αντιγόνο, προσδένεται στο προσκολλημένο αντίσωμα. Ακολούθως προστίθεται το δεύτερο ειδικό για το αντιγόνο αντίσωμα και προσδένεται στο αντιγόνο. Είναι σημαντικό μετά από κάθε βήμα να πλένεται η πλάκα με διάλυμα πλύσης ώστε να απομακρύνεται η περίσσεια αντισώματος και να απελευθερώνονται οι μη ειδικές θέσεις. Σε αυτό το σύμπλοκο προστίθεται το ένζυμο υπεροξειδάση τη στρεπταβιδίνης και τέλος εισάγεται το υπόστρωμα του ενζύμου. Η αντίδραση αυτή επάγει τη παραγωγή χρώματος η ένταση του οποίου είναι απευθείας ανάλογη της συγκέντρωσης του αντιγόνου στο δείγμα μας. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ουσίας δημιουργείται μια καμπύλη standard από δείγματα του αντιγόνου προς ανίχνευση γνωστών συγκεντρώσεων (παρέχεται από το kit).

In vitro ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων του ανθρώπινου VEGF σε υπερκείμενα κυτταρικών καλλιιεργειών μετά από επίδραση με CRF

Υλικά- Συσκευές

Human VEGF immunoassay kit (BioSource International, Inc.)

Φωτόμετρο ELISA

In vitro ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων του TGF-β (*Transforming Growth Factor-beta*) σε υπερκείμενα κυτταρικών καλλιιεργειών μετά από επίδραση με CRF

Υλικά- Συσκευές

Multispecies TGF-β1 immunoassay kit (BioSource International, Inc.)

Φωτόμετρο ELISA

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικού διαλύματος

Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε κυτταρικό εκχύλισμα που περιέχει απορρυπαντικά χρησιμοποιείται το σύστημα DC Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Palo Alto, CA, USA), το οποίο βασίζεται σε τροποποίηση της μεθόδου Lowry et al., 1951 σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

Αρχικά παρασκευάζεται μίγμα A/S: σε 1ml αντιδραστηρίου A προστίθενται 20μl αντιδραστηρίου S. Στη συνέχεια προστίθενται 10μl δείγματος σε 190μl απεσταγμένου νερού (τελικός όγκος διαλύματος 200μl). Σε κάθε δείγμα προστίθενται 100μl διαλύματος A/S καθώς και 800μl αντιδραστηρίου B (αντιδραστήριο folin). Ακολουθεί ανάδευση και τα δείγματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων υπολογίζεται στα 750nm. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα δείγματα χρησιμοποιείται πρότυπη καμπύλη η οποία δημιουργείται με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων πρωτεΐνης BSA (Bovine Serum Albumin) τα οποία έχουν ετοιμαστεί όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Ανοσοφθορισμός με μικροσκοπία συνεστίασης (Confocal Laser Scanning Microscopy)

Υλικά και συσκευές

Καλυπτρίδες διαμερισματοποιημένες 8 θέσεων (Nunc, Denmark)

Ορός εμβρύου βοός: FBS (Foetal Bovine Serum) (Gibco-BRL Co, MD, USA)

Φορμαλδεΰδη (Lab- Scan, Ireland)

Ροδαμίνη- Φαλλοϊδίνη (Molecular Probes, Invitrogen)

Ακετόνη

PBS

Μικροσκόπιο συνεστίασης

Τα κύτταρα στρώνονται σε καλυπτρίδες διαμερισματοποιημένες 8 θέσεων (50.000 κύτταρα/ οπή) με το κανονικό θρεπτικό μέσο και παραμένουν στον επωαστικό κλίβανο για 24 ώρες. Στη συνέχεια, απομακρύνεται το θρεπτικό και προστίθεται αυτό που θέλουμε να μελετήσουμε τις επιδράσεις. Την επόμενη ημέρα γίνονται οι επιδράσεις (CRF πεπτίδιο και 1% οξικό οξύ ως control). Τα κύτταρα επώάζονται με το θρεπτικό με τις επιδράσεις για 0, 1, 3 και 6 ώρες. Μετά το πέρας του ανάλογου χρονικού διαστήματος, απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα ξεπλένονται 1 φορά με PBS 1x για 3 λεπτά. Προστίθενται 3,7% φορμαλδεΰδη (αραιωμένη σε PBS) για δέκα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να γίνει η μονιμοποίηση των κυττάρων. Στη συνέχεια, τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με PBS 1x για τρία λεπτά και προστίθεται ακετόνη, η οποία έπρεπε να βρίσκεται στους -20°C, για 4 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και χωρίς ανάδευση. Η ακετόνη αφαιρείται και μετά από τρία ξεπλύματα με PBS (τρία λεπτά κάθε ξέπλυμα) προστίθεται FCS 1,5% (αραιωμένο σε PBS). Μετά την απομάκρυνση του FCS σε κάθε οπή προστίθενται Ροδαμίνη-Φαλλοϊδίνη 1:100 αραιώση, αραιωμένη σε PBS/FCS 1,5% (100μl/ οπή). Οι καλυπτρίδες παραμένουν για 40 λεπτά σε θερμό, υγρό και **σκοτεινό** περιβάλλον. Στο τέλος ξεπλένουμε με PBS 1x (τρία λεπτά/ ξέπλυμα) και προστίθεται καλυπτρίδα αφού απομακρυνθούν πιθανές φυσαλίδες. Ακολουθεί παρατήρηση και φωτογράφιση σε μικροσκόπιο συνεστίασης.

Οι μετρήσεις των αποστάσεων στη δοκιμή επούλωσης πληγής (wound healing assay ή scratch assay) έγιναν με το πρόγραμμα Image J (<http://rsweb.nih.gov/ij/>) ενώ η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα STATISTIKA.

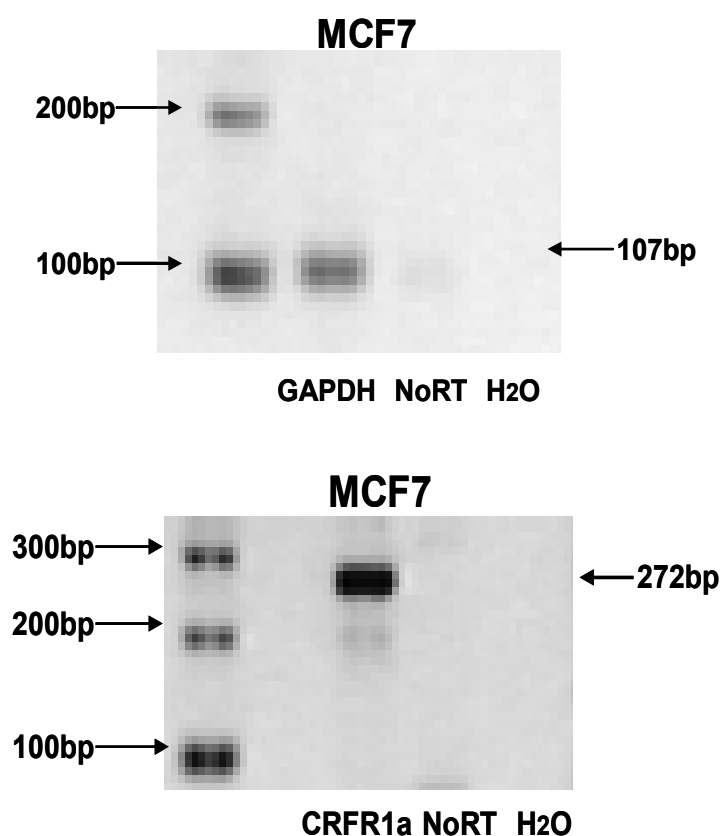
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πρωταρχικός σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η ανίχνευση των υποδοχέων CRFR1 και CRFR2 στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού (MCF7 και MDA MB 231) και του προστάτη (LnCaP και PC3). Στη συνέχεια μελετήθηκε ο ρόλος των CRF πεπτιδίων στο πολλαπλασιασμό, στην απόπτωση και στη κινητικότητα των κυττάρων αυτών.

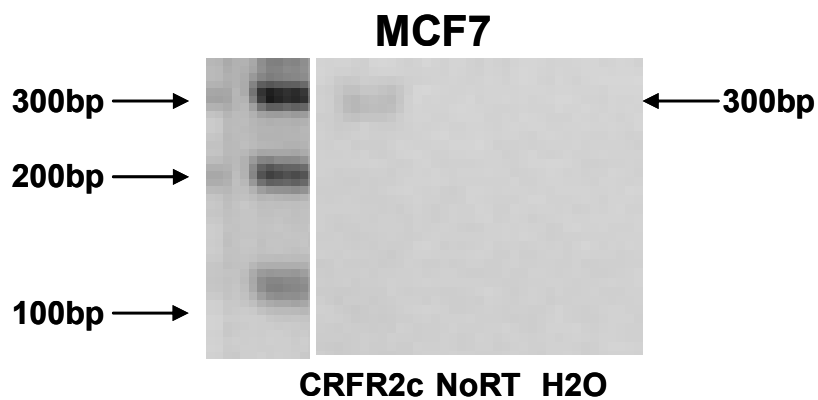
1. Προσδιορισμός του mRNA των CRFRs στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και του προστάτη

Αρχικός στόχος μας ήταν η ανίχνευση των υποδοχέων των CRF πεπτιδίων στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού (MCF7 και MDA MB 231) και προστάτη (LnCaP και PC3). Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε RNA από τις κυτταρικές σειρές και με τη μέθοδο της RT-PCR παρασκευάστηκαν τα cDNAs που στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για τη τεχνική της PCR.

Μετά από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των PCR αντιδράσεων σε πηκτή αγαρόζης προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα:

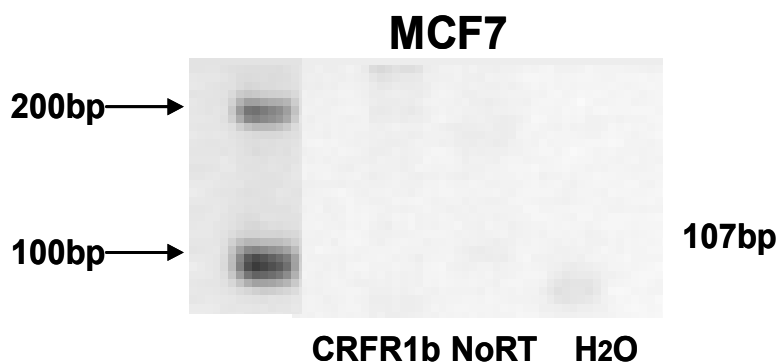


Σχήμα 1α. Επίπεδα του mRNA του CRFR1a στη κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού MCF7

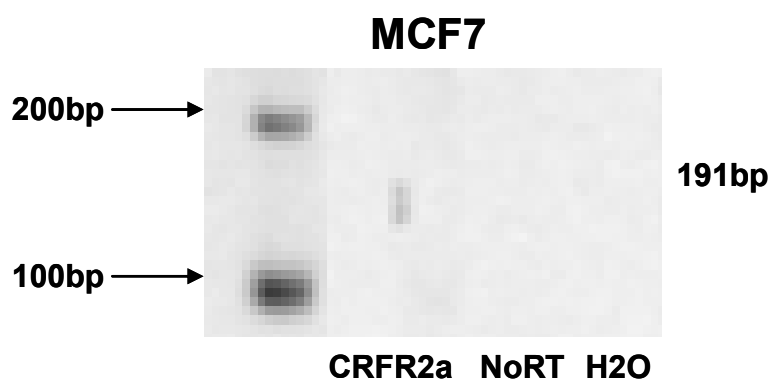


Σχήμα1β. Επίπεδα του mRNA του CRFR2c στη κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού MCF7

