



Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τμήμα Βιολογίας

Πτυχιακή εργασία

Θέμα: Διερεύνηση της έκφρασης και λειτουργικότητας του πυρηνικού CSF-1R σε ορμονοεξαρτώμενα και μη ορμονοεξαρτώμενα καρκινικά κύτταρα μαστού.

Αράπη Βασιλική

Εργαστήριο Βιοχημείας Τμήμα Ιατρικής

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ηράκλειο, 2012

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη Καθηγήτρια της πτυχιακής μου εργασίας, Κα Ευαγγελία Παπακωνσταντή (Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης), για την ευκαιρία που μου έδωσε και για όλη τη βοήθεια και τη συνεχή υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου.

Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στην Αικατερίνη Βεργετάκη και στη Νίκη Τζενάκη (μέλη του εργαστηρίου της κυρίας Παπακωνσταντή) για την βοήθεια που μου παρείχαν και τις πολύτιμες συμβουλές, ειδικά στα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου για όσα μου έχουν προσφέρει μέχρι τώρα και να αφιερώσω αυτή την εργασία σε αυτούς.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ/SUMMARY.....	4
1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ.....	5
1.2 MACROPHAGE COLONY STIMULATING FACTOR (CSF-1) ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	8
1.3 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	12
2-ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	13
2.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ: ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	13
2.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	13
ΥΛΙΚΑ	13
2.3 ΠΕΙΡΑΜΑ 1	15
<i>Διαχωρισμός κυτταροπλασματικών και πυρηνικών κλασμάτων από τα κύτταρα μετά από</i> <i>διέγερσή τους με CSF-1.....</i>	15
2.4 ΠΕΙΡΑΜΑ 2	19
<i>Διαχωρισμός κυτταροπλασματικών και πυρηνικών κλασμάτων από τα κύτταρα μετά από</i> <i>διέγερσή τους με οιστραδιόλη παρουσία ή απουσία ταμοξιφαίνης</i>	19
2.5 ΠΕΙΡΑΜΑ 3	20
<i>Πείραμα πολλαπλασιασμού.....</i>	20
2.6 WESTERN BLOT	22
<i>Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, σε συνθήκες SDS αποδιάταξης</i> <i>(SDS-PAGE).....</i>	22
<i>Μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης</i> <i>(Transfer).....</i>	25
<i>Υβριδοποίηση των πρωτεϊνών της νιτροκυτταρίνης και ανίχνευση τους με το σύστημα</i> <i>χημειοφωταγίας (ECL).....</i>	26
3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	30
3.1 ΔΙΕΥΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CSF-1R ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ CSF-1 (ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ 30 NG/ML) ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΑΣΤΟΥ.	30
3.2 ΔΙΕΥΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CSF-1R ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΑΣΤΟΥ.	35
3.3 ΠΕΙΡΑΜΑ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ	41
4-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	44
5-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	46

Περίληψη

Ο CSF-1 (Colony-stimulating factor-1) είναι ένας πολυλειτουργικός αυξητικός παράγοντας, του οποίου οι δράσεις πραγματοποιούνται μέσω του CSF-1 υποδοχέα (CSF-1R), έναν υποδοχέα κινάσης τυροσίνης που κωδικοποιείται από το *c-fms* πρωτο-ογκογονίδιο. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι ο CSF-1 και ο CSF-1R έχουν ρόλους όχι μόνο σε αιματοποιητικά συστήματα αλλά και σε καρκινικά. Πράγματι έχει τεκμηριωθεί μη φυσιολογική έκφραση του CSF-1R, με ή χωρίς CSF-1, σε ένα μεγάλο εύρος ανθρώπινων καρκινωμάτων και ανθρώπινων καρκινικών σειρών συμπεριλαμβανομένων όγκων επιθηλιακής προέλευσης, όπως καρκινώματα του μαστού, ωοθηκών, του τραχήλου, του ενδομητρίου, των πνευμόνων, των νεφρών, του πάγκρεας, και του προστάτη. Στην παρούσα εργασία, έγινε μια προσπάθεια να εξετασθεί η έκφραση και η λειτουργικότητα του πυρηνικού CSF-1R σε ορμονοεξαρτούμενους και ορμονο-ανεξάρτητους καρκίνους του μαστού με σκοπό τη καθιέρωση του ως ένα σημαντικό καρκινικό δείκτη και/ή έναν καινούργιο στόχο για την διάγνωση και την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα διερευνήθηκε η επίδραση της οιστραδιόλης, με απουσία ή παρουσία του CSF-1, στην έκφραση ή / και ενεργότητα των πυρηνικών CSF-1Rs. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδηλώνουν ότι ο πυρηνικός CSF-1R θα μπορούσε να είναι ένα σημαντικό μόριο που εμπλέκεται στην ανάπτυξη του καρκίνου καθώς και ένας δυνητικός στόχος τόσο σε ορμονοεξαρτούμενους όσο και σε ορμονοανεξάρτητους καρκίνους.

Summary

CSF-1 (Colony-stimulating factor-1) is a multifunctional growth factor whose effects are mediated by the CSF-1 receptor (CSF-1R), a receptor tyrosine kinase encoded by the *c-fms* proto-oncogene. Many studies have shown that CSF-1 and CSF-1R have roles not only in the hematopoietic system but also in systems correlating with cancer biology. Indeed, abnormal expression of CSF-1R, with or without CSF-1, has been documented in a wide variety of human carcinomas and carcinoma-derived cell lines, including tumors of epithelial origin such as carcinomas of breast, ovarian, cervical, endometrial, lung, kidney, pancreas, and prostate. In the current project an attempt was made to investigate the expression and functionality of the nuclear CSF-1R in hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines potentially establishing CSF-1R as a valuable tumor biomarker and/or a novel target for the diagnosis and treatment of cancer. More specifically the effect of estradiol in the absence or presence of CSF-1 was examined, on the expression and / or activity of nuclear CSF-1Rs. The results obtained suggest that the nuclear CSF-1R may be implicated in the development of cancer and that nuclear CSF-1R could potentially become a novel target for the diagnosis and treatment of cancer.

1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1Καρκίνος του μαστού και οιστρογόνα

Ο καρκίνος του μαστού είναι ένας από τους πιο συχνά εμφανιζόμενους καρκίνους στις γυναίκες (Lewis et al, 2009), αφού 1 στις 10 γυναίκες θα νοσήσει πριν την ηλικία των 80 χρόνων (Curado et al., 2007). Ο καρκίνος αυτός χαρακτηρίζεται από γενετικές αστάθειες που οδηγούν σε απώλεια εξάρτησης από ορμόνες, την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων και την αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Αυτές οι αλλαγές τελικά προκαλούν κυτταρικές σειρές που χαρακτηρίζονται από μετάσταση και διήθηση (Lee et al, 1999).

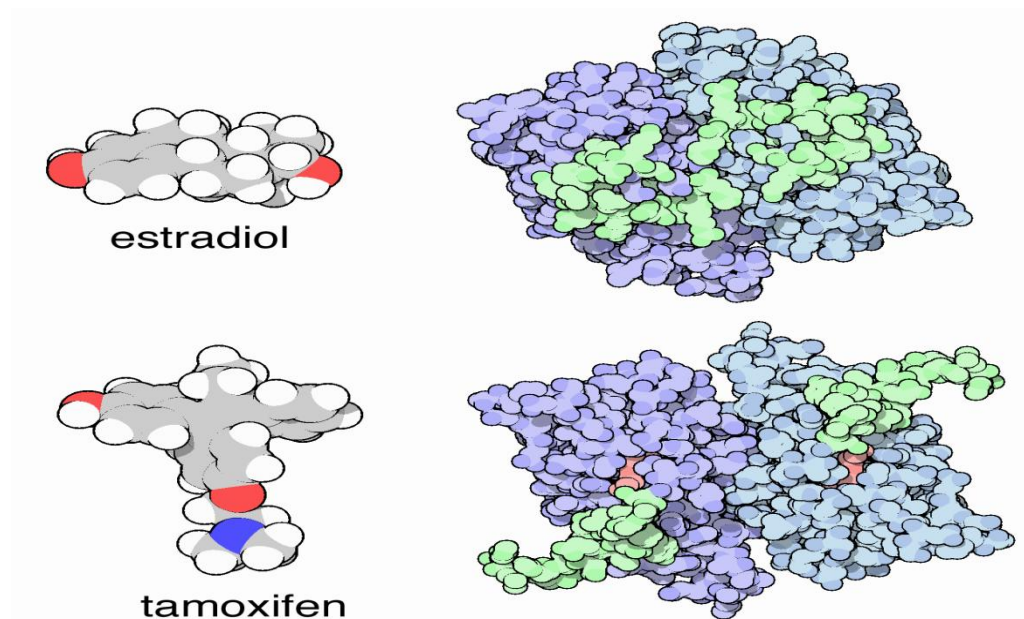
Ο καρκίνος του μαστού αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά ως οιστρογόνο-εξαρτώμενος το 1896, όταν ο George Beatson διαπίστωσε ότι η αφαίρεση των ωοθηκών σε προεμμηνοπαυσιακές ασθενείς ακολουθείται από ύφεση της νόσου. Ακολούθησαν ένα πλήθος εργαστηριακών και κλινικών μελετών οι οποίες απέδειξαν τον καθοριστικό ρόλο των οιστρογόνων στην ανάπτυξη αλλά και στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού (Lewis et al, 2009).

Γενικά τα οιστρογόνα βοηθούν την ανάπτυξη και αναστέλλουν την απόπτωση μέσω της πρόσδεσης στους υποδοχείς των οιστρογόνων σε πολλές κυτταρικές σειρές. Υπάρχουν όμως ενδείξεις ότι σε κάποιες περιπτώσεις όπως για παράδειγμα στον καρκίνο του μαστού τα οιστρογόνα επάγουν την απόπτωση (Lewis et al, 2009).

Τα οιστρογόνα ασκούν την δράση του μέσω δύο μελών από την οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων, τον υποδοχέα οιστρογόνων (estrogen receptor α) ER α και τον ER β (Heldring et al, 2007). Η παρουσία των υποδοχέων οιστρογόνων θεωρείται ένα βασικό χαρακτηριστικό της διαφοροποίησης επιθηλιακών κυττάρων (Godolphin et al 1981, Aamdal et al. 1984, Clarke et al 1990). Τα κύτταρα που εκφράζουν αυτούς τους υποδοχείς θεωρούνται καλά διαφοροποιημένα, ορμόνο (οιστρογόνα)-εξαρτώμενα και ευαίσθητα με αντι-οιστρογονική θεραπεία. Αντίθετα τα κύτταρα που δεν εκφράζουν οιστρογονικούς υποδοχείς είναι λίγο διαφοροποιημένα, ορμόνο-ανεξάρτητα και δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με οιστρογόνα (Platet et al, 2004).

Πάνω απο το 60% των περιπτώσεων που αφορούν τον καρκίνο του μαστού είναι ER-positive δηλαδή ορμόνο (οιστρογόνο) εξαρτώμενες από τους υποδοχείς των οιστρογόνων και περίπου το 1/3 των μεταστατικών καρκίνων αποκρίνονται σε ορμόνες (Dickson and Lippman, 1995).

Γενικά, τα μόρια όπως η οιστραδιόλη που δεσμεύονται σε έναν υποδοχέα και πυροδοτούν σηματοδοτικές πορείες ονομάζονται αγωνιστές. Άλλα μόρια τα οποία δεσμεύονται σε υποδοχείς πηληνικών ορμονών, αλλά δεν ενεργοποιούν αποτελεσματικά σηματοδοτικές πορείες ονομάζονται ανταγωνιστές. Ένα τέτοιο μόριο είναι η ταμοξιφαίνη και για αυτό τον λόγο χρησιμοποιείται στη θεραπεία κατά του καρκίνου του μαστού αφού ανταγωνίζεται και μπλοκάρει την δράση της οιστραδιόλης. Όμως η δράση της δεν είναι ακόμα απολύτως κατανοητή αφού τα αποτελέσματα που προκαλεί είναι σχετικά πολύπλοκα. Συγκεκριμένα κάποιες φορές η ταμοξιφαίνη δείχνει να έχει δραστηριότητα αγωνιστή. Στην **εικόνα 2** φαίνεται γιατί η πρόσδεση της ταμοξιφαίνης μπλοκάρει την δράση της οιστραδιόλης.



Εικόνα 2 : σύγκριση οιστραδιόλης και ταμοξιφαίνης.

Κανονικά η πάνω πρόσδεση είναι αυτή που θα προκαλέσει την σηματοδοτική πορεία και θα διεγείρει μια φυσιολογική ανάπτυξη αν και η προσδεδεμένη οιστραδιόλη δεν φαίνεται στην εικόνα γιατί είναι προσδεδεμένη κάτω από την λούπα που σχηματίζεται.

Όταν όμως προσδένεται η ταμοξιφαίνη αλλάζει το σχήμα της σηματοδοτικής λούπας στην επιφάνεια του υποδοχέα που όπως φαίνεται στην εικόνα είναι πράσινο. Στην περίπτωση αυτή ο βρόχος ενεργοποίησης βγαίνει έξω με αποτέλεσμα να μπλοκάρεται το σήμα και να αναστέλλεται η γονιδιακή έκφραση **(Ikeda et al, 2010)**.

