ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ – Ιατρική Σχολή

Π.Μ.Σ Ογκολογίας: Από την Ογκογένεση έως τη Θεραπεία

Διπλωματική εργασία

Μελέτη της αλληλεπίδρασης της PKM2 του μεταβολικού μονοπατιού και του αντιοξειδωτικού Nrf2 στην αντίσταση στη χημειοθεραπεία με βάση την οξαλιπλατίνη και το 5FU σε καρκινικά κύτταρα.

Κωνσταντίνος Βογιατζόγλου

Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας

Ιατρική σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης

Υπεύθυνος Καθηγητής: Ιωάννης Σουγκλάκος

Επιμέλεια εργασίας: Κωνσταντίνος Βογιατζόγλου

Στην οικογένεια μου

Ευχαριστίες

Η παρούσα Πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας-Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022, υπό την επίβλεψη του Καθ. Ιωάννη Σουγκλάκο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπλ. Καθ. Ιωάννη Σουγκλάκο για την ευκαιρία που μου πρόσφερε να εργαστώ στο εργαστήριο μεταφραστικής ογκολογίας και να αποκτήσω πληθώρα γνώσεων, τόσο στα πλαίσια του παρόντος ερευνητικού έργου, όσο και συνολικά στο εργαστήριο.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον post doc Ιπποκράτη Μεσσαριτάκη για τη συνεχή στήριξη και βοήθεια που μου παρείχε, αλλά και για την στάση του απέναντι μου ως μέντορας και φίλος. Σε κάθε προβληματισμό και απορία μου, βρισκόταν εκεί για να με βοηθήσει και να με κατευθύνει και γι' αυτό τον ευγνωμονώ.

Ιδιαίτερη αφιέρωση στις ευχαριστίες θα πρέπει να έχει η φίλη μου Έμμα Δαμάσκου. Μαζί ξεκινήσαμε ως δύο άγνωστοι φοιτητές, και έπειτα από αυτό το project, με τις πολλές του ώρες εργαστηριακής δουλειάς και πειραμάτων, έχει αποκτήσει ξεχωριστή θέση στην καρδιά μου και ευελπιστώ να συνεργαστώ ξανά μαζί της στο μέλλον.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους τους συναδέλφους του εργαστηρίου, Μαρία Σφακιανάκη, Χαρά Παπαδάκη, Μαρία Παπαδάκη, Δέσποινα Αγγουράκη, Αλεξία Μοναστηριώτη, Χαρά Κουτουλάκη, Μαρία Τρυπάκη, Ελένη Πολιτάκη και Γεωργία Σαλούστρου, αλλά και τους συμφοιτητές μου, Κατερίνα Καφούση και Νεφέλη Νικολαράκου, για το φιλικό κλίμα του εργαστηρίου, την ευχάριστη διάθεση τους απέναντι μου και φυσικά για το αίσθημα της οικογένειας που πρόσφεραν καθημερινά, ακόμη και σε καιρούς που συναντούσα πολλές δυσκολίες και απώλειες στη ζωή μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τους γονείς μου: Βασίλειο Βογιατζόγλου και Γρηγορία Αργυράκη καθώς και τους θείους μου: Δήμητρα Βογιατζόγλου και Νικόλαο Βογιατζόγλου για το ενδιαφέρον και την αδιάκοπη στήριξη και βοήθεια που μου παρείχαν στο ταξίδι μου ως τώρα.

Με την παρούσα διατριβή, ολοκληρώνεται ένα σημαντικό κεφάλαιο της ζωής μου, γεμάτο γνώσεις, κατορθώματα και πολλά συναισθήματα. Πλέον, το κεφάλαιο του

‘μεταπτυχιακού φοιτητή’ φτάνει στο τέλος του και ο δρόμος για τις μετέπειτα σπουδές της διδακτορικής διατριβής απλώνεται μπροστά μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη 6

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή 8

1.1 Καρκίνος Παχέος Εντέρου 8

1.1.1 Επιδημιολογία 8

1.1.2 Παράγοντες κινδύνου καρκινογένεση 9

1.1.3 Στάδια του καρκίνου του παχέος εντέρου 13

1.1.4 Γενετική αστάθεια και θεραπεία του ΚΠΕ 18

1.2 Φαινόμενο Warburg και ο ρόλος της *PKM2* στην αερόβια γλυκόλυση, την καρκινογένεση και την απόκριση των κυττάρων στη χημειοθεραπεία 20

1.2.1 Warburg effect: ένα χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων 20

1.2.2 Ο ρόλος της *PK-M2* στο φαινόμενο Warburg και στην αντίσταση στη χημειοθεραπεία 24

1.3 Ο ρόλος του NRF2 στην απόκριση των κυττάρων σε οξειδωτικό στρες και στην καρκινογένεση 32

1.3.1 NRF2: ένας ρυθμιστής του αντιοξειδωτικού μονοπατιού των κυττάρων 32

1.3.2 Η σκοτεινή πλευρά του *Nrf2* και η σχέση του με την καρκινογένεση 36

Κεφάλαιο 2: Σκοπός και υπόθεση 40

Κεφάλαιο 3: Υλικά και Μέθοδοι 42

3.1 Υλικά 42

3.1.1 Κυτταρικές σειρές 42

3.1.2 Αναστολείς – Ενεργοποιητές των Nrf2/PKM2 43

3.2 Μέθοδοι 44

3.2.1 Καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων 44

3.2.1.1 Ξεπάγωμα καρκινικών κυττάρων 44

3.2.1.2 Σπάσιμο και συγκομιδή καρκινικών κυττάρων 45

3.2.2.1 Στρώσιμο καρκινικών κυττάρων σε plate και επώαση τους με 5FU και Oxaliplatin για εύρεση τιμής IC50 45

3.2.2.2 Μέτρηση επιβίωσης των κυττάρων (Cell Viability Assay) 45

3.2.2.3 Στρώσιμο καρκινικών κυττάρων σε φλάσκα και μεταχείριση τους με φάρμακα 46

3.2.2.4 Μονιμοποίηση καρκινικών κυττάρων σε αντικειμενοφόρους πλάκες 46

3.2.3 Πάγωμα καρκινικών κυττάρων 46

3.2.4 Τεχνική ανοσοφθορισμού σε μονιμοποιημένες κυτταρικές σειρές 47

3.2.5 Western blot 47

3.2.5.1 Protein extraction 47

3.2.5.2 Bradford ποσοτικοποίηση 48

3.2.5.3 Western Blotting 48
Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα 49
4.1 Προσδιορισμός IC50 49
4.2 Βελτιστοποίηση του ανοσοφθορισμού για τον εντοπισμό των: *PKM2*, *NRF2*, *NQO1* και *4HNE* 56
4.3 Τεχνική τριπλού ανοσοφθορισμού 57
4.3.1 Κυτταρικές σειρές χωρίς Hepes 57
4.3.2 Κυτταρικές σειρές με προσθήκη Hepes και ρυθμιστών ενεργότητας *PKM2-Nrf2* 60
4.4 Βιωσιμότητα κυττάρων (Cell Viability) 63
4.5 Bradford ποσοτικοποίηση 67
4.6 Western blot 67
Κεφάλαιο 5: Συζήτηση –Συμπεράσματα 78
Βιβλιογραφία 80
Παράρτημα Α' Κεφ. 3.1 ΥΛΙΚΑ 88
3.1.1 Αντιδραστήρια 88
3.1.2 Αναλώσιμα υλικά 89
3.1.3 Εργαστηριακός εξοπλισμός 89
3.1.4 Φαρμακευτικές ουσίες 90
Παράρτημα Β' Κεφ. 3.2 Μέθοδοι 90
3.2.1 Καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων 90
3.2.1.1 *Ξεπάγωμα καρκινικών κυττάρων* 90
3.2.1.2 *Σπάσιμο και συγκομιδή καρκινικών κυττάρων* 91
3.2.2.1 Στρώσιμο καρκινικών κυττάρων σε plate και μεταχείριση τους με 5FU και Oxaliplatin 91
3.2.2.2 *Μέτρηση επιβίωσης των κυττάρων (Cell Viability Assay)* 92
3.2.2 Πάγωμα καρκινικών κυττάρων 92
3.2.3 Τεχνική ανοσοφθορισμού σε μονιμοποιημένες κυτταρικές σειρές 92
3.2.4 Εξαγωγή ολικής πρωτεΐνης 93
3.2.5 Western blot 93

Περίληψη

Η παρούσα εργασία αφορά την μελέτη της ισομορφής Μ2 του μεταβολικού παράγοντα της πυροσταφυλικής κινάσης (*PKM2*) και του αντιοξειδωτικού πυρηνικού παράγοντα 2 (*Nrf2*). Οι δύο παραπάνω πρωτεΐνες έχουν ήδη χαρακτηρισθεί ως βασικά ρυθμιστικά μόρια του μεταβολικού φαινοτύπου των καρκινικών κυττάρων, δίχως όμως η αλληλεπίδραση τους να έχει διευκρινιστεί επαρκώς. Από τη μία πλευρά, τα καρκινικά κύτταρα που έχουν αυξημένες ενεργειακές και βιοσυνθετικές ανάγκες, απαιτούν την αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης και την αξιοποίηση της σε αναβολικές διεργασίες μέσω ενός μηχανισμού που καλείται «αερόβια γλυκόλυση» ή "Warburg effect". Σε αυτό το φαινόμενο κυρίαρχο ρόλο έχει η πυροσταφυλική κινάση *PKM2*, η οποία εμφανίζεται σε δύο κύριες στερεοδιατάξεις, ως διμερής και ως τετραμερής μορφή και συμμετέχει στο τελευταίο και καθοριστικό στάδιο της γλυκόλυσης για τη μετατροπή του φώσφο-ενολ-πυροσταφυλικό (*PEP*) σε πυροσταφυλικό. Η τετραμερής μορφή χαρακτηρίζεται από την υψηλή καταλυτική της δράση και εμπλέκεται σε καταβολικές διεργασίες, ενώ η διμερής μορφή έχει χαμηλή καταλυτική δράση και συνεισφέρει επάγοντας γλυκολυτικά μονοπάτια και έμμεσα τη σύνθεση μακρομορίων για την κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμό και την εξουδετέρωση του ενδοκυττάριου οξειδωτικού φορτίου. Όταν η *PKM2* βρίσκεται κυρίως στην διμερή μορφή της όλα τα γλυκολυτικά ενδιάμεσα πάνω από την κινάση του πυροσταφυλικού, συσσωρεύονται και είναι διαθέσιμα ως πρόδρομες ενώσεις για την βιοσυνθετική διαδικασία προκειμένου να ανταπεξέλθουν στις αυξημένες μεταβολικές τους ανάγκες. Από την άλλη πλευρά, το οξειδωτικό στρες, που προκαλείται από τη συσσώρευση οξειδωτικών ριζών οξυγόνου και αζώτου (ROS & RNS), ενδέχεται να προκαλέσει σοβαρές και μη αναστρέψιμες ενδοκυττάριες βλάβες, όπως μεταλλάξεις του γονιδιώματος, αποδιάταξη πρωτεϊνών και οξείδωση λιπιδίων που δυνητικά θα οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο. Κεντρικό μόριο του μεταβολισμού του οξειδωτικού φορτίου (redox metabolism) είναι ο πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας *Nrf2*, ο οποίος ανήκει στο ενδοκυττάριο σηματοδοτικό μονοπάτι *Nrf2-Keap1-ARE* και επάγει τη μεταγραφή αντιοξειδωτικών και αποτοξινωτικών γονιδίων. Ο *Nrf2* σε συνθήκες μειωμένου οξειδωτικού φορτίου, βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα δεσμευμένος με τον αναστολέα του *Keap1* και οδηγείται σε πρωτεασωμική αποικοδόμηση μέσω ουβικιτινιλίωσης. Μόλις το οξειδωτικό φορτίο αυξηθεί, ο *Nrf2*

αποδεσμεύεται και μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου συμμετέχει στη μεταγραφή αντιοξειδωτικών γονιδίων με την αλληλουχία *ARE* στον υποκινητή τους. Ενώ ο *Nrf2* σε πρώιμα στάδια καρκινογένεσης διατηρεί χημειοπροστατευτική δράση, σε προχωρημένα στάδια φαίνεται προσδίδει στα καρκινικά κύτταρα πλεονέκτημα επιβίωσης, επιτρέποντας την επιβίωση τους ακόμη και σε συνθήκες με υψηλό οξειδωτικό φορτίο, όπως για παράδειγμα σε έκθεση των κυττάρων σε χημειοθεραπεία ή/και ακτινοθεραπεία. Αυτό το χαρακτηριστικό, καθώς και την αυξημένη βιοσυνθετική ικανότητα μέσω του Warburg effect και της σχετιζόμενης με αυτό *PKM2*, εκμεταλλεύονται τα καρκινικά κύτταρα για να αποκτήσουν πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι των υγιών. Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση πιθανής αλληλεπίδρασης μεταξύ *PKM2* και *Nrf2* και τα αποτελέσματα αυτής στην αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα Oxaliplatin και 5FU. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τεχνικές κυτταροκαλλιέργειας και μέτρηση επιβίωσης των κυττάρων (Cell Viability Assay). Αναδείχθηκαν οι βέλτιστες συγκεντρώσεις των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων σε κυτταρικές σειρές καθώς και η επίδραση τους σε αυτές απαγωγέων και αναστολέων των *PKM2-Nrf2* (HT-29, LoVo, CoLo205, SW480, CCD112, A549 και SKOV3). Στην πορεία, τεχνικές ανοσοκαθήλωσης ,όπως ο ανοσοφθορισμός, έδωσαν χρήσιμες πληροφορίες για την υποκυτταρική εντόπιση των πρωτεϊνών *Nrf2, PKM2* και άλλων σχετιζόμενων πρωτεϊνών, αλλά και την “cross – talk” σχέση τους πριν και μετά τη χορήγηση θεραπείας, ενώ η πληροφορία για την ποσοτική μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος λήφθηκε από την τεχνική Western blot.

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

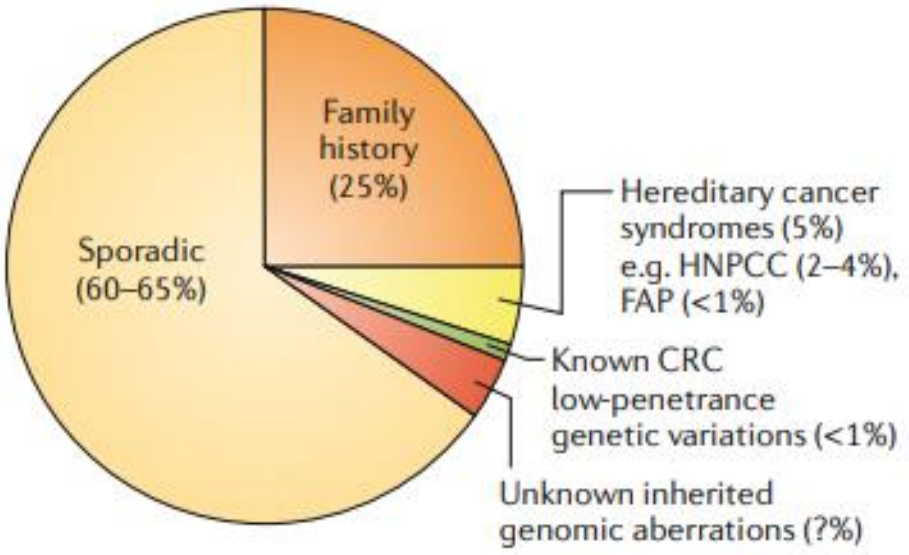
1.1 Καρκίνος Παχέος Εντέρου

1.1.1 Επιδημιολογία

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (ΚΠΕ) αφορά νεοπλασία που περιλαμβάνει το κόλον και το ορθό. Ο ΚΠΕ αποτελεί την τρίτη σε συχνότητα νεοπλασία, την δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο και προκύπτει μέσα από τρεις κύριες οδούς καρκινογένεσης, συμπεριλαμβανομένης της αλληλουχίας αδενώματος – καρκινώματος, της οδοντωτής οδού και της φλεγμονώδους οδού.[1]

Το μεγαλύτερο ποσοστό των ΚΠΕ (>90%) αφορά αδενοκαρκίνωμα, το οποίο αναπτύσσεται από αδενικά επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου και του ορθού, έπειτα από συσσώρευση γενετικών και επιγενετικών μεταλλάξεων, σε βάθος χρόνου δεκαετιών.[2] Άλλοι, σπάνιοι τύποι ΚΠΕ, περιλαμβάνουν το αδενοπλαστικό, το ακανθοκυτταρικό, το αδιαφοροποίητο και το ατρακτοκυτταρικό καρκίνωμα, που συνοψίζουν το υπόλοιπο 10% των περιπτώσεων.[3] Περίπου το 60-65% των περιπτώσεων ΚΠΕ είναι σποραδικές. Αυτό σημαίνει ότι εμφανίζονται σε άτομα χωρίς οικογενειακό ιστορικό ΚΠΕ ούτε έχουν κληρονομήσει γενετικές μεταλλάξεις που σχετίζονται με τη νόσο. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η νόσος προέκυψε μέσω επίκτητων μεταλλάξεων και γενετικών αλλοιώσεων σε σωματικά κύτταρα.[4] Το 35 – 40% των περιπτώσεων ΚΠΕ αφορά καρκινογένεση με κληρονομήσιμα χαρακτηριστικά εμφάνισης. Από αυτό το ποσοστό, περίπου το 25% των ασθενών έχουν οικογενειακό ιστορικό ΚΠΕ, χωρίς όμως να εμφανίζουν κάποιο καρκινικό σύνδρομο,[2] ενώ μόνο το 5% αποδίδεται σε κληρονομικά καρκινικά σύνδρομα όπως ο κληρονομικός μη-πολυποδισιακός καρκίνος του παχέος εντέρου (HNPCC, ή αλλιώς Lynch σύνδρομο) με ποσοστό εμφάνισης 2-4% ή ο οικογενής αδενωματώδης πολύποδας (FAP με ποσοστό εμφάνισης 1%). Σε αυτά τα σύνδρομα παρουσιάζονται κληρονομικές μεταλλάξεις βλαστικής σειράς σε σπάνιες αλλά υψηλής ευαισθησίας διείσδυσης γονίδια.[4] Τέτοιου είδους γονίδια, για το Lynch σύνδρομο, με σειρά συχνότητας μεταλλαξιογένεσης είναι τα *MSH2, MLH1, MSH6* και *PMS2*, ενώ για το FAP, το κύριο εμπλεκόμενο γονίδιο είναι το *APC*.[4]

Τέλος, γονίδια χαμηλής διείσδυσης που σχετίζονται με κίνδυνο πρόκλησης ΚΠΕ, αφορούν λιγότερο του 1%, ενώ στην πρόκληση της νόσου, ενδέχεται να εμπλέκονται και άλλα γονίδια σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς παράγοντες [1], όπως συνοψίζονται στην εικόνα 1.



Εικ1: Ποσοστό εμφάνισης ΚΠΕ που σχετίζεται με σποραδικούς (60-65%) ή με κληρονομικούς (35-40%) παράγοντες.[1]

1.1.2 Παράγοντες κινδύνου καρκινογένεση

Η συχνότητα εμφάνισης του ΚΠΕ τείνει να αυξηθεί, ιδίως στις αναπτυσσόμενες χώρες που υιοθετούν τον «δυτικό» τρόπο ζωής.[5] Ο ΚΠΕ συνήθως ξεκινά από τον πολλαπλασιασμό επιθηλιακών κυττάρων του βλεννογόνου, περνώντας από το στάδιο αδενώματος ή πολυπόδων, οι οποίοι μπορούν σε βάθος χρόνου 10-20 ετών, να οδηγήσουν σε καρκινογένεση.[6] Ο πολύποδας προέρχεται από κοκκιώδη κύτταρα, τα οποία φυσιολογικά παράγουν βλέννη η οποία διατρέχει όλο το παχύ έντερο. Από αυτούς τους πολύποδες, μόνο το 10% περίπου θα οδηγήσει σε διηθητικό καρκίνο, ωστόσο η πιθανότητα καρκινικής εξαλλαγής αυξάνεται με την αύξηση του μεγέθους του πολύποδα. Ο ΚΠΕ προερχόμενος από πολύποδες ονομάζεται αδενοκαρκίνωμα,

αποτελεί το 96% των περιπτώσεων και καθώς αναπτύσσεται στο τοίχωμα του παχέος εντέρου ή του ορθού, μπορεί να διεισδύσει στα αιμοφόρα ή στα λεμφικά αγγεία και να οδηγήσει σε απομακρυσμένες μεταστάσεις σε άλλα όργανα ή λεμφαδένες.[5] Παρόλο που η πιθανότητα εμφάνισης ΚΠΕ αυξάνεται με την ηλικία, ο τρόπος ζωής των ασθενών αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην καρκινογένεση. Πιο συγκεκριμένα, συνήθειες όπως το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, η αυξημένη κατανάλωση κόκκινου κρέατος αποτελούν κινητήριους παράγοντες πίσω από την ανάπτυξη της νόσου.[5,6] Παρόλο που υπάρχει συνεχής εξέλιξη σε προληπτικούς ελέγχους για έγκαιρη ανίχνευση της νόσου και νέες θεραπευτικές αγωγές, ο τρόπος ζωής των ανθρώπων παίζει μεγάλο ρόλο στην εμφάνιση ή μη μιας ασθένειας, όπως περιγράφεται παρακάτω. Τέτοιου είδους επιλογές διατροφής και τρόπου ζωής, αλληλεπιδρούν άμεσα με την εντερική μικροχλωρίδα, επηρεάζοντας τη σύσταση της, η οποία με τη σειρά της, μέσω χρόνιας φλεγμονής, μπορεί να προωθήσει μια ανοσολογική απόκριση και να διευκολύνει την ανάπτυξη πολυπόδων και τη μετατροπή σε καρκίνο.[7] Σε αυτά τα πλαίσια, μπορούν να ληφθούν προληπτικά μέτρα προστασίας, ιδίως στα άτομα με κληρονομική προδιάθεση για νεοπλασία, μέσω γενετικού ελέγχου και καλύτερης τεκμηρίωσης του οικογενειακού ιστορικού τους.[5]

i) <u>Φυλή και εθνικότητα:</u> Σε μελέτη που αφορά τον πληθυσμό των ΗΠΑ έχει δειχθεί ότι Αφροαμερικανοί και οι ιθαγενείς της Αμερικής έχουν υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης ΚΠΕ με ταυτόχρονη μικρότερη ολική επιβίωση, σε αντίθεση με Ισπανο-αμερικανούς και λευκούς Αμερικάνους. Αυτές οι διαφορές μεταξύ των διαφόρων φυλών πιθανότατα οφείλονται σε ανισότητες στην πρόσβαση στην υγειονομική περίθαλψη, προληπτικούς ελέγχους και εισόδημα παρά σε γενετικούς παράγοντες.[8]

ii) <u>Φύλο και Ηλικία:</u> Αναφορικά με τον ΚΠΕ, οι άντρες παρουσιάζουν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης της νόσου, κατά μιάμιση φορά περίπου, ανεξαρτήτου ηλικίας. Ωστόσο, οι γυναίκες φαίνονται πιο επιρρεπείς στη νόσο, με μεγαλύτερα ποσοστά εμφάνισης στο δεξί κόλον, το οποίο χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη επιθετικότητα και πιο χαμηλά ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με το αριστερό κόλον.[9] Εντούτοις, συνολικά φαίνεται ότι η πιθανότητα διάγνωσης ΚΠΕ αυξάνεται με την ηλικία. Αναφορικά, άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών, έχουν περίπου τριπλάσια πιθανότητα να εμφανίσουν ΚΠΕ συγκριτικά με ηλικίες 50-64 ετών και περίπου 30 φορές