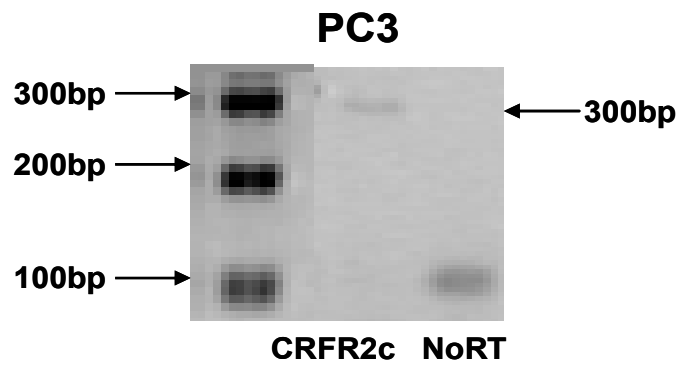
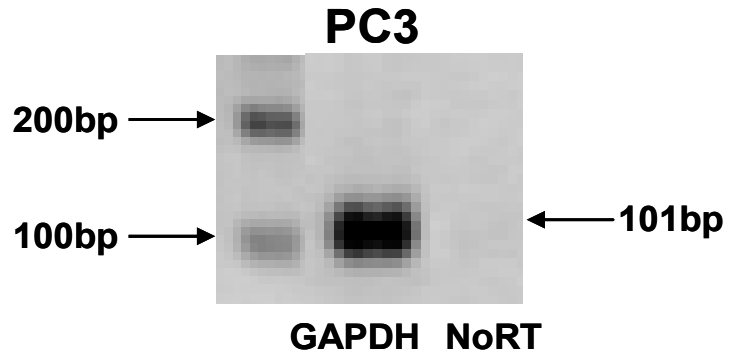
Σε αντίθεση με τα προηγούμενα αποτελέσματα, δε βρέθηκε έκφραση των mRNA των CRFR1b και CRFR2a (Σχήμα 1γ και 1δ αντίστοιχα)



Σχήμα 1γ



Σχήμα 1δ

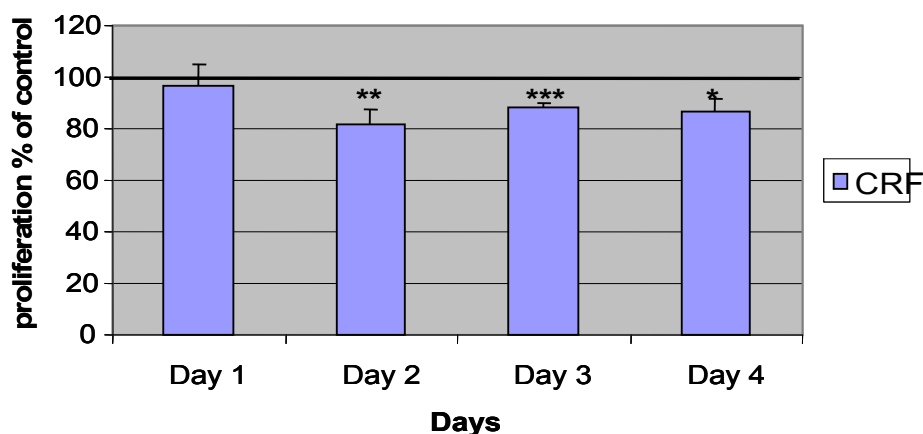


Σχήμα 1ε. Επίπεδα του mRNA του CRFR2c στη κυτταρική σειρά καρκίνου του προστάτη PC3.

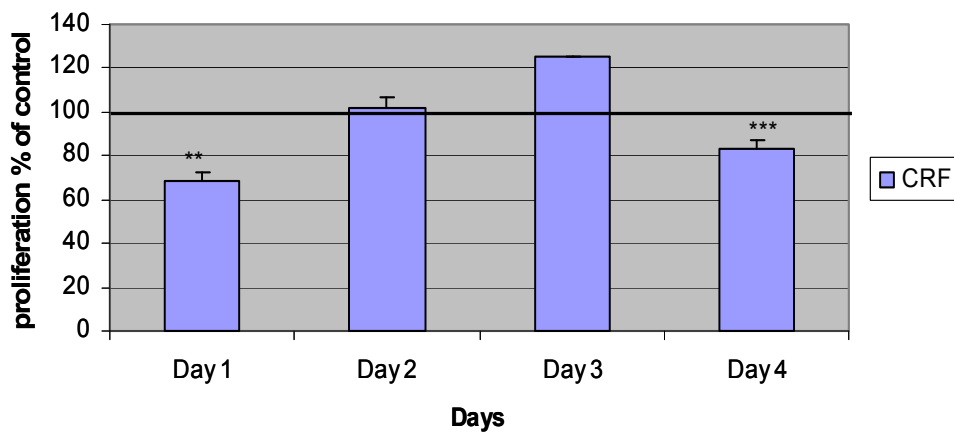
2. Επίδραση των εξωγενών πεπτιδίων CRF, UCNI και UCNIH στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού και του προστάτη

Στη συνέχεια θελήσαμε να δούμε την επίδραση των εξωγενών πεπτιδίων στο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Έτσι, με τη μέθοδο του MTT βρέθηκε πως τα CRF πεπτίδια επάγουν τη μείωση του πολλαπλασιασμού των LnCaP, MDA MB 231 και MCF7 καρκινικών κυττάρων στις διάφορες συνθήκες που μελετήθηκαν.

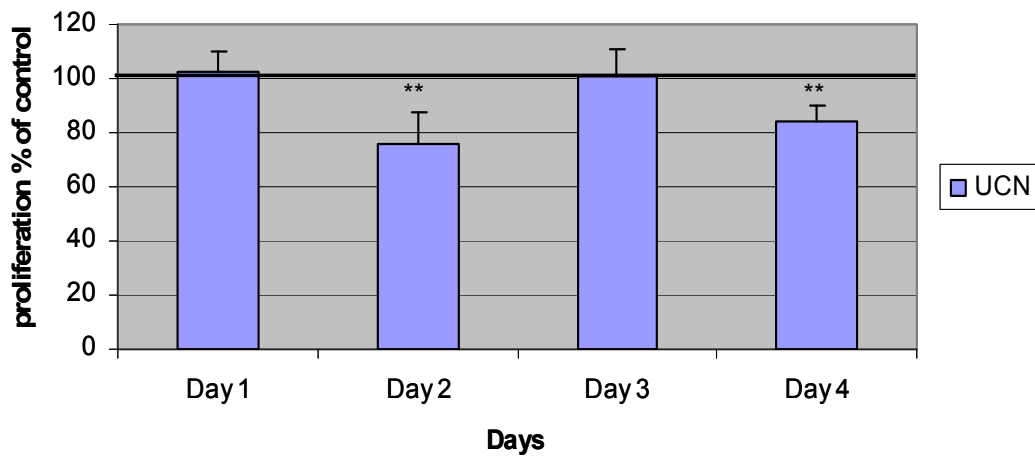
Κυτταρική σειρά καρκίνου του προστάτη LnCaP



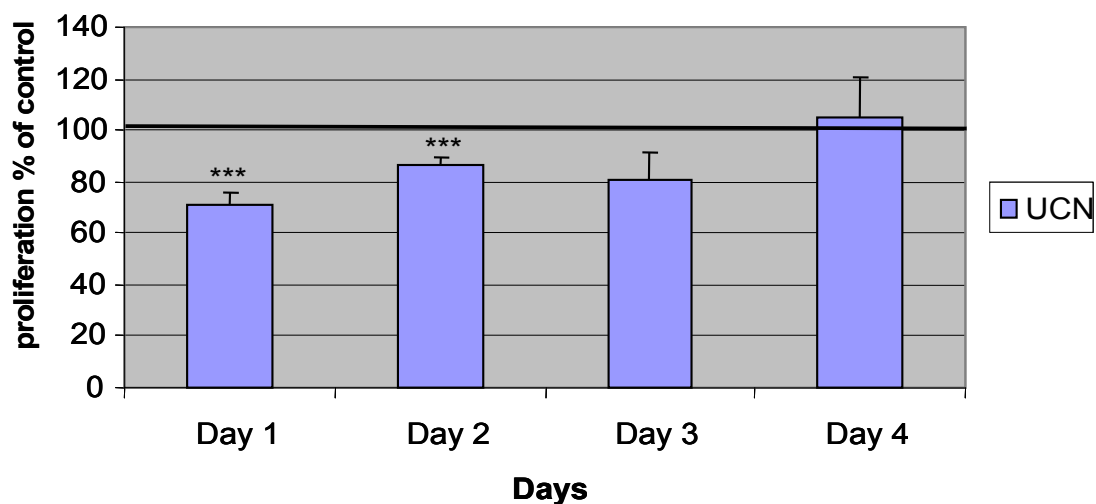
Σχήμα 2α. Ο CRF (10^{-8} M) επάγει τη μείωση του πολλαπλασιασμού των LnCaP παρουσία ορού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως επί της εκατό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αναφοράς (κύτταρα χωρίς επίδραση CRF πεπτιδίου αλλά επίδραση με μόνο το διαλυτικό μέσο του CRF, οξικό οξύ 1%). Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων όπου η κάθε επίδραση ελέγχθηκε σε τετραπλέτα. (* = στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα με πιθανότητα $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ και *** = $p < 0.001$ σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς)



Σχήμα 2β. Ο CRF ($10^{-8}M$) επάγει τη μείωση του πολλαπλασιασμού των LnCaP **απουσία** ορού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως επί της εκατό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αναφοράς (κύτταρα χωρίς επίδραση CRF πεπτιδίου, αλλά επίδραση με μόνο το διαλυτικό μέσο του CRF, οξικό οξύ 1%). Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων όπου η κάθε επίδραση ελέγχθηκε σε τετραπλέτα. (* = στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα με πιθανότητα $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ και *** = $p < 0.001$ σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς)

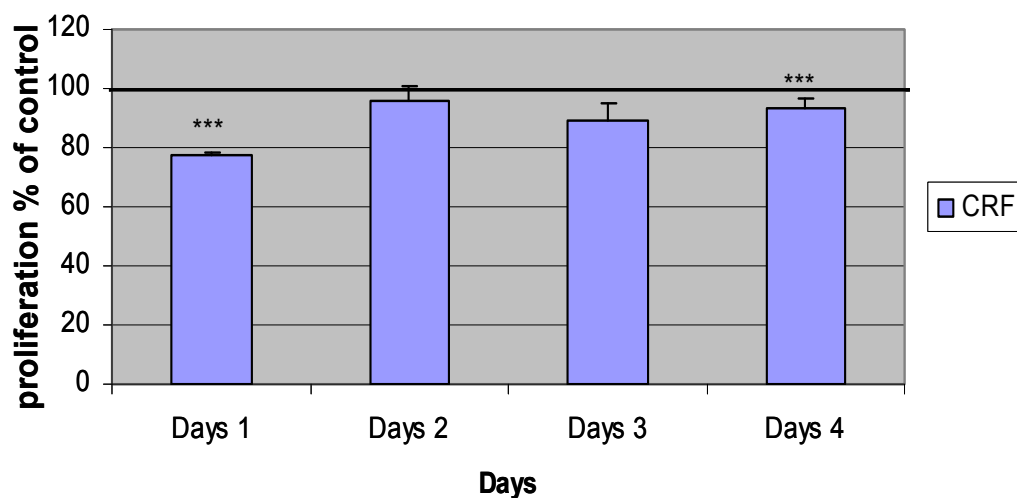


Σχήμα 2γ. Η UCN (10^{-8} M) επάγει τη μείωση του πολλαπλασιασμού των LnCaP παρουσία ορού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως επί της εκατό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αναφοράς (κύτταρα χωρίς επίδραση UCN πεπτιδίου, αλλά επίδραση με μόνο το διαλυτικό μέσο της UCN, οξικό οξύ 10%). Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων όπου η κάθε επίδραση ελέγχθηκε σε τετραπλέτα. (* = στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα με πιθανότητα $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ και *** = $p < 0.001$ σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς)