Όπως προαναφέρθηκε, η δράση όμως της ταμοξιφαίνης δεν είναι πλήρως κατανοητή, αφού για παράδειγμα, το 30–40 % γυναικών με καρκίνο μαστού ER-positive θα αναπτύξουν μεταστάσεις και θα πεθάνουν παρά την θεραπεία με ταμοξιφαίνη **(Loi et al, 2008)**.

Πριν την ανακάλυψη της ταμοξιφαίνης, υψηλή δόση οιστρογόνων χρησιμοποιούταν για να επάγει την καταστολή ορμονο-ευαίσθητων όγκων σε μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Αν και οι μηχανισμοί που αυτό συνέβαινε δεν είναι σαφείς φαίνεται να εμπλέκεται στην διαδικασία το μονοπάτι Fas και το μιτοχονδριακό μονοπάτι **(Lewis et al, 2009)**.

1.2 Macrophage Colony Stimulating Factor (CSF-1) και καρκίνος

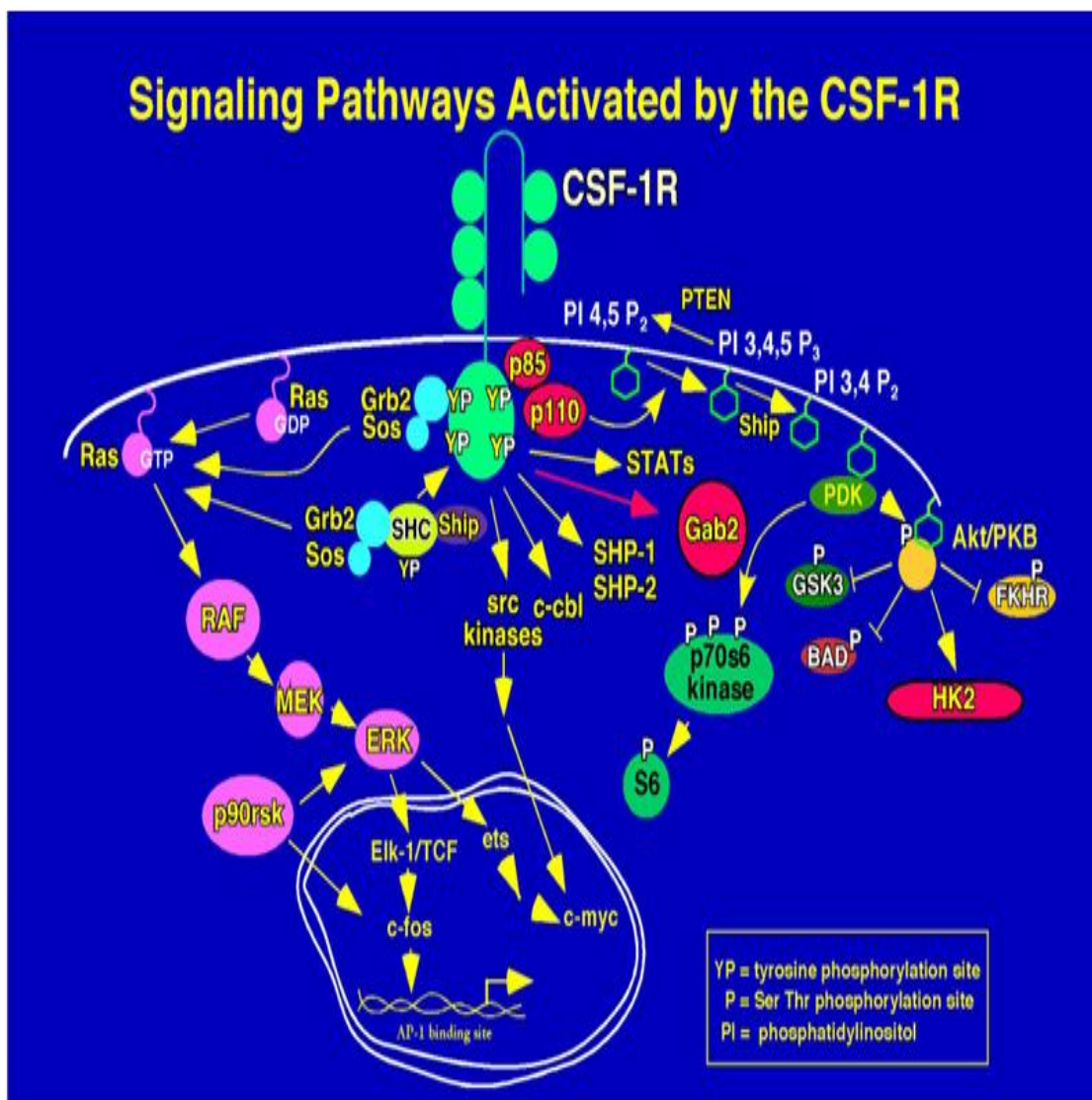
Οι Colony-Stimulating Factors (παράγοντες που επάγουν το σχηματισμό αποικιών) είναι μια οικογένεια γλυκοπρωτεϊνών που διαμορφώνουν την αιματοποιητική διαδικασία και ελέγχουν την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και τη λειτουργική ικανότητα των ώριμων προγονικών αιματοποιητικών κυττάρων, με αλληλεπικαλυπτόμενες δραστηριότητες (Armitage, 1998). Σε αυτή την κατηγορία ανήκει και ο CSF-1, όπως και η ιντερλευκίνη-3 (IL-3), ο παράγοντας διέγερσης κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF ή CSF-2), και κοκκιοκυττάρων (G-CSF ή CSF-3).

Ειδικότερα, ο Colony-Stimulating Factor-1 (CSF-1) ή αλλιώς Macrophage-CSF (M-CSF) αρχικά, είχε αναγνωριστεί ως ένας αιματοποιητικός αυξητικός παράγοντας που προάγει την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των μονοκύτταρων και των μακροφάγων. Πιο πρόσφατα, όμως, ο CSF-1 βρέθηκε σε μια ποικιλία καρκινωμάτων (π.χ. μαστού, ωοθηκών, πνευμόνων) που δεν έχουν αιματοποιητική προέλευση (Filderman, 1992).

Πολλά είδη κυττάρων, όπως τα επιθηλιακά, τα μεσεγχυματικά και οι οστεοβλάστες, παράγουν τον CSF-1. Αν και εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα σε φυσιολογικό επιθηλιακό ιστό του μαστού, ο CSF-1 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον μαστικό αδένα κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης και σε καρκινικά κύτταρα μαστού. Ουσιαστικά πρόκειται για μια ομοδιμερή γλυκοπρωτεΐνη η οποία προσδέεται με υψηλή συγγένεια στους υποδοχείς της. Υπάρχουν 3 βιολογικά ενεργές ομοδιμερείς ισομορφές του CSF-1: μια εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη (sgCSF-1), 5-7, μία εκκρινόμενη πρωτεογλυκάνη (spCSF-1), 8,9 και μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη (csCSF-1) (Pixley et al, 2004).

Οι δράσεις του CSF-1 πραγματοποιούνται μέσω του υποδοχέα του, τον CSF-1R. Ο CSF-1 υποδοχέας (CSF-1R) κωδικοποιείται από το πρώτο-ογκογονίδιο *c-fms* και είναι ένας υποδοχέας κινάσης τυροσίνης (RTK-Receptor Tyrosine Kinase).

Πιο συγκεκριμένα το *c-fms* καθίσταται ογκογόνο από μια μετάλλαξη στην εξωκυτταρική επιφάνεια η οποία προάγει το διμερισμό και ενεργοποιεί τον υποδοχέα ιδιοστατικά ακόμα και απουσία του CSF-1 με αποτέλεσμα να επάγονται πολλά μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Σε κύτταρα που ο CSF-1R εκφράζεται, ο CSF-1 ενεργοποιεί πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως φαίνεται στην **εικόνα 1**, μεταξύ των οποίων το το MAPK μονοπάτι, το μονοπάτι των PI3 κινασών, το JAK/STAT και το *c-cbl* μονοπάτι (Lee 1992, Roussel 1994, Hamilton 1997).



Εικόνα 1 : Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τον CSF-1.

Έχει επίσης αποδειχθεί ότι το 52% του CSF-1R θετικών σε καρκίνο του μαστού καρκινωμάτων εκφράζουν ενεργοποιημένο, δηλαδή φωσφορυλιωμένο στην Tyr723, CSF-1R (Flick, 1997) και ότι η παρεμπόδιση της ενεργοποίησης του CSF-1R από τον CSF-1 είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόπτωσης και την μειωμένη επιβίωση σε κύτταρα του τραχήλου της μήτρας και των ωοθηκών (Toy 2009, Kirma 2007). Η ενεργοποίηση του CSF-1R από τον CSF-1 θα μπορούσε να συμβεί σε διηθητικά καρκινικά κύτταρα στα οποία ο CSF-1R και ο CSF-1 συν-εκφράζονται (αυτοκρινής ενεργοποίηση). Μπορεί όμως οι CSF-1Rs σε καρκινικά κύτταρα να διεγερθούν έμμεσα από τον CSF-1 που θα είχε συντεθεί από διεισδυτικά μονοκύτταρα ή ινοβλάστες που βρίσκονται στο κυτταρικό στρώμα (παρακρινική ενεργοποίηση).

Μη φυσιολογική έκφραση του CSF-1R έχει συσχετιστεί με επιθετική συμπεριφορά σε μια ποικιλία κακοηθιών συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου του μαστού, του προστάτη, των ωοθηκών, του τραχήλου και του ενδομητρίου. Πιο συγκεκριμένα, το 58 - 90% διηθητικών καρκίνων του μαστού φάνηκε να είναι θετικό στον CSF-1R (Kacinski et al., 1991, Tang et al, 1992, Scholl et al, 1994).

Για να εξεταστούν οι συνέπειες της έκφρασης του υποδοχέα μετά την ενεργοποίησή του, έγινε εισαγωγή του CSF-1R γονιδίου σε ER-positive κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού (Lee et al, 1999). Στα πειράματα αυτά έγινε διέγερση με τον CSF-1 και την οιστραδιόλη ξεχωριστά αλλά και μαζί και τα αποτελέσματα ήταν τα ακόλουθα. Στην ευαίσθητη σε οιστρογόνα κυτταρική σειρά MCF-7, η οιστραδιόλη έδειξε να επάγει αύξηση στην ανάπτυξη, ενώ ο CSF-1 από μόνος του όχι. Παρόλα αυτά, σε συνδυασμό, ο CSF-1 ανέστειλε την δράση της οιστραδιόλης επάγωντας σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 ως αποτέλεσμα μιας MAPK-εξαρτώμενης και p53-ανεξάρτητης ρύθμισης της p21. Κάτι τέτοιο όμως δεν συνέβη και στην άλλη κυτταρική σειρά που μελετήθηκε (T47D). Πιο συγκεκριμένα, και αντίθετα με την πρώτη περίπτωση, φάνηκε ότι ο CSF-1 προκάλεσε αύξηση στη σύνθεση του DNA και μόνος του και μαζί με την οιστραδιόλη.

Μέχρι σήμερα ήταν γνωστό ότι ο CSF-1 ασκεί αυτές τις δράσεις μέσω ενός μεμβρανικού CSF-1R υποδοχέα. Όμως, ο συνδεδεμένος με το μεμβρανικό υποδοχέα CSF-1, έχει αποδειχθεί να μην επαρκεί για κάποιες κυτταρικές αποκρίσεις. Πρόσφατα, βρέθηκε από το εργαστήριο της επιβλέπουσας καθηγήτριας ότι λειτουργικοί CSF-1Rs δεν βρίσκονται μόνο στην κυτταρική μεμβράνη, όπως

θεωρούνταν μέχρι σήμερα, αλλά και στην περιφερειακή πυρηνική μήτρα μιας ποικιλίας κυτταρικών τύπων συμπεριλαμβανομένων των πρωτογενών μακροφάγων, καρκινικών κυττάρων μαστού, ωθηκών και τραχήλου **(Zwaenepoel et al., 2011)**..

Βρέθηκε επίσης ότι ο εξωκυττάριος CSF-1, μετά την ενδοκύττωση του μεταφέρεται στον πυρηνικό CSF-1R τον οποίο και ενεργοποιεί με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση άλλων αντι-αποπτωτικών πυρηνικών μορίων, συμπεριλαμβανομένων της Akt και της p27 **(Zwaenepoel et al., 2011)**.

1.3 Σκοπός εργασίας

Στην παρούσα εργασία θα διευρυνηθεί η έκφραση του πυρηνικού CSF-1R σε ορμονοεξαρτώμενα και σε μη ορμονοεξαρτώμενα καρκινικά κύτταρα μαστού υπό την επίδραση CSF-1 συγκριτικά με την επίδραση οιστραδιόλης παρουσία και απουσία ταμοξιφαίνης.

Συγκεκριμένα θα εξεταστεί εάν ο CSF-1 και η οιστραδιόλη μπορεί να επηρεάσει την έκφραση ή / και την ενεργότητα των πυρηνικών CSF-1Rs και κατά πόσο η ταμοξιφαίνη θα μπορούσε να αποτρέψει τις πιθανές αλλαγές της έκφρασης και της σηματοδότησης του πυρηνικού CSF-1R στις ορμονο-εξαρτώμενο κυτταρικές σειρές.

Γενικός στόχος της εργασίας είναι η καθιέρωση του πυρηνικού CSF-1R ως ένα σημαντικό καρκινικό δείκτη και/ή έναν καινούργιο στόχο για την διάγνωση και την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού.