μεγαλύτερη πιθανότητα σε σχέση με νέους ανθρώπους ηλικίας 25-49 ετών.[9]

iii) Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (IBD): Ένας ακόμη παράγοντας κινδύνου για ΚΠΕ είναι η χρόνια φλεγμονώδης νόσος (IBD). Η IBD είναι φλεγμονή στο παχύ έντερο που διαρκεί για μεγάλες χρονικές περιόδους και ασθενείς με αυτή τη νόσο έχουν διπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης ΚΠΕ. Η χρόνια φλεγμονή οδηγεί στην ανώμαλη απελευθέρωση αυξητικών κυτοκινών, αυξημένη ροή αίματος και παραγωγή μεταβολικών ελεύθερων ριζών και λοιπών παραγόντων που ευνοούν την καρκινογένεση. Οι δύο κύριες αιτίες της IBD είναι η ελκώδης κολίτιδα και η νόσο του Crohn. Η ελκώδης κολίτιδα χαρακτηρίζεται από φλεγμονή και έλκη στο παχύ έντερο και εμφανίζεται ως αυτοάνοση διαταραχή, η οποία ακολουθεί ιογενή ή βακτηριακή λοίμωξη με κληρονομικό χαρακτήρα. Ενώ, τα ακριβή αίτια της νόσου παραμένουν ακόμη άγνωστα, έχει δειχθεί ότι οι διατροφικές συνήθειες, το άγχος και η έλλειψη άσκησης επιδεινώνουν την κατάσταση.[10] Από την άλλη πλευρά, η νόσος του Crohn, παρουσιάζεται ως αυτοάνοσο φλεγμονώδες νόσημα με μερικώς κληρονομικό χαρακτήρα, βαθύτερη διεισδυτική φλεγμονή και έλλειψη ελκών. Τόσο η ελκώδης κολίτιδα, όσο και η νόσος του Crohn έχουν μεγαλύτερη και συνεχώς αυξανόμενη συχνότητα κυρίως στις ανεπτυγμένες χώρες.[10]

iv) Ιστορικό κοιλιακής ακτινοβολίας: Σε επιζώντες από παιδιατρικό καρκίνο που είχαν λάβει κοιλιακή ακτινοβολία, έχει βρεθεί αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης ΚΠΕ κατά την ενήλικη ζωή. Πιο συγκεκριμένα, έχει σημειωθεί σαφές αποτέλεσμα δόσης – απόκρισης ακτινοβολίας στον κίνδυνο εμφάνισης ΚΠΕ, με την πιθανότητα καρκινογένεσης να αυξάνεται κατά 70% για κάθε Gy δόσης ακτινοβολίας.[11]

v) Παχυσαρκία και σωματική αδράνεια: Δύο από τους πιο σημαντικούς παράγοντες κινδύνου στην ανάπτυξη ΚΠΕ είναι η παχυσαρκία και η έλλειψη γυμναστικής. Μελέτες έχουν δείξει ότι η τακτική σωματική άσκηση μπορεί να μειώσει την πιθανότητα για ΚΠΕ έως και 25%. Αντιθέτως, άτομα με καθιστική ζωή διατρέχουν 50% μεγαλύτερη πιθανότητα πρόκλησης ΚΠΕ και παράλληλα εμφανίζουν πιο συχνή τάση για παχυσαρκία. Με την παχυσαρκία από την άλλη πλευρά, διαταράσσεται η φυσιολογική μικροχλωρίδα του εντέρου και προκαλούνται χρόνιες

φλεγμονές στο εντερικό επιθήλιο, προάγοντας έτσι την καρκινογένεση. Έχει βρεθεί ότι υπάρχει 50% αυξημένος κίνδυνος ΚΠΕ και 20% για καρκίνο του ορθού σε παχύσαρκους άντρες, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά επικινδυνότητας στις γυναίκες είναι 20% και 10%.[12]

vi) Διατροφικές συνήθειες: Η διατροφή παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ή μη του ΚΠΕ. Οι διατροφικές συνήθειες ενός ανθρώπου έχουν σημαντική επίδραση, θετική ή αρνητική, στη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου, όπου τα βακτήρια υπερτερούν έναντι των ανθρώπινων κυττάρων κατά δέκα φορές. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, στον εντερικό αυλό βρίσκονται περισσότερα μικροβιακά από ότι ανθρώπινα κύτταρα. Αυτό το γεγονός υποδεικνύει την αναγκαιότητα της ποικιλομορφίας στην εντερική μικροχλωρίδα, στην οποία επιφέρουν επιπτώσεις τα διάφορα τρόφιμα. [13] Για παράδειγμα, το κόκκινο και το επεξεργασμένο κρέας μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο για ΚΠΕ, μέσω της μεταβολής στη σύσταση των βακτηριακών στελεχών. Το κόκκινο κρέας, ιδίως εκείνο που προέρχεται από ζώο που τρεφόταν με δημητριακά, είναι πλούσιο σε λιπαρά, όπως τα ωμέγα-6, τα οποία προωθούν την καρκινογένεση μέσω χρόνιας φλεγμονής. Επίσης, τρόφιμα που έχουν επεξεργαστεί, όπως τα παστά, τα καπνιστά και τα τρόφιμα που έχουν μαγειρευτεί σε υψηλή θερμοκρασία, φαίνεται ότι επίσης προωθούν την καρκινογένεση. Αντιθέτως, τρόφιμα που περιέχουν ασβέστιο, φυτικές ίνες, βιταμίνη D όπως επίσης και τα φρούτα και λαχανικά, μειώνουν την πιθανότητα εμφάνισης ΚΠΕ.[13]

vii) Κάπνισμα: Το κάπνισμα έχει χαρακτηρισθεί ως η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο, ιδίως στον καρκίνο του πνεύμονα και της ουροδόχου κύστης. Ο αντίστοιχος κίνδυνος ΚΠΕ υπολογίζεται στο 1,18. Το κάπνισμα συσχετίζεται περισσότερο με τον καρκίνο του ορθού και προκαλεί μια σειρά από γενετικές και μοριακές ανωμαλίες όπως είναι μετάλλαξη στο γονίδιο *BRAF* υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια και μεθυλίωση CpG νησίδων.[14]

viii) Αλκοόλ: Το αλκοόλ έχει επίσης συσχετιστεί με αύξηση της πιθανότητας καρκινογένεσης. Κατανάλωση αλκοόλ, μεγαλύτερη από μία μερίδα την ημέρα, αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ΚΠΕ. Άτομα που καταναλώνουν 2-3 αλκοολούχα ποτά ημερησίως, έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΚΠΕ κατά 20%, ο οποίο αυξάνεται στο 40% για ημερήσια κατανάλωση

άνω των τριών ποτών. Αυτό το φαινόμενο εμφανίζεται ισχυρότερα στους άνδρες, ενδεχομένως λόγω ορμονικών παραλλαγών στον μεταβολισμό του αλκοόλ.[15]

ix) Λήψη φαρμάκων: Η μακροχρόνια χρήση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, όπως η ασπιρίνη, έχει βρεθεί ότι μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης ΚΠΕ και οι ασθενείς που εμφάνισαν τη νόσο παρουσιάζουν λιγότερο επιθετικούς όγκους και μεγαλύτερη επιβίωση. Περαιτέρω συνδυασμός με ατορβαστατίνη, η οποία έχει χημειοπροληπτικά αποτελέσματα έναντι του ΚΠΕ, μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης ΚΠΕ κατά 62%, ενώ μειώνει κατά 80-85% τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων στο παχύ έντερο, όπως προέκυψα μετά από πειράματα σε αρουραίους. Ο συνδυασμός των δύο φαρμάκων εμφανίζει καλύτερα αποτελέσματα από ότι το κάθε φάρμακο μόνο του, ωστόσο αποτυγχάνει να αναστείλει την πρόοδο σε άτομα με προχωρημένο ΚΠΕ.[16]

1.1.3 Στάδια του καρκίνου του παχέος εντέρου

Όπως προαναφέρθηκε, ο ΚΠΕ συνήθως ξεκινάει από καλοήθη πολύποδα, με την πάροδο του χρόνου μετατρέπεται σε προχωρημένο αδένωμα υψηλού βαθμού δυσπλασίας και καταλήγει σε διηθητικό καρκίνωμα.[6,17] Περιπτώσεις ασθενών σταδίου Ι και ΙΙ, όπου τα καρκινικά κύτταρα περιορίζονται εντός του τοιχώματος του παχέος εντέρου παρουσιάζουν αυξημένα ποσοστά επιβίωσης. Ωστόσο, εάν η νόσος δεν αντιμετωπιστεί εγκαίρως και προχωρήσει σε περιφερειακούς λεμφαδένες (στάδιο ΙΙΙ) ή σε απομακρυσμένες μεταστάσεις (στάδιο IV), τα ποσοστά επιβίωσης μειώνονται δραματικά.[18] Όγκοι σταδίου Ι και ΙΙ συνήθως θεραπεύονται μόνο με χειρουργική εκτομή. Ασθενείς σταδίου ΙΙΙ έχουν ποσοστά επιβίωσης 73% όταν λάβουν συμπληρωματική χημειοθεραπεία με 5FU και Oxaliplatin έπειτα από το χειρουργείο, ενώ όγκοι σταδίου IV είναι συνήθως ανίατοι παρά την πρόοδο των

θεραπευτικών αγωγών .[18] Η ταξινόμηση των όγκων του παχέος εντέρου κατά TNM (Tumor, Lymph Node, Metastasis) αναγράφονται στον Πίνακα 1.

TNM edition	T stage	N stage	M stage
5th edition			
I	T1 or T2	N0	M0
II	T3 or T4	N0	M0
III	Any T	N1	M0
IV	Any T	Any N	M1
6th edition			
I	T1 or T2	N0	M0
IIa	T3	N0	M0
IIb	T4	N0	M0
IIIa	T1 or T2	N1	M0
IIIb	T3 or T3	N1	M0
IIIc	Any T	N2	M0
IV	Any T	Any N	M1

Πίν.1: Σταδιοποίηση του καρκίνου του παχέος εντέρου κατά American joint committee of cancer (TNM), 5η και 6η έκδοση.

Η πρόοδος της νόσου, από αδενοματώδη πολύποδα έως διηθητικό καρκίνωμα προωθείται από την απώλεια γονιδιωματικής σταθερότητας και τη συσσώρευση μεταλλάξεων σε γονίδια κλειδιά. Η απώλεια της γονιδιωματικής σταθερότητας προωθεί την καρκινογένεση επιτρέποντας τη μετάλλαξη πολλών γονιδίων που σχετίζονται με τον όγκο.[18] Μέρος της γονιδιωματικής αστάθειας είναι και η χρωμοσωμική αστάθεια, η οποία προκαλεί αλλαγές στη δομή και τον αριθμό των χρωμοσωμικών αντιγράφων.[18] Με αυτόν τον τρόπο χάνεται η λειτουργία διαφόρων γονιδίων, τα οποία φυσιολογικά σταματούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αυτά τα γονίδια ονομάζονται “ογκοκατασταλτικά” και ο ρόλος τους είναι να αντιτίθενται στον κακοήθη φαινότυπο. Τρία από τα πιο πολυσύχναστα ογκοκατασταλτικα γονίδια που μεταλλάσσονται στον ΚΠΕ είναι τα *APC, P53* και *SMAD 4*.[17,18]

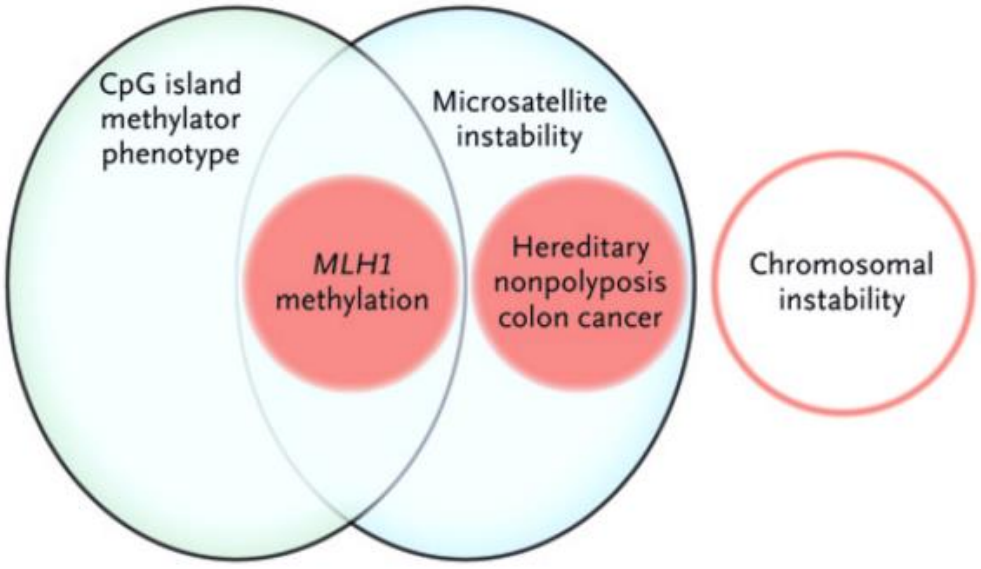
Μία άλλη υποκατηγορία γονιδίων που σχετίζονται με την καρκινογένεση είναι αυτά που ανήκουν σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA, όπως ο μηχανισμός MMR. Απώλεια λειτουργίας σε αυτά τα γονίδια μπορεί είτε να κληρονομηθεί, όπως συμβαίνει στο FAP και Lynch σύνδρομο, είτε να προκληθούν κατά την πορεία της

ζωής του ανθρώπου, συνήθως μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή.[17] Σε ασθενείς με Lynch σύνδρομο τα ποσοστά λειτουργικής απώλειας για κάθε γονίδιο κλειδί είναι 42-50% για το *MLH1*, 33-39% για το *MSH2*, 7-18% για το *MHS6* και λιγότερο από 7% για το *PMS2*.[19] Για ασθενείς με ανεπαρκή μηχανισμό επιδιόρθωσης (κυρίως με ανενεργά *MLH1* και *MSH2*) έχουν ποσοστά εμφάνισης ΚΠΕ περίπου 80% σε ηλικία 45 ετών.[17] Η απώλεια του επιδιορθωτικού μηχανισμού MMR, μπορεί να αναγνωριστεί μέσω του φαινομένου της μικροδορυφορικής αστάθειας. Κατά τη μικροδορυφορική αστάθεια παρουσιάζεται αδυναμία επιδιόρθωσης σε επαναλαμβανόμενα μονονουκλεοτιδικών ή δινουκλεοτιδικών μοτίβα DNA, γνωστά ως μικροδορυφόροι, που βρίσκονται διάσπαρτα σε όλο το γονιδίωμα.[18] Η μελέτη της δραστικότητας του MMR μηχανισμού μέσω της μικροδορυφορικής αστάθειας επιτυγχάνεται επίσης με ανοσοϊστοχημικέ αναλύσεις.[18] Συνήθη ογκοκατασταλτικά γονίδια που μεταλλάσσονται, όταν ο μηχανισμός MMR δυσλειτουργεί, είναι τα *TGF-β, TGFBR2* και το *BAX*, καθώς στην αλληλουχία τους εδράζονται μονονουκλεοτιδικές ή δινουκλεοτιδικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες.[17]

Μία εναλλακτική πορεία για τον ΚΠΕ περιλαμβάνει το γονίδιο *mutY* (ή αλλιώς *MYH*) του επιδιορθωτικού μηχανισμού εκτομής βάσης (Base Excision Repair – BER).[20] Ρόλος της πρωτεΐνης *MYH* είναι να αφαιρεί από το DNA την οξειδωμένη μορφή της γουανίνης, την 8-οξογουανίνης.[20] Άτομα ομόζυγα για το μεταλλαγμένο γονίδιο του *mutY*, σε κύτταρα βλαστικής σειράς, αναπτύσσουν πολύποδες και έχουν 100% πιθανότητα για ΚΠΕ μέχρι την ηλικία των 60 ετών.[20] Οι πιο συχνές μεταλλάξεις που αφορούν το γονίδιο του *MYH* είναι στα κατάλοιπα Y165C και G382D που μαζί αποτελούν το 85% των περιπτώσεων. Αναφορικά με τον ΚΠΕ δεν έχει ανιχνευθεί σωματική αδρανοποίηση του *MYH*, ενώ περίπου το ένα τρίτο των ατόμων με περισσότερα από 15 αδενώματα, έχουν πολυποδίαση που σχετίζεται με το γονίδιο αυτό.[20]

Προώθηση της καρκινογένεσης στον εντερικό αυλό σχετίζεται επίσης και με τη μεθυλίωση του DNA. Μέσω της ανώμαλης μεθυλίωσης του DNA, επιτυγχάνεται επιγενετική αποσιώπηση γονιδίων με κεντρικό ρόλο στην καρκινογένεση.[21] Κατά το φαινόμενο αυτό, μία από τις βασικές βάσεις του DNA, η κυτοσίνη, δέχεται μία μεθυλομάδα στον πέμπτο άνθρακα και μετατρέπεται σε μεθυλο-κυτοσίσει (5-μεθυλκυτοσίνη).[21] Η μέθυλοκυτοσίνη ορίζεται ως η πέμπτη βάση του DNA και απαντάται σε περιοχές δινουκλεοτιδίων CpG. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η μεθυλίωση του DNA εμφανίζεται σε επαναλαμβανόμενες περιοχές του γονιδιώματος

εκτός εξωνίων. Εντούτοις, σε ασθενείς με ΚΠΕ, παρουσιάζεται έντονη μεθυλίωση σε CpG νησίδες εντός των υποκινητών γονιδίων που σχετίζονται με τη νόσο. Η ανώμαλη μεθυλίωση προκαλεί επιγενετική σίγαση της γονιδιακής έκφρασης γονιδίων, όπως το *MLH1*, όπως συμβαίνει στον ΚΠΕ.[21] Το φαινόμενο μεθυλίωσης CpG νησίδων ονομάζεται CIMP (CpG island methylator phenotype). Παρόλο που ο μοριακός μηχανισμός για το CIMP παραμένει άγνωστος, έχει βρεθεί ότι σε ασθενείς με ΚΠΕ παρατηρείται στο 15% περίπου των περιπτώσεων και από αυτούς σχεδόν όλοι έχουν ανώμαλη μεθυλίωση του *MLH1*.[21]
Η σχέση μεταξύ μεθυλίωσης CpG νησίδων, μικροδορυφορικής αστάθειας και των αποτελεσμάτων τους στο γονίδιο *MLH1* και στον κληρονομικό μη-πολυποδισιακό ΚΠΕ απεικονίζονται στην εικόνα 2.