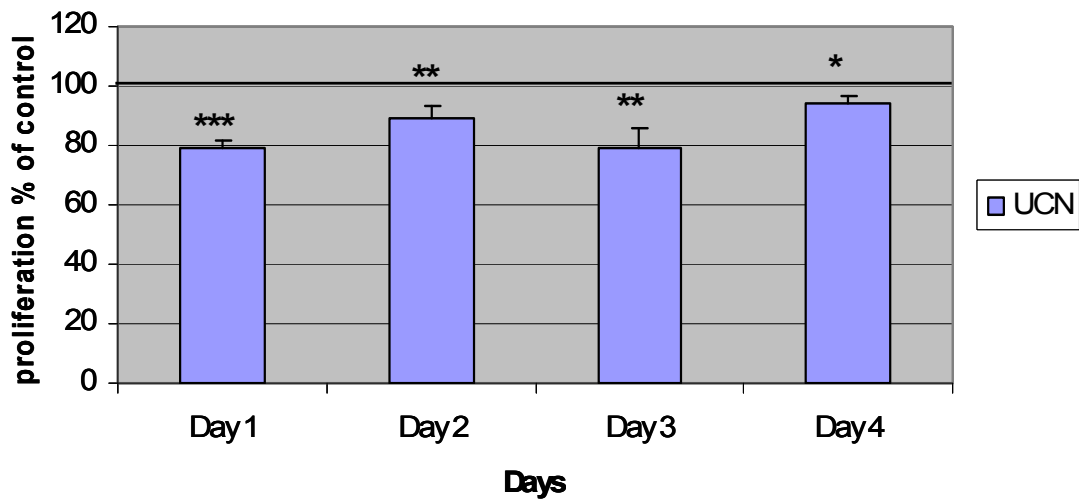


Σχήμα 2δ. Η UCN ($10^{-8}M$) επάγει τη μείωση του πολλαπλασιασμού των LnCaP **απουσία** ορού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως επί της εκατό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αναφοράς (κύτταρα χωρίς επίδραση UCN πεπτιδίου, αλλά επίδραση με μόνο το διαλυτικό μέσο της UCN, οξικό οξύ 10%). Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων όπου η κάθε επίδραση ελέγχθηκε σε τετραπλέτα. (* = στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα με πιθανότητα $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ και *** = $p < 0.001$ σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς)

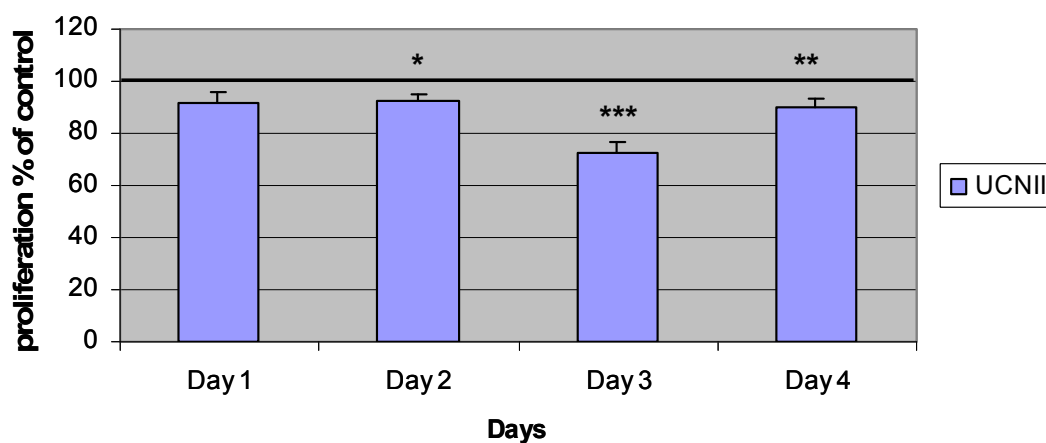
Κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού **MDA MB 231**



Σχήμα 2ε. Ο CRF ($10^{-8}M$) επάγει τη μείωση του πολλαπλασιασμού των **MDA MB 231** **απουσία** ορού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως επί της εκατό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αναφοράς (κύτταρα χωρίς επίδραση CRF πεπτιδίου, αλλά επίδραση με μόνο το διαλυτικό μέσο του CRF, οξικό οξύ 1%). Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων όπου η κάθε επίδραση ελέγχθηκε σε τετραπλέτα. (* = στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα με πιθανότητα $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ και *** = $p < 0.001$ σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς)

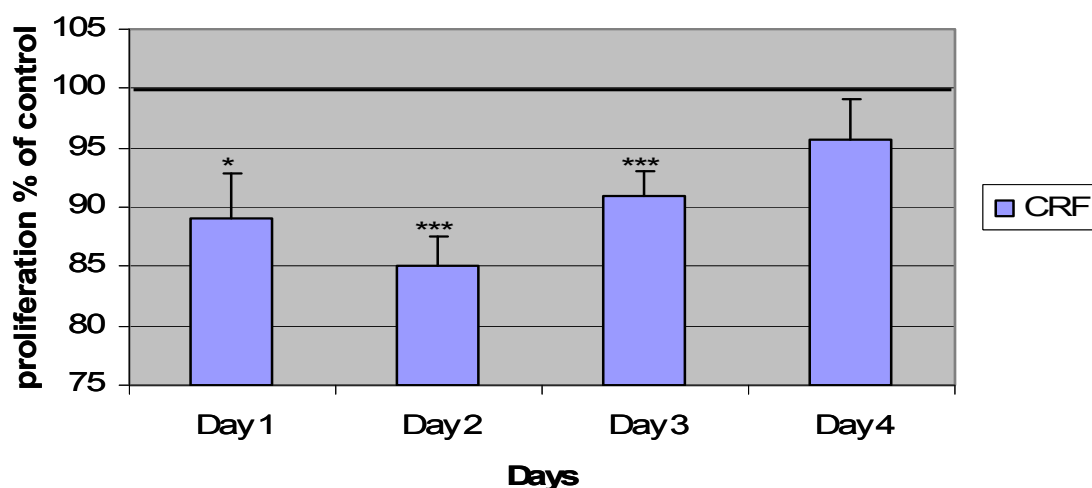


Σχήμα 2στ. Η UCN ($10^{-8}M$) επάγει τη μείωση του πολλαπλασιασμού των **MDA MB 231** **απουσία** ορού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως επί της εκατό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αναφοράς (κύτταρα χωρίς επίδραση UCN πεπτιδίου, αλλά επίδραση με μόνο το διαλυτικό μέσο της UCN, οξικό οξύ 10%). Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων όπου η κάθε επίδραση ελέγχθηκε σε τετραπλέτα. (* = στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα με πιθανότητα $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ και *** = $p < 0.001$ σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς)

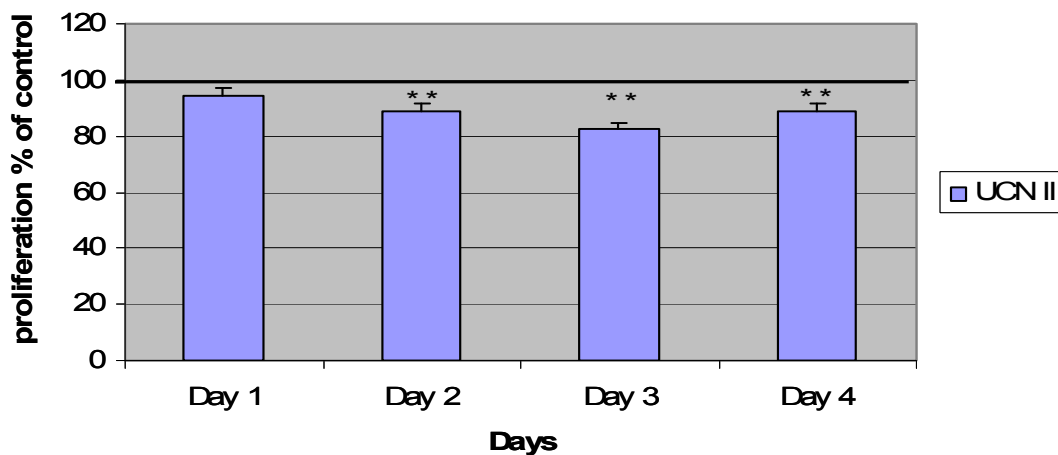


Σχήμα 2ζ. Η UCNII (10^{-8} M) επάγει τη μείωση του πολλαπλασιασμού των **MDA MB 231** **απουσία** ορού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως επί της εκατό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αναφοράς (κύτταρα χωρίς επίδραση UCNII πεπτιδίου, αλλά επίδραση με μόνο το διαλυτικό μέσο της UCN, οξικό οξύ 0,1%). Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων όπου η κάθε επίδραση ελέγχθηκε σε τετραπλέτα. (* = στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα με πιθανότητα $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ και *** = $p < 0.001$ σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς)

Κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού MCF7



Σχήμα 2η. CRF ($10^{-8}M$) επάγει τη μείωση του πολλαπλασιασμού των **MCF7 παρουσία** ορού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως επί της εκατό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αναφοράς (κύτταρα χωρίς επίδραση CRF πεπτιδίου, αλλά επίδραση με μόνο το διαλυτικό μέσο του CRF, οξικό οξύ 1%). Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων όπου η κάθε επίδραση ελέγχθηκε σε τετραπλέτα. (* = στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα με πιθανότητα $p<0.05$, ** = $p<0.01$ και *** = $p<0.001$ σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς).



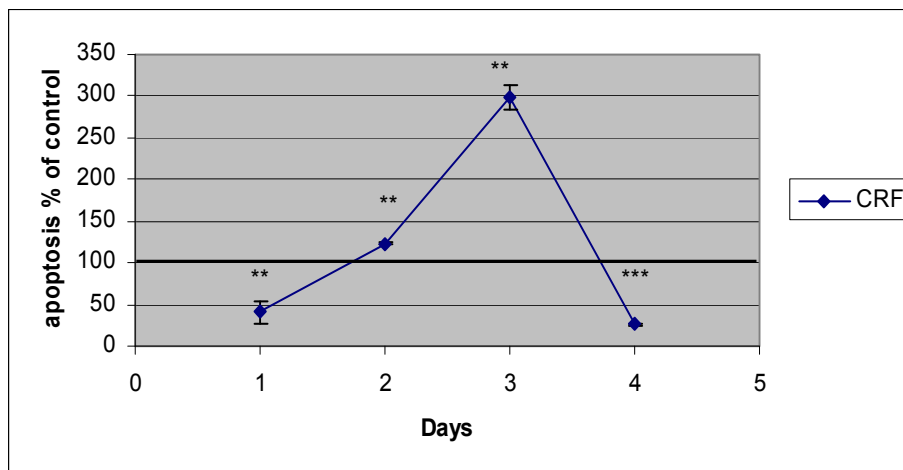
Σχήμα 2θ. Η UCNII (10^{-8} M) επάγει τη μείωση του πολλαπλασιασμού των **MCF7 παρουσία** ορού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως επί της εκατό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αναφοράς (κύτταρα χωρίς επίδραση UCNII πεπτιδίου, αλλά επίδραση με μόνο το διαλυτικό μέσο της UCNII, οξικό οξύ 0,1 %). Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων όπου η κάθε επίδραση ελέγχθηκε σε τετραπλέτα. (* = στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα με πιθανότητα $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ και *** = $p < 0.001$ σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς)

Αφού διαπιστώθηκε η έκφραση των υποδοχέων στις διάφορες κυτταρικές σειρές, θελήσαμε να δούμε τη πιθανή δράση των εξωγενών CRF πεπτιδίων μέσω των υποδοχέων τους στο πολλαπλασιασμό των LnCaP, MDA MB 231 και MCF7 καρκινικών κυττάρων. Όλα τα πεπτίδια χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 10^{-8} M.