2-ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βιολογικό υλικό: Ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού

Οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού που μελετήθηκαν ήταν οι εξής:

- MDA-MB-231 (ER-independent)
- T47D (ER-dependent)
- ZR-75-1 (ER-dependent).

2.2 Καλλιέργεια κυττάρων

Υλικά

Για την καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν:

- DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) (Gibco Co)
- FBS (Fetus Bovine Serum) (Gibco Co)
- Penicillin/Streptomycin (Gibco Co)
- Trypsin-EDTA (Gibco Co)
- BSA-Bovine Serum Albumine (Sigma Co)
- DMSO (Roth Co)

Μέθοδοι

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των κυττάρων περιείχε 1/1 v/v DMEM (4.500mg/L glucose + L-glutamine +pyruvate), 10% v/v FBS (θερμικά απενεργοποιημένο) και 1% v/v πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (50 IU/ml πενικιλίνη και 50 mg/ml στρεπτομυκίνη).

Γενικά τα κύτταρα βρίσκονταν διατηρημένα στους -80°C μέσα σε κρυοφαλίδια (cryovials) σε κλάσματα του 1 ml. Η απόψυξη γινόταν ως εξής: ένα cryovial θερμαινόταν για πολύ λίγο στους 37° C και αμέσως μετά τα κύτταρα μαζί με 10 ml θρεπτικού φυγοκεντρούνταν για 10 λεπτά στις 1200 στροφές (rpm/min).

Στη συνέχεια απομακρυνόταν το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναδιαλύονταν με θρεπτικό καλλιέργειας σε πιάτα μεγέθους 100x20 mm και με συνολικό όγκο θρεπτικού 10 ml.

Μετά την φυγοκέντρωση και το μοίρασμα στα πιάτα, τα κύτταρα τοποθετούνταν σε επωαστήρα με θερμοκρασία 37° C και υγρή ατμόσφαιρα 95 % αέρος και 5% CO₂. Κάθε περίπου 2-3 μέρες το θρεπτικό της καλλιέργειας ανανεώνονταν.

Όταν ο πληθυσμός των κυττάρων γίνει ικανοποιητικός, περίπου την 5^η με 6^η μέρα αφαιρούνταν το παλιό θρεπτικό, τα κύτταρα πλένονταν με 2ml PBS και ύστερα γινόταν επώαση στον κλίβανο για περίπου 5-10 λεπτά με διάλυμα που περιείχε 0,25% Trypsin και 0,2% w/v EDTA. Στην συνέχεια τα κύτταρα παραλαμβάνονται σε θρεπτικό υλικό, φυγοκεντρώνονται στις 1200 στροφες (rpm/min) για 6 λεπτά και αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο επαναδιαλυτοποιούνται σε θρεπτικό υλικό, ποσότητας που ορίζεται κάθε φορά από την εκάστοτε επιθυμητή τελική συγκέντρωση κυττάρων και μοιράζονται σε πιάτα καλλιέργειας τα οποία παραμένουν στον επωαστήρα μέχρι περίπου 16-18 ώρες πριν από το πείραμα. Τότε αφαιρείται το θρεπτικό (που περιέχει ορό) και αντικαθίσταται από θρεπτικό που δεν περιέχει ορό. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν όταν τα κύτταρα βρίσκονταν στην λογαριθμική φάση ανάπτυξης.

Τέλος για την διατήρηση των κυττάρων στους -80° C, το ίζημα που προέκυπτε μετά την φυγοκέντρωση επαναδιαλύονταν σε μέσο κατάψυξης που αποτελούταν από DMSO και FBS σε αναλογία 10/100. Από το κυτταρικό εναιώρημα (4x10⁶ κύτταρα/ml), κλάσματα του 1 ml τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα κρυοφουάλια και μεταφέρονταν στους -80° C.

2.3 Πείραμα 1

Διαχωρισμός κυτταροπλασματικών και πυρηνικών κλασμάτων από τα κύτταρα μετά από διέγερσή τους με CSF-1.

Υλικά

- DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) (Gibco Co)
- Versene (Gibco Co)
- BSA (bovine serum albumine) (Sigma Co.)
- **Buffer A**-Διάλυμα λύσης κυττάρων (**υπότονο**) 200 ml
- **Buffer C**-Διάλυμα ρήξης πυρήνων (**υπέρτονο**) 100ml
- **Buffer D** 100ml

Παρασκευή διαλυμάτων

- | | |
|-----------------------|--------------------------------|
| • Buffer A | 200 ml |
| 10 mM Hepes pH=7.9 | 4ml stock Hepes 0,5M pH=7.9 |
| 10mM KCl | 1ml stock KCl 2M |
| 2mM MgCl ₂ | 400 μl stock MgCl ₂ |
| 0.1mM EDTA | 40μl stock EDTA 0.5M |
| 0.5% NP-40 | 1ml NP-40 |

Την ημέρα διεξαγωγής του πειράματος προστίθενται οι εξής αναστολείς πρωτεασών:

- | | |
|--------------------------------------|---|
| 1 mM DTT | 1:1000 of stock DTT 1 mM |
| 10 μM leupeptin | 1:1000 of stock leupeptin 10 mM |
| 1mM PMSF | 1:100 of stock 100 mM PMSF (in isopropanol) |
| 10 μg/ml aprotinin | |
| 1 mM Na ₄ VO ₃ | 1:100 of stock 100 mM Na ₄ VO ₃ |
| • Buffer C | 100ml |
| 20 mM Hepes pH=7.9 | 4ml of stock Hepes 0,5M pH=7.9 |

1.5Mm MgCl ₂	150μl of stock MgCl ₂ 1M
0.42M NaCl	8.4ml of stock NaCl 5M
0.2mM EDTA	40μl of stock EDTA 0,5M
25% (v/v) glycerol	25ml glycerol

και προστίθενται ανάλογα και οι αναστολείς DTT, PMSF, Leupeptin κ.τ.λ όπως και στο buffer A.

• Buffer D	100ml
20 mM Hepes pH=7.9	4ml of stock Hepes 0,5M pH=7.9
0,05M KCl	2.5ml stock KCl 2M
0.2mM EDTA	40μl stock EDTA 0.5M
20%(v/v) glycerol	20 ml glycerol

Ανάλογα και εδώ προστίθενται οι αναστολείς την ημέρα του πειράματος.

Όπως προαναφέρθηκε, 16-18 ώρες πριν το πείραμα το θρεπτικό αντικαθιστάται με starvation medium (θρεπτικό χωρίς ορό). Η διαδικασία που ακολουθείται για την απομόνωση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών πρωτεϊνών είναι η παρακάτω.

Επώαση κυττάρων με CSF-1.

Μέθοδος

Αφού απομακρυνθεί το starvation medium από τα κύτταρα προστίθεται 3ml καινούργιο θρεπτικό και 9 μl CSF-1 (τελική συγκέντρωση 30 ng/ml) και γίνεται επώαση στον επωαστήρα για τα ακόλουθα χρονικά διαστήματα: 0, 1, 2, 4, 6 και 24 ώρες.

Στη συνέχεια, η διαδικασία αποτελείται από τα εξής στάδια:

- Αρχικά ξεπλένονται τα κύτταρα με 2ml PBS.
- Προστίθεται 1ml Versene σε κάθε πιάτο και αφήνονται για 10 λεπτά στον επωαστήρα.

- Τοποθετούνται τα πιάτα σε πάγο και με την βοήθεια ειδικής σπάτουλας ξεκολλάνε όλα τα κύτταρα από τα πιάτα και μεταφέρονται σε σωληνάρια (περιεκτικότητας 1.5 ml).
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 5 λεπτά (- 4° C) ώστε το versene να απομακρυνθεί εντελώς.
- Αφαιρείται το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιείται η πελέτα των κυττάρων σε 800 μl **Buffer A**.
- Τοποθετούνται τα tubes στον rotator για 15 λεπτά στους 4⁰C.
- Γίνεται μια φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές για 6 λεπτά.
- Σε αυτό το στάδιο απομονώνονται οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (υπερκείμενο) σε καινούργια tubes.
- Στην πελέτα προστίθενται 160 μl από το **Buffer C** και αφήνονται τα πιάτα 30 λεπτά στον πάγο.
- Προστίθενται 120 μl **Buffer D**.
- Γίνεται μια τελευταία φυγοκέντρηση για 6 λεπτά στις 1300 στροφές και αυτή τη φορά απομονώνεται το υπερκείμενο, το οποίο είναι οι πυρηνικές πρωτεΐνες.
- Η μέτρηση πρωτεϊνών στο φωτόμετρο για τα κυτταροπλασματικά και πυρηνικά δείγματα με την μέθοδο Bradford γίνεται ως εξής : Σε κάθε tube για την μέτρηση προστίθενται :
800 μl H₂O , 200μl Biorad (1/5) και 10μl από το κάθε δείγμα.

Πιο αναλυτικά η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού με τα αντιδραστήρια Bio-Rad βασίζεται στην τεχνική Bradford και περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Τοποθέτηση των δειγμάτων σε tubes (δύο για κάθε δείγμα) και συμπλήρωση του όγκου μέχρι τα 800 μl με ενέσιμο νερό. Ως τυφλό δείγμα (blank) χρησιμοποιείται αυτό, στο οποίο ο όγκος του κυτταρικού εκχυλίσματος αντικαθίσταται με ίσο όγκο διαλύματος λύσης.
- Προσθήκη 200μl Biorad (1/5).
- Προσθήκη 10 μl από το κυτταρικό δείγμα.
- Ισχυρή ανάδευση των δειγμάτων τα οποία αφήνονται σε ηρεμία για λίγο.
- Μεταφορά σε κυβέττες και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 595 nm.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του δείγματος γίνεται με βάση την τιμή απορρόφησης κάθε δείγματος σε σύγκριση με ταυτόχρονη μέτρηση δειγμάτων γνωστών ποσοτήτων BSA (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 μg) με την χρήση πρότυπης καμπύλης.

Αφού γίνει ο ποσοτικός προσδιορισμός κάθε δείγματος, υπολογίζεται ο όγκος κάθε δείγματος που περιέχει την επιθυμητή ποσότητα πρωτεϊνών (όλα τα δείγματα πρέπει να έχουν την ίδια ποσότητα) και η μετρούμενη ποσότητα κυτταρικού εκχυλίσματος μεταφέρεται σε ξεχωριστά tubes.

- Φυλάσσονται τα δείγματα στους -20°C μέχρι το Western Blot.

2.4 Πείραμα 2

Διαχωρισμός κυτταροπλασματικών και πυρηνικών κλασμάτων από τα κύτταρα μετά από διέγερσή τους με οιστραδιόλη παρουσία ή απουσία ταμοξιφαίνης .

Η διαδικασία της απομόνωσης των κυττάρων είναι ακριβώς ίδια με αυτήν που αναφέρθηκε παραπάνω όμως αντί για CSF-1 προστίθεται στα κύτταρα οιστραδιόλη ή ταμοξιφαίνη στις εξής συγκεντρώσεις για 24 ώρες:

0 nM / 0,1nM/ 1nM /10 nM / 100nM και 1000nM

Πιο συγκεκριμένα, αφού απομακρυνθεί το starvation medium για να δημιουργηθούν διαδοχικές αραιώσεις η διαδικασία είναι η εξής:

Η συγκέντρωση της οιστραδιόλης στο stock (διατηρείται σε αιθανόλη) είναι 1mM.

Στο πρώτο πιάτο προστίθεται 10 ml medium DMEM και 10 μl από το stock της οιστραδιόλης οπότε η τελική συγκέντρωση είναι 1000nM (1μM).Στα επόμενα πιάτα γίνονται διαδοχικές αραιώσεις με τον ακόλουθο τρόπο:

- για την 100nM συγκέντρωση αφαιρείται 1mL από το πρώτο πιάτο (1000nM) και συνδυάζεται με 9 ml θρεπτικό.
- για την 10nM συγκέντρωση αφαιρείται 1mL από το δεύτερο πιάτο (100nM) και συνδυάζεται με 9 ml θρεπτικό.
- για την 1nM συγκέντρωση αφαιρείται 1mL από το τρίτο πιάτο (10nM) και συνδυάζεται με 9 ml θρεπτικό.
- για την 0,1nM συγκέντρωση αφαιρείται 1mL από το τέταρτο πιάτο (1nM) και συνδυάζεται με 9 ml θρεπτικό.
- Τέλος, για την 0 nM προστίθεται μόνο 10mL θρεπτικό.

Το ίδιο ακριβώς συμβαίνει και με την ταμοξιφαίνη και οι συγκεντρώσεις παραμένουν ίδιες σε όλα τα στάδια της διαδικασίας.

2.5 Πείραμα 3

Πείραμα πολλαπλασιασμού

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation assay της Promega. Είναι μία χρωματομετρική μέθοδος καθορισμού του αριθμού των ζώντων κυττάρων στα πειράματα πολλαπλασιασμού. Το CellTiter 96 AQueous assay αποτελείται από τα διαλύματα μιας ένωσης τετραζολίου (MTS) και ενός ηλεκτρονιο-δεσμευτικού αντιδραστηρίου (PMS). Το MTS βιοανάγεται στα κύτταρα σε ένα προϊόν φορμαζάνης που διαχέεται στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας. Η απορροφητικότητα της φορμαζάνης μπορεί να μετρηθεί στα 490nm απευθείας από τα πιάτα (96-well assay plates).