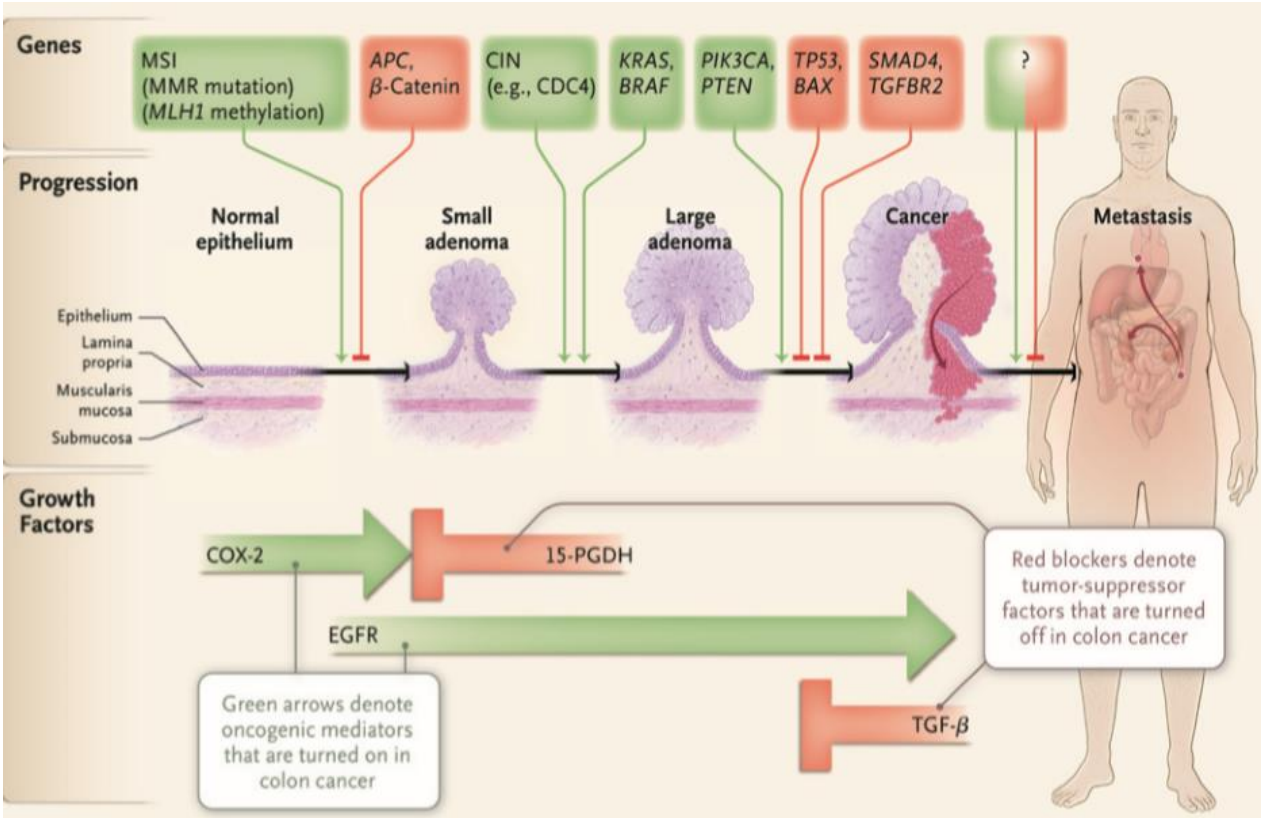


Εικ.2: Αλληλεπικαλυπτόμενες σχέσεις που καθορίζουν τις κύριες οδούς γονιδιωματικής αστάθειας σε καρκίνους του παχέος εντέρου: χρωμοσωμική αστάθεια, μικροδορυφορική αστάθεια που προκαλείται από μεταλλάξεις σε γονίδια επιδιόρθωσης του DNA, που είτε κληρονομούνται μέσω βλαστικής σειράς (π.χ. σε κληρονομικό μη πολυποδισιακό καρκίνο του παχέος εντέρου) ή σωματικά επίκτητα (π.χ. με ανώμαλη μεθυλίωση και επιγενετική σίγαση του *MLH1*), και ο φαινότυπος μεθυλίωσης νησίδας CpG.[18]

Ακόμη μία οδός καρκινογένεσης που αφορά τον ΚΠΕ, είναι η αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων μέσω μετάλλαξης. Μία από αυτές τις αλλαγές, αφορά το σηματοδοτικό μονοπάτι *Wnt* που θεωρείται ως το συμβάν έναρξης του ΚΠΕ.[17] Η σηματοδότηση *Wnt* ξεκινά με την δέσμευση της ογκοπρωτεΐνης β-κατενίνη σε πυρηνικούς εταίρους (μέλη της οικογένειας παραγόντων Τ-λεμφοκυττάρου-παράγοντα ενισχυτή λεμφοκυττάρων). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός

μεταγραφικού παράγοντα που εμπλέκεται στην κυτταρική ενεργοποίηση.[17] Τα επίπεδα έκφρασης της β-κατενίνης ελέγχονται από την πρωτεΐνη *APC*, η οποία δρα μέσω πρωτεόλυσης της β-κατενίνης και αναστολή του πυρηνικού εντοπισμού της. Αποσιώπηση του γονιδίου του *APC* και υπερενεργοποίηση του μονοπατιού *Wnt*, αποτελούν το πρώτο βήμα για την εμφάνιση ΚΠΕ.[17] Το δεύτερο βήμα στην εμφάνιση του ΚΠΕ είναι η μετάλλαξη του γονιδίου *TP53*, που εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 και η αδρανοποίηση της αντίστοιχης οδού της *p53*.[17] Στις περισσότερες περιπτώσεις, έπειτα από μετάλλαξη στο ένα αλληλόμορφο του *TP53*, αδρανοποιείται και το δεύτερο μέσω ανασυνδυασμού και 17p χρωμοσωμικής διαγραφής.[17]

Τέλος, στην ανάπτυξη του ΚΠΕ, σημαντικό ρόλο παίζουν τα πρώτο-ογκογονίδια. Μεταλλάξεις σε γονίδια με κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση της μίτωσης μέσω σηματοδότησης πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK), αφορούν τα *RAS* και *BRAF* με συχνότητα εμφάνισης 37% και 13% αντίστοιχα.[22] Η πρωτεΐνη Ras, που έχει ενεργότητα GTPase, ενεργοποιεί την *Raf* η οποία έχει δραστηριότητα κινάσης σερίνης-θρεονίνης και προωθεί περαιτέρω τον καταρράκτη σηματοδότησης MAPK.[22] Μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRAF* εμφανίζονται πιο συχνά από το *Ras* σε υπερπλαστικούς πολύποδες, οδοντωτούς αδενώματα και εγγύς ΚΠΕ και κυρίως όταν εμφανίζεται το φαινόμενο CIMP.[18] Ένας άλλος παράγοντας που σχετίζεται με τον ΚΠΕ είναι ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (*EGF*). Ο παράγοντας *EGF* είναι μια διαλυτή πρωτεΐνη και εμφανίζει τροφικά αποτελέσματα στα κύτταρα του εντέρου. Ο *EGF* μαζί με τον υποδοχέα του *EGFR* μεσολαβούν στη σηματοδότηση, ενεργοποιώντας καταρράκτες σηματοδότησης MAPK και *PI3K* που οδηγούν σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση.[18] Τα διακριτά βήματα στην πορεία ΚΠΕ παρουσιάζονται στην εικόνα 3.



Εικ.3: Η πορεία μετατροπής υγιούς ιστού σε καρκίνωμα χωρίζεται σε διακριτά βήματα, με αντίστοιχα συμβάντα μεταλλαξιογένεσης που προκαλούν γενετική αστάθεια. Το ερωτηματικό υποδειλώνει ότι δεν έχουν εντοπιστεί γενετικές ή επιγενετικές αλλαγές που αφορούν την μεταστατική εξέλιξη. Οι κύριες οδοί αυξητικού παράγοντα που μεταβάλλονται στον ΚΠΕ εμφανίζονται στο κάτω μέρος του διαγράμματος. Το CIN υποδηλώνει χρωμοσωμική αστάθεια, *EGFR* υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, *15-PGDH* αφυδρογονάση προσταγλανδίνης και *TGF-β* transforming growth factor β.[18]

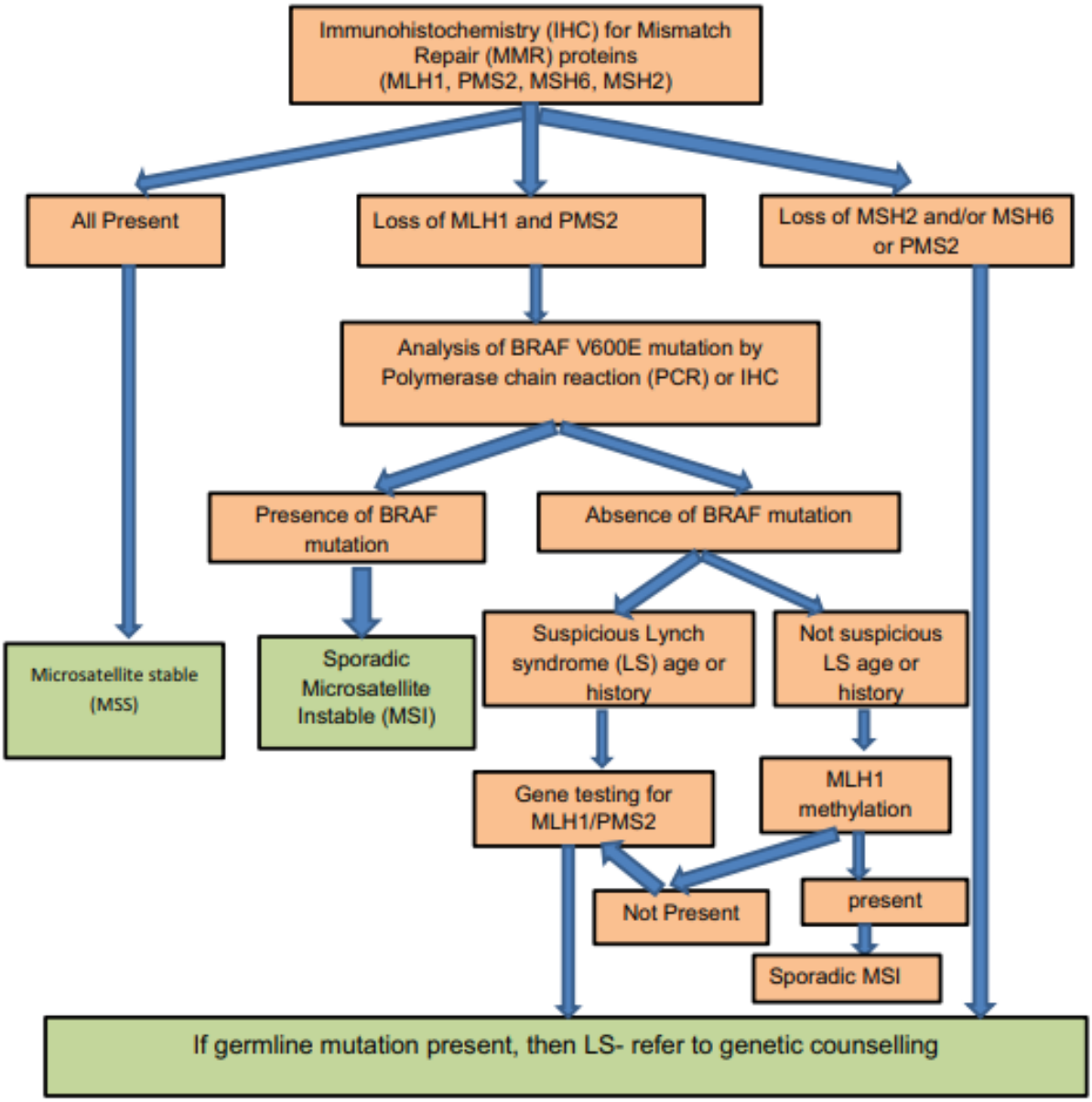
1.1.4 Γενετική αστάθεια και θεραπεία του ΚΠΕ

Λόγω της πολυπλοκότητας της νόσου, ασθενείς με ΚΠΕ πρέπει να υποβάλλονται σε μοριακό έλεγχο για την επιλογή της βέλτιστης θεραπευτικής αγωγής. Βασικό ρόλο στον ΚΠΕ παίζει η γονιδιωματική αστάθεια, η οποία απαρτίζεται από δύο βασικές οδούς.[23] Η μία οδός αφορά την χρωμοσωμική αστάθεια (CIN), με ποσοστό εμφάνισης 85%, ενώ η δεύτερη αφορά το μονοπάτι μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI), με συχνότητα 15%.[18] Σε όγκους με CIN, συμβάντα μεταλλαξηγένεσης γονιδίων (ογκοκατασταλτικών και ογκογονιδίων) που οδηγούν σε χρωμοσωμική ανευπλοειδία, απώλεια ετεροζυγωτία και δομικές χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, αποτελούν την κύρια αιτία έναρξης και προώθησης της καρκινογένεσης.[18] Από την άλλη, MSI όγκοι προκύπτουν από αδρανοποίηση σε τουλάχιστον ένα από τα τέσσερα

γονίδια επιδιόρθωσης ασυμφωνίας του MMR επιδιορθωτικού μηχανισμού (*MSH2, MLH1, MSH6* και *PMS2*).[19,24] Φυσιολογικά, κατά την αντιγραφή του DNA, προκύπτουν λάθη ασυμφωνίας βάσεων, τα οποία ο MMR μηχανισμός είναι υπεύθυνος να ανιχνεύσει και να επιδιορθώσει, όπου το ετεροδιμερές *MLH1* και/ή *PMS2* βοηθά στην εκτομή της λανθασμένης βάσης.[23]

Επιπροσθέτως, σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του ΚΠΕ διαδραματίζει το ανοσοποιητικό σύστημα. Οι MSI όγκοι παρουσιάζουν πυκνή διήθηση λεμφοκυττάρων, γνωστά ως TILs (Tumor Infiltrating Lymmphocytes) και κυτοκίνες που σχετίζονται με Th1 λεμφοκύτταρα.[25] Η περίσσεια σε CD3+ και CD8+ κυτταροτοξικά TILs προωθεί μία ανοσοαπόκριση του ξενιστεί, η οποία οδηγεί σε μια διαδικασία «ανοσοεπεξεργασίας» με αποτέλεσμα την ανοσολογική ανοχή.[25] Κατά την ανοσολογική ανοχή, τα αντιγόνα του όγκου διαφεύγουν από την κατάλληλη ανοσοαπόκριση μέσω μίας σειράς αναστολέων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως είναι τα *PD-1, PDL-1, CTLA-4* και *LAG-3*.[23] MSS όγκοι διαφέρουν στην έκφραση *PD-1/ PDL-1* από MSI Η όγκους σε TILs και κύτταρα όγκου αντίστοιχα. Τα TILs σε MSI-Η όγκους έχουν 77% έκφραση *PD-1* και 32% έκφραση *PD-L1*. Αντιθέτως, τα TILs σε MSS (microsatellite stable) όγκους έχουν 39% έκφραση *PD-1* και 32% έκφραση *PD-L1*.[25] Λόγω αυτού, ασθενείς με MSI-Η (MSI High) όγκους ανταποκρίνονται καλύτερα στην ανοσοθεραπεία όπως το atezolizumab και το pembrolizumab (αντί-*PD1/αντί-PDL1* θεραπεία).[23,25]

Για αποτελεσματική θεραπεία του ΚΠΕ, το χειρουργείο συνίσταται σε όλα τα στάδια της νόσου.[23] Για τα στάδια Ι και ΙΙ, η νόσος μπορεί να θεραπευτεί μόνο με χειρουργείο, ενώ για το στάδιο ΙΙΙ, συνίσταται μετεγχειρητική χημειοθεραπεία με FOLFOX (5-FU, leucovorin, και oxaliplatin) ή CapOx (capecitabine και oxaliplatin).[23] Επιπλέον, μοριακοί έλεγχοι για το μονοπάτι MEK (γονίδια *KRAS* και *BRAF*), βοηθούν στη λήψη απόφασης χορήγησης στοχευμένης θεραπείας με cobimetinib (αναστολείς του MEK μονοπατιού).[23] Παρακάτω, στην εικόνα 4 φαίνεται συνοπτικά ο τρόπος μοριακού ελέγχου του επιδιορθωτικού μηχανισμού MMR και του συνδρόμου Lynch σε ασθενείς με ΚΠΕ. Τα αποτελέσματα των μοριακών ελέγχων βοηθούν στην λήψη θεραπευτικών αποφάσεων για τον ΚΠΕ σύμφωνα με την γονιδιωματική αστάθεια του ασθενούς.



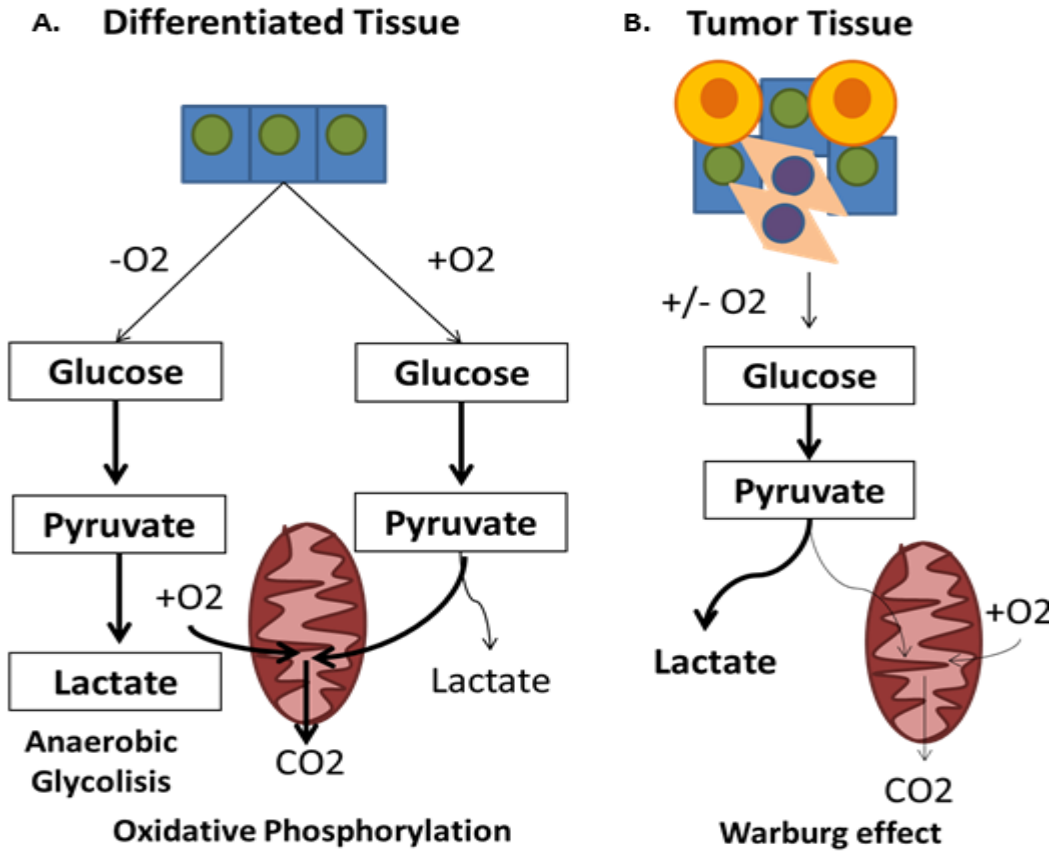
Εικ.4: Αλγόριθμος για την αξιολόγηση του νεοδιαγνωσθέντος καρκίνου του παχέος εντέρου για την κατάσταση σταθερότητας μικροδορυφορικής αστάθειας συμπεριλαμβανομένου του προσυμπτωματικού ελέγχου για το σύνδρομο Lynch.[23]

1.2 Φαινόμενο Warburg και ο ρόλος της *PKM2* στην αερόβια γλυκόλυση, την καρκινογένεση και την απόκριση των κυττάρων στη χημειοθεραπεία

1.2.1 Warburg effect: ένα χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων

Στις αρχές της δεκαετία του 1920, ο βιοχημικός Otto Warburg παρατήρησε ότι η αυξημένη κατανάλωση γλυκόζης από τα καρκινικά κύτταρα, σχετίζεται με μείωση στην κατανάλωση οξυγόνου και αύξηση στην παραγωγή γαλακτικού οξέος.[26] Αυτό το

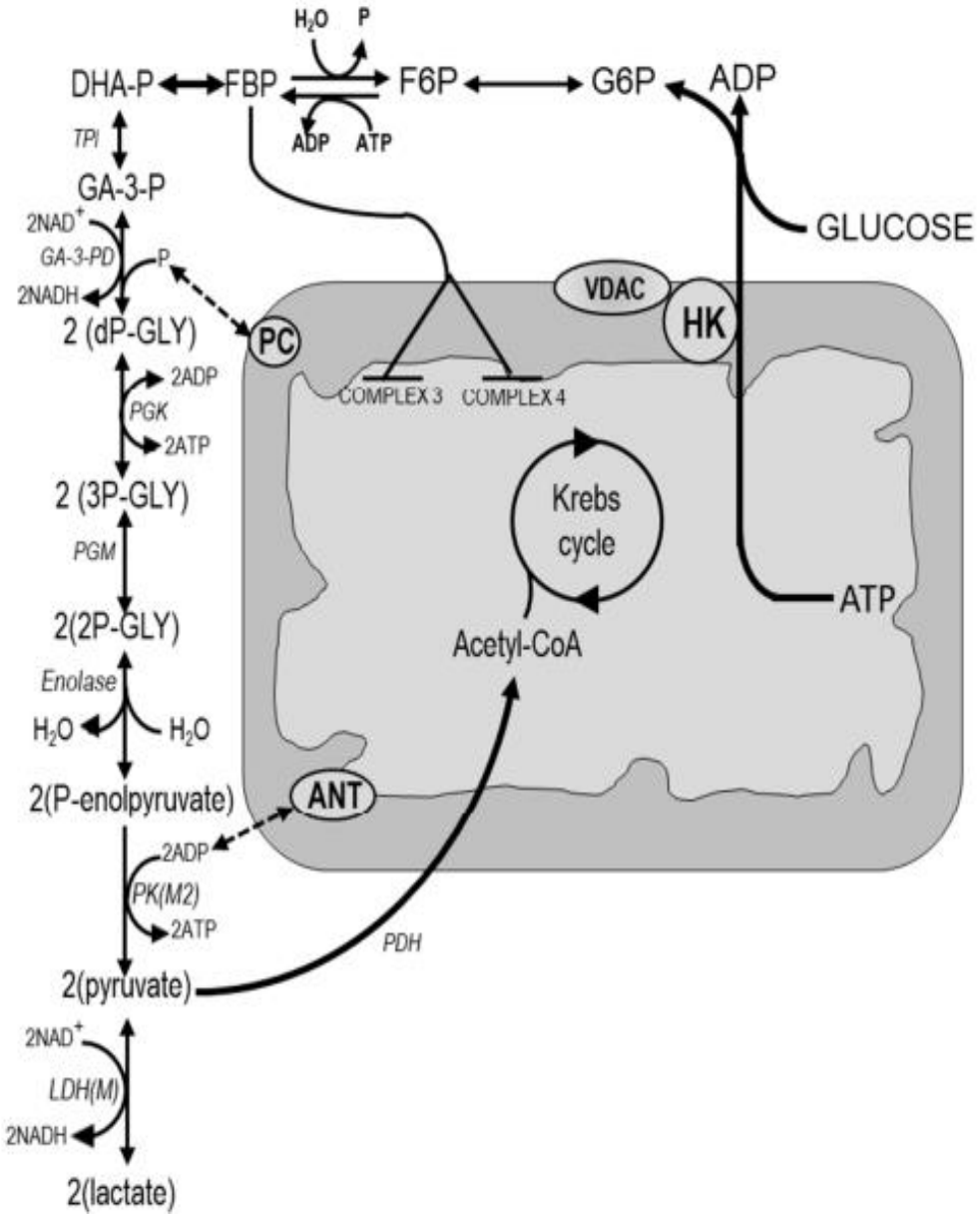
φαινόμενο ονομάστηκε αερόβια γλυκόλυση (φαινόμενο Warburg) και φαίνεται ότι σχετίζεται με την εξέλιξη του όγκου, καθώς αυξάνεται με τον βαθμό κακοήθειας.[26,27] Φυσιολογικά, όταν υπάρχει διαθεσιμότητα οξυγόνου, τα περισσότερα διαφοροποιημένα κύτταρα μεταβολίζουν την γλυκόζη σε πυροσταφυλικό, μέσω της διαδικασίας της γλυκόλυσης και στην πορεία οξειδώνουν το μεγαλύτερο ποσοστό του πυροσταφυλικού στα μιτοχόνδρια προς παραγωγή CO2 και ATP (~36mol ATP/mol γλυκόζης) μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Από την άλλη, όταν τα επίπεδα οξυγόνου είναι ελλειπή, η γλυκόζη μεταβολίζεται σε γαλακτικό οξύ μέσω της αναερόβιας γλυκόλυσης που οδηγεί σε χαμηλότερα επίπεδα παραγωγής ATP (~2 mol ATP/mol γλυκόζης) σε σχέση με την οξειδωτική φωσφορυλίωση.[28] Αντιθέτως, κύτταρα όπως τα καρκινικά, που έχουν ταχείς ρυθμούς αναπαραγωγής, μέσω του φαινόμενο Warburg μπορούν να παράγουν ενέργεια (4 mol ATP ανά μόριο γλυκόζης) και παράλληλα τους απαραίτητους δομικούς λίθους για την σύνθεση μακρομορίων απαραίτητων για τη δημιουργία νέων κυττάρων.[28] Παρακάτω, στην εικόνα 5, φαίνονται τα πιθανά μονοπάτια μεταβολισμού της γλυκόζης προς παραγωγή ενέργειας (ATP).