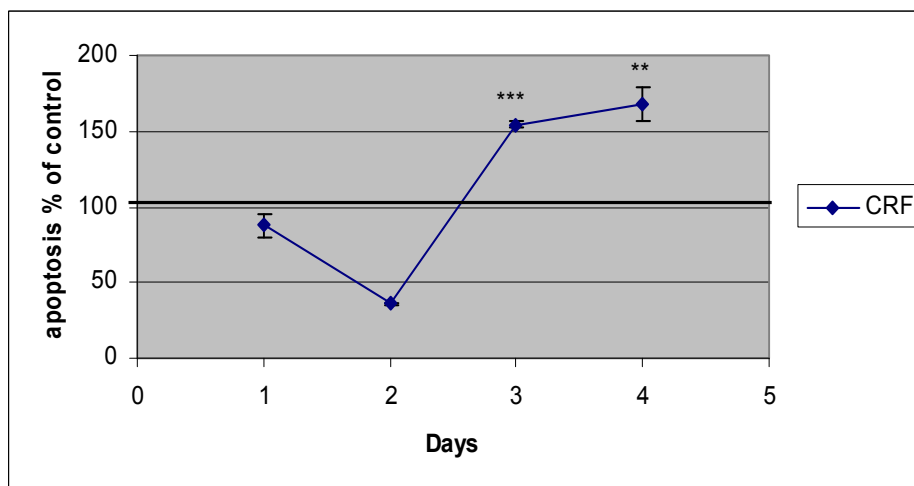
Έτσι, διαπιστώθηκε πως ο CRF και η UCN επάγουν τη μείωση του πολλαπλασιασμού των LnCaP κυττάρων τόσο σε συνθήκες παρουσίας ορού στο θρεπτικό (Σχήματα 2α και 2γ αντίστοιχα) όσο σε συνθήκες απουσίας (Σχήματα 2β και 2δ αντίστοιχα). Στα MDA MB 231 κύτταρα και τα τρία CRF πεπτίδια (CRF, UCN και UCNII, Σχήματα 2ε, 2στ και 2ζ αντίστοιχα) που μελετήθηκαν είχαν ως αποτέλεσμα τη μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε συνθήκες χωρίς ορό. Τέλος, στα MCF7 κύτταρα παρατηρήθηκε μείωση του πολλαπλασιασμού από τη δράση του CRF (Σχήμα 2η) και της UCNII (Σχήμα 2θ) σε συνθήκες παρουσίας ορού στο θρεπτικό μέσο. Επειδή η πιο έντονη δράση παρατηρήθηκε σε αυτή τη κυτταρική σειρά, τα υπόλοιπα πειράματα έγιναν στα MCF7 κύτταρα. Επίσης, στα κύτταρα αυτά εκφράζεται σε πολύ μεγάλο βαθμό ο CRFR1a γι' αυτό μελετήθηκε μονάχα η δράση του CRF σε συνθήκες με και χωρίς ορό.

3. Επίδραση του CRF πεπτιδίου στην απόπτωση των MCF7 κυττάρων

Στη συνέχεια θελήσαμε να δούμε εάν η μείωση του πολλαπλασιασμού των MCF7 κυττάρων από τη δράση του CRF σχετίζεται με την απόπτωση των κυττάρων αυτών. Έτσι, διαπιστώθηκε πως όντως ο CRF επάγει αυξημένη απόπτωση στα κύτταρα αυτά σε συνθήκες με (Σχήμα 3α) και χωρίς (Σχήμα 3β) ορό.



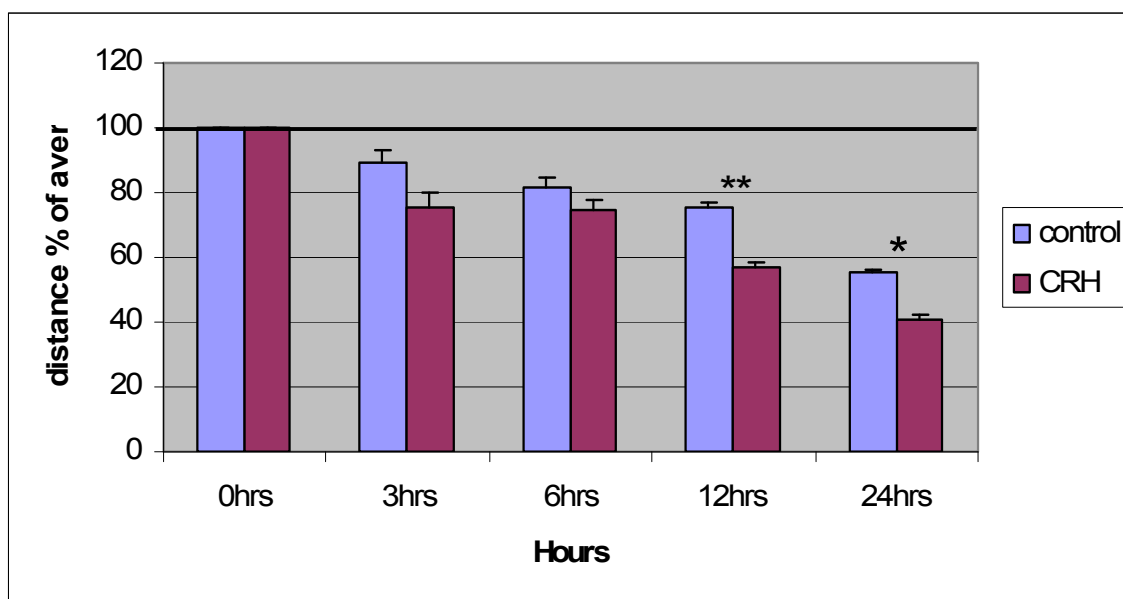
Σχήμα 3α. Ο CRF (10^{-8} M) επάγει την απόπτωση των MCF7 κυττάρων **παρουσία** ορού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως επί της εκατό της απόπτωσης των κυττάρων αναφοράς (κύτταρα χωρίς επίδραση CRF πεπτιδίου). (* = στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα με πιθανότητα $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ και *** = $p < 0.001$ σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς)



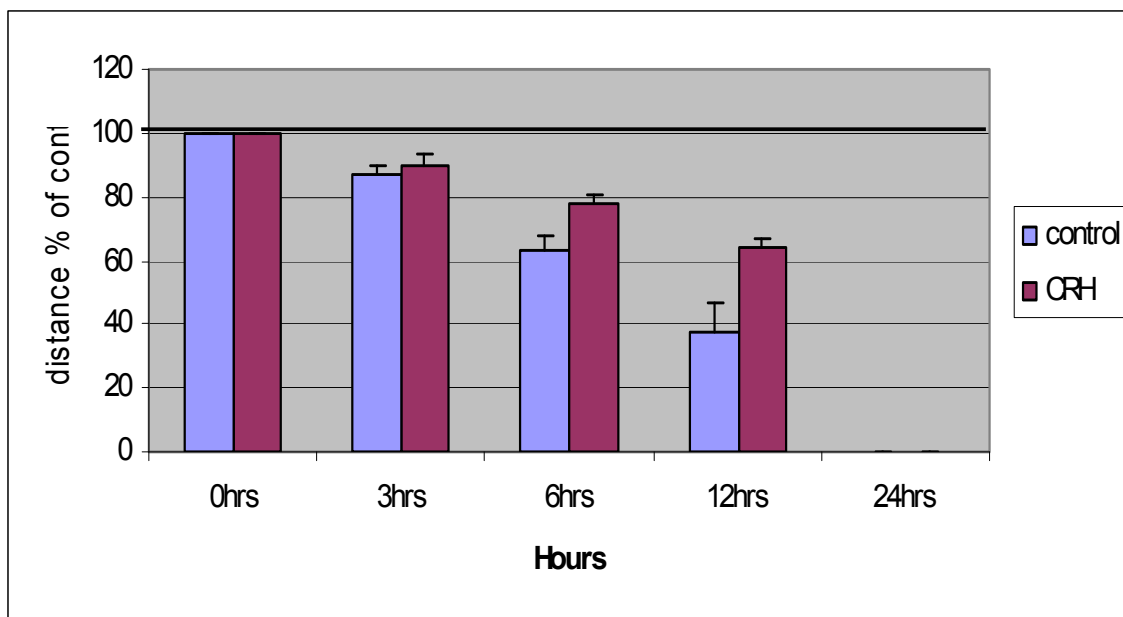
Σχήμα 3β. Ο CRF (10^{-8} M) επάγει την απόπτωση των MCF7 κυττάρων **απουσία** ορού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως επί της εκατό της απόπτωσης των κυττάρων αναφοράς (κύτταρα χωρίς επίδραση CRF πεπτιδίου). (* = στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα με πιθανότητα $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ και *** = $p < 0.001$ σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς)

4. Επίδραση του CRF στη κινητικότητα των MCF7 κυττάρων παρουσία και απουσία ορού

Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά που αποκτούν τα καρκινικά κύτταρα είναι η αυξημένη ικανότητα κίνησης που τους βοηθάει να απομακρύνονται από το αρχικό τους περιβάλλον και να δημιουργούν μεταστάσεις σε άλλα σημεία του σώματος. Από τη βιβλιογραφία φαίνεται πως ο CRF μπορεί να επάγει μία μικρή, αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση της κινητικότητας των μονοπύρηνων κυττάρων απομονωμένων από το αίμα (57). Επίσης, έχει δειχθεί πως ο CRF δρα ως χημειοτακτικός παράγοντας που επάγει την αγγειογένεση και την ανάπτυξη επιθηλιακών όγκων στο δέρμα (58). Εδώ φαίνεται πως ο CRF επηρεάζει τη κινητικότητα των MCF7 ανάλογα με το μέσο που αναπτύσσονται. Έτσι, βλέπουμε πως απουσία ορού ο CRF επάγει τη κινητικότητα των κυττάρων (Σχήμα 4.1.α), ενώ παρουσία ορού τη μειώνει (σχήμα 4.1.β). Ωστόσο, η μείωση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική.