Υλικά

Υλικά καλλιέργειας καρκινικών κυττάρων:

E2

Tam

MTS (Promega Co.)

PMS (Promega Co.)

Διάλυμα MTS/PMS:

2 ml διάλυμα MTS

100 μl διάλυμα PMS

Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν την εφαρμογή του στην καλλιέργεια κυττάρων

Μέθοδος

Το θρεπτικό καλλιέργειας των κυττάρων έχει αντικατασταθεί μία μέρα πριν το πείραμα με starvation medium. Την ημέρα του πειράματος, τα κύτταρα παραλαμβάνονται με Trypsin-EDTA, μετρώνται και φυγοκεντρώνται. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας ώστε να έχουν τελική συγκέντρωση 100.000 κύτταρα/ml.

Από το κυτταρικό αιώρημα χωρίζονται κλάσματα 3 ml σε διαφορετικά falcon ανάλογα με το πόσες είναι και οι καταστάσεις στις οποίες χρειάζεται να ελεγχθεί ο πολλαπλασιασμός.

Συγκεκριμένα, ανά φάλκον προσθέτουμε:

- 1) DMEM (control)
- 2) E₂: 3μl για έλεγχο 1000nM συγκέντρωσης
- 3)CSF-1: 15 μl
- 4) CSF-1 και E₂ μαζί

Μετά 100μl κυτταρικού εναιωρήματος από κάθε κατάσταση, προστίθενται σε διαφορετικά πιάτα που βρίσκονται σε ένα 96-well assay plate και αφήνονται στον επωαστικό κλίβανο (37° C, 5% CO₂) για 48 ώρες. Σε κάθε well μέσα σε ένα πιάτο των 96-wells προστίθεται 20 μl διαλύματος MTS/PMS και αφήνεται για επώαση στον κλίβανο για 1-4 ώρες. Η απορροφητικότητα των κυττάρων μετράται στα 490 nm, με τη χρήση ενός ELISA plate reader.

2.6 Western Blot

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, σε συνθήκες SDS αποδιάταξης (SDS-PAGE)

Για την μελέτη των πρωτεϊνών έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, σε συνθήκες SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) σε συνδυασμό με μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western Blotting).

Υλικά

- Ακρυλαμίδιο/Bis-Ακρυλαμίδιο: N,N'-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο (Roth Co.)
- SDS (Roth Co.)
- Tris (Roth Co.)
- (NH₄)₂S₂O₈ (APS) (Roth Co.)
- DTT Sigma Co.)
- Γλυκερόλη (Roth Co.)
- Κυανό της βρωμοφαινόλης (BPB) (Sigma Co.)
- TEMED (Roth Co.)
- Γλυκίνη (Pnoï Co.)
- Marker Precision Plus (Biorad Co.)

Διαλύματα

- **Συγκεντρωμένο διάλυμα ακρυλαμίδης 30%**

Ακρυλαμίδιο 29.2% (w/v)

Bis-ακρυλαμίδιο 0.8% (w/v)

Το διάλυμα φιλτράρεται σε φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.45 ή 0.20 μm και διατηρείται στους 4° C.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα Διαχωρισμού (Separation gel buffer) 200 ml**

200 ml Tris.HCl 1.5 M pH=8.8

0.8 gr SDS (0.4% w/v).

Το pH ρυθμίζεται στο 8.8 και το διάλυμα αφήνεται να αναδευτεί για 1 ώρα. Επαναλαμβάνεται η μέτρηση του pH και αν είναι διαφορετική διορθώνεται με διάλυμα HCl και μετά διατηρείται στους 4° C.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοιβαξής (Stacking gel buffer) 200 ml**

200 ml Tris.HCl 0.5 M pH= 6.8

0.8 gr SDS (0.4% w/v)

Το pH ρυθμίζεται σε 6.8 και το διάλυμα αφήνεται να αναδευτεί για 1 ώρα. Εάν μετά η μέτρηση του pH είναι διαφορετική διορθώνεται με διάλυμα HCl.

- **Συγκεντρωμένο διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (APS) 10%**

1 gr APS

Προστίθεται ddH₂O μέχρι να παρασκευαστούν 10ml διαλύματος, το οποίο διατηρείται στους 4° C για περίπου μια βδομάδα.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης 50 ml (sample buffer 4x)**

12.5 ml Tris.HCl 1M pH = 6.8

20 ml SDS 20%

3.08 gr DTT

10 ml γλυκερόλη

10 mgr κυανό της βρωμοφαινόλης (BPB)

Προστίθεται στη συνέχεια H₂O μέχρι ο τελικός όγκος να είναι 50ml.

- **Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Electrophoresis buffer) 10x 1L**

30.3 gr Tris

144.2 gr Γλυκίνη

10 gr SDS

Προστίθεται H₂O (μέχρι να φτάσει σε τελικό όγκο 1L).

Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι χωρίς διόρθωση περίπου 8.3. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Πήκτωμα διαχωρισμού 30 ml (Running gel) 10%**

10 ml 30% acrylamide

7.5 ml Separation gel buffer

12.5 ml ddH₂O

300 μ l 10% APS

15 μ l TEMED

- **Πήκτωμα επιστοίβαξης (Stacking gel) 10ml**

1.5 ml 30% ακρυλαμίδη

2.5 ml Stacking gel buffer

6.0 ml ddH₂O

100 μ l 10% APS

10 μ l TEMED

Μέθοδος

Στην SDS ηλεκτροφόρηση το ανιονικό απορρυπαντικό SDS (δωδεκακυλο-θειικό νάτριο) χρησιμοποιείται ως αποδιατακτικός παράγοντας ο οποίος καταστρέφει όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες σε αναλογία ενός μορίου SDS ανά δύο αμινοξέα (1,4g SDS/gr πρωτεΐνης) και σχηματίζουν επιμήκη σύμπλοκα με καθορισμένη δευτεροταγή δομή. Η δέσμευση είναι υδρόφοβη, ανεξάρτητη από την ιονική ισχύ και προσδίδει στα μόρια αρνητικό φορτίο. Επειδή το φορτίο ανά μονάδα μάζας είναι περίπου σταθερό και οι υδροδυναμικές ιδιότητες είναι συνάρτηση μόνο του μοριακού μήκους, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος και για αυτό η ηλεκτροφόρηση αυτή έχει μεγάλη διαχωριστική ικανότητα και είναι πολύ ακριβής.

Το σύστημα ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε στηρίζεται στη μέθοδο του Laemmli (1970), με διαφορά στη χρήση επίπεδου (16cm*18cm*1.5mm) αντί κυλινδρικού πήκτωματος. Μετά την συναρμολόγηση της συσκευής ηλεκτροφόρησης, προστίθεται αρχικά το πήκτωμα διαχωρισμού (running gel) σε ύψος περίπου 11cm από την βάση της συσκευής. Όταν ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης, προστίθεται το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel), μέσα στο οποίο τοποθετείται το “κτένι” για τον σχηματισμό των θέσεων (πηγάδια) όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματα των πρωτεϊνών.

Ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης γίνεται με μηχανισμό ελευθέρων ριζών και σαν καταλύτες χρησιμοποιούνται το $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (APS) για την έναρξη του πολυμερισμού και το TEMED για τη συντήρηση του πολυμερισμού με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός τρισδιάστατου πολυμερισμού δικτύου πολυακρυλαμίδης. Το ρόλο του συνδέσμου των αλυσίδων της πολυακρυλαμίδης για τη δημιουργία του δικτύου παίζει το N, N'-μεθυλεν-δις-ακρυλαμίδιο.

Τα δείγματα που πρόκειται να τοποθετηθούν στην πηκτή πολυακρυλαμίδης, έχουν απομονωθεί από τα κύτταρα σύμφωνα με τις μεθόδους που προαναφέρθηκαν.

Στην συνέχεια, προστίθενται σε αυτά $\frac{1}{4}$ του τελικού όγκου διάλυμα μετουσίωσης (sample buffer) 4x και θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά. Σε αυτές τις συνθήκες οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται διατηρώντας μόνο την πρωτοταγή τους δομή.

Αφού τοποθετηθεί πρώτα ο marker και μετά τα δείγματα στην πηκτή τοποθετείται και το διάλυμα ηλεκτροφόρησης στη συσκευή και αρχικά εφαρμόζεται σταθερή τάση 150V. Όταν τα δείγματα περάσουν το πήκτωμα διαχωρισμού εφαρμόζεται τάση 250V. Αυτή η διαδικασία διαρκεί περίπου 5 - 6 ώρες.

Μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Transfer)

Υλικά

Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Malva Co)

Χαρτί Whatman 3MM (Getacherr Co)

Μεθανόλη (Roth Co)

Διαλύματα

- **2.5 L Διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer)**

500 ml MeOH

250 ml Electrophoresis buffer 10x

1.75L H_2O

Μέθοδος

Η μεταφορά των αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμίδης στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης γίνεται μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο, με τη βοήθεια κατασκευής που έχει την μορφή 'sandwich'. Πιο συγκεκριμένα στην κασέτα της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς τοποθετούνται τα υλικά με την εξής σειρά (από κάτω προς τα πάνω): σφουγγάρι/χαρτί Whatman 3MM/πηκτή/μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (ίδιων διαστάσεων με πηκτή) /χαρτί Whatman 3MM /σφουγγάρι. Πριν όμως την δημιουργία της κατασκευής αυτής όλα τα υλικά έχουν εμβαπτιστεί με το διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) πρωτεϊνών, το οποίο είναι τοποθετημένο από πριν μέσα στην συσκευή. Το 'sandwich' μετά τοποθετείται στη συσκευή με το πηκτωμα προς την κάθοδο και η μεταφορά γίνεται στους 4^ο C για 1.30-2 ώρες.

Υβριδοποίηση των πρωτεϊνών της νιτροκυτταρίνης και ανίχνευση τους με το σύστημα χημειοφωταύγιας (ECL)

Υλικά

Tris (Roth Co.)

NaCl (Roth Co.)

Tween-20 (Sigma Co.)

Ξηρό γάλα με χαμηλά λιπαρά

Αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης που μελετάται:

Phospho-Akt (Ser473) Antibody (MW: 60 kDa, πηγή: Rabbit-Cell Signalling-9271)

Akt Antibody (MW: 60 kDa, πηγή: Rabbit-Cell Signalling-9272)

CSF-1R Antibody (MW: 170kDa πηγή: Rabbit-Santa Cruz Biotechnology)

Δεύτερο αντίσωμα (Secondary antibody) κατά ανοσοσφαιρινών (IgG) (ανάλογα με το πρώτο αντίσωμα)

Φιλμ εμφάνισης υψηλής ευαισθησίας (Lab Supply Co.)

Luminol (Sigma Co.)

Hydrogen Peroxide (Sigma Co.)

Coumaric acid (Sigma Co.)

Διαλύματα:

- **1L Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-φυσιολογικού ορού (TBS) (10X)**

24.2 gr Tris

80gr NaCl

H₂O (μέχρι ο τελικός όγκος να γίνει 1L)

Ρυθμίζεται το pH σε 7.6 με προσθήκη HCl και φυλάσσεται στους 4° C.

- **TBS-Tween-20 (TBS 1x –T 0.05%) 500ml**

50 ml TBS 10X

450 ml H₂O

250 μl Tween-20 (0.05% v/v)

- **Stripping buffer 1 L**

20gr 2% SDS

7.5 gr 62.5 mM Tris

H₂O μέχρι να φτάσει σε τελικό όγκο 1L

Το pH ρυθμίζεται σε 6.7 και προστίθεται λίγο πριν την εφαρμογή του διαλύματος στην μεμβράνη 100 mM β-μερκαπτοαιθανόλη 350 μl/50 ml/blot.

- **Διάλυμα 1^ο αντισώματος 11ml**

5% BSA ή 0.55gr γάλα

1/1000 NaN₃ (stock: 20% σε TBS-T) 11μl

1^ο Αντίσωμα : 1/1000 (Cell Signaling: για P-Akt, Akt) 11μl

ή 1/100 (Santa Cruz: για Csf-1r) ή 110μl

TBS-T μέχρι να φτάσει σε τελικό όγκο 11ml

- **Διάλυμα 2^ο αντισώματος 20 ml**

1gr 5% γάλα

1μl 1/20.000 2^ο αντίσωμα (anti-rabbit)

TBS-T μέχρι να φτάσει σε τελικό όγκο 20ml

- **Διάλυμα χημειοφωταυγίας**

Stock διαλύματα:

500 mM Luminol σε DMSO (0.886gr /10 ml)

30% Hydrogen Peroxide

0.09M Coumaric acid σε DMSO (0.15 gr/10 ml),

1 M Tris.HCl σε pH 8.5 (60.57gr Tris/500ml ddH₂O)

- **Διάλυμα A 200ml : 20 ml Tris-HCl pH= 8.5**

180ml ddH₂O

128μl Hydrogen Peroxide

- **Διάλυμα B 200ml: 20ml Tris-HCl pH= 8.5**

178 ml ddH₂O

880 μl Coumaric acid

1 ml Luminol

Μέθοδος

Αρχικά γίνεται επώαση της μεμβράνης με TBS-T στο οποίο έχει προστεθεί 5% ξηρό γάλα (blocking solution) με σκοπό την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων. Η επώαση διαρκεί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

Ύστερα γίνεται πλύση της μεμβράνης με TBS-T, 3 φορές για 10 λεπτά. Έπειτα γίνεται επώαση, υπό ανάδευση, με το διάλυμα του αντισώματος της πρωτεΐνης στόχου, για όλη την νύχτα στους 4° C. Την επόμενη μέρα η μεμβράνη πλένεται 3 φορές με TBS-T για 10 λεπτά. Μετά επωάζεται με το διάλυμα του 2^{ου} αντισώματος (που θα πρέπει να είναι συμβατό με το πρώτο), υπό αργή ανάδευση, για 1 ώρα.