Εικ.5: Συνοπτική παρουσίαση παραγωγής ενέργειας κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση και το Warburg effect.[28]

Σύμφωνα με τον Crabtree, η γλυκόζη καταστέλλει την αναπνοή και την οξειδωτική φωσφορυλίωση των καρκινικών κυττάρων. Αυτή η απόδειξη για τη ρύθμιση του γλυκολυτικού μεταβολισμού, αποτέλεσε μία από τις πρώτες παρατηρήσεις για τα καρκινικά κύτταρα.[29] Επιπροσθέτως, σύμφωνα με τους Chance και Hess, πριν από την αναπνευστική αναστολή και επακόλουθη καταστολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, που προκαλείται από την προσθήκη γλυκόζης στα καρκινικά κύτταρα (φαινόμενο Crabtree), προηγείται μια σύντομη περίοδος αναπνευστικής διέγερσης.[30,31] Το φαινόμενο Chance–Hess εξηγήθηκε με παραλλαγές της διαθεσιμότητας της ADP, όπου η αναπνευστική διέγερση προκαλείται από την ADP που παράγεται κατά τη διάρκεια της πρώτης φάσης της γλυκόλυσης (σύνθεση 6-φωσφορικής γλυκόζης -G6P- και διφωσφορικής φρουκτόζης -FBP), ακολουθούμενη από μείωση του αναπνευστικού ρυθμού, όταν η ADP μετατρέπεται σε τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP)[31]. Το μεγαλύτερο μέρος του ATP, που παράγεται από τη μιτοχονδιακή οξειδωτική δραστηριότητα, στα φυσιολογικά κύτταρα, χρησιμοποιείται για ATP-εξαρτώμενες αντιδράσεις. Αντιθέτως, στα καρκινικά κύτταρα, η παραγωγή ATP μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι χαμηλή και η φωσφορυλίωση της γλυκολυτικής γλυκόζης είναι αυξημένη.[32] Τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν σχετικά μικρό αριθμό λειτουργικών μιτοχονδρίων, ικανών να παράγουν ATP, λόγω διαφόρων δυσλειτουργιών.[32] Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας κατανάλωσης καθαρού οξυγόνου, που οδηγεί στην εμφάνιση του φαινομένου Warburg.[32]

Έπειτα από μελέτες σε κύτταρα νεοπλάσματος, φάνηκε σαφής απορρύθμιση στη σχέση αναπνοής και γλυκόλυσης, όπου παρουσία οξυγόνου τα μιτοχόνδρια δεν είναι ικανά να οξειδώσουν το πυροσταφυλικό και έτσι προωθείται αύξηση παραγωγής γαλακτικού οξέος κατά την αεροβίωση. Στο φαινόμενο αυτό, κεντρικό ρόλο έχει η εξωκινάση 2 (*HK2*) στο, εξαρτώμενο από την τάση, κανάλι ανιόντων (φαινόμενο Warburg), η οποία είναι η κύρια ισομορφή στους όγκους.[33] Η *HK2* συνδέεται με στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων όπου είναι συνδεδεμένη με το, εξαρτώμενο από την τάση, κανάλι ανιόντων (*VDAC*)όπως φαίνεται και στην εικόνα 6.[33,34] Αυτή η σύνδεση προωθεί την αύξηση του μεταβολισμού της γλυκόζης και την αναστολή της απόπτωσης, μέσω στενής επαφής της *HK2* με το νεοσυντηθέμενο, στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, ATP.[33]



Εικ.6: Αμοιβαία ρύθμιση μεταξύ μιτοχονδριακής και γλυκολυτικής οδού, όπου τα διακεκομμένα διπλά βέλη υποδεικνύουν τον ανταγωνισμό.

Συντομογραφίες: *ANT*, μεταφορέας νουκλεοτιδίων αδενοσίνης, *PC*: φορέας Pi, *VDAC*: κανάλι ανιόντων εξαρτώμενο από την τάση.

Υποστρώματα: *DHA-P*: φωσφορική διυδροξυακετόνη, *F6P*: 6-φωσφορική φρουκτόζη, *FBP*: 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη, *G6P*: 6-φωσφορική γλυκόζη, *2dP-GLY*: 2-διφωσφογλυκερικό, *2PG*: 2-φωσφογλυκερικό, *3PG*: 3-φωσφογλυκερικό, *PEP*: πυροσταφυλική φωσφοενόλη.

Ένζυμα: *GA-3-PD*: 3-φωσφορική γλυκεραλδεΰδη αφυδρογονάση, *LDH*: γαλακτική αφυδρογονάση, *PDH*: πυροσταφυλική αφυδρογονάση, *PGK*: φωσφογλυκερική κινάση, *PGM*: φωσφογλυκερική μουτάση, *PKM2*: πυροσταφυλική κινάση ισομορφή 2, *TPI*: ισομεράση τριόζης-φωσφορικής.[34]

Το μεγαλύτερο μέρος των ενζυμικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά τη γλυκόλυση είναι αναστρέψιμες. Ωστόσο, υπάρχουν και ορισμένες αντιδράσεις οι

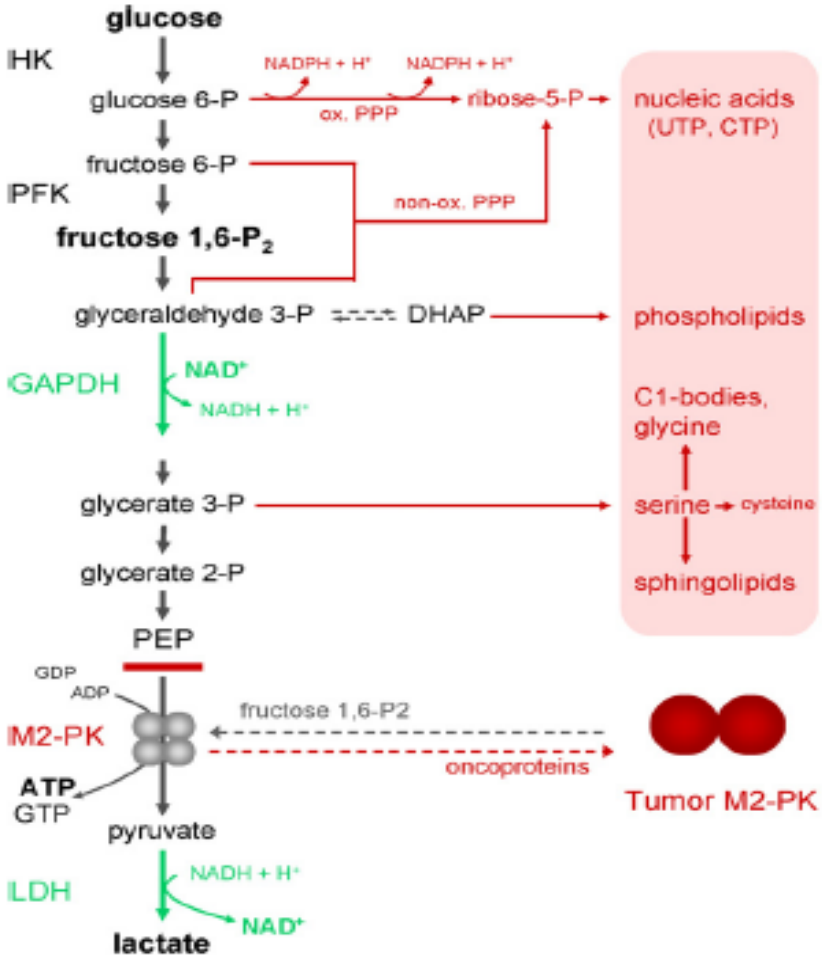
οποίες είναι μη αναστρέψιμες και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για γλυκόλυση και για σύνθεση γλυκογόνου συγχρόνως και παρέχουν την ισορροπία μεταξύ κυτταροπλασματικής ADP και ATP.[34] Τέτοιου είδους αντιδράσεις είναι αυτές που οδηγούν στη φωσφορυλίωση της γλυκόζης και της F6P, με την παραγωγή G6P και FBP, που καταλύεται από την *HK2* και τη φωσφοφρουκτοκινάση (*PFK*), αντίστοιχα, και η αποφωσφορυλίωση της *PEP* σε πυροσταφυλικό.[34] Η αύξηση της συγκέντρωσης του ADP κατά την χρήση γλυκόζης οδηγεί σε αύξηση κατανάλωσης οξυγόνου. Αυτό οδηγεί με τη σειρά του στην μείωση της κυτταροπλασματικής ADP και αύξηση της μιτοχονδριακής ATP (φαινομένου Crabtree). Κατά συνέπεια, μειώνεται η οξείδωση του πυροσταφυλικού άλατος στη μιτοχονδριακή μήτρα, η οποία μπορεί επίσης να συμβάλει στη μείωση μεταφοράς πυροσταφυλικού, από έναν συγκεκριμένο φορέα, στη μιτοχονδριακή μήτρα,σε αύξηση της πυροσταφυλικής δραστηριότητα της αφυδρογονάσης κινάσης 1 (*PDK-1*) και, τουλάχιστον σε υπερέκφραση της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης E1α (*PDH-E1α*).[34] Ακόμη, έχει φανεί ότι τα επίπεδα πρωτεΐνης της β-F1-αδενοσίνης-τριφωσφατάσης (*β-F1-ATPάση*, ο φυσιολογικός αναστολέας της συνθάσης H+-ATP) είναι μειωμένα σε μία σειρά καρκίνων στον άνθρωπο, όπως σε αυτούς του ήπατος, των νεφρών, του παχέος εντέρου, του μαστού και του στομάχου. Τέλος, τα μειωμένα επίπεδα της *β-F1-ATPάσης* έχουν συσχετιστεί με την ολική επιβίωση και το χρόνο υποτροπής των ασθενών με ΚΠΕ, γεγονός που υποδεικνύει ότι η αλλοίωση της βιοενεργειακής λειτουργίας των μιτοχονδρίων είναι ένα κύριο χαρακτηριστικό αυτών των τύπων καρκίνου.[34]

1.2.2 Ο ρόλος της *PK-M2* στο φαινόμενο Warburg και στην αντίσταση στη χημειοθεραπεία

Η έκφραση και ο υποκυτταρικός εντοπισμός της *PKM2* έχουν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη και επιβίωση του καρκίνου.[34] Η ρύθμιση της *PKM2* είναι περίπλοκη και για τη δράση της έχουν προκύψει αρκετά δεδομένα. Ένα από τα βασικά ένζυμα της γλυκόλυσης είναι η πυροσταφυλική κινάση (*PK*), η οποία δρα στο υπόστρωμα φωσφοενλοπυροσταφυλικού (*PEP*) για να σχηματίσει πυροσταφυλικό και έχει τέσσερις διαφορετικούς υποτύπους: *L, R, M1* και *M2*.[35] Οι ισόμορφες *PKL* βρίσκονται κυρίως στο ήπαρ, τα νεφρά και τα ερυθρά αιμοσφαίρια, ενώ η *PKR* εκφράζεται κυρίως σε ερυθρά αιμοσφαίρια και η βιολογική δραστηριότητα της δεν

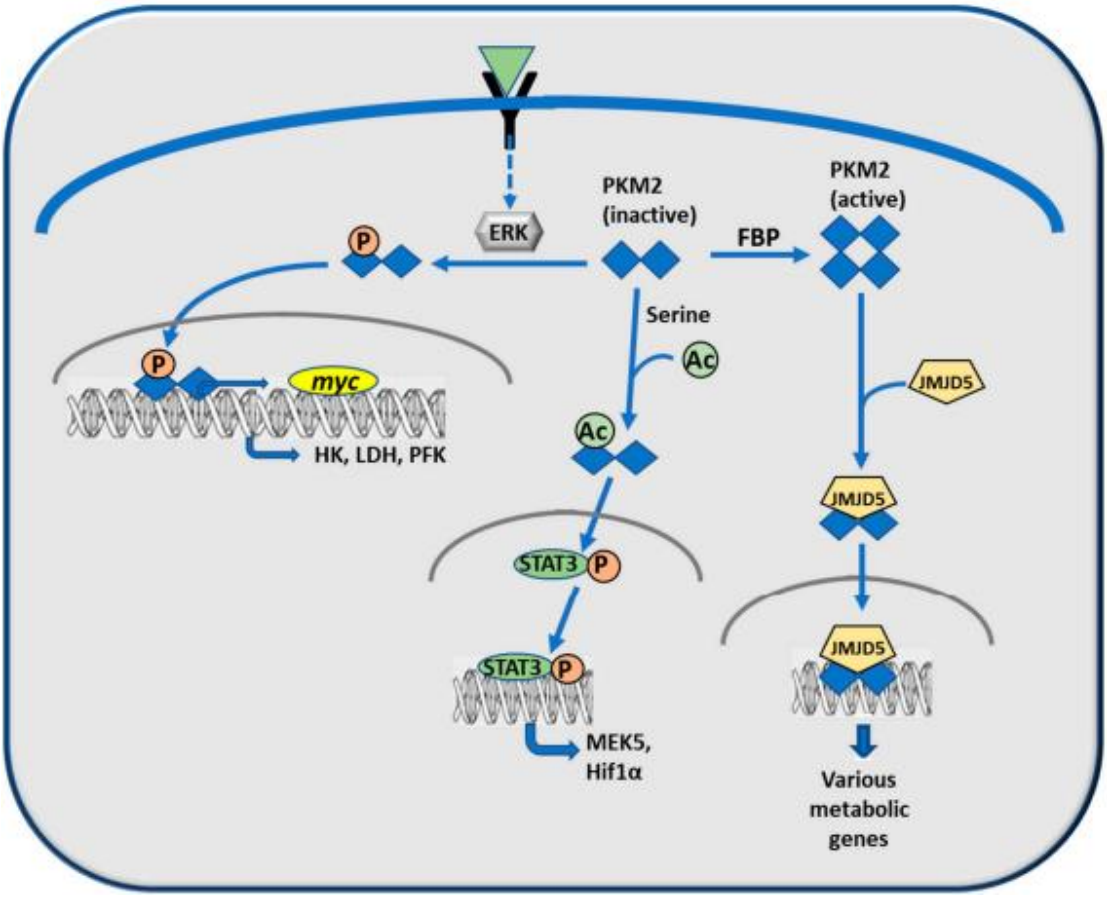
είναι σαφής.[35] Η ισομορφή *PKM1* κατανέμεται σε μυοκάρδιο, σκελετικό μυ και εγκεφαλικό ιστό. Η *PKM2* εκφράζεται σε ιστούς όπως ο εγκέφαλος, το παχύ έντερο και το ήπαρ. Αν και η τετραμερής και η διμερής *PKM2* αποτελούνται από το ίδιο μονομερές, τα βιολογικά αποτελέσματα μεταξύ του τετραμερούς και του διμερούς είναι σημαντικά διαφορετικά. Το τετραμερές μόριο παίζει κυρίως τον ρόλο της πυροσταφυλικής κινάσης και ρυθμίζει τη γλυκόλυση. ενώ η διμερής μορφή *PKM2* στο πλαίσιο του μεταβολισμού της γλυκόζης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ρυθμιστής για τον μεταβολισμό ενέργειας και τη σύνθεση δομικών υλικών (Εικόνα7). Με τη σειρά τους, παρέχεται μια πηγή άνθρακα και ένα ισοδύναμο οξείδωσης-αναγωγής (REDOX) για τον αναβολισμό της κιτοχρωμικής ριβόζης και για τον αναβολισμό αμινοξέων.[35] Όταν βρίσκεται στην ανενεργή της κατάσταση, δηλαδή στη διμερή μορφή, τα γλυκολυτικά συστατικά που προηγούνται του *PEP* τείνουν να συσσωρεύονται και να μεταπηδούν στην οδό φωσφορικής πεντόζης (PPP), την οδό ουρονικού οξέος (UAP), την πορεία πολυόλης (PYP) και τη βιοσύνθεση αμινοξέων, όπως η σερίνη.[34,35] Επιπλέον, υπό υποξικές συνθήκες, η περιοχή προαγωγέα της *PKM2* συνδέεται με τον παράγοντα *HIF1a*[36], προωθώντας έτσι την μεταγραφή κατάντη γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου του *PKM2*.[34]

Οι δύο κύριες στερεοδιατάξεις της *PKM2* είναι η διμερής (ανενεργή) και η τετραμερής (ενεργή) μορφή.[34] Όταν βρίσκεται στην τετραμερή μορφή, προωθεί τον μετασχηματισμό του πυροσταφυλικού σε oxaloacetate (*OAA*), το οποίο χρησιμοποιείται στον κύκλο του Krebs για οξειδωτική φωσφορυλίωση.[37] Ακόμη, αλληλοεπιδρά με τη διοξυγενάση/δεμεθυλάση (*JMJD5*) στον πυρήνα, όπου το σύμπλοκο *JMJD5*/*PKM2* ρυθμίζει την επαγόμενη από το *HIF1α* έκφραση των μεταβολικών γονιδίων.[34] Από την άλλη, η ανενεργή μορφή της *PKM2*, όταν είναι φωσφορυλιωμένη, εισέρχεται στον πυρήνα, και οδηγεί στην βιοσύνθεση νουκλεοτιδίων, φωσφολιπιδίων και αμινοξέων.[34]



Εικ.7: Έκφραση διμερούς μορφής *PKM2*, η οποία έχει χαμηλή συγγένεια με το φωσφοενλοπυροσταφυλικό (*PEP*).

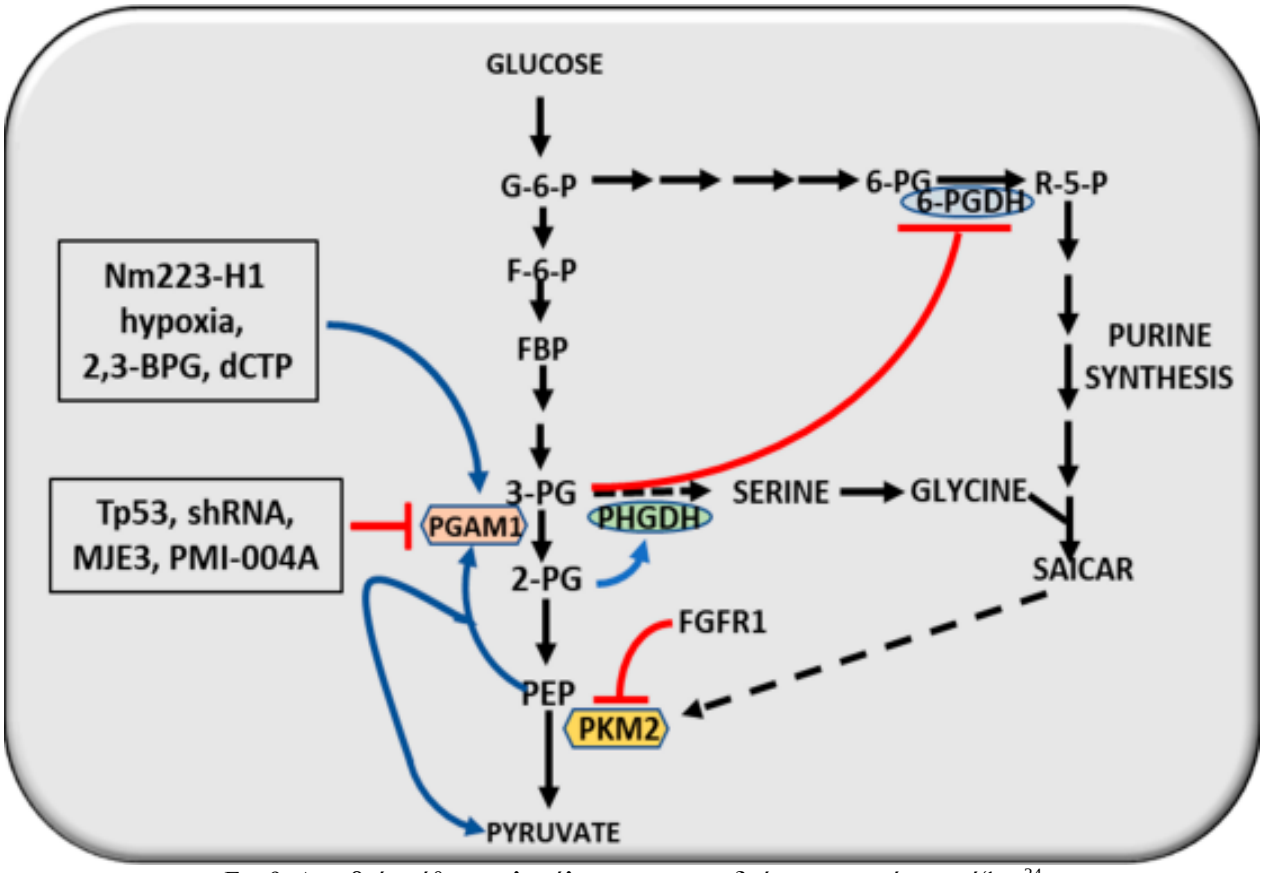
Παράλληλα, η διμερής *PKM2* μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση γονιδίων όπως το *myc*, το *HK*, το PFK και το *LDH* (Εικόνα 8).[37] Όταν η *PKM2* είναι ακετυλιωμένη στην ανενεργή της μορφή παρουσία σερίνης, μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα όπου αλληλεπιδρά με το *Oct-4*. Έτσι, ενισχύεται το δυναμικό μεταγραφής που προκαλείται από το *Oct-4* και ενεργοποιείται το *STAT3* φωσφορυλιώνοντας το υπόλειμμά του Tyr305, με το *PEP* να έχει ρόλο δότη φωσφορικών ομάδων.[34] Αποτέλεσμα αυτού είναι η μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως το *mek5* και το *Hif1α*.[34,36] Επίσης, η *PKM2* παίζει σημαντικό ρόλο στην φωσφορυλίωση του Thr11 της ιστόνης H3. Αυτό οδηγεί στην ακετυλίωση και την απομάκρυνση του *HDAC3* (histone deacetylase 3) από την κυκλίνη D1 και έτσι ευνοείται ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων.[34]



Εικ.8: Τροποποιήσεις και λειτουργίες της PKM2 στη διμερή και την τετραμερή της μορφή. [34]