Σχήμα 4.1.α. **Επαγωγή της κινητικότητας των MCF7 κυττάρων από τον CRF ($10^{-8}M$) απουσία ορού.** Με ELISA είδαμε πως τα MCF7 κύτταρα δεν εκκρίνουν TGFβ, οπότε η επαγωγή της κινητικότητάς τους οφείλεται στη παρουσία του CRF. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως επί της εκατό της κινητικότητας των κυττάρων αναφοράς (κύτταρα χωρίς επίδραση CRF πεπτιδίου, αλλά επίδραση με μόνο το διαλυτικό μέσο του CRF, οξικό οξύ 1%). Σε κάθε χρονική στιγμή υπολογίστηκε ο μέσος όρος τριών αποστάσεων στο ίδιο σημείο. (* = στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα με πιθανότητα $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ και *** = $p < 0.001$ σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς)

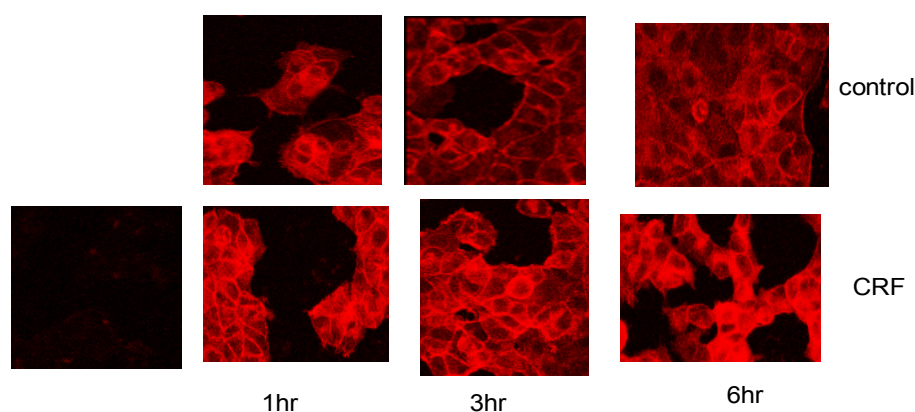


Σχήμα 4.1.β. **Μείωση της κινητικότητας** των MCF7 κυττάρων από τον CRF ($10^{-8}M$) **παρουσία** ορού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως επί της εκατό της κινητικότητας των κυττάρων αναφοράς (κύτταρα χωρίς επίδραση CRF πεπτιδίου, αλλά επίδραση με μόνο το διαλυτικό μέσο του CRF, οξικό οξύ 1%). Σε κάθε χρονική στιγμή υπολογίστηκε ο μέσος όρος τριών αποστάσεων στο ίδιο σημείο.

Για να μελετήσουμε περαιτέρω την επίδραση του CRF στη κινητικότητα των MCF7 κυττάρων, ερευνήθηκε η δράση του CRF στο κυτταροσκελετό. Αυτό έγινε με δύο τρόπους: με άμεσο ανοσοφθορισμό (4.2.α) και με διαχωρισμό της F και G ακτίνης του κυτταροσκελετού και με υπολογισμό του λόγου $G/(F+G)$ (4.2.β). Ανάλογα με το αποτέλεσμα του λόγου αυτού φαίνεται εάν υπάρχει πολυμερισμός ή αποπολυμερισμός της ακτίνης και άρα επίδραση του CRF στα κύτταρα αυτά.

(4.2.α) Ανοσοφθορισμός

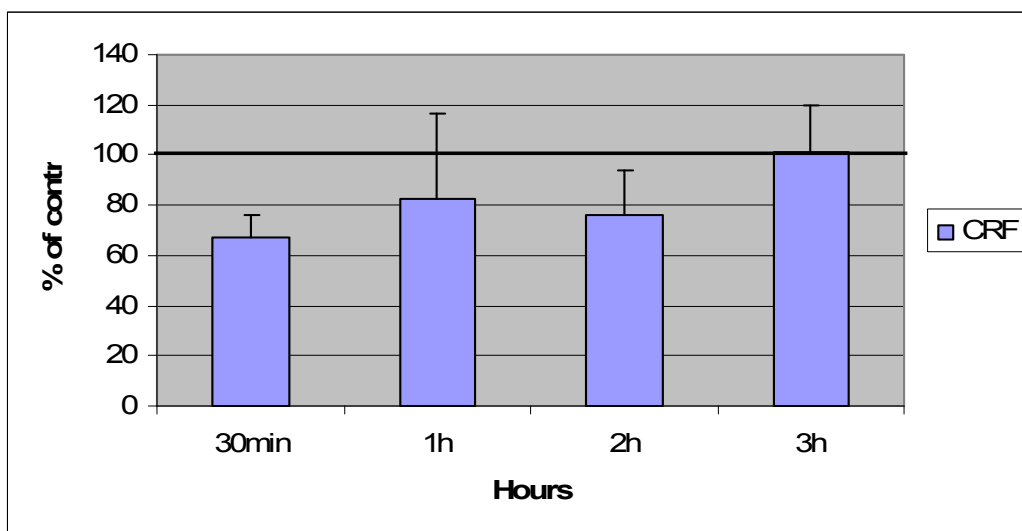
Χρώση με ροδαμίνη/φαλλοϊδίνη. Επίδραση CRF στα MCF7 παρουσία FBS



Εικόνα 4.2.α. Επίδραση του CRF ($10^{-8}M$) στα MCF7. Χρησιμοποιήθηκε ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη σε αραιώση 1:100.

Στη παραπάνω εικόνα (Εικόνα 4.2.α) φαίνεται πως ο CRF προκαλεί έναν πιο έντονο φθορισμό που δε περιορίζεται στη πλασματική μεμβράνη αλλά επεκτείνεται και στο κυτταρόπλασμα. Αυτό ίσως να σημαίνει πως αυξάνεται το ποσοστό της πολυμερισμένης F ακτίνης. Το αποτέλεσμα αυτό προκύπτει και από τα πειράματα του υπολογισμού του λόγου $G/(F+G)$. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 4.2.β, ο λόγος αυτός είναι μειωμένος στη μισή ώρα, στη μία και δύο ώρες. Η μείωση του λόγου σημαίνει πως μειώνεται το ποσοστό της G ακτίνης. Η G ακτίνη μπορεί να μειώνεται διότι πολυμερίζεται προς την F ακτίνη, χαρακτηριστικό κάποιων καρκινικών κυττάρων με μικρή μεταστατική ικανότητα που χρησιμοποιούν το πολυμερισμό αυτό για τη δημιουργία ψευδοποδίων και την διείσδυση αυτών στο γειτονικό ιστό, και τελικά για την αποτελεσματική μετάσταση των κυττάρων (70).

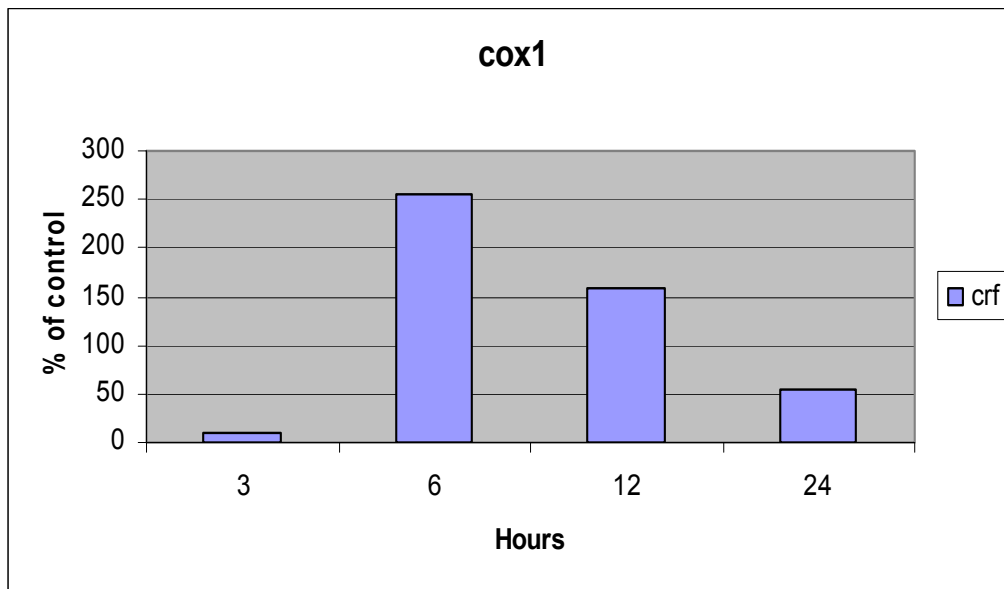
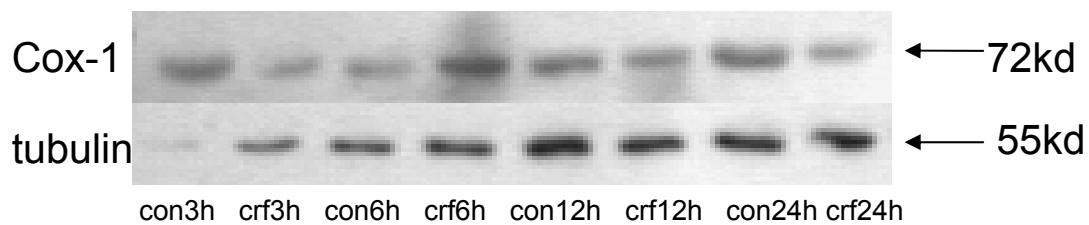
4.2.β. Μελέτη της επίδρασης του CRF στον κυτταροσκελετό με τη μέθοδο απομόνωσης των διαλυτών (G ακτίνη) και αδιάλυτων (F ακτίνη) στο Triton-X-100 κλασμάτων.



Εικόνα 4.2.β. Επίδραση του CRF στα κλάσματα της F και G ακτίνης. Ο CRF επάγει τον **πολυμερισμό** της ακτίνης. Τα κλάσματα της F και G ακτίνης χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης για την ανίχνευση της ακτίνης (αντίσωμα ακτίνης σε αραιώση 1:1000) και στη συνέχεια υπολογίστηκε ο λόγος $G/(F+G)$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως επί της εκατό του λόγου $G/(F+G)$ των κυττάρων αναφοράς (κύτταρα χωρίς επίδραση CRF πεπτιδίου, αλλά επίδραση με μόνο το διαλυτικό μέσο του CRF, οξικό οξύ 1%). Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο δύο ανεξάρτητων πειραμάτων όπου η κάθε επίδραση ελέγχθηκε από μία φορά. (* = στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα με πιθανότητα $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ και *** = $p < 0.001$ σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς)

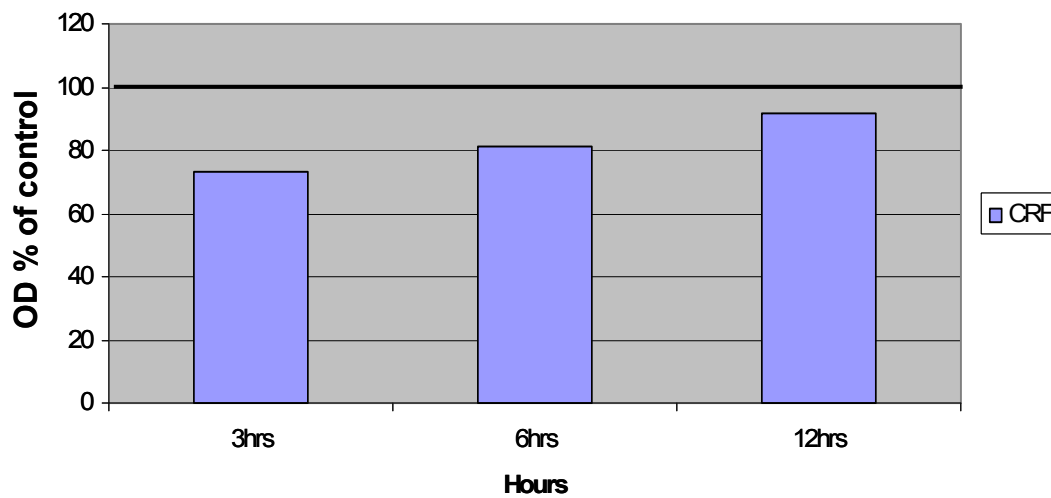
5. Επίδραση του CRF πεπτιδίου στην έκφραση της Cox-1 και στην έκκριση του VEGF

Είναι γνωστό πως τόσο η Cox-1 όσο η Cox-2 εκφράζονται σε καρκίνους του μαστού. Η έκφρασή τους, και κατά συνέπεια η παραγωγή προσταγλανδινών, συνδέεται με την ικανότητα άμεσης μετακίνησης των καρκινικών κυττάρων, αλλά και με την ικανότητά τους να δημιουργούν μεταστάσεις μέσω της ενεργοποίησης της διαδικασίας της αγγειογένεσης (74). Ένας από τους σημαντικότερους προ-αγγειογενετικούς παράγοντες είναι και ο VEGF, η έκφραση του οποίου επάγεται από τις κυκλοοξυγενάσες. Όπως φαίνεται στην εικόνα 5.α. ο CRF επάγει την έκφραση της Cox-1 στις 6 ώρες.