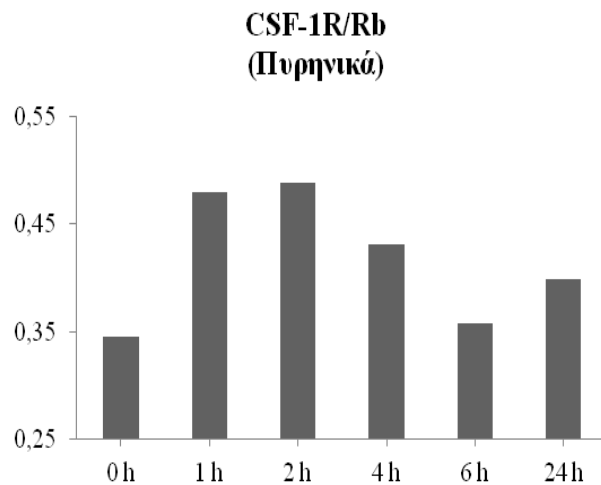
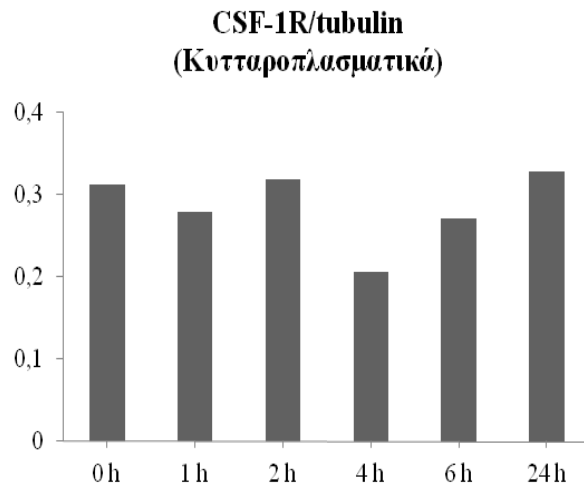
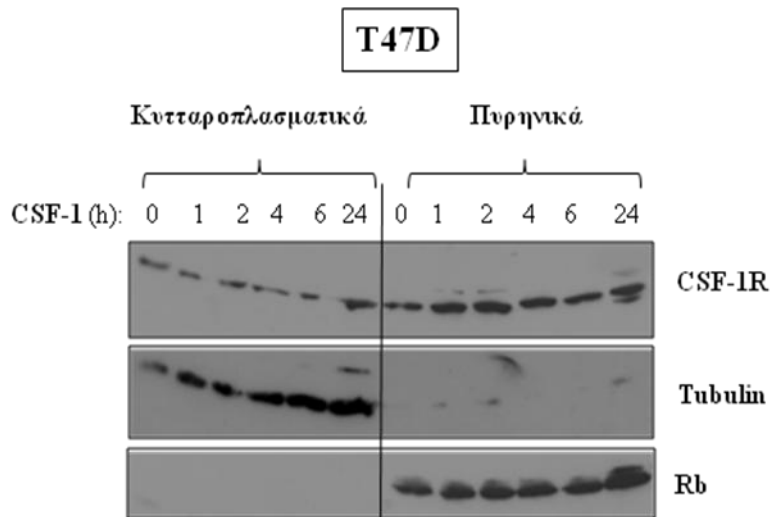
Ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης με TBS-T για 10 λεπτά. Μετά προετοιμάζεται το διάλυμα ECL με ανάμιξη ίσων ποσοτήτων διαλύματος A και B. Η μεμβράνη επωάζεται σε αυτό το διάλυμα για 2 λεπτά και ύστερα γίνεται η έκθεση σε φιλμ εμφάνισης υψηλής ευαισθησίας ECL για διάφορα χρονικά διαστήματα (developing). Όταν είναι απαραίτητη η ανίχνευση διαφορετικών πρωτεϊνών στην ίδια μεμβράνη τότε η απομάκρυνση των αντισωμάτων γίνεται με επώαση της μεμβράνης στο διάλυμα αφαίρεσης (stripping solution) στους 55° C για περίπου 25 λεπτά. Ακολουθεί ύστερα πλύση της μεμβράνης με TBS-T 2 φορές για 10 λεπτά και στην συνέχεια η διαδικασία όπως περιγράφεται παραπάνω.

3-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Διευρέυνση της έκφρασης του CSF-1R μετά από διέγερση με CSF-1 (συγκέντρωση 30 ng/ml) σε καρκινικά κύτταρα μαστού.

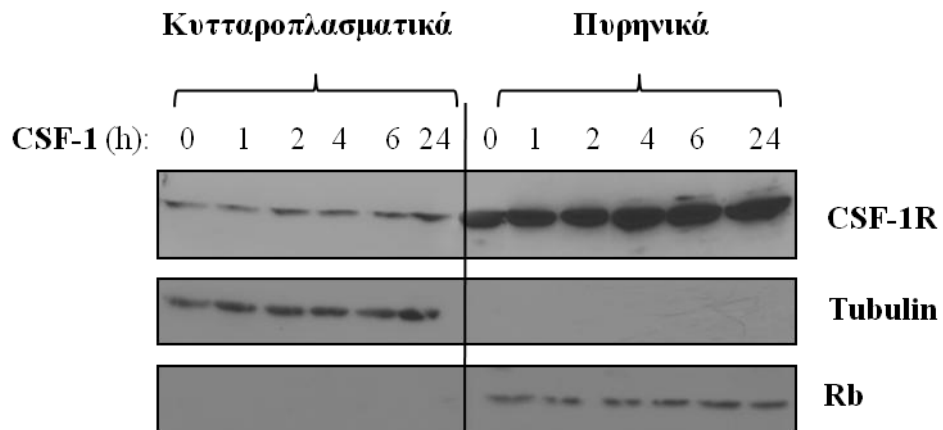
Τα κύτταρα από κάθε καρκινική κυτταρική σειρά (T47D, MDA-MB-231 και ZR-75) καλλιεργήθηκαν και επωάστηκαν με τον CSF-1 για τα ακόλουθα χρονικά διαστήματα: 0, 1, 2, 4, 6 και 24 h. Στην συνέχεια, ακολούθησε λύση των κυττάρων και ποσοτικός προσδιορισμός κυτταροπλασματικών και πυρηνικών πρωτεϊνών. Μετά χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ίσης συγκέντρωσης πρωτεϊνών, ηλεκτροφορήθηκαν και επεξεργάστηκαν με Western Blot. Τέλος, οι μεμβράνες επωάστηκαν με το αντίσωμα για τον CSF-1R.

Οι εικόνες που ακολουθούν (εικόνες 1, 2 και 3 για τα T47D, MB-231 και ZR-75 αντίστοιχα) απεικονίζουν ένα αντιπροσωπευτικό (από δύο ή τρία που πραγματοποιήθηκαν συνολικά) Western Blot για τον CSF-1R για κάθε μια κυτταρική σειρά ξεχωριστά. Σε κάθε Western Blot έγινε επίσης εμφάνιση με αντίσωμα ενάντια στην τουμπουλίνη (Tubulin), η οποία χρησιμοποιήθηκε ως marker για το κυτταρόπλασμα, και με αντίσωμα ενάντια στην Rb (πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος) η οποία χρησιμοποιήθηκε ως marker για τον πυρήνα. Η Tubulin και η Rb χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση των μετρήσεων του CSF-1R σε κάθε κλάσμα καθώς και για τον έλεγχο επιμόλυνσης πρωτεϊνών του ενός κλάσματος από το άλλο. Όπως φαίνεται, δεν υπήρξε επιμόλυνση των κυτταροπλασματικών κλασμάτων με πυρηνικά ούτε και το αντίστροφο. Στα αντίστοιχα Western Blots έγινε ποσοτικοποίηση η οποία απεικονίζεται στα γραφήματα που ακολουθούν και εκφράζεται ως ο λόγος CSF-1R/Tubulin για τα κυτταροπλασματικά και CSF-1R/ Rb για τα πυρηνικά.

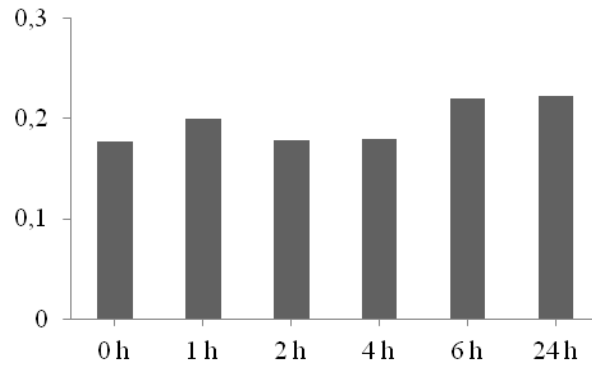


Εικόνα 1: Western Blot για τον CSF-1R, την Tubulin και την Rb, και διάγραμμα ποσοτικού προσδιορισμού της έκφρασης του υποδοχέα στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα σε T47D κύτταρα.

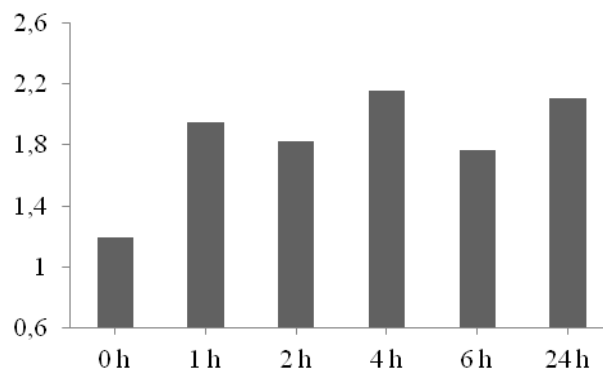
MB-231



CSF-1R/tubulin
(Κυτταροπλασματικά)

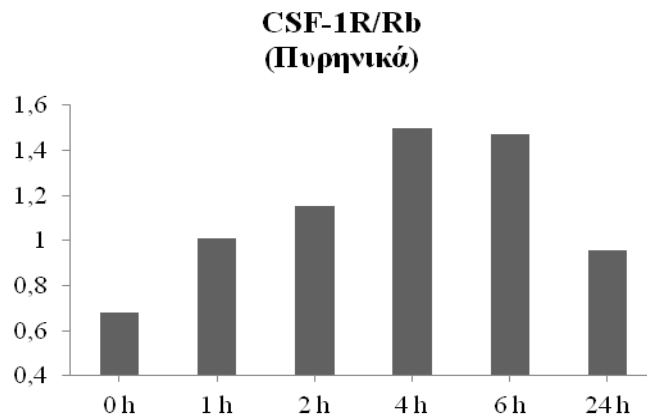
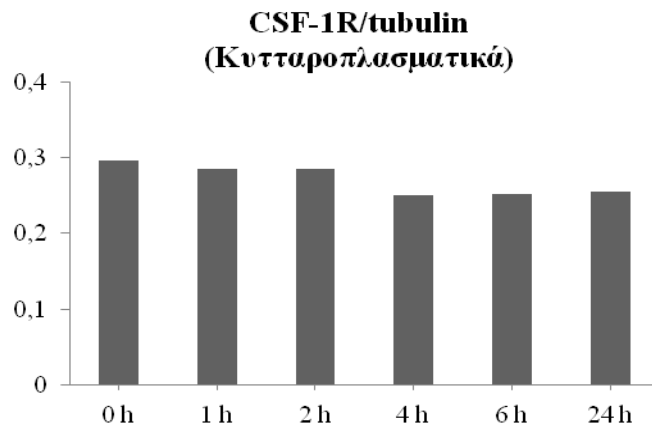
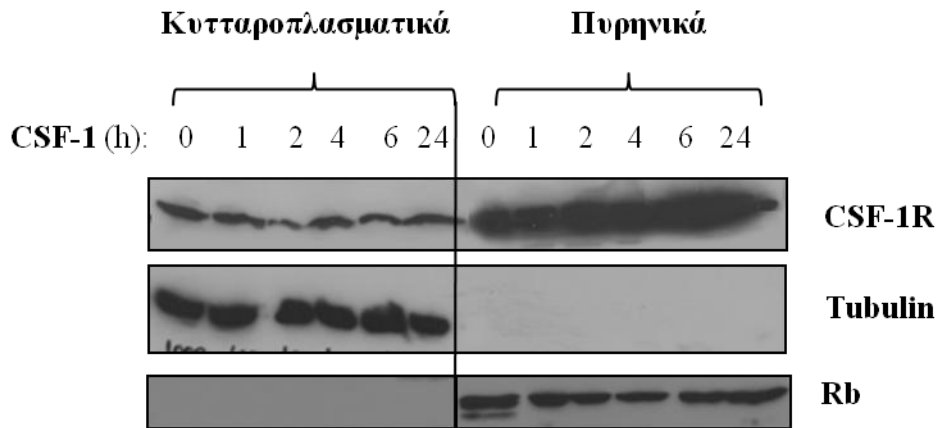


CSF-1R/Rb
(Πυρήνικά)



Εικόνα 2: Western Blot για τον CSF-1R, την Tubulin και την Rb, και διάγραμμα ποσοτικού προσδιορισμού της έκφρασης του υποδοχέα στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα στα MB-231 κύτταρα.