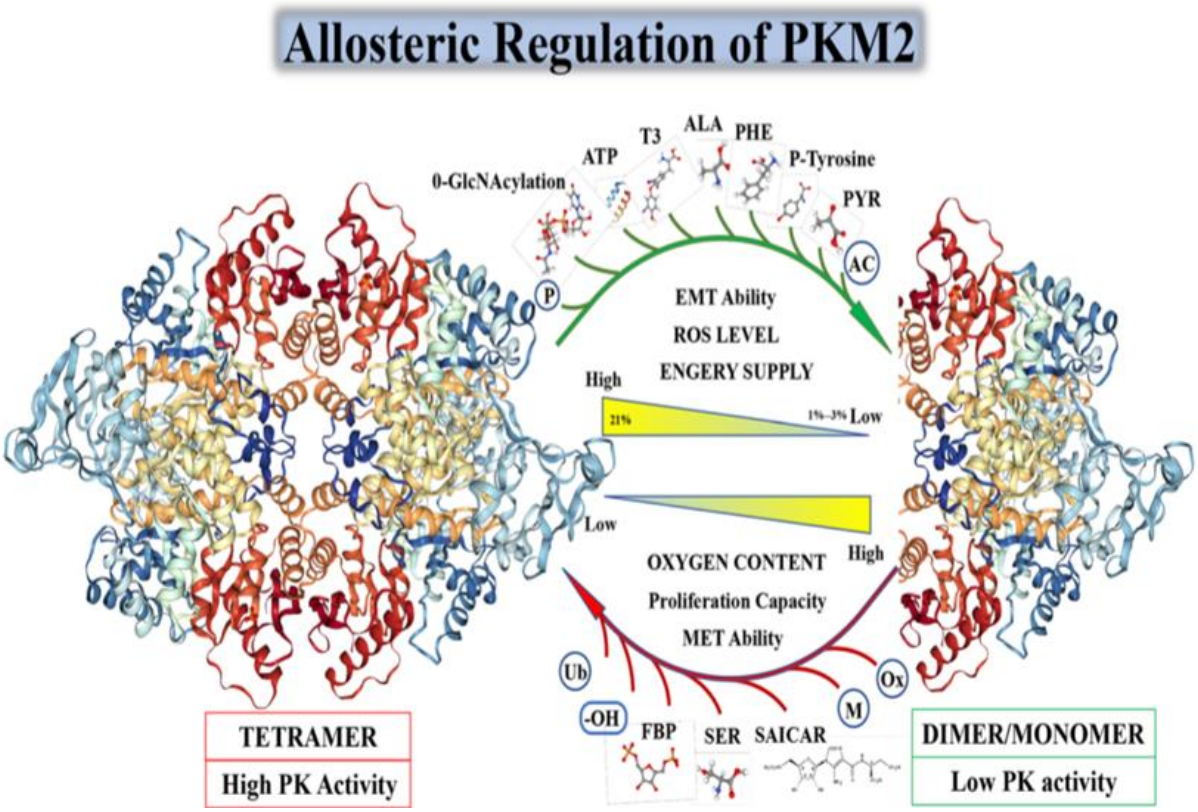
Επιπλέον, υπάρχει βρόγχος θετικής ανάδρασης, κατά τον οποίο προωθείται η δράση του *HIF1α* και διατηρεί υψηλή έκφραση γλυκολυτικών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου του *PKM2*. Ωστόσο, έχει δειχθεί ότι η έκφραση *PKM2* δεν είναι απαραίτητη για πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων, καθώς με εξάλειψη της έκφρασης του σε *BRC1* μεταλλαγμένα ποντίκια επιταχύνεται ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων.[38] Συγχρόνως, καρκινικά κύτταρα με υψηλά επίπεδα έκφρασης *PKM2*, έχουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης *PKM1*. Αυτό υποδηλώνει μία αρνητική συσχέτιση μεταξύ *PK* δραστηριότητας και κυτταρικού πολλαπλασιασμού.[38] Παράλληλα, η *PKM2* σχετίζεται με την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και με τον μεταβολισμό, καθώς έχει λειτουργίες μεταγραφικού συνενεργοποιητή και πρωτεϊνικής κινάσης.[34] Ένας ακόμη ογκογόνος ρόλος σχετίζεται πιθανά με τη δράση της *PHGDH* (φωσφογλυκερική αφυδρογονάση). Η *PHGDH* σχετίζεται με τη σύνθεση σερίνης, πυροσταφυλικού και υδροξυπυροσταφυλικού σε διάφορους καρκίνους, όπως αυτοί του μαστού, του δέρματος και γλοιώματος.[34] Το *2-PG* (2-φωσφογλυκερικό) ενεργοποιεί την *PHGDH* και με τη σειρά του ενεργοποιείται η

σύνθεση του *SAICAR*, ενώ το *3-PG* (3-φωσφογλυκερικό) αναστέλλει το 6-*PGDH*. Το *SAICAR* είναι ενδιάμεσο σύνθεσης πουρίνης που ενεργοποιεί την *PKM2* και κατά συνέπεια τη σύνθεση πυροσταφυλικού οξέος (Εικόνα 9).[34]



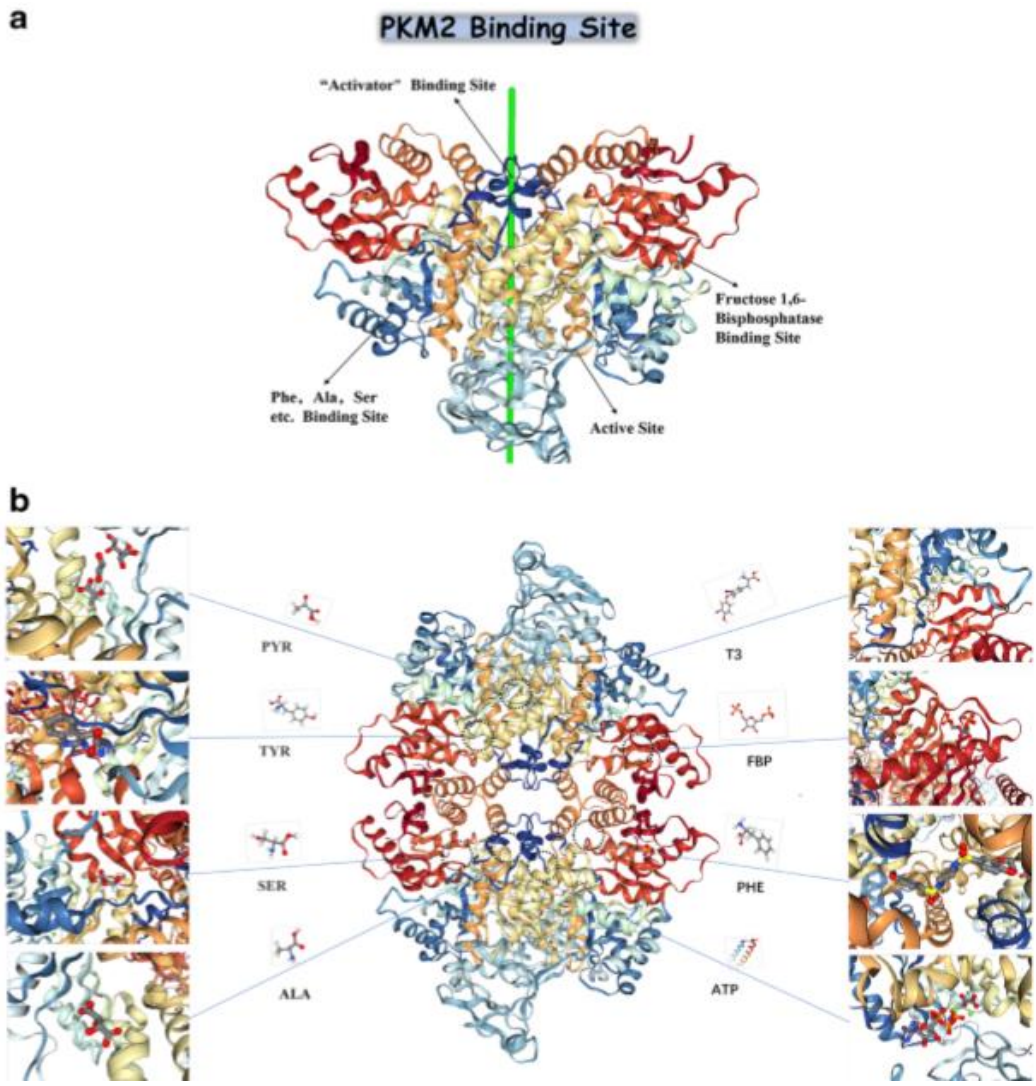
Εικ.9: Αμοιβαία ρύθμιση γλυκόλυσης και της οδού φωσφορικής πεντόζης.[34]

Όταν η έκφραση της *PKM2* από τον όγκο αντικαθίσταται από *PKM1*, ο μιτοχονδριακός μεταβολισμός των καρκινικών κυττάρων μετατρέπεται από αερόβια γλυκόλυση σε μιτοχονδριακή αναπνοή και η ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων του όγκου, η ικανότητα εισβολής και η μετάσταση μειώνονται. Αυτή η παραδοχή αναφέρεται από μερικούς μελετητές ως "post-post-Warburg effect", ή "ZZ effect", και το νέο μοντέλο τροφοδότησης ενέργειας ονομάζεται "επαναπρογραμματισμός μεταβολισμού ενέργειας κυττάρων όγκου (EMR)".[39] Η αλληλομετατροπή από την τετραμερή, υψηλής ενεργότητας *PKM2* στη διμερή, χαμηλής *PK* ενεργότητας μορφή, ελέγχεται αλλοστερικά από μια ποικιλία ενδογενών και εξωγενών ενεργοποιητών και καταστολέων.[35] Στην εικόνα 10, αναπαρίστανται όλα τα, έως τώρα, γνωστά μόρια που συμμετέχουν στην αλλαγή της στερεοδιάταξης της *PKM2* από τη μία μορφή, στην άλλη.



Εικ.10: Η μετάβαση μεταξύ της διμερούς και της τετραμερούς *PKM2* ρυθμίζεται αλλοστερικά από ενδογενείς και εξωγενείς ενεργοποιητές και αναστολείς. Η *PKM2* έχει δραστικότητα ενζύμου *PK* μόνο όταν χρησιμεύει ως τετραμερές. Η *PKM2* ενεργοποιείται από τα γλυκολυτικά ενδιάμεσα προϊόντα που ονομάζονται 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη (*FBP*), από τις αλλοστερικές επιδράσεις της Phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide (*SAICAR*) και της succinate dehydrogenase (*SDH*). Η *PK* ενζυμική δραστικότητα της *PKM2* μπορεί να ανασταλεί από πολλούς ενδογενείς αναστολείς και συμβάντα κυτταρικής σηματοδότησης που περιλαμβάνουν: 0-GlcNAcylation, pyruvate (*PYR*), P-tyrosine (P-TYR), phenylalanine (PHE), alanine (ALA), adenosine triphosphate (ATP) και θυρεοειδική ορμόνη T3 [35]

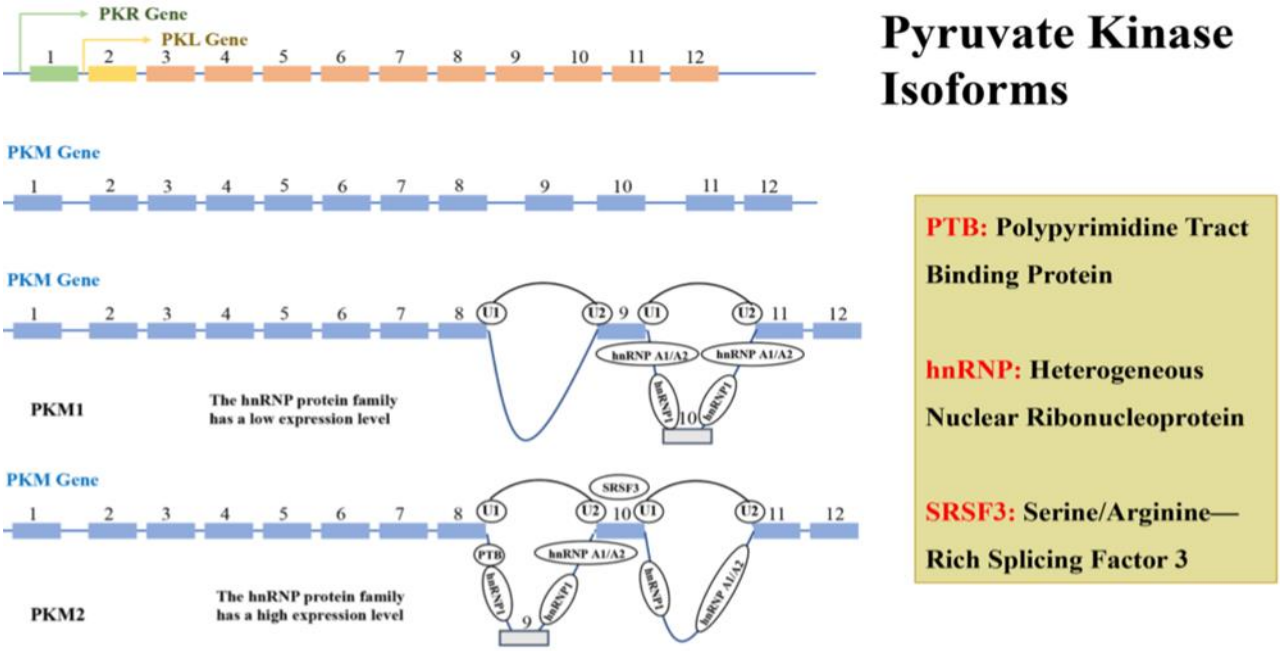
Όπως φαίνεται στην εικόνα 11, με την προσθήκη των κατάλληλων αλλοστερικών ρυθμιστών, η τετραμερής *PKM2* μπορεί να μεταφερθεί από μία συμπαγή (κατάσταση R) σε μια χαλαρή κατάσταση (T-κατάσταση) και τελικά να οδηγηθεί στερεοδιατακτικά σε μία διμερή μορφή με χαμηλή *PK* ενεργότητα.[35]



Εικ.11: Απεικόνιση κάθε αλλοστερικής ρύθμιση, της θέσης πρόσδεσης των μορίων και της θέσης πρόσδεσης των ενεργοποιητών στην τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης *PKM2*.[35]

Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα, στα θηλαστικά υπάρχουν δύο γονίδια που εκφράζουν τους 4 υπότυπους του *PK* ενζύμου. Το *PKLR* γονίδιο είναι υπεύθυνο για την έκφραση των *PKL* και *PKR* ισομορφών, ενώ το *PKM* είναι υπεύθυνο για την έκφραση των *PKM1* και *PKM2*. Στην περίπτωση του *PKM* γονιδίου, οι δύο ισομορφές έχουν το ίδιο μήκος κωδικοποίησης και εξώνια που κωδικοποιούν 56 υπολείμματα αμινοξέων στη θέση 22, όπου γίνεται εναλλακτικό μάτισμα.[35]
Το *PKM* υπό τη δράση του παράγοντα διάσπασης, μπορεί να σχηματίσει *PKM1* που περιέχει το εξώνιο 9 ή *PKM2* που περιλαμβάνει το εξώνιο 10. Στην Εικόνα 12, απεικονίζονται οι παράγοντες ματίσματος του γονιδίου *PKM*, που περιλαμβάνουν τρεις ετερογενείς ριβοπρωτεΐνες: hnRNPL (*PTB*), hnRNPAI, hnRNPA2, οι οποίες απελευθερώνουν το εξώνιο 10 με σύνδεση του εξωνίου 9 και προάγουν την έκφραση

PKM2 ενώ αναστέλλουν την έκφραση *PKM1*. Η *NEK2* μπορεί να προάγει την απελευθέρωση του εξωνίου 10 με δέσμευση στο hnRNPAI / A2, οδηγώντας σε περαιτέρω αύξηση της έκφρασης της *PKM2*.[35] Ακόμη, υπό την ρύθμιση του *C-MYC,* τρία hnRNPs: hnRNPL (*PTB*), hnRNPA1 και hnRNPA2, δεσμεύονται με την αλληλουχία εσωνίου μεταξύ εξωνίου 9 και 10, αναστέλλουν τη διάσπαση του εξωνίου 9, ενώ μια πλούσια σε σερίνη /αργινίνη πρωτεϊνική κινάση (*SRSF-3*) συνδέεται με το εξώνιο 10 για να διευκολύνει την διάσπαση του, ολοκληρώνοντας έτσι τη μετατροπή της *PKM1* σε *PKM2*. Σύμφωνα με έρευνες, το εξώνιο 10 που είναι εξειδικευμένο για έκφραση *PKM2* μπορεί να στρατολογήσει την εξωκυτταρική κινάση 2 (*ERK2*), δεσμεύεται στην περιοχή Iso429 / Leu431 της *PKM2*, μεσολαβεί φωσφορυλίωση στη θέση Ser37 και κατόπιν στρατολογεί το μόριο *PIN1* για να σχηματίσει σύμπλοκο *PKM2* / *PIN1*. Τέλος, σε περίπτωση μεταλλαγής στη θέση Ser37, αν και η *PKM2* μπορεί ακόμα να σχηματίσει τετραμερή δομή στο κυτταρόπλασμα, δεν μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα, πράγμα που υποδηλώνει ότι το σύμπλεγμα είναι ένας σημαντικός μεταφορέας που μεσολαβεί στην είσοδο της *PKM2* στον πυρήνα. Αυτά τα στοιχεία υποδηλώνουν ότι η *PKM2* μπορεί να παίξει ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής και της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης και αυτά τα αποτελέσματα εξαρτώνται από την αλληλεπίδραση μεταξύ των *PKM2*, *ERK1 / 2* σηματοδοτικού μονοπατιού και *PIN1*.[35]



Εικ.12: Απεικόνιση εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου *PKM*. Κατά τη μεταγραφή, με τη βοήθεια των ριβοπρωτεϊνών hnRNPL (*PTB*), hnRNPAI και hnRNPA2, καθώς επίσης και του παράγοντα μεταγραφής *SRSF3,* προκύπτει η έκφραση είτε της *PKM2* είτε της *PKM1*.[35]

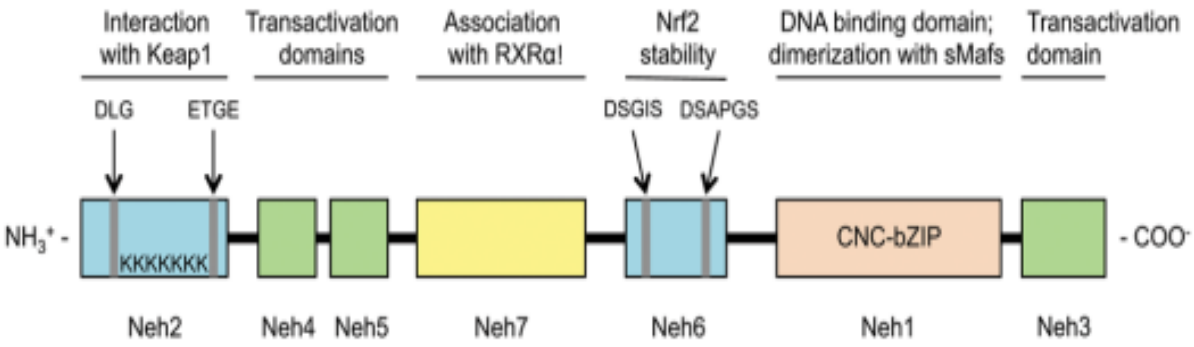
1.3 Ο ρόλος του NRF2 στην απόκριση των κυττάρων σε οξειδωτικό στρες και στην καρκινογένεση

1.3.1 NRF2: ένας ρυθμιστής του αντιοξειδωτικού μονοπατιού των κυττάρων

Στην καθημερινότητα, είμαστε συνεχώς εκτεθειμένοι σε μια σειρά ουσιών και λοιπών παραγόντων που μπορούν να προκαλέσουν ξενοβιοτικό ή οξειδωτικό στρές στα κύτταρα του σώματος μας. Σε αυτούς τους βλαπτικούς παράγοντες συγκαταλέγονται διάφορα χημικά, συμπεριλαμβανομένων φαρμάκων, περιβαλλοντικών ρύπων, πρόσθετα τροφίμων και μορφές ακτινοβολίας όπως η υπεριώδης και η ιονίζουσα.[40] Εκτός από τις εξωτερικές πηγές οξειδωτικού στρες, υπάρχουν και εκείνες που παράγονται εντός του ανθρώπινου σώματος. Σε αυτές περιλαμβάνονται οι ελεύθερες ρίζες και οι αντιδραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species – ROS). Οι ROS παράγονται ως παραπροϊόντα είτε λόγω φυσιολογικών είτε παθολογικών κυτταρικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στα μιτοχόνδρια, τα υπεροξισώματα και το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και σε υψηλά επίπεδα δύναται να προκαλέσουν ενδοκυτταρικές βλάβες σε βιομόρια, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και DNA.[40] Ο μηχανισμός που αντιμετωπίζει αυτούς τους τοξικούς παράγοντες αφορά το αντιοξειδωτικό σηματοδοτικό μονοπάτι *Nrf2-Keap1-ARE,* με κεντρικό ρυθμιστή του, τον nuclear factor E2-related factor 2 (*Nrf2*).[41] Η ρύθμιση της δράσης και αφθονίας του *Nrf2* είναι πολύ αυστηρή και γίνεται τόσο σε μεταγραφικό, όσο και σε μετα-μεταγραφικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο.[42] Όταν υπάρχουν τα κατάλληλα ερεθίσματα, ο *Nrf2* ενεργοποιείται και μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου συμβάλει στην μεταγραφή κατάντη αντιοξειδωτικών και αποτοξινωτικών γονιδίων στόχων.[42]

Ο μεταγραφικός παράγοντας *Nrf2* ανήκει στην υποοικογένεια cap 'n' collar (CNC) του φερμουάρ λευκίνης βασικής περιοχής (bZIP). Στην ίδια υποοικογένεια ανήκει ο *Nrf1*, ο *Nrf3*, η υπομονάδα *NF-E2 p45* και οι λιγότερο συγγενικοί παράγοντες, τομέας *BTB* και ομόλογος *CNC 1* και *2* (*Bach1* και *Bach2*).[43] Ο *Nrf2* είναι μια αρθρωτή πρωτεΐνη και αποτελείται από επτά τομείς ομολογίας. Αυτοί οι τομείς ονομάζονται *Nrf2-ECH* (*Neh1-7*) και κάθε ένας από αυτούς έχει τη δική του ξεχωριστή δράση και λειτουργεία, όπως φαίνεται στην εικόνα 13.[42] Η δέσμευση του *Nrf2* με το DNA επιτυγχάνεται από τον τομέα *Neh1*, ο οποίος περιλαμβάνει την περιοχή CNC-bZIP. Η περιοχή CNC-bZIP βοηθά τόσο στη δέσμευση του *Nrf2* στο DNA, όσο και τη

δέσμευση σε αυτόν των εταίρων διμερισμού, μικρών πρωτεϊνών του αρσενικού αποπονευρωτικού ινοσαρκώματος (*sMaf*).[43] Η αμινοξική αλληλουχία, κυρίως η βασική περιοχή, είναι εξαιρετικά διατηρημένη σε ένα ευρύ φάσμα ειδών, πράγμα που υποδηλώνει τη σημαντικότητα του τομέα *Neh1*.[43]