Εικόνα 5.α. Επαγωγή της Cox-1 από τον CRF στις 6 ώρες επίδρασης. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα Cox-1 και τουμπουλίνης σε αραιώση 1:500.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω ο CRF φαίνεται να μειώνει την έκκριση του VEGF (Εικόνα 5.β.)



Εικόνα 5.β. Ο CRF αναστέλλει την έκκριση του VEGF από τα MCF7 κύτταρα. Για το προσδιορισμό της έκκρισης του VEGF χρησιμοποιήθηκε *Human VEGF immunoassay kit* (BioSource International, Inc.). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως επί της εκατό της απορρόφησης των κυττάρων αναφοράς (κύτταρα που επώαστηκαν μονάχα με το διαλυτικό μέσο του CRF, οξικό οξύ 1%).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της δράσης των CRF πεπτιδίων στα καρκινικά κύτταρα και πιο συγκεκριμένα ο ρόλος των CRF πεπτιδίων στο πολλαπλασιασμό, στην απόπτωση και στη κινητικότητα των κυττάρων αυτών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού (MCF7 και MDA MB 231) και καρκίνου του προστάτη (LnCaP και PC3).

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τη πιο συνηθισμένη μορφή καρκίνου που παρατηρείται στις γυναίκες, προσβάλλοντας περίπου 1 στις 7 γυναίκες που φτάνουν την ηλικία των 90. Πρόκειται για τη δεύτερη στη σειρά θανατηφόρα μορφή καρκίνου, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα. Η κύρια θεραπεία του καρκίνου του μαστού είναι η χειρουργική αφαίρεση του όγκου, με πιθανή υποστήριξη με ορμονική θεραπεία με ή χωρίς ακτινοθεραπεία. *Ο καρκίνος του προστάτη* εμφανίζεται κυρίως στους άνδρες άνω των 50 ετών. Αποτελεί τον δεύτερο στη σειρά πιο συνηθισμένο τύπο καρκίνου στους άνδρες στις ΗΠΑ, μετά από τον καρκίνο του πνεύμονα. Μπορεί να θεραπευτεί με χειρουργική επέμβαση, ακτινοθεραπεία, ορμονική θεραπεία, συχνά με χημειοθεραπεία, ή με κάποιο συνδυασμό των παραπάνω. Σημαντικό ρόλο στη θεραπεία και των δύο τύπων καρκίνου παίζουν η ηλικία του ασθενή καθώς και η έκταση του όγκου.

Τα νευροπεπτίδια της οικογένειας του CRF ανήκουν στα νευροπεπτίδια του στρες, όπως έχουν χαρακτηριστεί λόγω του κυρίαρχου ρόλου που έχουν στην απόκριση του οργανισμού στο στρες. Ωστόσο, έχει δείχθει πως τα CRF πεπτίδια εκφράζονται σε και εκκρίνονται από καρκινικά κύτταρα και μέσω των υποδοχέων τους επάγουν διαδικασίες που επηρεάζουν τη φυσιολογία του όγκου. Για παράδειγμα μία μελέτη έδειξε την έκφραση του CRF στο 30% των δειγμάτων βιοψίας καρκίνου του μαστού (31), ενώ σε καρκίνους του προστάτη έχει εντοπιστεί η έκφραση της UCN (38). Μέσω των υποδοχέων τους, οι οποίοι εκφράζονται σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων, τα CRF πεπτίδια επηρεάζουν τις φυσιολογικές λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων χρησιμοποιώντας τα ίδια ή και διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Είναι σημαντικό πως οι δράσεις των CRF πεπτιδίων στις διάφορες λειτουργίες των κυττάρων εξαρτώνται από τον κυτταρικό τύπο καθώς και από το θρεπτικό μέσο στο οποίο αναπτύσσονται τα κύτταρα (5).

Στη συγκεκριμένη έρευνα μελετήθηκε ο ρόλος των CRF πεπτιδίων στο πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και τη κινητικότητα των κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού (MCF7 και MDA MB 231) και του προστάτη (LnCaP και PC3).

Αρχικά διαπιστώθηκε η έκφραση των CRF υποδοχέων σε αυτές τις κυτταρικές σειρές. Αυτό σημαίνει ότι τα CRF πεπτίδια που βρίσκονται στο μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων θα μπορούσαν δυνητικά να επηρεάσουν τον πολλαπλασιασμό τους, την απόπτωση ή την κινητικότητα/μεταστατικότητα τους. Πράγματι, βρέθηκε πως τα CRF πεπτίδια επάγουν τη μείωση του πολλαπλασιασμού των MCF7, MDA MB 231 και LnCaP κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε πως ο CRF και η UCN επάγουν τη μείωση του

πολλαπλασιασμού των LnCaP κυττάρων τόσο σε συνθήκες παρουσίας ορού στο θρεπτικό όσο σε συνθήκες απουσίας. Στα MDA MB 231 κύτταρα και τα τρία CRF πεπτίδια (CRF, UCN και UCNII) που μελετήθηκαν είχαν ως αποτέλεσμα τη μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε συνθήκες χωρίς ορό. Τέλος, στα MCF7 κύτταρα παρατηρήθηκε μείωση του πολλαπλασιασμού από τη δράση του CRF και της UCNII σε συνθήκες παρουσίας ορού στο θρεπτικό μέσο. Επειδή η πιο έντονη δράση παρατηρήθηκε στα MCF7, τα υπόλοιπα πειράματα έγιναν σε αυτή τη κυτταρική σειρά. Επίσης, στα κύτταρα αυτά εκφράζεται σε πολύ μεγάλο βαθμό ο CRFR1a γι' αυτό μελετήθηκε μονάχα η δράση του CRF σε συνθήκες με και χωρίς ορό. Αφού είδαμε μείωση του πολλαπλασιασμού των MCF7 κυττάρων από τη δράση του CRF, στη συνέχεια θελήσαμε να διαπιστώσουμε εάν αυτή η μείωση συνοδεύεται από αυξημένη απόπτωση των κυττάρων αυτών. Όντως, ο CRF επάγει την απόπτωση αυτών των κυττάρων σε συνθήκες με ή χωρίς τη παρουσία ορού στο θρεπτικό μέσο. Τα πειράματα έγιναν στα MCF7 κύτταρα τα οποία είναι μια κυτταρική σειρά χαμηλής μεταστατικότητας. Δεν είναι γνωστό ποιά θα ήταν η δράση του CRF σε κύτταρα υψηλής μεταστατικότητας. Σε έναν όγκο που αποτελείται από μικτό πληθυσμό κυττάρων είναι πιθανό ο CRF να εξαλείφει τα χαμηλής μεταστατικότητας κύτταρα χωρίς να επηρεάζει τα υψηλής και επομένως να ευοδώνει την εξέλιξη του καρκίνου.

Λίγα είναι σήμερα γνωστά για τη δράση του CRF στη κινητικότητα και μεταστατικότητα των καρκινικών κυττάρων. Σε μελέτη που έγινε σε μονοπύρρηνα κύτταρα απευθείας απομονωμένα από το αίμα ανθρώπων φάνηκε πως ο CRF επάγει μία μικρή, αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση της κινητικότητας των κυττάρων αυτών (57). Επίσης, έχει δειχθεί πως ο CRF επάγει την αγγειογένεση και την ανάπτυξη επιθηλιακών όγκων στο δέρμα (58). Πιο συγκεκριμένα, ο CRF σε αυτό το σύστημα δρα ως χημειοτακτικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων, ένα σημαντικό στάδιο της διαδικασίας της αγγειογένεσης. Από τα δικά μας αποτελέσματα προκύπτει πως ο CRF μπορεί να επάγει ή να μειώνει τη κινητικότητα των MCF7 κυττάρων ανάλογα με το μέσο στο οποίο αναπτύσσονται. Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να συνδυαστούν με τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού και του υπολογισμού του λόγου $G/(F+G)$. Γενικά, έχει βρεθεί πως η αναδιοργάνωση των μικροϊνιδίων της ακτίνης σχετίζεται με την ικανότητα που αποκτούν τα καρκινικά κύτταρα να πολλαπλασιάζονται άναρχα, να έχουν αυξημένη διεισδυτικότητα και να μεταναστεύουν δημιουργώντας μεταστάσεις. Αυτό που παρατηρείται στις διάφορες μορφές νεοπλασιών (λευχαιμίες, καρκίνους ενδομητρίου, μαστού, δέρματος) είναι ότι στα καρκινικά κύτταρα υπάρχει μείωση της ολικής και της F ακτίνης σε σχέση με τα φυσιολογικά (67-69) και μάλιστα η μεταβολή του όγκου σχετίζεται με το βαθμό διαφοροποίησης των νεοπλασματικών κυττάρων. Στο δικό μας σύστημα ο CRF προκαλεί έναν πιο έντονο ανοσοφθορισμό που δε περιορίζεται στη πλασματική μεμβράνη αλλά επεκτείνεται και στο κυτταρόπλασμα σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Αυτό ίσως να σημαίνει πως αυξάνεται το ποσοστό της πολυμερισμένης F ακτίνης.

Το αποτέλεσμα αυτό προκύπτει και από τα πειράματα του υπολογισμού του λόγου $G/(F+G)$. Ο λόγος αυτός μειώνεται στη μισή, μία και δύο ώρες. Η μείωση του λόγου σημαίνει πως μειώνεται το ποσοστό της G ακτίνης. Η G ακτίνη μπορεί να μειώνεται διότι πολυμερίζεται προς την F ακτίνη. Ο πολυμερισμός της ακτίνης αποτελεί χαρακτηριστικό κάποιων καρκινικών κυττάρων με μικρή μεταστατική ικανότητα που χρησιμοποιούν την F ακτίνη για τη δημιουργία ψευδοποδίων και την διείσδυση αυτών στο γειτονικό ιστό, και τελικά για την αποτελεσματική μετάσταση των κυττάρων (70).