ZR-75



Εικόνα 3: Western Blot για τον CSF-1R, την Tubulin και την Rb, και διάγραμμα ποσοτικού προσδιορισμού της έκφρασης του υποδοχέα στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα στα ZR-75 κύτταρα.

Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Ξεκινώντας με την κυτταρική σειρά T47D στις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες βλέπουμε παρόμοια έκφραση του υποδοχέα σε όλα τα χρονικά διαστήματα διέγερσης των κυττάρων με CSF-1. Επομένως, τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι ο CSF-1 δεν επηρεάζει την έκφραση του κυτταροπλασματικού υποδοχέα (CSF-1R). Αντίθετα στο πυρηνικό κλάσμα μετρήθηκε μία σαφή χρονοεξαρτώμενη αύξηση της έκφρασης του πυρηνικού CSF-1R. Η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρείται στις 1,2 και 24 ώρες **(εικόνα 1)**. Η αύξηση αυτή δεν μπορεί να αποδοθεί σε μετακίνηση του κυτταροπλασματικού CSF-1R στον πυρήνα δεδομένου ότι δεν μετρήθηκε αντίστοιχα μείωση του κυτταροπλασματικού CSF-1R υπό την επίδραση CSF-1.

Όσον αφορά στη σειρά MDA-MB-231, μετά από διέγερση με CSF-1 η έκφραση του κυτταροπλασματικού υποδοχέα ήταν παρόμοια σε όλους τους χρόνους διέγερσης. Όμως η έκφραση του πυρηνικού CSF-1R αυξήθηκε σημαντικά μετά από 1, 4, 6 και 24 ώρες **(εικόνα 2)**.

Συνεχίζοντας με τη σειρά ZR-75, στις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες δεν υπάρχουν αποκλίσεις, ενώ στο πυρηνικό κλάσμα υπάρχει έντονη έκφραση του υποδοχέα στις 2 ώρες αλλά και περισσότερο στις 4 και στις 6 ώρες **(εικόνα 3)**.

Συγκεντρωτικά, φαίνεται ότι η έκφραση του κυτταροπλασματικού υποδοχέα και στις τρεις κυτταρικές σειρές δεν παρουσιάζει καμία μεταβολή και δεν επηρεάζεται από την επίδραση του CSF-1.

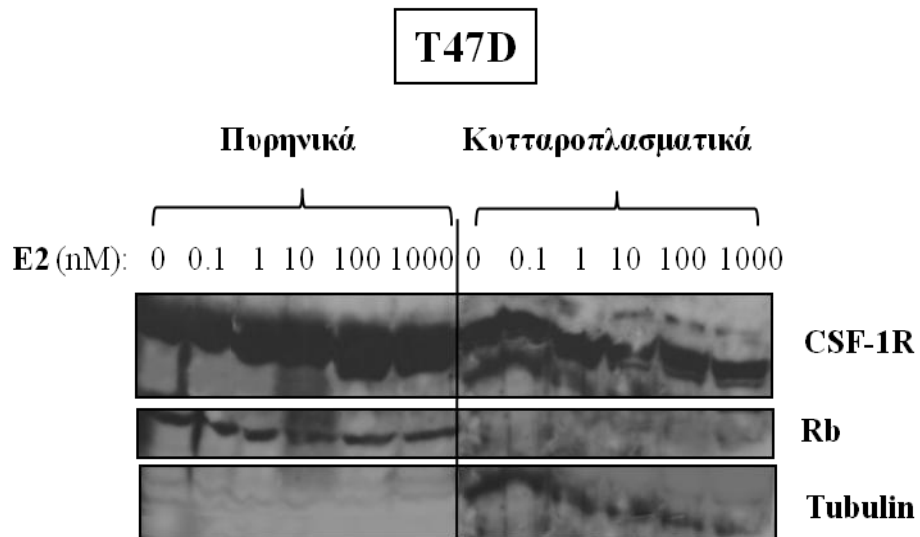
Αντίθετα, τα αποτελέσματα για τον πυρηνικό CSF-1R είναι πιο ενδιαφέροντα, αφού ανάλογα με τις ώρες επίδρασης με CSF-1 υπάρχουν διακυμάνσεις με πιο κρίσιμες ώρες που προκαλούν αύξηση στην έκφραση του υποδοχέα, τις 4, 6 και 24.

3.2 Διευρέυνηση της έκφρασης του CSF-1R μετά από διέγερση με οιστραδιόλη σε καρκινικά κύτταρα μαστού.

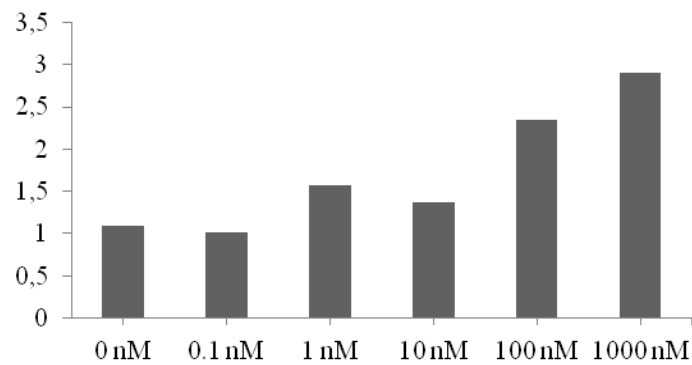
Εκτός από την διέγερση με τον αυξητικό παράγοντα CSF-1, έγιναν επίσης πειράματα στα οποία εξετάστηκε η έκφραση του υποδοχέα του CSF-1 (CSF-1R) μετά από διέγερση με οιστραδιόλη (E2). Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν, χωρίστηκαν σε πιάτα και την ημέρα του πειράματος αντί για CSF-1 επώασθησαν με οιστραδιόλη στις εξής συγκεντρώσεις για 24 ώρες: 0 nM / 0,1nM/ 1nM /10 nM / 100nM και 1000nM. Στη συνέχεια απομονωνόθηκαν οι κυτταροπλασματικές και οι πυρηνικές πρωτεΐνες, δημιουργήθηκαν δείγματα ίσης ποσότητας πρωτεϊνών και επεξεργάστηκαν με Western Blot. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι ενάντια στον CSF-1R, την τουμπουλίνη και την Rb για τους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω στην ενότητα 1. Ακολουθούν τα αποτελέσματα για τις σειρές T47D και ZR-75 στις **εικόνες 4 και 5** αντίστοιχα. Επίσης, έγινε ποσοτικοποίηση η οποία απεικονίζεται στα γραφήματα που ακολουθούν και εκφράζεται ως ο λόγος CSF-1R/Tubulin για τα κυτταροπλασματικά και CSF-1R/Rb για τα πυρηνικά.

Τέλος, στην **εικόνα 6** φαίνεται το Western Blot μόνο για τις πυρηνικές πρωτεΐνες για τις τρεις κυτταρικές σειρές μαζί, ύστερα από διέγερση με τις δύο συγκεντρώσεις οιστραδιόλης (100nM και 1000 nM) οι οποίες είχαν τη μεγαλύτερη επίδραση και συγκριτικό διάγραμμα έκφρασης του υποδοχέα ανάμεσα στις τρεις κυτταρικές σειρές.

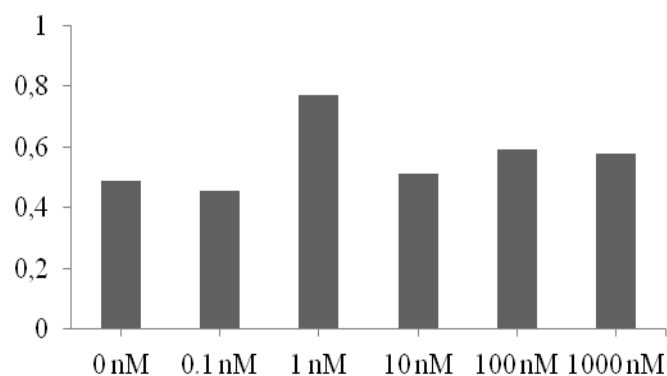
Τα πειράματα με την ταμοξιφαίνη έγιναν κανονικά, όμως δεν δούλεψαν και τα Western Blots δεν ήταν παρουσιάσιμα, για αυτό τα αποτελέσματα θα αφορούν μόνο την οιστραδιόλη.



**CSF-1R/Rb
(Πυρήνικά)**

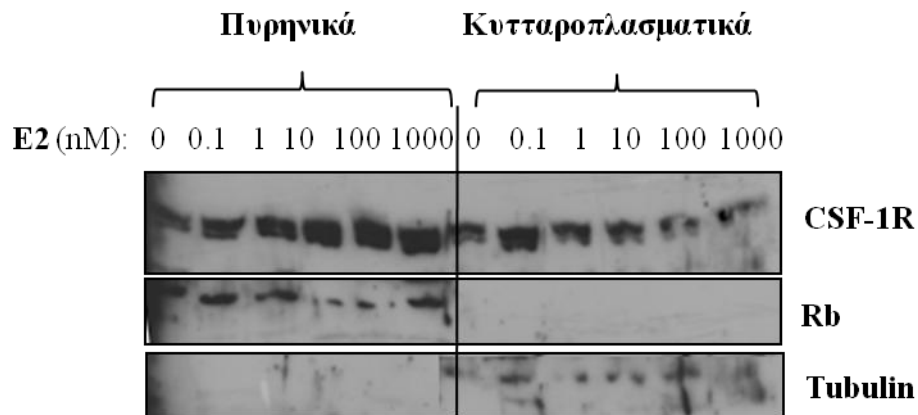


**CSF-1R/tubulin
(Κυτταροπλασματικά)**

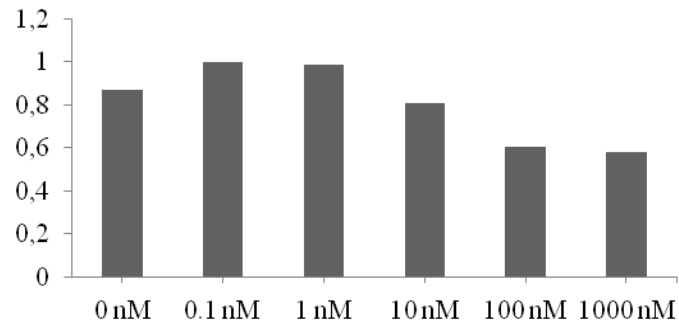


Εικόνα 4: Western Blot για τον CSF-1R, την Tubulin και την Rb, μετά από επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις οιστραδιόλης (E2) και διάγραμμα ποσοτικού προσδιορισμού της έκφρασης του υποδοχέα στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα στα T47D κύτταρα.