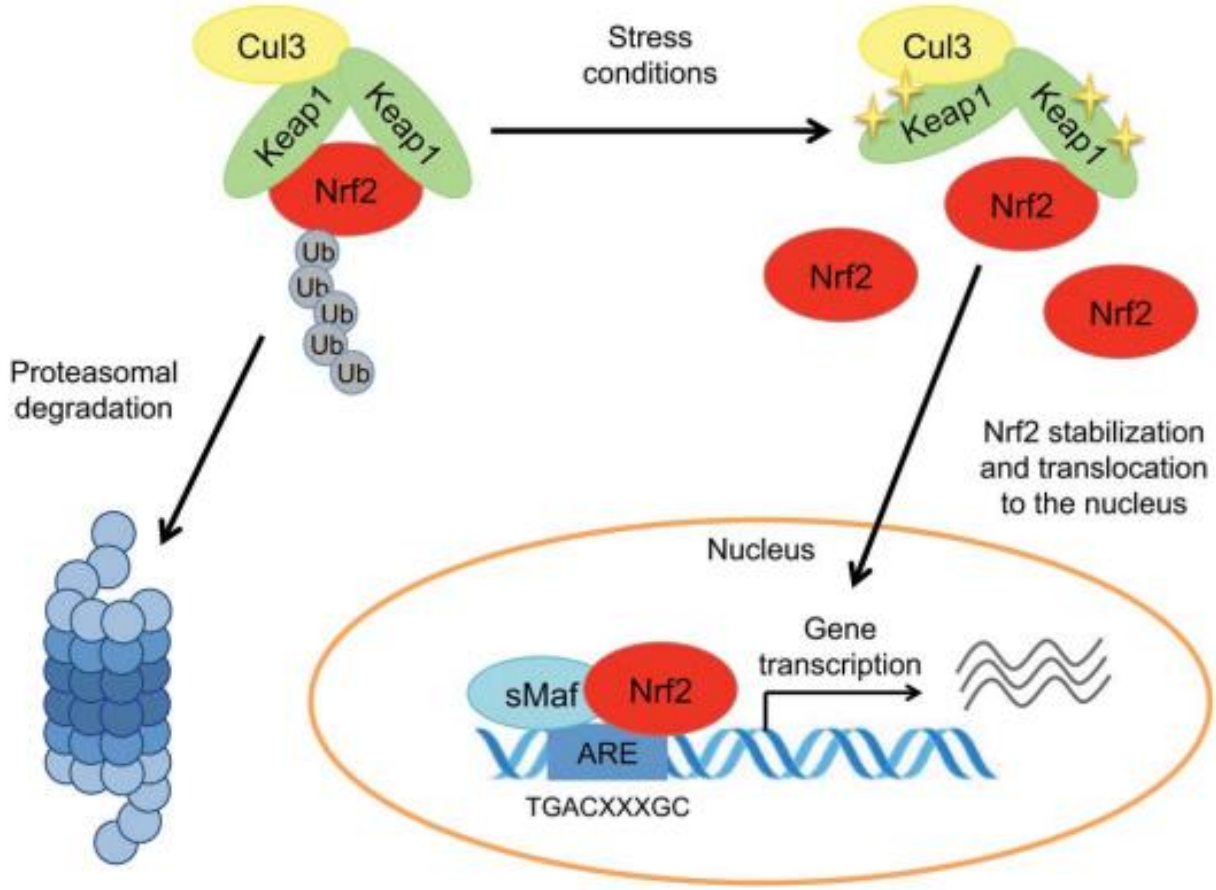


Εικ.13: Ο *Nrf2* περιλαμβάνει τομείς *Neh*. Ο τομέας *Neh1* CNC-bZIP είναι υπεύθυνος για τη δέσμευση του DNA και διμερισμό με τις μικρές πρωτεΐνες *Maf*. Ο τομέας *Neh2* μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση με το *Keap1* μέσω των μοτίβων *DLG* και *ETGE*. Οι τομείς *Neh3, Neh4* και *Neh5* είναι τομείς συναλλαγής. Ο τομέας Neh6 είναι μια περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα σερίνης που ρυθμίζει την σταθερότητα του *Nrf2*. Ο τομέας *Neh7* εμπλέκεται στη δέσμευση toy *RXRα*.[43]

Ο τομέας *Neh2* περιέχει δύο καλά συντηρημένες αμινοξικές περιοχές διάτασης, *DLG* και *ETGE*. Οι περιοχές αυτές είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση με τον αρνητικό ρυθμιστή του *Nrf2* που σχετίζεται με ECH τύπου Kelch (*Keap1*). Επίσης, ο *Neh2* περιλαμβάνει επτά υπολείμματα λυσίνης, τα οποία σημαίνονται με μόρια ουβικιτίνης και οδηγούν τον *Nrf2* σε πρωτεασωμική αποικοδόμηση.[44] Ο τομέας *Neh3*, μέσω του καρβοξυτελικού του άκρου, έχει την ικανότητα μετενεργοποίησης και δρα σε συνεργασία με τους τομείς *Neh4* και *Neh5* για την μεταγραφή γονιδίων στόχων του *Nrf2*.[45] Ο τομέας *Neh6* είναι πλούσιος σε κατάλοιπα σερίνης και εμπλέκεται στην αρνητική ρύθμιση της σταθερότητας του *Nrf2*, ανεξάρτητα από τη δράση του *Keap1*. Ο *Neh6* περιέχει δύο καλά διατηρημένα πεπτιδικά μοτίβα (DSGIS και DSAPGS) τα οποία αναγνωρίζονται από την *β-TrCP* (β–transducing repeat-containing protein). Το *β-TrCP* συνδέεται αποτελεσματικότερα με τον τομέα *Neh6*, έπειτα από τη φωσφορυλίωση αυτού στο μοτίβο DSGIS από την κινάση-3β συνθάση γλυκογόνου (*Gsk-3β*). Μόλις το *β-TrCP* προσδεθεί στον *Neh6*, προωθείται η στρατολόγηση του συμπλέγματος λιγάσης ουβικιτίνης πρωτεΐνης *Skp1-Cul1-F-box*

(*SCF*), που έχει ως αποτέλεσμα την πρωτεασωμική αποικοδόμηση του *Nrf2*.[46] Τέλος, ο τομέας *Neh7* σχετίζεται με την μεταγραφική καταστολή του *Nrf2* από τον υποδοχέα α ρετινοειδούς Χ (*RXRα*), έπειτα από φυσική συσχέτιση των δύο βιομορίων.[47]

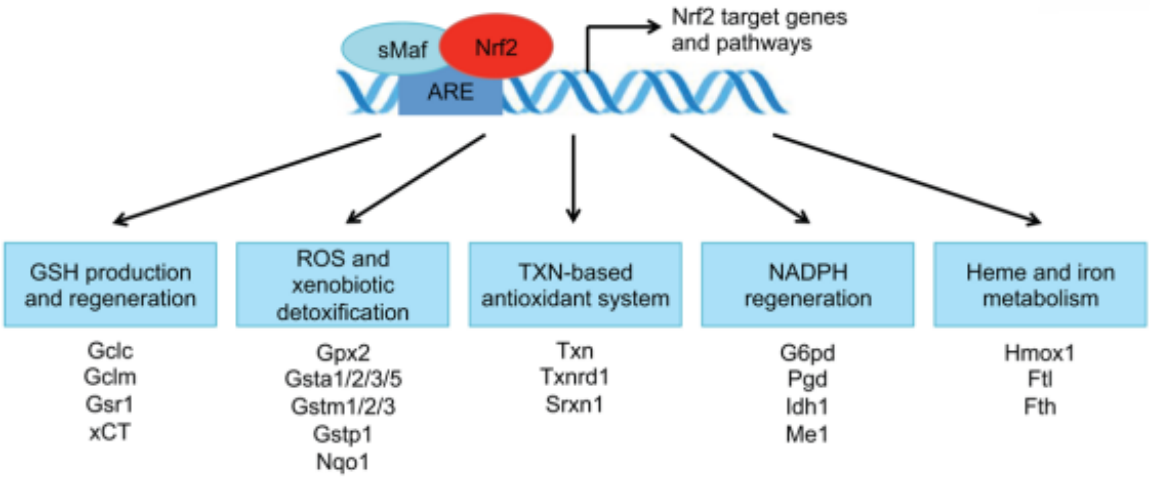
Όπως προαναφέρθηκε, η ενεργότητα και η αφθονία του *Nrf2* εντός του κυττάρου ρυθμίζεται αυστηρά από τον αναστολέα του, τον *Keap1*. Ο *Keap1* είναι ένας, ευαίσθητος στην οξειδοαναγωγή, προσαρμογέας υποστρώματος Ε3 ουβικιτίνης λιγάσης.[44] Σε πειράματα με εμβρυϊκούς ινοβλάστες (*MEFs*) και σε ήπαρ knockout *Keap1* ποντικών, φάνηκε ότι απουσία του αναστολέα *Keap1*, εμφανίζονται υψηλά επίπεδα έκφρασης τόσο του *Nrf2*, όσο και των γονιδίων στόχων του.[44,48] Υπό φυσιολογικές συνθήκες και σε κατάσταση απουσίας οξειδωτικού στρες, δύο μόρια *Keap1* συνδέονται στον τομέα *Neh2* του *Nrf2* στα μοτίβα *ETGE* και *DLG* (μέσω του πεδίου επανάληψης Kelch), όπως φαίνεται και στην εικόνα 14.[43] Κατά τη δέσμευση του *Nrf2*, ο *Keap1* δρα ως πρωτεΐνη προσαρμογής για τη λιγάση ουβικιτίνης *Cul3 E3,* η οποία με τη σειρά της σημαίνει συνεχώς τον *Nrf2* με μόρια ουβικιτίνης, με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του.[43] Ο χρόνος ημίσειας ζωής του *Nrf2* κυμαίνεται μεταξύ 10 και 30 λεπτών και λόγω της δράσης του *Keap1*, τα επίπεδα του διατηρούνται πολύ χαμηλά.[43] Ωστόσο, σε περίπτωση υψηλού οξειδωτικού φορτίου, ο *Keap1* οξειδώνεται σε αντιδραστικά υπολείμματα κυστεΐνης. Η οξείδωση του *Keap1* οδηγεί στην αδρανοποίηση του και την απελευθέρωση του *Nrf2*. Μόλις ο *Nrf2* απελευθερωθεί, μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου ετεροδιμερίζεται με μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών *sMaf* (*MafF*, *MafG* και *MafK*).[43] Πειράματα που παρέχουν γενετικά στοιχεία για τον ρόλο των πρωτεϊνών *sMaf* ως εταίρων δέσμευσης *Nrf2,* προέκυψαν από τη διασταύρωση *sMaf* knockout ποντικών με *Keap1* knockout ποντίκια. Τα *Keap1*$^{-/-}$ ποντίκια παρουσιάζουν υπερενεργοποίηση του *Nrf2*. Η υπερενεργοποίηση του *Nrf2* οδηγεί σε μεταγεννητική θνησιμότητα λόγω ανώμαλου πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων στον οισοφάγος και προστόμαχο.[48] Ο φαινότυπος αυτός μπορεί να αντιστραφεί τόσο με τη διακοπή του *Nfe212*, όσο και με την ταυτόχρονη διαγραφή των *MafG* και *MafF*, πράγμα που υποδηλώνει τον ρόλο των *sMafs* ως βασικούς εταίρους διμερισμού *Nrf2*.[43,48]



Εικ.14: Σε συνθήκες έλλειψης οξειδωτικού φορτίου, ο *Keap1* δεσμεύει και αδρανοποιεί τον Nrf2, ενώ παράλληλα δρα ως πρωτεΐνη προσαρμογέας για την Ε3 λιγάση *Cul3*. Η *Cul3* με τη σειρά της σημαίνει τον *Nrf2* με μόρια ουβικιτίνης και τον οδηγεί για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα. Υπό συνθήκες οξειδωτικού στρές, ο *Nrf2* αποδεσμεύεται από τον αναστολέα του, μεταβαίνει στον πυρήνα και με τη βοήθεια των πρωτεϊνών *sMafs* μεταγράφει γονίδια στόχους που περιέχουν στον υποκινητή τους την αλληλουχία ARE.[43]

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 14, το σύμπλεγμα *Nrf2-sMaf* αναγνωρίζει και δεσμεύεται στον υποκινητή των γονιδίων στόχων του *Nrf2* στην, ειδική για το αντιοξειδωτικό μονοπάτι, αλληλουχία ARE (antioxidant response element 5'–TGACXXXGC -3'). Οι περιοχές ARE ενώ αρχικά είχαν ταυτοποιηθεί ως cis-ρυθμιστικά στοιχεία για τα γονίδια της αφυδρογονάσης κινόνης NADPH 1 (*Nqo1*) και της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (*Gst*), αργότερα βρέθηκαν και άλλα γονίδια με τα οποία εμπλέκεται.[43] Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται γονίδια που σχετίζονται με τις αντιοξειδωτικές αποκρίσεις, την αποτοξίνωση των φαρμάκων, την αναγέννηση και τη ρύθμιση του NADPH του μεταβολισμού.[42] Άλλα γονίδια, τα

οποία ελέγχει ο *Nrf2* στο αντιοξειδωτικό σύστημα αφορούν βασικά συστατικά της γλουταθειόνης (*GSH*) και της θειοredοξίνης (*TXN*), το μεταβολισμό της αίμης και την αποτοξίνωση από ROS και ξενοβιοτικά (Εικόνα 15). Συνεπώς, ο *Nrf2* έχει κεντρικό ρόλο στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό του κυττάρου και αποτελεί μόριο "κλειδί" του αντιοξειδωτικού μηχανισμού.[41]



Εικ.15: Το σύμπλοκο *Nrf2-sMaf* αναγνωρίζει, μέσω των αλληλουχιών ARE, και ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται την παραγωγή και αναγέννηση του *GSH*, την αποτοξίνωση από ROS και ξενοβιοτικά, το σύστημα *TXN*, την αναγέννηση του NADPH και το μεταβολισμό της αίμης και του σιδήρου.[43]

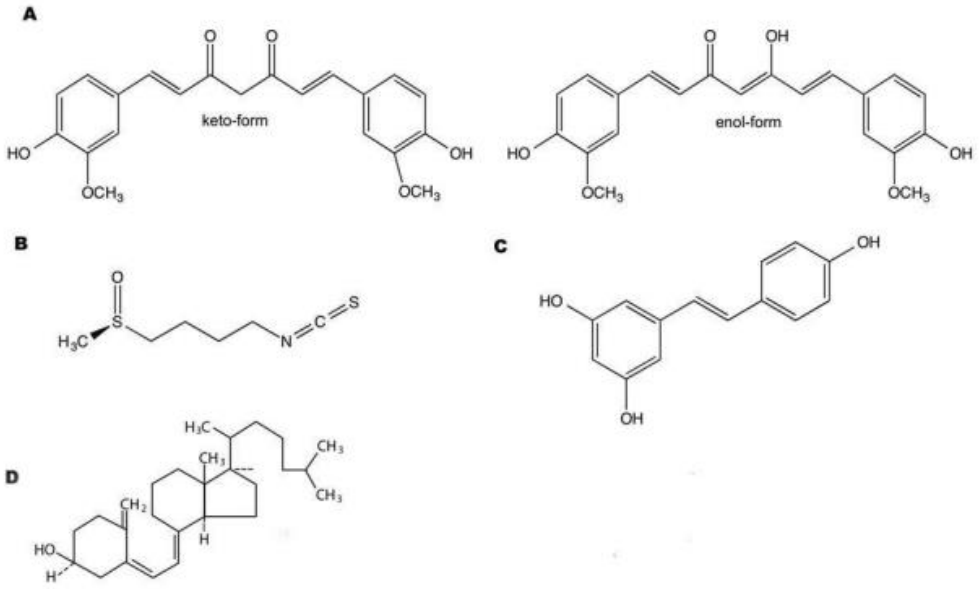
1.3.2 Η σκοτεινή πλευρά του *Nrf2* και η σχέση του με την καρκινογένεση

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, όταν τα κύτταρα προσβάλλονται από οξειδωτικό ή ξενοβιοτικό στρές, ενεργοποιείται το αντιοξειδωτικό μονοπάτι *NRF2-KEAP1*-ARE για τη θωράκιση του κυττάρου. Αφού το μονοπάτι του *Nrf2* αντιμετωπίζει βλαπτικούς παράγοντες για βιομόρια του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένου του DNA, η αρχική θεώρηση ήταν ότι το μόριο κλειδί του αντιοξειδωτικού μηχανισμού είναι υπεύθυνο για την προστασία από μία σειρά ασθενειών, μεταξύ των οποίων και του καρκίνου.[49] Πράγματι, έπειτα από μελέτες σε *Nrf2*$^{-/-}$ ποντίκια, αποδείχθηκε ότι απουσία του *Nrf2*, είναι πιο συχνή η ογκογένεση από χημικές καρκινογόνες ουσίες, σε σύγκριση με ποντίκια αγρίου τύπου.[49]

Η ενεργοποίηση και καταστολή του *Nrf2* γίνεται από μία σειρά παραγόντων, τόσο φυσικών, όσο και συνθετικών.[50,51,52]

I. **Φυσικοί ενεργοποιητές του *Nrf2*:**

Ένας σημαντικός φυσικός ενεργοποιητής του *Nrf2*, που μελετάται και σε κλινικές δοκιμές, είναι η σουλφοραφάνη (εικ. 16Β), που βρίσκεται σε σταυρανθή φυτά όπως το μπρόκολο και το λάχανο. [50,51,52] Άλλα σημαντικά μόρια είναι η κουρκουμίνη (εικ. 16Α) που παράγεται από τον κουρκουμά, η ρεσβερατρόλη (εικ. 16C) που βρίσκεται σε σταφύλια και το κόκκινο κρασί και η βιταμίνη D(εικ. 16D), η στερεοδιάταξη των οποίων αναπαρίσταται στην εικόνα 16.[51]



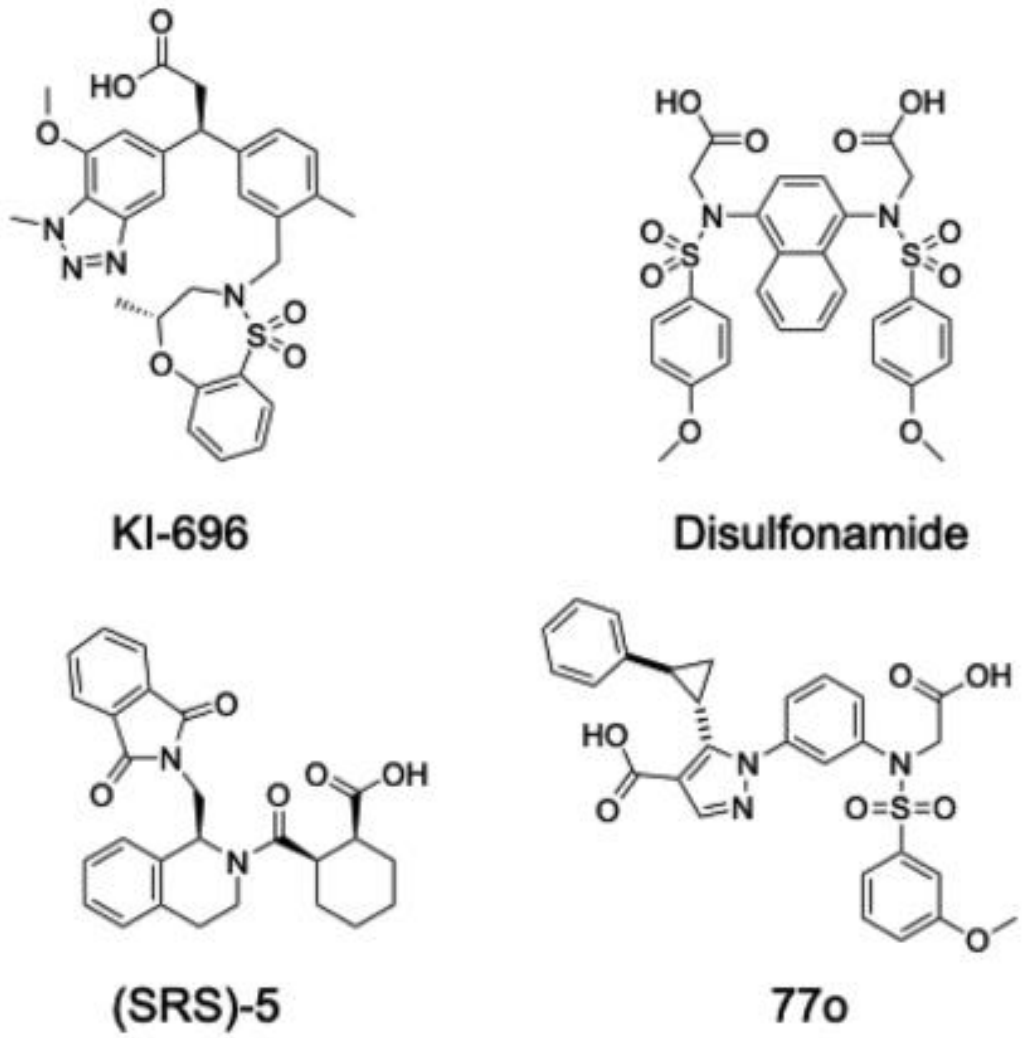
Εικ.16: Χημικός τύπος για : Α κουρκουμίνη, Β σουλφοραφάνη, C ρεσβερατρόλη, D βιταμίνη-D.[51]

Άλλες ενώσεις που ενεργοποιούν τον *Nrf2* και βρίσκονται σε τρόφιμα είναι οι αβικίκες (ανιχνεύεται στα Bentham plants), η καρνοσόλη (ανιχνεύεται στο δεντρολίβανο), οργανοθειικές ενώσεις σκόρδου, το zerumbone (ανιχνεύεται στο τζίντζερ), ενώσεις με βάση την κανέλα, τα cafestol και kahweol που βρίσκονται στον καφέ, το γουασάμπι, ο Φαιναιθυλεστέρας καφεϊκού οξέος (ανιχνεύεται στα κωνοφόρα δένδρα) και η γαλλική Επιγαλλοκατεχίνη-3 που βρίσκεται στο πράσινο τσάι.[52]

II. **Συνθετικοί και ημισυνθετικοί ενεργοποιητές του *Nrf2*:**

Οι τέσσερεις πιο πρόσφατοι συνθετικοί ενεργοποιητές του *Nrf2* είναι τα (SRS)-5, Benzene-disulfonamides, KI-696 και 77o (εικόνα 17), που

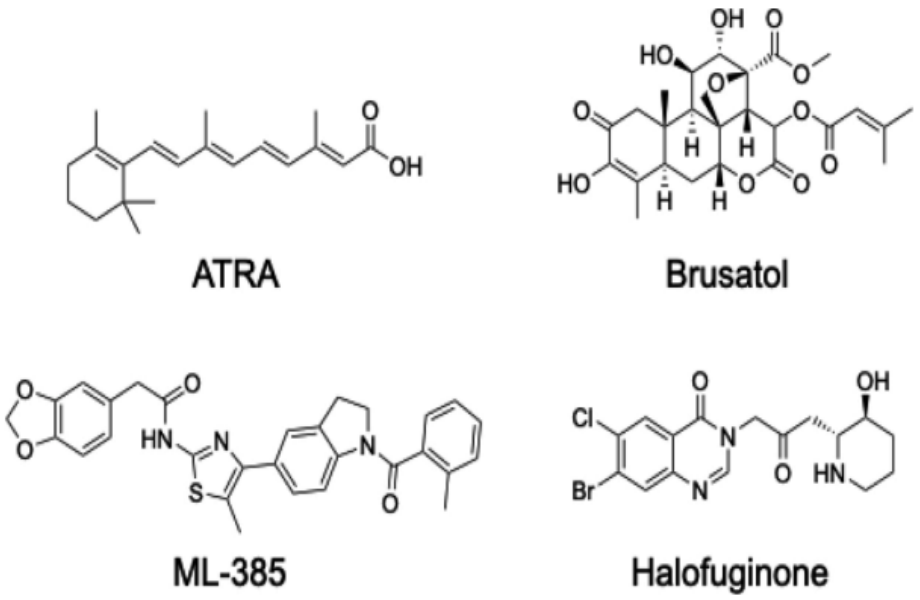
συμβάλουν στην απελευθέρωση του *Nrf2* από τον καταστολέα του *Keap1* και του επιτρέπουν να μετατοπιστεί στον πυρήνα και να δράσει ως μεταγραφικός παράγοντας για τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του.[50]



Εικ. 17: Τέσσερεις νέοι συνθετικοί ενεργοποιητές του *Nrf2*.[50]

III. **Αναστολείς του *Nrf2*:**

Στους αναστολείς του *Nrf2* συγκαταλέγονται 4 σημαντικά μόρια. Αυτά είναι τα all-trans retinoic acid (ATRA), η μπρουσατόλη, το ML385 και η αλοφουγινόνη. Η δράση αυτών των μορίων είναι να διαταράσσουν τη σηματοδότηση του μονοπατιού του *NRF2-KEAP1*-ARE και να μειώνουν τη μεταγραφική ικανότητα του *Nrf2* στα γονίδια στόχους του. Η χημική δομή των ενώσεων αυτών αναπαρίσταται στην εικόνα 18.