Πέρα από τα παραπάνω, σήμερα έχει μελετηθεί αρκετά και ο ρόλος των κυκλοξυγενεασών στο καρκίνο. Είναι λοιπόν, γνωστό πως τόσο η έκφραση της Cox-1 (62, 73) όσο η έκφραση της Cox-2 (65, 73) είναι αυξημένες σε διάφορες περιπτώσεις καρκίνων. Επίσης, η έκφραση της Cox-2 είναι απαραίτητη για το πολλαπλασιασμό, τη κινητικότητα και την διεισδυτικότητα των κυττάρων καρκίνου του μαστού (72). Σημαντικό είναι πως τόσο η Cox-1 όσο η Cox-2 εκφράζονται σε καρκίνους του μαστού. Συγκεκριμένα η Cox-1 εκφράζεται από τα κύτταρα του στρώματος, ενώ η Cox-2 από τα καρκινικά (73). Η έκφρασή τους, και κατά συνέπεια η παραγωγή προσταγλανδινών, συνδέεται με την ικανότητα άμεσης μετακίνησης των καρκινικών κυττάρων, αλλά και με την ικανότητά τους να δημιουργούν μεταστάσεις μέσω της ενεργοποίησης της διαδικασίας της αγγειογένεσης (74). Για παράδειγμα σε μοντέλο μεταστατικού καρκίνου του μαστού σε επίμυ αναστολές των κυκλοξυγενεασών επιβραδύνουν την εξέλιξη του όγκου μέσω της καθυστέρησης της μετανάστευσης, της ικανότητας εισβολής και αγγειογένεσης (75). Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να συνδυαστούν με την επίδραση που έχει ο CRF στην έκφραση της Cox-1. Είδαμε πως ο CRF επάγει την έκφραση της Cox-1 στις έξι ώρες επίδρασης στα MCF7 και επιπλέον αναστέλλει την έκκριση του VEGF στα ίδια κύτταρα. Ο VEGF είναι ο πιο καλά χαρακτηρισμένος **προ-αγγειογενετικός παράγοντας**. Εκφράζεται σε πολλούς ανθρώπινους καρκίνους, όπως σε καρκίνους του μαστού, του εντέρου, του νεφρού, του γαστρεντερικού σωλήνα και άλλους(78, 79). Μία μελέτη έδειξε πως ο CRF οδηγεί σε μειωμένη έκφραση του VEGF από κύτταρα λείου μυός (Smooth Muscle Cells) μέσω του CRFR2 υποδοχέα του που εκφράζεται σε αυτά τα κύτταρα, ενώ ποντίκια knockout για το γονίδιο του CRFR2 χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά αυξημένο αγγειακό δίκτυο καθώς και από αυξημένα επίπεδα VEGF (92). Επομένως, αυτό που θα πρέπει να ερευνηθεί σε επόμενο στάδιο είναι ο μηχανισμός δράσης του CRF μέσω των Cox ενζύμων και η πιθανή επίδραση στην έκκριση του VEGF στα καρκινικά κύτταρα.

Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή έδειξε πως η παρουσία εξωγενών CRF πεπτιδίων στο περιβάλλον των MCF7, MDA MB 231 και LnCaP κυττάρων οδηγεί στη μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών, αφού πρώτα διαπιστώθηκε η έκφραση των CRF υποδοχέων στα κύτταρα αυτά. Επειδή η πιο έντονη δράση παρατηρήθηκε στα MCF7, τα

υπόλοιπα πειράματα έγιναν σε αυτή τη κυτταρική σειρά. Παρατηρήθηκε αύξηση της απόπτωσης αλλά και της κινητικότητας των κυττάρων αυτών συνοδευόμενη από αύξηση των επιπέδων της COX-1 υπό την επίδραση του CRF σε σύντομο χρόνο. Σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα παρατηρήθηκε μείωση της έκκρισης VEGF που συνοδευόταν από μείωση του πολλαπλασιασμού. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν μία σύνθετη, πλειοτροπική δράση του CRF στα καρκινικά κύτταρα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J** 1981 Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213:1394-7
2. **Petrusz P, Merchenthaler I, Maderdrut JL, Heitz PU** 1985 Central and peripheral distribution of corticotropin-releasing factor. *Fed Proc* 44:229-35
3. **Suda T, Tomori N, Tozawa F, Mouri T, Demura H, Shizume K** 1984 Distribution and characterization of immunoreactive corticotropin-releasing factor in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 59:861-6
4. **Aird F, Clevenger CV, Prystowsky MB, Redei E** 1993 Corticotropin-releasing factor mRNA in rat thymus and spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7104-8
5. **Slominski A, Zbytek B, Pisarchik A, Slominski RM, Zmijewski MA, Wortsman J** 2006 CRH functions as a growth factor/cytokine in the skin. *J Cell Physiol* 206:780-91
6. **Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C, et al.** 1995 Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 378:287-92
7. **Kageyama K, Bradbury MJ, Zhao L, Blount AL, Vale WW** 1999 Urocortin messenger ribonucleic acid: tissue distribution in the rat and regulation in thymus by lipopolysaccharide and glucocorticoids. *Endocrinology* 140:5651-8
8. **Slominski A, Wortsman J, Pisarchik A, Zbytek B, Linton EA, Mazurkiewicz JE, Wei ET** 2001 Cutaneous expression of corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin, and CRH receptors. *Faseb J* 15:1678-93
9. **Seres J, Bornstein SR, Seres P, Willenberg HS, Schulte KM, Scherbaum WA, Ehrhart-Bornstein M** 2004 Corticotropin-releasing hormone system in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 89:965-70
10. **Slominski A, Pisarchik A, Tobin DJ, Mazurkiewicz JE, Wortsman J** 2004 Differential expression of a cutaneous corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology* 145:941-50

11. **Chen A, Blount A, Vaughan J, Brar B, Vale W** 2004 Urocortin II gene is highly expressed in mouse skin and skeletal muscle tissues: localization, basal expression in corticotropin-releasing factor receptor (CRFR) 1- and CRFR2-null mice, and regulation by glucocorticoids. *Endocrinology* 145:2445-57
12. **Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, Kunitake KS, Vaughan J, Arias CA, Hogenesch JB, Gulyas J, Rivier J, Vale WW, Sawchenko PE** 2001 Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2843-8
13. **Suda T, Kageyama K, Sakihara S, Nigawara T** 2004 Physiological roles of urocortins, human homologues of fish urotensin I, and their receptors. *Peptides* 25:1689-701
14. **Saruta M, Takahashi K, Suzuki T, Fukuda T, Torii A, Sasano H** 2005 Urocortin 3/stresscopin in human colon: possible modulators of gastrointestinal function during stressful conditions. *Peptides* 26:1196-206
15. **Arai M, Assil IQ, Abou-Samra AB** 2001 Characterization of three corticotropin-releasing factor receptors in catfish: a novel third receptor is predominantly expressed in pituitary and urophysis. *Endocrinology* 142:446-54
16. **Hauger RL, Olivares-Reyes JA, Braun S, Catt KJ, Dautzenberg FM** 2003 Mediation of corticotropin releasing factor type 1 receptor phosphorylation and desensitization by protein kinase C: a possible role in stress adaptation. *J Pharmacol Exp Ther* 306:794-803
17. **Palchaudhuri MR, Wille S, Mevenkamp G, Spiess J, Fuchs E, Dautzenberg FM** 1998 Corticotropin-releasing factor receptor type 1 from *Tupaia belangeri*--cloning, functional expression and tissue distribution. *Eur J Biochem* 258:78-84
18. **Chatzaki E, Crowe PD, Wang L, Million M, Tache Y, Grigoriadis DE** 2004 CRF receptor type 1 and 2 expression and anatomical distribution in the rat colon. *J Neurochem* 90:309-16

19. **Heldwein KA, Duncan JE, Stenzel P, Rittenberg MB, Stenzel-Poore MP** 1997 Endotoxin regulates corticotropin-releasing hormone receptor 2 in heart and skeletal muscle. *Mol Cell Endocrinol* 131:167-72
20. **Asakura H, Zwain IH, Yen SS** 1997 Expression of genes encoding corticotropin-releasing factor (CRF), type 1 CRF receptor, and CRF-binding protein and localization of the gene products in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2720-5
21. **Lovenberg TW, Chalmers DT, Liu C, De Souza EB** 1995 CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology* 136:4139-42
22. **Perrin MH, Vale WW** 1999 Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann N Y Acad Sci* 885:312-28
23. **Kostich WA, Chen A, Sperle K, Largent BL** 1998 Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: the CRF2gamma receptor. *Mol Endocrinol* 12:1077-85
24. **Grammatopoulos DK, Randeve HS, Levine MA, Katsanou ES, Hillhouse EW** 2000 Urocortin, but not corticotropin-releasing hormone (CRH), activates the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in human pregnant myometrium: an effect mediated via R1alpha and R2beta CRH receptor subtypes and stimulation of Gq-proteins. *Mol Endocrinol* 14:2076-91
25. **Heldwein KA, Redick DL, Rittenberg MB, Claycomb WC, Stenzel-Poore MP** 1996 Corticotropin-releasing hormone receptor expression and functional coupling in neonatal cardiac myocytes and AT-1 cells. *Endocrinology* 137:3631-9
26. **Grammatopoulos DK, Randeve HS, Levine MA, Kanellopoulou KA, Hillhouse EW** 2001 Rat cerebral cortex corticotropin-releasing hormone receptors: evidence for receptor coupling to multiple G-proteins. *J Neurochem* 76:509-19
27. **Rivier J, Rivier C, Vale W** 1984 Synthetic competitive antagonists of corticotropin-releasing factor: effect on ACTH secretion in the rat. *Science* 224:889-91

28. **Miranda A, Koerber SC, Gulyas J, Lahrichi SL, Craig AG, Corrigan A, Hagler A, Rivier C, Vale W, Rivier J** 1994 Conformationally restricted competitive antagonists of human/rat corticotropin-releasing factor. *J Med Chem* 37:1450-9
29. **Rivier J, Gulyas J, Kirby D, Low W, Perrin MH, Kunitake K, DiGruccio M, Vaughan J, Reubi JC, Waser B, Koerber SC, Martinez V, Wang L, Tache Y, Vale W** 2002 Potent and long-acting corticotropin releasing factor (CRF) receptor 2 selective peptide competitive antagonists. *J Med Chem* 45:4737-47
30. **Ruhmann A, Bonk I, Lin CR, Rosenfeld MG, Spiess J** 1998 Structural requirements for peptidic antagonists of the corticotropin-releasing factor receptor (CRFR): development of CRFR2beta-selective antisauvagine-30. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15264-9
31. **Ciocca DR, Puy LA, Fasoli LC, Tello O, Aznar JC, Gago FE, Papa SI, Sonogo R** 1990 Corticotropin-releasing hormone, luteinizing hormone-releasing hormone, growth hormone-releasing hormone, and somatostatin-like immunoreactivities in biopsies from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 15:175-84
32. **Slominski A, Ermak G, Hwang J, Chakraborty A, Mazurkiewicz JE, Mihm M** 1995 Proopiomelanocortin, corticotropin releasing hormone and corticotropin releasing hormone receptor genes are expressed in human skin. *FEBS Lett* 374:113-6
33. **Slominski A** 1998 Identification of beta-endorphin, alpha-MSH and ACTH peptides in cultured human melanocytes, melanoma and squamous cell carcinoma cells by RP-HPLC. *Exp Dermatol* 7:213-6
34. **Sato H, Nagashima Y, Chrousos GP, Ichihashi M, Funasak Y** 2002 The expression of corticotropin-releasing hormone in melanoma. *Pigment Cell Res* 15:98-103
35. **Makrigiannakis A, Zoumakis E, Margioris AN, Theodoropoulos P, Stournaras C, Gravanis A** 1995 The corticotropin-releasing hormone (CRH) in normal and tumoral epithelial cells of human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 80:185-9