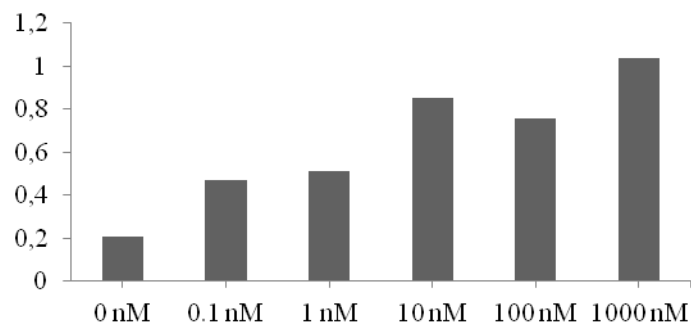
ZR-75



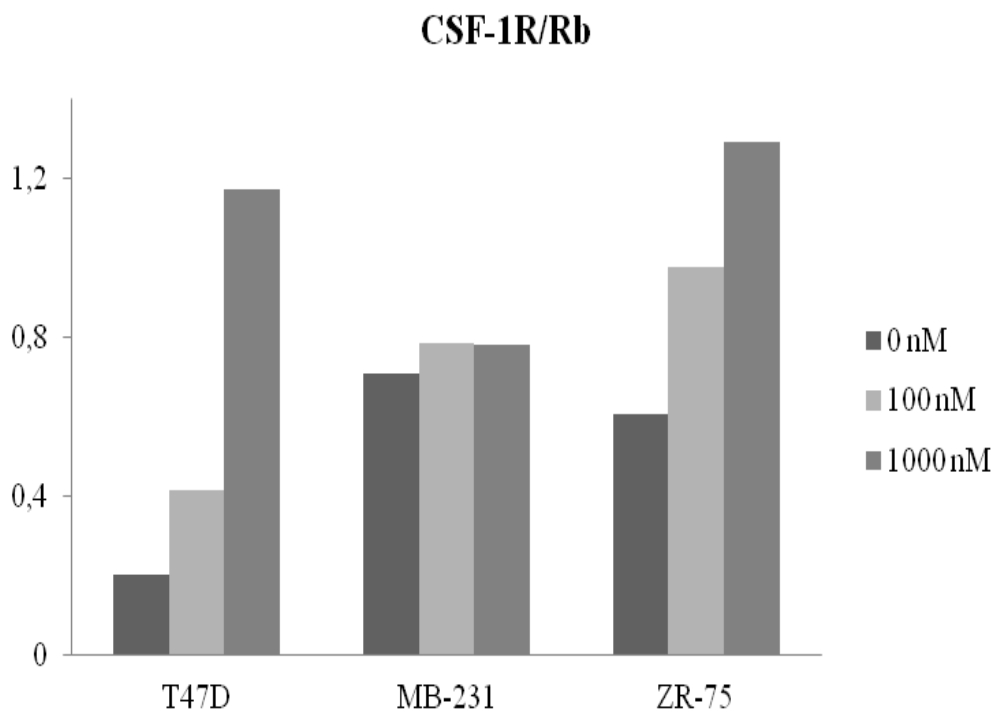
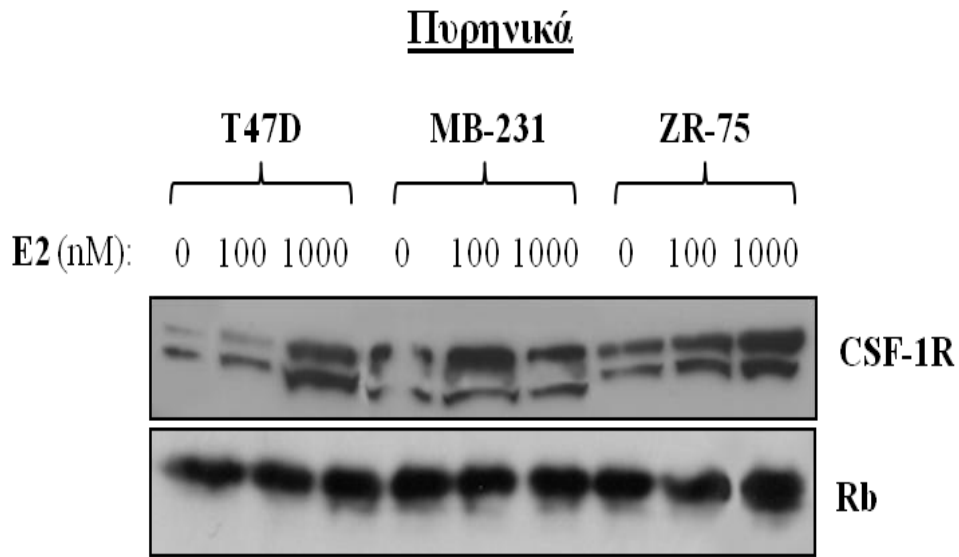
CSF-1R/tubulin
(Κυτταροπλασματικά)



CSF-1R/Rb
(Πυρηγικά)



Εικόνα 5: Western Blot για τον CSF-1R, την Tubulin και την Rb, μετά από επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις οιστραδιόλης (E2) και διάγραμμα ποσοτικού προσδιορισμού της έκφρασης του υποδοχέα στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα στα ZR-75 κύτταρα,.



Εικόνα 6: Western Blot για τον CSF-1R και την Rb, μετά από επώαση με υποδηλούμενες συγκεντρώσεις οιστραδιόλης (E2) και διάγραμμα ποσοτικού προσδιορισμού της έκφρασης του υποδοχέα στον πυρήνα και στις τρεις κυτταρικές σειρές.

Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Όσον αφορά στην κυτταρική σειρά T47D, οποιαδήποτε συγκέντρωση επίδρασης με E2 δεν επηρέασε την έκφραση του κυτταροπλασματικού CSF-1R. Η μικρή αύξηση της έκφρασης μετά από επίδραση 1 nM E2 απαιτεί ίσως περισσότερες επαναλήψεις του πειράματος για να επιβεβαιωθεί ή όχι. Αντίθετα, επίδραση 100 και 1000 nM E2 οδήγησε σε σημαντική αύξηση του πυρηνικού CSF-1R(εικόνα 4). Δεν μετρήθηκε μείωση του κυτταροπλασματικού υποδοχέα υπό την επίδραση 100 και 1000 nM E2 και συνεπώς η αύξηση του πυρηνικού υποδοχέα δεν οφείλεται σε μετακίνησή του από το κυτταρόπλασμα αλλά πιθανότατα σε αύξηση της έκφρασής του.

Στα ZR-75 κύτταρα, μετρήθηκε μικρή μείωση του κυτταροπλασματικού CSF-1R υπό την επίδραση 10 nM E2 η οποία έγινε εντονότερη υπό την επίδραση 100 και 1000 nM E2. Αντίστοιχα, παρατηρήθηκε αύξηση του πυρηνικού υποδοχέα μετά από επίδραση 10, 100 και 1000nM E2 (εικόνα 5). Συνεπώς, είναι πιθανή η μετακίνηση του CSF-1R από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα σε αυτήν τη κυτταρική σειρά.

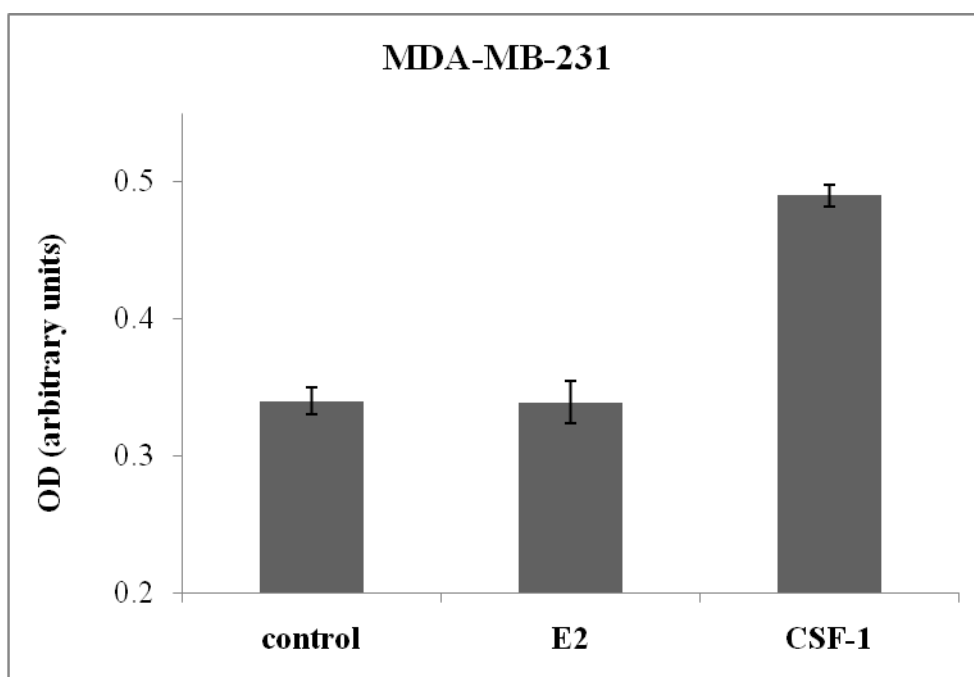
Στην εικόνα 6, φαίνεται η αλλαγή της έκφρασης του υποδοχέα και στις τρεις κυτταρικές σειρές στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης που χρησιμοποιήθηκαν σε σύγκριση πάντα με το control όπου δεν είχε προστεθεί καθόλου οιστραδιόλη. Αξίζει να σχολιασθεί πρώτα από όλα ότι στα MB-231, η έκφραση του CSF-1R δεν μεταβλήθηκε υπό την επίδραση E2 κάτι που είναι αναμενόμενο αφού τα συγκεκριμένα κύτταρα δεν εκφράζουν υποδοχείς οιστρογόνων. Για το λόγο αυτό, τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα ως αρνητικός μάρτυρας. Η έκφραση του CSF-1R φαίνεται να είναι αυξημένη υπό βασικές συνθήκες (απουσία E2) στα ZR-75 σε σχέση με τα T47D κύτταρα. Επίδραση 100nM E2 οδήγησε σε μεγαλύτερη αύξηση στον πυρηνικό CSF-1R στα ZR-75 σε σχέση με τα T47D. Αυτό όμως μπορεί να οφείλεται στο ότι στα ZR-75 πραγματοποιείται μετακίνηση του υποδοχέα από το κυτταρόπλασμα (εικόνα 5), ενώ στα T47D αύξηση της έκφρασης. Επίδραση 1000 nM E2 οδήγησε σε περαιτέρω αύξηση της ποσότητας του πυρηνικού CSF-1R και στις δύο κυτταρικές σειρές η οποία όμως ήταν παρόμοια και στις δύο κυτταρικές σειρές.

Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι η διακύμανση από την συγκέντρωση 100nM στην 1000nM ήταν σαφώς εντονότερη στα κύτταρα T47D συγκριτικά με τα ZR-75 γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο ότι,όπως αναφέρθηκε και πριν,στα T47D παρατηρείται επίδραση της συγκέντρωσης στην έκφραση του υποδοχέα,ενώ στα ZR-75 μετακίνησή του υποδοχέα από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα.

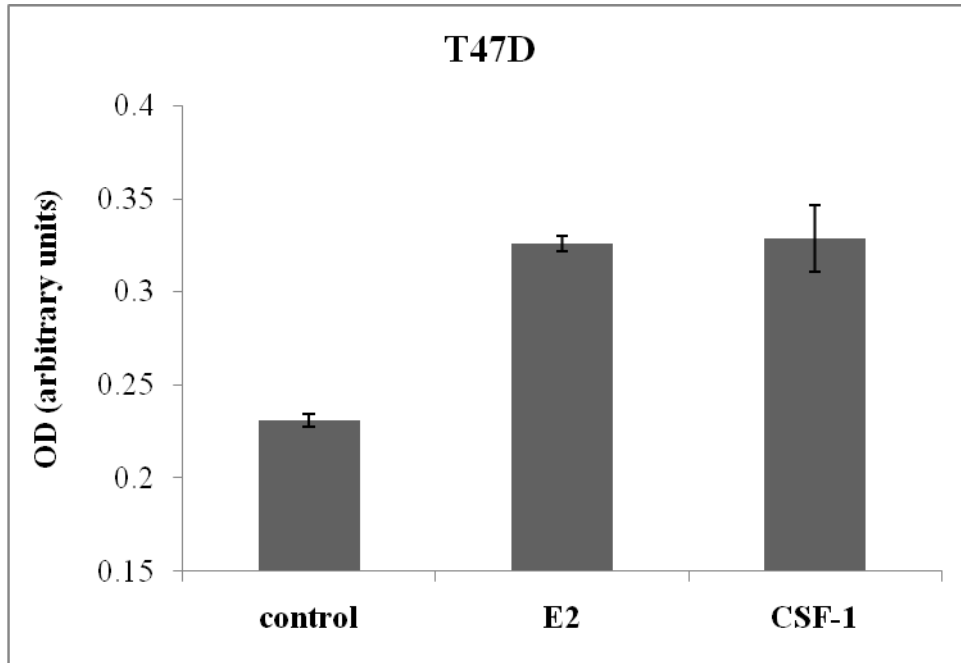
3.3 Πείραμα πολλαπλασιασμού

Τα δείγματα από τις τρεις κυτταρικές σειρές εξετάστηκαν ως προς τον ρυθμό του πολλαπλασιασμού μετά από 48 ώρες, σύμφωνα με την μέθοδο που βασίστηκε στο CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation assay της Promega. Πρόκειται για μία χρωματομετρική μέθοδο καθορισμού του αριθμού των ζώντων κυττάρων η οποία έχει αναφερθεί πιο αναλυτικά και στο κεφάλαιο ‘Υλικά και Μέθοδοι’. Η απορροφητικότητα των κυττάρων μετρήθηκε στα 490 nm, με τη χρήση ενός ELISA plate reader.

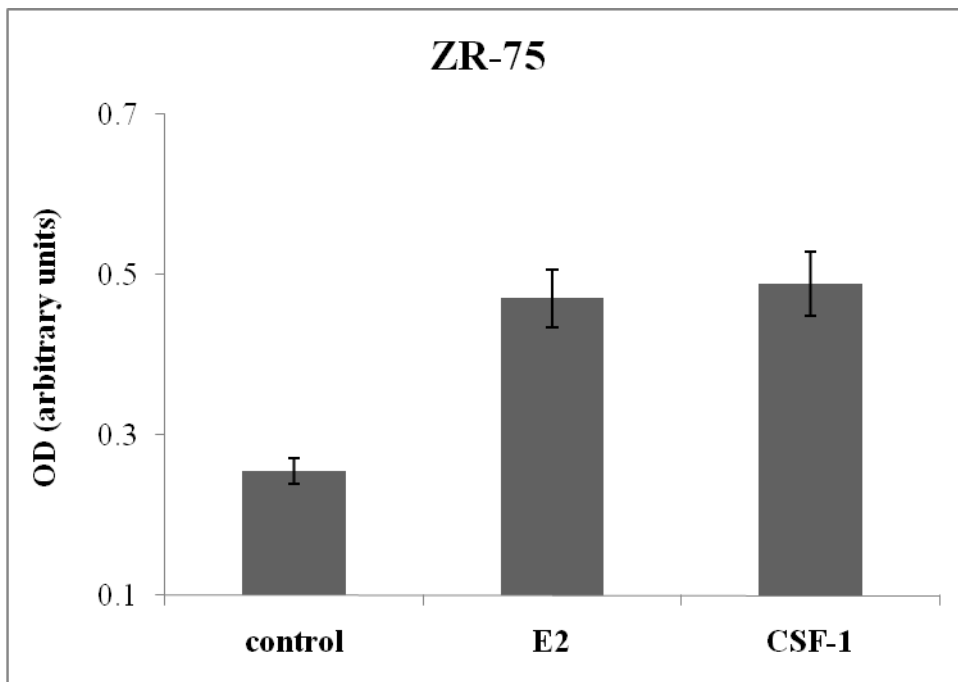
Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά για την κάθε σειρά με την μορφή διαγραμμάτων. Κάθε διάγραμμα απεικονίζει την μεταβολή του αριθμού των ζώντων κυττάρων κάθε κατάστασης (μετά από επίδραση E2 ή CSF-1) ως προς τα κύτταρα control στα οποία δεν είχε προστεθεί κανένας παράγοντας. Η **εικόνα 7** αφορά στα κύτταρα MDA-MB-231, η **εικόνα 8** στα T47D και η **εικόνα 9** στα ZR-75.