Εικ. 18: Αναστολείς του *Nrf2*.[50]

Αν και έχει δειχθεί ότι ο *Nrf2*, λόγω του αντιοξειδωτικού του ρόλου, προστατεύει τα κύτταρα από ασθένειες όπως ο καρκίνος, σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να προάγει την καρκινογένεση.[53] Μάλιστα, υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης προωθούν την εξέλιξη του όγκου, την μετάσταση και την αντίσταση στη χημειοθεραπεία. Ακόμη, έχει φανεί ότι ασθενείς με υψηλά επίπεδα έκφρασης *Nrf2* παρουσιάζουν πιο πτωχή πρόγνωση και μεγαλύτερη πιθανότητα υποτροπής.[53] Αυτός ο διττός ρόλος του *Nrf2* αναφέρεται και ως "η σκοτεινή πλευρά" του.[53] Σε αρκετούς ανθρώπινους καρκίνους ανιχνεύονται υψηλά επίπεδα έκφρασης *Nrf2*, που είναι αποτέλεσμα σωματικών μεταλλάξεων οι οποίες συντελούν στην απορρύθμιση του. Μεταλλάξεις που διαταράσσουν την αλληλεπίδραση του *Nrf2* με τον αναστολέα του *Keap1* είναι κοινές σε μία σειρά καρκινικών τύπων και ιδιαίτερα του καρκίνου του πνεύμονα, όπου εμφανίζονται στο ένα τρίτο των περιπτώσεων.[54] Μεταλλάξεις στον *Keap1* είναι συχνό φαινόμενο σε αρκετούς καρκίνους, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, της κεφαλής – τραχήλου και του πνεύμονα.[54] Σημαντικό στοιχείο αποτελεί η συχνότητα μεταλλαξιογένεσης του *Keap1* στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα, που υπερβαίνει το 30% των περιπτώσεων, ποσοστό ίδιο με το ογκοκατασταλτικό γονίδιο του *TP53*.[54] Καρκινικά κύτταρα, που έχουν σωματικές μεταλλάξεις σε *Nrf2* ή/και *Keap1* είναι πολύ πιο ευαίσθητα σε αναστολείς του μονοπατιού, καθώς στηρίζουν σε σημαντικό βαθμό την επιβίωση τους σε αυτό. Αίτιο αυτής της κατάστασης είναι το γεγονός ότι κατά τον γρήγορο και ανεξέλεγκτο

πολλαπλασιασμό τους, τα καρκινικά κύτταρα βρίσκονται συνεχώς υπό οξειδωτικό, πρωτεοτοξικό και μεταβολικό στρες.[55] Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ενεργοποίηση του *Nrf2* επιταχύνει τη μετάσταση σε όγκους ποντικών, ενώ σε *Nrf2* εξαρτώμενους όγκους, με εξασθένηση του αντιοξειδωτικού μονοπατιού μπορεί να επιτευχθεί επιβράδυνση της εξέλιξης του καρκίνου, μείωση της πιθανότητας μετάστασης και ευαισθητοποίηση των καρκινικών κυττάρων στη χημειοθεραπεία.[56] Τέλος, σίγαση του *Nrf2* θανατώνει ή κάνει πιο ευάλωτα τα *Nrf2* εξαρτώμενα καρκινικά κύτταρα, δίχως όμως να προκαλεί βλάβες στα φυσιολογικά, όπου η έκφραση της πρωτεΐνης είναι χαμηλή.[56]

Κεφάλαιο 2: Σκοπός και υπόθεση

Κάθε χρόνο διαγιγνώσκονται περισσότερες από 1,2 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις ασθενών με ΚΠΕ, οι οποίες αποτελούν περίπου το 10% όλων των καρκίνων. Οι ασθενείς με ΚΠΕ και εντοπισμένη νόσο έχουν 90% πιθανότητα για πενταετή επιβίωση, ενώ το ποσοστό μειώνεται δραματικά στο 10% για ασθενείς με απομακρυσμένες μεταστάσεις. Οι γνώσεις μας γύρω από την ετερογένεια και τη μοριακή βιολογία του ΚΠΕ αυξάνονται συνεχώς. Ταυτόχρονα με την διεύρυνση των γνώσεων μας γύρω από τη νόσο, προκύπτει και η ανάγκη για ανακάλυψη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων και στοχευμένων φαρμάκων, προκειμένου για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση της.

Η ενδεδειγμένη θεραπεία ασθενών με ΚΠΕ σταδίου ΙΙΙ και IV περιλαμβάνει τη χορήγηση χημειοθεραπευτικών σχημάτων με 5-φθοριουρακίλη (5-FU) και οξαλιπλατίνα. Παρόλα αυτά, η ανταπόκριση των ασθενών στα χημειοθεραπευτικά σχήματα ποικίλει. Ανάμεσα σε αυτούς τους ασθενείς, ορισμένοι παρουσιάζουν μειωμένη απάντηση ή αντίσταση στη χημειοθεραπεία, είτε από την αρχή της χορήγησης, είτε έπειτα από μερικούς κύκλους θεραπείας. Παρά την πληθώρα των μελετών σχετικά με τα αίτια εμφάνισης της χημειοανθεκτικότητας στον ΚΠΕ, οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ορισμένοι ασθενείς δεν ανταποκρίνονται στη χημειοθεραπεία μας είναι ακόμη άγνωστοι. Δύο πιθανοί μηχανισμοί, μέσω των οποίων αναπτύσσεται ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία είναι το μεταβολικό μονοπάτι με κεντρικό μόριο την ισομορφή *M2* της πυροσταφυλικής κινάσης (*PKM2*)

και το αντιοξειδωτικό μονοπάτι με κεντρικό ρυθμιστή τον πυρηνικό μεταγραφικό παράγοντα 2 (*Nrf2*).

Η παρούσα εργασία αφορά την μελέτη της ισομορφής *M2* του μεταβολικού παράγοντα της πυροσταφιλικής κινάσης (*PKM2*) και του αντιοξειδωτικού παράγοντα *Nrf2*. Οι δύο παραπάνω πρωτεΐνες έχουν ήδη χαρακτηρισθεί ως βασικά ρυθμιστικά μόρια του μεταβολικού φαινοτύπου των καρκινικών κυττάρων, δίχως όμως η αλληλεπίδρασή τους να έχει διευκρινιστεί επαρκώς. Από τη μία πλευρά, τα καρκινικά κύτταρα που έχουν αυξημένες ενεργειακές και βιοσυνθετικές ανάγκες, απαιτούν την αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης και την αξιοποίηση της σε αναβολικές διεργασίες μέσω ενός μηχανισμού που καλείται αερόβιος γλυκόλυση ή φαινόμενο Warburg. Σε αυτό το φαινόμενο κυρίαρχο ρόλο έχει η πυροσταφυλική κινάση *PKM2*, η οποία εμφανίζεται κυρίως ως διμερής και ως τετραμερής μορφή και συμμετέχει στο τελευταίο και καθοριστικό στάδιο της γλυκόλυσης για τη μετατροπή του φώσφο-ενολ-πυροσταφιλικού (*PEP*) σε πυροσταφυλικό. Η τετραμερής μορφή χαρακτηρίζεται από την υψηλή καταλυτική της δράση και εμπλέκεται σε καταβολικές διεργασίες ενώ η διμερής μορφή έχει χαμηλή καταλυτική δράση και συνεισφέρει επάγοντας γλυκολυτικά μονοπάτια και έμμεσα τη σύνθεση μακρομορίων για την κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμό και την εξουδετέρωση του ενδοκυττάριου οξειδωτικού φορτίου.

Από την άλλη πλευρά, το οξειδωτικό στρες, που προκαλείται από συσσώρευσης οξειδωτικών ριζών οξυγόνου και αζώτου, ενδέχεται να προκαλέσει σοβαρές και μη αναστρέψιμες ενδοκυττάριες βλάβες όπως μεταλλάξεις του γονιδιώματος, αποδιάταξη πρωτεϊνών και οξείδωση λιπιδίων που δυνητικά θα οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο. Κεντρικό μόριο του μεταβολισμού του οξειδωτικού φορτίου (redox metabolism) είναι ο μεταγραφικό παράγοντας *Nrf2*, ο οποίος ανήκει στο ενδοκυττάριο σηματοδοτικό μονοπάτι *Nrf2-Keap1*-ARE και επάγει τη μεταγραφή αντιοξειδωτικών και αποτοξινωτικών γονιδίων. Ο *Nrf2* σε συνθήκες μειωμένου οξειδωτικού φορτίου, βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα δεσμευμένος με τον αναστολέα του *Keap1* και οδηγείται σε πρωτεασωμική αποικοδόμηση μέσω ουβικιτινιλίωσης. Μόλις το οξειδωτικό φορτίο αυξηθεί, ο *Nrf2* αποδεσμεύεται και μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου μεταγράφει αντιοξειδωτικά γονίδια με υποκινητή ARE. Ενώ ο *Nrf2* σε πρώιμα στάδια καρκινογένεσης διατηρεί χημειοπροστατευτική δράση, σε προχωρημένα στάδια φαίνεται να αποδίδει στα καρκινικά κύτταρα πλεονέκτημα

επιβίωσης επιτρέποντας την επιβίωση τους ακόμη και σε συνθήκες με υψηλό οξειδωτικό φορτίο, όπως για παράδειγμα σε έκθεση των κυττάρων σε χημειοθεραπεία ή/και ακτινοθεραπεία. Αυτό το χαρακτηριστικό, καθώς και την αυξημένη βιοσυνθετική ικανότητα μέσω του Warburg effect και της σχετιζόμενης με αυτό *PKM2*, εκμεταλλεύονται τα καρκινικά κύτταρα για να αποκτήσουν πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι των υγιών. Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση πιθανής αλληλεπίδρασης μεταξύ *PKM2 – Nrf2* και τα αποτελέσματα αυτής στην αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα.

Κεφάλαιο 3: Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Υλικά

3.1.1 Κυτταρικές σειρές

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 7 κυτταρικές σειρές, οι οποίες προήλθαν από την American Type Culture Collection (ATCC; www.atcc.org), πίνακας 2. Από αυτές, οι τέσσερεις προέρχονται από αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου (LoVo, SW-480, HT-29 και CoLo-205), μία από ινοβλάστες του παχέος εντέρου (CCD-112 CON), μία από αδενοκαρκίνωμα ωοθηκών (Skov-3) και μία από καρκίνωμα του πνεύμονα (A-549).

Όργανο προέλευσης	**Κυτταρική σειρά**	**Κωδικός**
Αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου	LoVo	CCL-229
	SW-480	CCL-228
	HT-29	HTB-38
	Colo205	CCL-222
Αδενοκαρκίνωμα ωοθηκών	Skov3	HTB-77
Καρκίνωμα πνεύμονα	A549	CCL-185
Ινοβλάστες παχέος εντέρου	CCD112 CoN	CRL-1541

Πίν. 2: Κυτταρικές σειρές και κωδικοί εταιρείας.

3.1.2 Αναστολείς – Ενεργοποιητές των Nrf2/PKM2

Για τη διερεύνηση της ενεργότητας του *Nrf2* και της *PKM2* χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια, όπως περιγράφονται παρακάτω:

Επαγωγή/Αναστολή *Nrf2*:

Sulforaphane: Η σουλφοραφάνη (1-ισοθειοκυανικό-4-μεθυλσουλφινυλοβουτάνιο, SFN) είναι μία φυσική ισοθειοκυανική ένωση που εμπεριέχεται στα σταυρανθή φυτά, όπως το λάχανο και το μπρόκολο. Η δράση της σουλφοραφάνης είναι να ενεργοποιεί τον *Nrf2* σε περιπτώσεις αυξημένου οξειδωτικού φορτίου, ο οποίος στην πορεία μετατοπίζεται στον πυρήνα και εμπλέκεται στη μεταγραφή γονιδίων στόχων για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες. Ο τρόπος δράσης της σουλφοραφάνης περιλαμβάνει την τροποποίηση στις θειόλες της κυστεΐνης (C151, C489, C583) του *Keap1*, επιτρέποντας έτσι την απελευθέρωση του *Nrf2* από αυτόν. Σε πειράματα ποντικών έχει φανεί ότι με χρήση SFN αυξάνεται η συγκέντρωση του *Nrf2* και εμποδίζεται ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από αυξημένο οξειδωτικό στρες.[51]

Brusatol: Η ανακάλυψη της μπρουσατόλης αποτέλει τον πρώτο αναστολέα του μονοπατιού *Nrf2-Keap1*-ARE, λόγω του διττού ρόλου του *Nrf2* στην ογκογένεση. Η απομόνωση του έγινε από το *Brucea javanica* «*Macassar kernels*» και φάνηκε ότι αναστέλλει τη δραστηριότητα της ARE-λουσιφεράσης σε σταθερά επιμολυσμένα κύτταρα MDA-MB-231. Όταν η μπρουσατόλη χορηγήθηκε στην κυτταρική σειρά A-549 μείωσε την έκφραση του *Nrf2* σε σχεδόν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, δύο ώρες μετά τη χορήγηση της. Ωστόσο, τα επίπεδα *Nrf2* επιστρέφουν στις αρχικές τους τιμές, ακόμη και παρουσία αναστολέα, έπειτα από τρεις ημέρες. Αργότερα, αντίστοιχα αποτελέσματα έδωσαν και άλλες κυτταρικές σειρές με χορήγηση μπρουσατόλης. [50]

Επαγωγή/Αναστολή *PKM2*:

Shikonin: Η σικονίνη απομονώνεται από το φυτό *Lithospermum erythrorhizon* και παρουσιάζει θεραπευτικές ιδιότητες σε μία σειρά ασθενειών συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, ενώ προκαλεί ελάχιστες βλάβες στα φυσιολογικά κύτταρα. Η σικονίνη αναστέλλει την έκφραση της *PKM2*. Έτσι, καταστέλλεται ο πολλαπλασιασμός και η γλυκόλυση που ελέγχονται από την *PKM2* και τελικά τα νεοπλασματικά κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση. Ανάμεσα στους καρκινικούς τύπους όπου δρα η σικονίνη

είναι ο καρκίνος του προστάτη, ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, η λευχαιμία και το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.[57]

TEPP-46: Το TEPP-46 είναι ένας αλλοστερικός ενεργοποιητής της *PKM2* με ελάχιστη έως καμία επίδραση στις υπόλοιπες ισομορφές (*PKM1, PKL, PKR*). Ο τρόπος δράσης του TEPP-46 είναι να επάγει την τετραμερή μορφή της *PKM2* (με υψηλή ενζυμική ενεργότητα) και να παρεμποδίζει την μεταφορά της στον πυρήνα.[57]

Insulin: Η ινσουλίνη επάγει την έκφραση και τον διμερισμό της *PKM2*, οδηγώντας στη συσσώρευση δομικών λίθων απαραίτητων για τον ταχύ πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η *PKM2* στη διμερή της μορφή έχει χαμηλή *PK* ενεργότητα και δεν οδηγεί στη μετατροπή του φωσφο-ενολ-πυροσταφυλικού (*PEP*) σε πυροσταφυλικό. Έτσι, τα γλυκολυτικά συστατικά που προηγούνται του *PEP* συσσωρεύονται και μεταπηδούν στην οδό φωσφορικής πεντόζης (PPP), την οδό ουρονικού οξέος (UAP), την πορεία πολυόλης (PYP) και τη βιοσύνθεση αμινοξέων. Με αυτό τον τρόπο, η δράση της ινσουλίνης παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, μέσω της ρύθμισης της έκφρασης της *PKM2*.[34,35,58]

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων

3.2.1.1 Ξεπάγωμα καρκινικών κυττάρων

Όλες οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν αποθηκευμένες στους -80 ºC. Πριν από κάθε χρήση, πραγματοποιήθηκε ξεπάγωμα της εκάστωτε κυτταρικής σειράς σε υδατόλουτρο στους 37 ºC. Ακολούθησε η προσθήκη "στάγδην" 1 ml θρεπτικού, μεταφορά των κυττάρων σε falcon και προσθήκη στάγδην 10 ml θρεπτικού. Στην πορεία πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 5 min στις 750-800 rpm σε θερμοκρασία δωματίου (RT) και απομάκρυνση του υπερκείμενου με πιπέτα pasteur. Τέλος, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε φλάσκα T25 με 5-7 ml θρεπτικού υλικού, κατάλληλο για την εκάστοτε κυτταρική σειρά και επώαση στους 37 ºC 5% CO_2, για την ανάπτυξη της καλλιέργειας των κυττάρων.

3.2.1.2 Σπάσιμο και συγκομιδή καρκινικών κυττάρων

Μετά την ανάπτυξη της καλλιέργειας, για την αποκόλληση των κυττάρων από την φλάσκα, αρχικά έγινε απομάκρυνση του θρεπτικού με πιπέτα pasteur και ξέπλυμα της φλάσκας με PBS, pH 7.4. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη θρυψίνης και επώαση για 1-5 min, 37 ºC, 5% CO_2. Έπειτα, έγινε προσθήκη 9,5 ml θρεπτικού προκειμένου να αδρανοποιηθεί η θρυψίνη και ακολούθησε φυγοκέντηση σε 1200 rpm για 5 min. Στην πορεία, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, πραγματοποιήθηκε επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος και χρήση των κυττάρων.

3.2.2.1 Στρώσιμο καρκινικών κυττάρων σε plate και επώαση τους με 5FU και Oxaliplatin για εύρεση τιμής IC50

Η μεταχείριση προϋποθέτει το σπάσιμο και πέρασμα των κυττάρων σε falcon. Σε κάθε πείραμα επωαστήκαν κύτταρα σε plates για 24, 48 και 72 ώρες σε συγκεντρώσεις φαρμάκων 8μM,10μM και 15μM για Oxaliplatin και 8μM, 10μM και 16μM για 5FU, οι οποίες εν δυνάμει αυξάνονται σε πειράματα σταδιακά μέχρι να επιτευχθεί το IC50 στην κάθε κυτταρική σειρά. Το πείραμα ξεκινά με αραίωση των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο και μεταφορά σε 96 well plates. Στην πορεία γίνεται αφαίρεση του υπερκείμενου με πιπέτα gilson, προσθήκη αραιώσεων φαρμάκου (100 μl/well) και επώαση των κυττάρων σε 37 ºC, 5% CO_2.

3.2.2.2 Μέτρηση επιβίωσης των κυττάρων (Cell Viability Assay)

Η μέτρηση της επιβίωσης των κυττάρων γίνεται με τη χρήση του MTS-PMS (Promega, Madison, Wisconsin, U.S). Ο τρόπος δράσης του MTS-PMS solution περιλαμβάνει τη δημιουργία πόρων στην επιφάνεια των κυττάρων και τη δέσμευση των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων. Με την προσθήκη του MTS solution γίνεται χρωματική αλλαγή του MTS λόγω της δράσης ενζύμων αφυδρογονάσης που εξαρτώνται από NAD(P)H στα μεταβολικά ενεργά κύτταρα. Στην συνέχεια, με φωτομέτρηση των κυττάρων με το *Microplate reader* (Multiscan FC, Thermo Scientific), μπορούμε να έχουμε μία ποιοτική εικόνα του ποσοστού επιβίωσης των

κυττάρων “IC50” σε κάθε συγκέντρωση φαρμάκου συγκριτικά με την πορεία των κυττάρων ελέγχου (control) τα οποία εκτίθενται στις ίδιες συνθήκες, αλλά με απουσία φαρμάκου. Το MTS-PMS solution αποθηκεύεται στους -20 ºC, είναι τοξικό και φωτοευαίσθητο. Αρχικά γίνεται ξεπάγωμα των διαλυμάτων PMS και MTS σε υδατόλουτρο στους 37 ºC για 15 min ή σε θερμοκρασία δωματίου για 90 min. Ακολουθεί προσθήκη 20μl αντιδραστηρίου, επώαση για 1-4 h και φωτομέτρηση στα 490 nm

3.2.2.3 Στρώσιμο καρκινικών κυττάρων σε φλάσκα και μεταχείριση τους με φάρμακα

Αφού γίνει σπάσιμο και συγκομιδή των κυττάρων από τη φλάσκα καλλιέργειας, ακολουθεί αραίωση των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο με την βέλτιστη συγκέντρωση φαρμάκου, πέρασμα σε καινούρια φλάσκα και επώαση στον κλίβανο για το βέλτιστο χρονικό διάστημα, σε συνθήκες 37ºC και 5% CO_2.

3.2.2.4 Μονιμοποίηση καρκινικών κυττάρων σε αντικειμενοφόρους πλάκες

Η μέθοδος μονιμοποίησης κυττάρων σε αντικειμενοφόρο πλάκα απαιτεί την αραίωση των κυττάρων σε υγρό θρεπτικό μέσο. Η αντικειμενοφόρος πλάκα εισέρχεται στη βάση και συσφίγγεται με τον θαλαμίσκο, όπου προστίθεται 0,5 ml κυτταρικού διαλύματος. Ακολουθεί φυγοκέντριση στα 1200 rpm για 2 min και στέγνωμα σε θερμοκρασία δωματίου για λίγες ώρες, προτού τα κύτταρα αποθηκευτούν στους -80 ºC.