36. **Asa SL, Kovacs K, Vale W, Petrusz P, Vecsei P** 1987 Immunohistologic localization of corticotrophin-releasing hormone in human tumors. *Am J Clin Pathol* 87:327-33
37. **Sasaki A, Yumita S, Kimura S, Miura Y, Yoshinaga K** 1990 Immunoreactive corticotropin-releasing hormone, growth hormone-releasing hormone, somatostatin, and peptide histidine methionine are present in adrenal pheochromocytomas, but not in extra-adrenal pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 70:996-9
38. **Arcuri F, Cintorino M, Florio P, Floccari F, Pergola L, Romagnoli R, Petraglia F, Tosi P, Teresa Del Vecchio M** 2002 Expression of urocortin mRNA and peptide in the human prostate and in prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 52:167-72
39. **Reubi JC, Waser B, Vale W, Rivier J** 2003 Expression of CRF1 and CRF2 receptors in human cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3312-20
40. **Suda T, Tozawa F, Dobashi I, Horiba N, Ohmori N, Yamakado M, Yamada M, Demura H** 1993 Corticotropin-releasing hormone, proopiomelanocortin, and glucocorticoid receptor gene expression in adrenocorticotropin-producing tumors in vitro. *J Clin Invest* 92:2790-5
41. **Fukuda T, Takahashi K, Suzuki T, Saruta M, Watanabe M, Nakata T, Sasano H** 2005 Urocortin 1, urocortin 3/stresscopin, and corticotropin-releasing factor receptors in human adrenal and its disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4671-8
42. **Funasaka Y, Sato H, Ichihashi M** 1999 Expression of corticotropin releasing hormone in malignant melanoma. *Ann N Y Acad Sci* 885:391-3
43. **Olianas MC, Lampis G, Onali P** 1992 Human Y-79 retinoblastoma cells express functional corticotropin-releasing hormone receptors. *Brain Res* 593:304-6
44. **Hauger RL, Dautzenberg FM, Flaccus A, Liepold T, Spiess J** 1997 Regulation of corticotropin-releasing factor receptor function in human Y-79 retinoblastoma cells: rapid and reversible homologous desensitization but prolonged recovery. *J Neurochem* 68:2308-16
45. **Dieterich KD, DeSouza EB** 1996 Functional corticotropin-releasing factor receptors in human neuroblastoma cells. *Brain Res* 733:113-8

46. **Schoeffter P, Feuerbach D, Bobirnac I, Gazi L, Longato R** 1999 Functional, endogenously expressed corticotropin-releasing factor receptor type 1 (CRF1) and CRF1 receptor mRNA expression in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Fundam Clin Pharmacol* 13:484-9
47. **Dieterich KD, Grigoriadis DE, De Souza EB** 1994 Corticotropin-releasing factor receptors in human small cell lung carcinoma cells: radioligand binding, second messenger, and northern blot analysis data. *Endocrinology* 135:1551-8
48. **Graziani G, Ferrandina G, Pozzoli G, Vergati M, Muzi A, Legge F, Tentori L, Scambia G, Navarra P** 2006 Corticotropin-releasing hormone receptor-1 in human endometrial cancer. *Oncol Rep* 15:375-9
49. **Slominski AT, Roloff B, Zbytek B, Wei ET, Fechner K, Curry J, Wortsman J** 2000 Corticotropin releasing hormone and related peptides can act as bioregulatory factors in human keratinocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 36:211-6
50. **Graziani G, Tentori L, Portarena I, Barbarino M, Tringali G, Pozzoli G, Navarra P** 2002 CRH inhibits cell growth of human endometrial adenocarcinoma cells via CRH-receptor 1-mediated activation of cAMP-PKA pathway. *Endocrinology* 143:807-13
51. **Melzig MF** 1994 Corticotropin releasing factor inhibits proliferation of AtT-20 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 30A:741-3
52. **Dermitzaki E, Tsatsanis C, Gravanis A, Margioris AN** 2002 Corticotropin-releasing hormone induces Fas ligand production and apoptosis in PC12 cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277:12280-7
53. **Radulovic M, Hippel C, Spiess J** 2003 Corticotropin-releasing factor (CRF) rapidly suppresses apoptosis by acting upstream of the activation of caspases. *J Neurochem* 84:1074-85
54. **Tsatsanis C, Androulidaki A, Dermitzaki E, Charalampopoulos I, Spiess J, Gravanis A, Margioris AN** 2005 Urocortin 1 and Urocortin 2 induce macrophage apoptosis via CRFR2. *FEBS Lett* 579:4259-64

55. **Brar BK, Stephanou A, Okosi A, Lawrence KM, Knight RA, Marber MS, Latchman DS** 1999 CRH-like peptides protect cardiac myocytes from lethal ischaemic injury. *Mol Cell Endocrinol* 158:55-63
56. **Scarabelli TM, Pasini E, Stephanou A, Comini L, Curello S, Raddino R, Ferrari R, Knight R, Latchman DS** 2002 Urocortin promotes hemodynamic and bioenergetic recovery and improves cell survival in the isolated rat heart exposed to ischemia/reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 40:155-61
57. **Genedani S, Bernardi M, Baldini MG, Bertolini A** 1992 Influence of CRF and alpha-MSH on the migration of human monocytes in vitro. *Neuropeptides* 23:99-102
58. **Arbiser JL, Karalis K, Viswanathan A, Koike C, Anand-Apte B, Flynn E, Zetter B, Majzoub JA** 1999 Corticotropin-releasing hormone stimulates angiogenesis and epithelial tumor growth in the skin. *J Invest Dermatol* 113:838-42
59. **Perrin M, Donaldson C, Chen R, Blount A, Berggren T, Bilezikjian L, Sawchenko P, Vale W** 1995 Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2969-73
60. **Rouzer CA, Marnett LJ** 2003 Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases. *Chem Rev* 103:2239-304
61. **Mindrescu C, Le J, Wisniewski HG, Vilcek J** 2005 Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression by TSG-6 protein in macrophage cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 330:737-45
62. **Daikoku T, Tranguch S, Trofimova IN, Dinulescu DM, Jacks T, Nikitin AY, Connolly DC, Dey SK** 2006 Cyclooxygenase-1 is overexpressed in multiple genetically engineered mouse models of epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 66:2527-31
63. **Lampiasi N, Fodera D, D'Alessandro N, Cusimano A, Azzolina A, Tripodo C, Florena AM, Minervini MI, Notarbartolo M, Montalto G, Cervello M** 2006 The selective cyclooxygenase-1 inhibitor SC-560 suppresses cell proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Mol Med* 17:245-52

64. **Timoshenko AV, Chakraborty C, Wagner GF, Lala PK** 2006 COX-2-mediated stimulation of the lymphangiogenic factor VEGF-C in human breast cancer. *Br J Cancer* 94:1154-63
65. **Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA** 2002 Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 62:1676-81
66. **Ma X, Kundu N, Rifat S, Walser T, Fulton AM** 2006 Prostaglandin E receptor EP4 antagonism inhibits breast cancer metastasis. *Cancer Res* 66:2923-7
67. **Katsantonis J, Tosca A, Koukouritaki SB, Theodoropoulos PA, Gravanis A, Stournaras C** 1994 Differences in the G/total actin ratio and microfilament stability between normal and malignant human keratinocytes. *Cell Biochem Funct* 12:267-74
68. **Stournaras C, Stiakaki E, Koukouritaki SB, Theodoropoulos PA, Kalmanti M, Fostinis Y, Gravanis A** 1996 Altered actin polymerization dynamics in various malignant cell types: evidence for differential sensitivity to cytochalasin B. *Biochem Pharmacol* 52:1339-46
69. **Moustakas A, Stournaras C** 1999 Regulation of actin organisation by TGF-beta in H-ras-transformed fibroblasts. *J Cell Sci* 112 (Pt 8):1169-79
70. **Verschueren H, Van der Taelen I, Dewit J, De Braekeleer J, De Baetselier P** 1994 Metastatic competence of BW5147 T-lymphoma cell lines is correlated with in vitro invasiveness, motility and F-actin content. *J Leukoc Biol* 55:552-6
71. **Shimokawa-Kuroki R, Sadano H, Taniguchi S** 1994 A variant actin (beta m) reduces metastasis of mouse B16 melanoma. *Int J Cancer* 56:689-97
72. **Larkins TL, Nowell M, Singh S, Sanford GL** 2006 Inhibition of cyclooxygenase-2 decreases breast cancer cell motility, invasion and matrix metalloproteinase expression. *BMC Cancer* 6:181
73. **Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E** 1998 Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90:455-60

74. **Timoshenko AV, Xu G, Chakrabarti S, Lala PK, Chakraborty C** 2003 Role of prostaglandin E2 receptors in migration of murine and human breast cancer cells. *Exp Cell Res* 289:265-74
75. **Rozić JG, Chakraborty C, Lala PK** 2001 Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis. *Int J Cancer* 93:497-506
76. **Takaoka K, Kishimoto H, Segawa E, Hashitani S, Zushi Y, Noguchi K, Sakurai K, Urade M** 2006 Elevated cell migration, invasion and tumorigenicity in human KB carcinoma cells transfected with COX-2 cDNA. *Int J Oncol* 29:1095-101
77. **Konturek PC, Kania J, Burnat G, Hahn EG, Konturek SJ** 2005 Prostaglandins as mediators of COX-2 derived carcinogenesis in gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol* 56 Suppl 5:57-73
78. **Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR** 1993 Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 143:1255-62
79. **Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF** 1993 Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 53:4727-35
80. **Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH** 1998 Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med* 4:336-40
81. **Joo YE, Rew JS, Seo YH, Choi SK, Kim YJ, Park CS, Kim SJ** 2003 Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 37:28-33
82. **Xiong B, Sun TJ, Yuan HY, Hu MB, Hu WD, Cheng FL** 2003 Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 9:1237-40

83. **Lee JS, Choi YD, Lee JH, Nam JH, Choi C, Lee MC, Park CS, Juhng SW, Min KW** 2006 Expression of cyclooxygenase-2 in epithelial ovarian tumors and its relation to vascular endothelial growth factor and p53 expression. *Int J Gynecol Cancer* 16 Suppl 1:247-53
84. **Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, Lagioia M, Gendler SJ, Mukherjee P** 2004 Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis in breast cancer cells in an in vivo model of spontaneous metastatic breast cancer. *Mol Cancer Res* 2:632-42
85. **Ueno T, Chow LW, Toi M** 2006 Increases in circulating VEGF levels during COX-2 inhibitor treatment in breast cancer patients. *Biomed Pharmacother* 60:277-9
86. **Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW** 1979 Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17:16-23
87. **Yuan S, Trachtenberg J, Mills GB, Brown TJ, Xu F, Keating A** 1993 Androgen-induced inhibition of cell proliferation in an androgen-insensitive prostate cancer cell line (PC-3) transfected with a human androgen receptor complementary DNA. *Cancer Res* 53:1304-11
88. **Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP** 1983 LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 43:1809-18
89. **Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M** 1973 A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51:1409-16
90. **Toh Y, Pencil SD, Nicolson GL** 1995 Analysis of the complete sequence of the novel metastasis-associated candidate gene, mta1, differentially expressed in mammary adenocarcinoma and breast cancer cell lines. *Gene* 159:97-104
91. **Golenhofen N, Doctor RB, Bacallao R, Mandel LJ** 1995 Actin and villin compartmentation during ATP depletion and recovery in renal cultured cells. *Kidney Int* 48:1837-45
92. **Bale TL, Giordano FJ, Vale WW** 2003 A new role for corticotropin-releasing factor receptor-2: suppression of vascularization. *Trends Cardiovasc Med* 13:68-71