Εικόνα 7: Διάγραμμα που απεικονίζει την επίδραση της οιστραδιόλης ή του CSF-1 στον πολλαπλασιαστικό ρυθμό κυττάρων MDA-MB-231.



Εικόνα 8: Διάγραμμα που απεικονίζει την επίδραση της οιστραδιόλης ή του CSF-1 στον πολλαπλασιαστικό ρυθμό κυττάρων T47D.



Εικόνα 9: Διάγραμμα που απεικονίζει την επίδραση της οιστραδιόλης ή του CSF-1 στον πολλαπλασιαστικό ρυθμό κυττάρων ZR-75.

Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Από τα προηγούμενα διαγράμματα προκύπτουν οι ακόλουθες παρατηρήσεις. Φαίνεται ότι τα MDA-MB-231 δεν παρουσιάζουν καμία αλλαγή στον πολλαπλασιασμό τους υπό την επίδραση οιστραδιόλης (αναμενόμενο αφού δεν εκφράζουν υποδοχείς οιστρογόνων), ενώ αντίθετα παρουσιάζεται σημαντική αύξηση του πολλαπλασιασμού υπό την επίδραση CSF-1, περίπου η διπλάσια σε σχέση με τα κύτταρα control. Τα T47D δείχνουν να αυξάνονται και με την οιστραδιόλη και με τον CSF-1 με ίσως ελάχιστα μεγαλύτερη αύξηση με τον CSF-1. Τέλος, και στα ZR-75 παρουσιάζεται μια παρόμοια εικόνα, αφού και με την επίδραση της οιστραδιόλης και του CSF-1 ο ρυθμός πολλαπλασιασμού φαίνεται σημαντικά μεγαλύτερος σε σχέση με τα κύτταρα control.

4-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η διερεύνηση της έκφρασης του πυρηνικού CSF-1R σε ορμονοεξαρτώμενα και σε μη ορμονοεξαρτώμενα καρκινικά κύτταρα μαστού υπό την επίδραση CSF-1 και οιστραδιόλης παρουσία ή απουσία ταμοξιφαίνης. Τα αποτελέσματα και η συζήτηση τους θα αφορούν μόνο τον CSF-1 και την οιστραδιόλη, αφού τα πειράματα με την ταμοξιφαίνη δεν δούλεψαν.

Βέβαια πρέπει να αναφερθεί ότι ο ρόλος της ταμοξιφαίνης, όπως αναφέρεται και στην εισαγωγή, αν και φαίνεται να είναι πολύ σημαντικός, δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί πλήρως και χρειάζονται περαιτέρω πειράματα για να καθοριστεί η σχέση της όχι μόνο με την οιστραδιόλη και με τον αυξητικό παράγοντα CSF-1, αλλά και με άλλους παράγοντες που εμπλέκονται σε μονοπάτια πολλαπλασιασμού αλλά και απόπτωσης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, φάνηκε ότι ο υποδοχέας του CSF-1 εκφράζεται σε όλα σχεδόν τα καρκινικά κύτταρα μαστού στο κυτταροπλασματικό κυτταρικό κλάσμα. Η έκφρασή του βρέθηκε να είναι πολύ μεγαλύτερη στο πυρηνικό κυτταρικό κλάσμα, και μάλιστα αυξήθηκε περισσότερο μετά από διέγερση των κυττάρων με CSF-1 για περισσότερο από 4 ώρες.

Η οιστραδιόλη στην ορμονοανεξάρτητη κυτταρική σειρά MB-231, όπως ήταν αναμενόμενο λόγω του ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα δεν εκφράζουν υποδοχείς οιστρογόνων, δεν προκάλεσε κάποια διακύμανση ακόμα και στη μεγαλύτερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (1000nM). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει ότι οι μετρήσεις μας στα άλλα κύτταρα έγιναν σωστά και δεν οφείλονται σε πειραματικό λάθος. Στις ορμονοεξαρτώμενες κυτταρικές σειρές η αύξηση στην έκφραση του υποδοχέα του CSF-1 ήταν εμφανής με μεγαλύτερη απόκλιση στα T47D κύτταρα. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι στα ZR-75 κύτταρα μετρήθηκε μικρή μείωση του κυτταροπλασματικού CSF-1R με αντίστοιχη αύξηση του πυρηνικού υποδοχέα μετά από επίδραση συγκεντρώσεων 10, 100 και 1000nM E2, κάτι που καθιστά πιθανή τη μετακίνηση του CSF-1R από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα σε αυτήν τη κυτταρική σειρά. Αντίθετα στη σειρά T47D παρατηρήθηκε επίδραση της συγκέντρωσης στην αύξηση του υποδοχέα.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα του πειράματος πολλαπλασιασμού, όπου μελετήθηκε ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων ύστερα από επώαση με CSF-1 και οιστραδιόλη. Τα κύτταρα της σειράς MB-231 δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή στην οιστραδιόλη, αφού πρόκειται για μια ορμονοανεξάρτητη σειρά, όμως παρουσίασαν αύξηση μετά από την προσθήκη CSF-1.

Τα T47D έδειξαν σημαντική αύξηση στον ρυθμό πολλαπλασιασμού και στον CSF-1, αλλά και στην οιστραδιόλη γεγονός που συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες (Lee et al, 1999). Στα ZR-75 τα αποτελέσματα πάλι παρουσίασαν μια αντίστοιχη αύξηση και στους δύο παράγοντες.

Συνοπτικά από όλα τα πειράματα που διεξήχθησαν, το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι η ορμονοανεξάρτητη σειρά που μελετήθηκε παρουσίασε αύξηση μόνο στον CSF-1 και οι δύο ορμονοεξαρτώμενες και στην οιστραδιόλη και στον CSF-1. Τα αποτελέσματα, όσον αφορά στη δράση της οιστραδιόλης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, συμφωνούν με την μέχρι τώρα βιβλιογραφία.

Επίσης, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, και ο CSF-1 φαίνεται να έχει μια σχετικά πλειοτροπική συμπεριφορά και για αυτό είναι απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης που έχει όχι μόνο με την οιστραδιόλη, αλλά και με άλλους δείκτες που εμπλέκονται σε μονοπάτια πολλαπλασιασμού και επιβίωσης, όπως για παράδειγμα το μονοπάτι των PI3 κινασών.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδηλώνουν για πρώτη φορά ότι ο πυρηνικός CSF-1R θα μπορούσε να έχει την ίδια δράση με την οιστραδιόλη τόσο σε ορμονοεξαρτώμενους όσο και σε ορμονοανεξάρτητους καρκίνους. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τους ορμονοανεξάρτητους καρκίνους αφού θα μπορούσε να αποτελέσει νέο αντι-καρκινικό στόχο για τη μείωση του πολλαπλασιασμού αυτών των κυττάρων. Όσον αφορά στους ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους, θα είχε ενδιαφέρον να μελετηθεί η δράση του συνδυασμού οιστραδιόλης - CSF-1 ώστε να αποσαφηνιστεί εάν είναι προσθετική. Αυτό θα είναι ιδιαίτερα σημαντικό αφού θα υποδηλωθεί ένας νέος πιθανός στόχος επιπλέον των υποδοχέων οιστρογόνων.

5-Βιβλιογραφία

- Aamdal, S. et al. (1984). *Estrogen receptors and long-term prognosis in breast cancer. Cancer* 53, 2525-2529.
- Armitage, J. O. (1998). *Emerging applications of recombinant human Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor, Blood*, 92,4491-4508.
- Clarke, R., Dickson, R.B. & Brunner, N. (1990). *The process of malignant progression in human breast cancer. Annals of Oncology* 1, 401-407
- Curado, et al (2007).*Cancer Incidence in Five Continents, Vol. IX. IARC Scientific Publications No. 160, Lyon: IARC, 2007*
- Dickson RB, Lippman ME(1995) *Growth factors in breast cancer. Endocrine Rev* 16 ,559–589.
- Filderman AE, Bruckner A, Kacinski BM, Deng N and Remold HG (1992) *Macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) enhances invasiveness in CSF-1 receptor-positive carcinoma cell lines. Cancer Res* 52,3661–3666.
- Flick, M. B., Sapi, E., Perrotta, P. L., Maher, M. G., Halaban, R., Carter, D., and Kacinski, B. M. (1997) *Recognition of activated CSF-1 receptor in breast carcinomas by a tyrosine 723 phosphospecific antibody. Oncogene* 14, 2553–2561.
- Godolphin, W., Elwood, J.M. & Spinelli, J.J. (1981). *Estrogen receptor quantitation and staging as complementary prognostic indicators in breast cancer: a study of 583 patients. Int J Cancer* 28, 677-683.
- Hamilton, J. A. (1997) *CSF-1 signal transduction. J. Leukoc. Biol.* 62,145–155.
- Heldring, N. et al. (2007).*Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. Physiol. Rev.* 87,905–931.
- Ikeda H, Taira N, Hara F, Fujita T, Yamamoto H, et al. (2010) *The estrogen receptor influences microtubule-associated protein tau (MAPT) expression and the selective estrogen receptor inhibitor fulvestrant downregulates MAPT and increases the sensitivity to taxane in breast cancer cells. Breast Cancer Res* 12,R43.
- Kacinski BM, Scata K, Carter D, Yee L, Sapi E, King B, Chambers S, Jones M, Pirro M, Stanley ER and Rohrschneider L. (1991). *FMS (CSF-1 receptor) and CSF-1 transcripts and protein are expressed by human breast carcinomas in vivo and in vitro. Oncogene* 6, 941-952.
- Kirma N, Hammes LS, Liu YG, Nair HB, Valente PT, Kumar S, et al. (2007) *Elevated expression of the oncogene c-fms and its ligand, the macrophage colony-stimulating factor-1, in cervical cancer and the role of transforming growth factor-beta1 in inducing c-fms expression. Cancer Res* 67(5),1918–26.
- Lee AW. (1992). *Signal transduction by the colony-stimulating factor-1 receptor; comparison to other receptor tyrosine kinases. Curr. Top. Cell. Regul.* 32, 73-181.

Lee AW, Nambirajan S, Moffat JG (1999) **CSF-1 activates MAPK-dependent and p53-independent pathways to induce growth arrest of hormone-dependent human breast cancer cells.** *Oncogene*. 18, 7477–94.

Lewis-Wambi JS, Jordan VC. (2009) **Estrogen regulation of apoptosis: how can one hormone stimulate and inhibit?** *Breast Cancer Res*. 11,1–10.

Loi S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Wirapati P, Lallemand F, Tutt AM, Gillet C, Ellis P, Ryder K, Reid JF, Daidone MG, Pierotti MA, Berns EM, Jansen MP, Foekens JA, Delorenzi M, Bontempi G, Piccart MJ, Sotiriou C (2008) **Predicting prognosis using molecular profiling in estrogen receptor-positive breast cancer treated with tamoxifen.** *BMC Genomics* 9:239.

Pixley FJ, Stanley ER (2004) **CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action.** *Trends Cell Biol*. 14,628-638.

Platet,N., Cathiard,A.M., Gleizes,M. and Garcia,M. (2004) **Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion.** *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 51, 55–67.

Roussel MF. (1994). **Signal transduction by the macrophage- colony stimulating factor receptor (CSF-1R).** *J. Cell. Sci. Suppl*. 18, 105-108.

Scholl S, Pallud C, Beuvon F, Hacene K, Stanley ER, Rohrschneider L, Tang R, Pouillart P and Lidereau R. (1994). **Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis** *J. Natl. Cancer Inst*. 86, 120-126.

Tang R, Beuvon F, Ojeda M, Mosseri V, Pouillart P and Scholl S. (1992). **M-CSF and M-CSF receptor expression by breast tumour cells: M-CSF mediated recruitment of tumour infiltrating monocytes?** *J. Cell. Biochem*. 50, 350-356.

Toy EP, Azodi M, Folk NL, Zito CM, Zeiss CJ, Chambers SK (2009) **Enhanced ovarian cancer tumorigenesis and metastasis by the macrophage colony-stimulating factor.** *Neoplasia* 11(2),136-144.

Zwaenepoel O, Tzenaki N, Vergetaki A, Makrigiannakis A, Vanhaesebroeck B, Papakonstanti EA (2011) **Functional CSF-1 receptors are located at the nuclear envelope and activated via the p110 δ isoform of PI 3-kinase.** *FASEB J*. Nov 11. [Epub ahead of print]

BIBΛΙΑ

Βιοχημεία, τομ. II, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, SEL.993-994

Κοινωνία και υγεία, τομ. VI, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, σελ. 25-28.

INTERNET

www.pdb.org/pdb/101/motm.do?momID=45