3.2.3 Πάγωμα καρκινικών κυττάρων

Η μέθοδος απαιτεί τη χρήση της κρυοπροστατευτικής ουσίας “DMSO”(Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), η οποία προστατεύει τα κύτταρα από το θάνατο λόγο μεγάλης μείωσης της θερμοκρασίας. Επιπλέον, το δοχείο Mister Frosty, που στη βάση του περιέχει ισοπροπανόλη (Scharlau, Barcelona, Spain), βοηθά στην σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας (1 ºC/min). Ακολουθούν τα εξής βήματα: Μεταφορά 500 μl κυτταρικού διαλύματος σε cryovials (10^6 cells/tube), προσθήκη

FBS / DMSO στάγδην, μεταφορά των σωληναρίων σε δοχείο “Mister Frosty” στους -20 ºC για μία ημέρα και ακολούθως αποθήκευση στους -80 ºC.

3.2.4 Τεχνική ανοσοφθορισμού σε μονιμοποιημένες κυτταρικές σειρές

Η τεχνική του ανοσοφθορισμού περιλαμβάνει την πρόσδεση γνωστού αντισώματος σε αντιγόνο στόχο και σήμανση αυτού με φθορίζουσα χρωστική για παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. Κατά την πειραματική διαδικασία τα υπό μελέτη κύτταρα πρέπει να είναι μονιμοποιημένα και διαπερατά στα αντισώματα και τις χρωστικές. Σε αυτό συντελεί το διάλυμα Ακετόνης /Μεθανόλης (9:1 v/v), ενώ παράλληλα αποφεύγεται η αυτόλυση των κυττάρων, τερματίζεται κάθε βιολογική διαδικασία, διατηρείται η μορφολογία τους και αυξάνεται η αντοχή τους σε μηχανική ρήξη. Για τις πλύσεις των κυττάρων και την αραίωση των αντισωμάτων (πίνακας 19) χρησιμοποιείται ένα δεύτερο διάλυμα (διάλυμα 2), το οποίο αποτελείται από 5% FBS και 95% PBS, pH 7.4. Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας και πριν το κλείσιμο του πλακιδίου με καλυπτρίδα, γίνεται προσθήκη σταγόνας DAPI/Antifade (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) που βοηθά στη χρώση των πυρήνων με μπλε χρώμα.

3.2.5 Western blot

3.2.5.1 Protein extraction

Η τεχνική της απομόνωσης ολικής πρωτεΐνης απαιτεί την τοποθέτηση τόσο των κυττάρων, όσο και όλων των αντιδραστηρίων στον πάγο για διατήρηση χαμηλής θερμοκρασίας, καθ’ όλη τη διάρκεια του πειράματος. Η διαδικασία ξεκινά με αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και πλύση της φλάσκας με FBS δύο φορές. Στην πορεία γίνεται προσθήκη αντιδραστηρίου RIPA για λύση των κυττάρων, καθώς και αναστολέων πρωτεϊνάσης και φωσφατάσης (Millipore Corp, Burlington, Massachusetts, USA) για προστασία των πρωτεϊνών από τα αντίστοιχα ένζυμα. Έπειτα από επώαση 15 λεπτών συλλέγεται το εναιώρημα με Cell Scraper σε μικροσωληνάρια όγκου 1.5 mL, φυγοκεντρείται στα 1200g για 15 λεπτά και το υπερκείμενο φυλάσσεται σε καθαρά tubes στους -80 ºC.

3.2.5.2 Bradford ποσοτικοποίηση

Για την διεξαγωγή της τεχνικής απαιτείται κατασκευή πρότυπης καμπύλης, με τη χρωστική που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί. Κατά την ποσοτικοποίηση δείγματος πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford, τα δείγματα πρέπει να ξεπαγώσουν τοποθετημένα στον πάγο, αν βρίσκονται στους -80ºC. Στην πορεία, γίνεται ανάδευση 10 μl δείγματος με 200 μl χρωστικής (Bio-Rad, *Dye Reagent)* και επώαση για 20 λεπτά. Τέλος, γίνεται φωτομέτρηση στα 595 nm και σύγκριση των απορροφήσεων του δείγματος με την καμπύλη αναφοράς.

3.2.5.3 Western Blotting

Το στύπωμα Western βοηθά στην ταυτοποίηση πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος, με τη βοήθεια ειδικών για αυτές αντισωμάτων. Η μέθοδος Western blot ξεκινά με την τοποθέτηση resolving και stacking gel ανάμεσα από τα τζαμάκια και αναμονή μέχρι αυτό να πήξει. Πάνω από το stacking gel τοποθετούνται χτενάκια, τα οποία θα μας δημιουργήσουν τα πηγαδάκια όπου θα φορτωθεί η πρωτεΐνη και ένας ladder, που βοηθά στον υπολογισμό του μοριακού βάρους της κάθε μπάντας που θα προκύψει αργότερα. Η πρωτεΐνη πρέπει να έχει μάζα 25-30 μg, ο όγκος της οποίας προκύπτει από τη μέθοδο Bradford. Στην πορεία το σύστημα μεταφέρεται σε δοχείο με running buffer (συνταγή στο παράρτημα 3.2.6) όπου γίνεται ηλεκτροφόρηση. Έπειτα, το gel επωάζεται για 5 λεπτά σε transfer buffer (συνταγή στο παράρτημα 3.2.6) και μεταφέρεται σε άλλο δοχείο με το ίδιο buffer σε μορφή σάντουιτς (σφουγγαράκι-whatman-gel-PVDF ή μεμβράνη νιτροκυτταρίνης-whatman-σφουγγαράκι) και ηλεκτροφόρηση για μία ώρα στα 100V. Στη συνέχεια γίνεται blocking της μεμβράνης με αποβουτυρομένο γάλα (5%) σε σκόνη και επώαση του πρωτογενούς αντισώματος (παράρτημα 3.2.6) overnight. Την επόμενη μέρα η μεμβράνη ξεπλένεται, επωάζεται με το δευτερογενές αντίσωμα και μεταφέρεται στο εμφανιστικό μηχάνημα για εμφάνιση των μπαντών.

Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα

4.1 Προσδιορισμός IC50

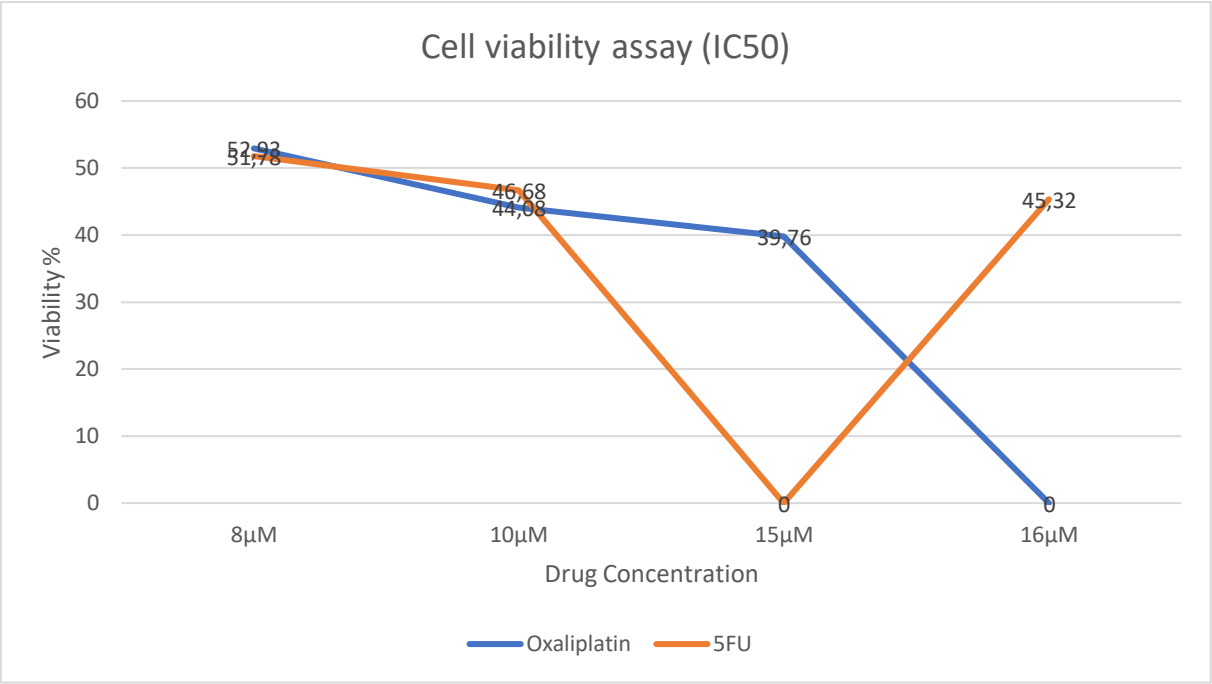
LoVo

Πραγματοποιήθηκε cell viability assay για την oxaliplatin σε συγκεντρώσεις 8μM, 10μM, 15μM και για το 5FU σε συγκεντρώσεις 8μM, 10μM και 16μM για την κυτταρική σειρά LoVo με σκοπό τον προσδιορισμό του IC50 (Γράφημα. 1). Η μέτρηση στο φωτόμετρο έγινε 24, 48 και 72 ώρες μετά την προσθήκη των φαρμάκων, με τα βέλτιστα αποτελέσματα να λαμβάνονται στις 48 ώρες επώασης(Πιν. 3) και το πείραμα επαναλήφθηκε 6 φορές σε μορφή triplicates .

Concentration Oxa.	**8μM**	**10μM**	**15μM**
Viability %	51,18	43,03	39,60
	50,00	48,56	45,42
	54,68	40,66	39,93
Concentration 5FU.	**8μM**	**10μM**	**16μM**
Viability %	55,36	48,28	48,85
	49,21	46,62	43,56
	50,78	45,14	43,56

Πιν. 3: Παρουσίαση της μέσης τιμής του ποσοστού επιβίωσης των κυττάρων LoVo για κάθε συγκέντρωση φαρμάκου.

Φαίνεται ότι η τιμή "IC50" για την καρκινική κυτταρική σειρά LoVo είναι στα 8μM συγκέντρωσης για την oxaliplatin και 8-10 μM για το 5FU για 48 ώρες επώασης, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρουσιάζεται μεγαλύτερη ευαισθησία, κυρίως για την oxaliplatin. Παρακάτω φαίνεται και το αντίστοιχο διάγραμμα % βιωσιμότητας των κυττάρων στις εκάστοτε συγκεντρώσεις φαρμάκων (Γράφημα. 1).



Γράφ. 1: Αναπαράσταση cell viability assay καρκινικής κυτταρικής σειράς LoVo για Oxaliplatin και 5FU.

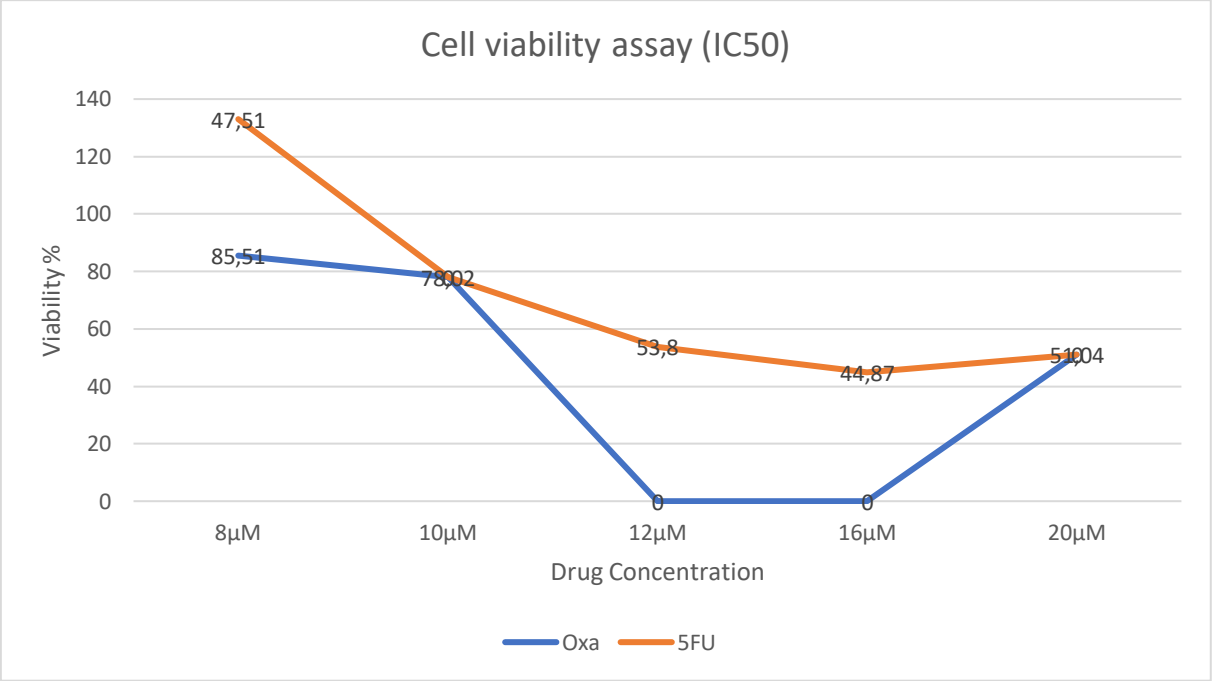
HT29

Σύμφωνα με το cell viability assay, για την κυτταρική σειρά HT29, έπειτα από μεταχείριση σε συγκεντρώσεις 8μM, 10μM, 20μM για την oxaliplatin και 10μM, 12μM και 16μM για το 5FU, φάνηκε ότι τα καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται στις 48 ώρες επώασης (Πιν. 4). Το πείραμα επαναλήφθηκε 6 φορές σε μορφή triplicates για 24, 48 και 72 ώρες έκαστος.

Concentration Oxa.	**8μM**	**10μM**	**20μM**
Viability %	85,51	78,02	51,04
	56,77	53,77	46,09
	55,33	47,09	52,81
Concentration5FU.	**10μM**	**12μM**	**16μM**
Viability %	47,51	53,80	44,87
	47,51	55,01	43,77
	36,90	44,40	36,77

Πιν. 4: Παρουσίαση της μέσης τιμής του ποσοστού επιβίωσης των κυττάρων HT29 για κάθε συγκέντρωση φαρμάκου.

Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα (Γράφ. 2), η καρκινική κυτταρική σειρά HT29 παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα Oxaliplatin και 5FU. Η τιμή IC50 για την oxaliplatin βρίσκεται στα 20μM, ενώ για το 5FU στα 12μM για 48 ώρες επώασης.



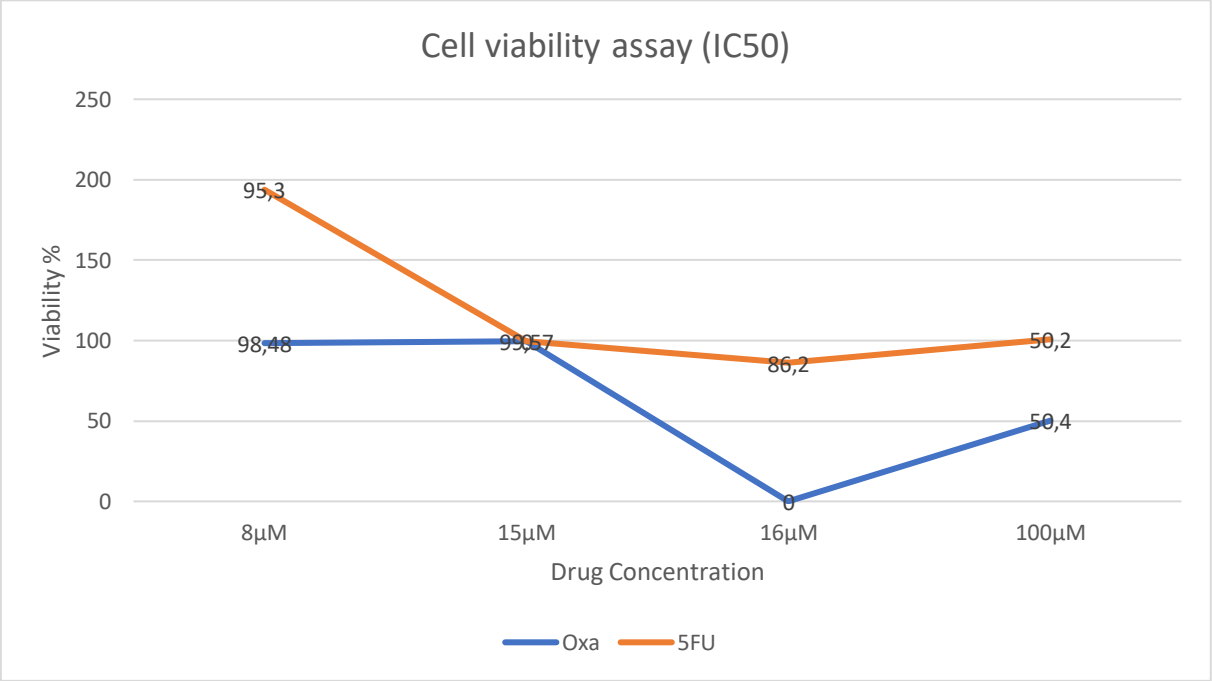
Γράφ. 2: Αναπαράσταση cell viability assay καρκινικής κυτταρικής σειράς HT29 για Oxaliplatin και 5FU.

Skov3

Σχετικά με την κυτταρική σειρά Skov3, έγινε επώαση σε 96 well plate για 24, 48 και 72 ώρες. Λόγω της μεγάλης ανθεκτικότητας των κυττάρων σε μικρότερες συγκεντρώσεις φαρμάκων, εκτελέστηκαν πειράματα εις τριπλούν σε συγκεντρώσεις 8μM,15μM ,20μM 50μM, 75μM, 100μM και 150μM για Oxaliplatin και 5FU. Η τελική συγκέντρωση "IC50" που οδηγεί σε %βιωσιμότητα των κυττάρων 55-60% παρουσιάζεται στα 100μM και για τα δύο φάρμακα σε 72 ώρες επώαση (γράφημα 3). Παρακάτω, στον πίνακα 5 φαίνονται οι τιμές απορρόφησης για διάφορες συγκεντρώσεις φαρμάκων για την κυτταρική σειρά Skov3.

Concentration Oxa.	**8μM**	**15μM**	**100μM**
Viability %	98,48	99,57	56,4
	128,39	141,52	55,3
	146,12	133,22	50,1
Concentration 5FU.	**8μM**	**16μM**	**100μM**
Viability %	95,3	86,2	50,2
	106,93	111,97	51,8
	128,98	97,38	60,1

Πιν. 5: Παρουσίαση της μέσης τιμής του ποσοστού επιβίωσης των κυττάρων Skov3 για κάθε συγκέντρωση φαρμάκου.



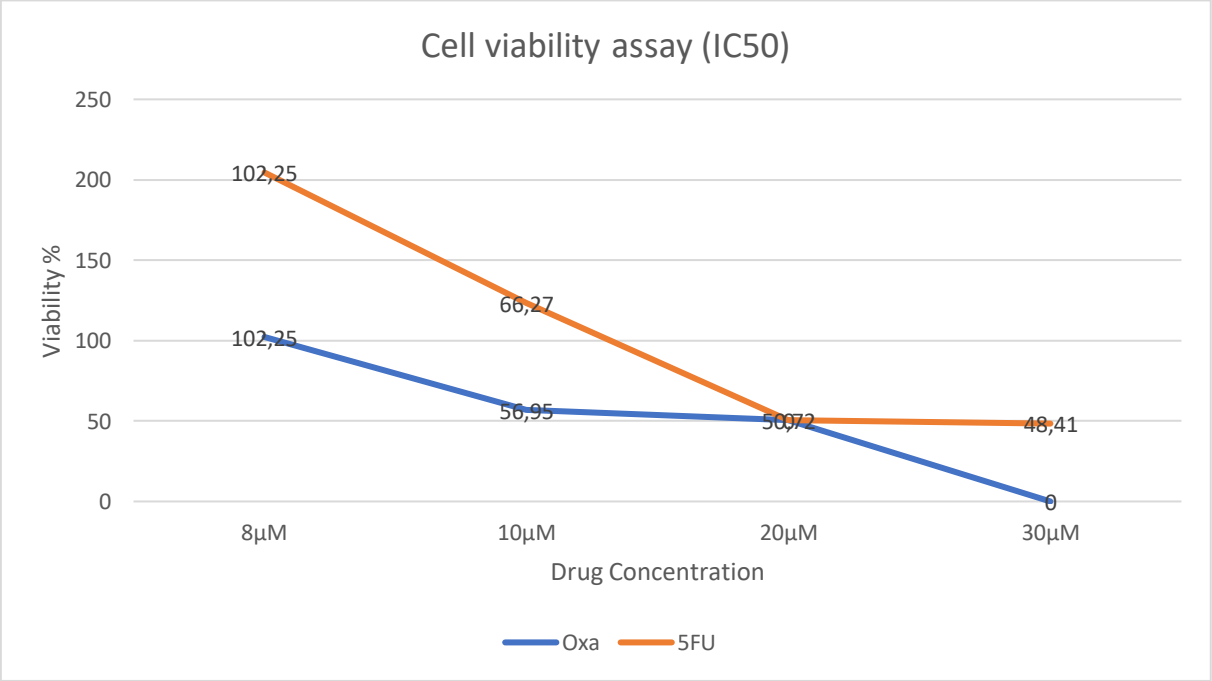
Γράφ. 3: Αναπαράσταση cell viability assay καρκινικής κυτταρικής σειράς Skov3 για Oxaliplatin και 5FU

A-549

Για την καρκινική σειρά A549, έγινε επώαση σε 96 well plate για 24, 48 και 72 ώρες. Οι συνθήκες καλλιέργειας που αντιστοιχούν στο σημείο του IC50 είναι: 20μM Oxaliplatin / 30μM 5FU για 72 ώρες (Πιν.6). Το πείραμα επαναλήφθηκε 6 φορές σε μορφή triplicates και τα αποτελέσματα φαίνονται στη γραφική παράσταση (Γράφ. 4).

Concentration Oxa.	**8μM**	**10μM**	**20μM**
Viability %	88,87	72,56	47,56
	71,57	62,63	50,72
	86,95	67,63	51,95
Concentration 5FU.	**8μM**	**10μM**	**30μM**
Viability %	102,25	48,41	50,71
	65,84	36,94	45,98
	66,55	14,73	66,27

Πιν. 6: Παρουσίαση της μέσης τιμής του ποσοστού επιβίωσης των κυττάρων A-549 για κάθε συγκέντρωση φαρμάκου.



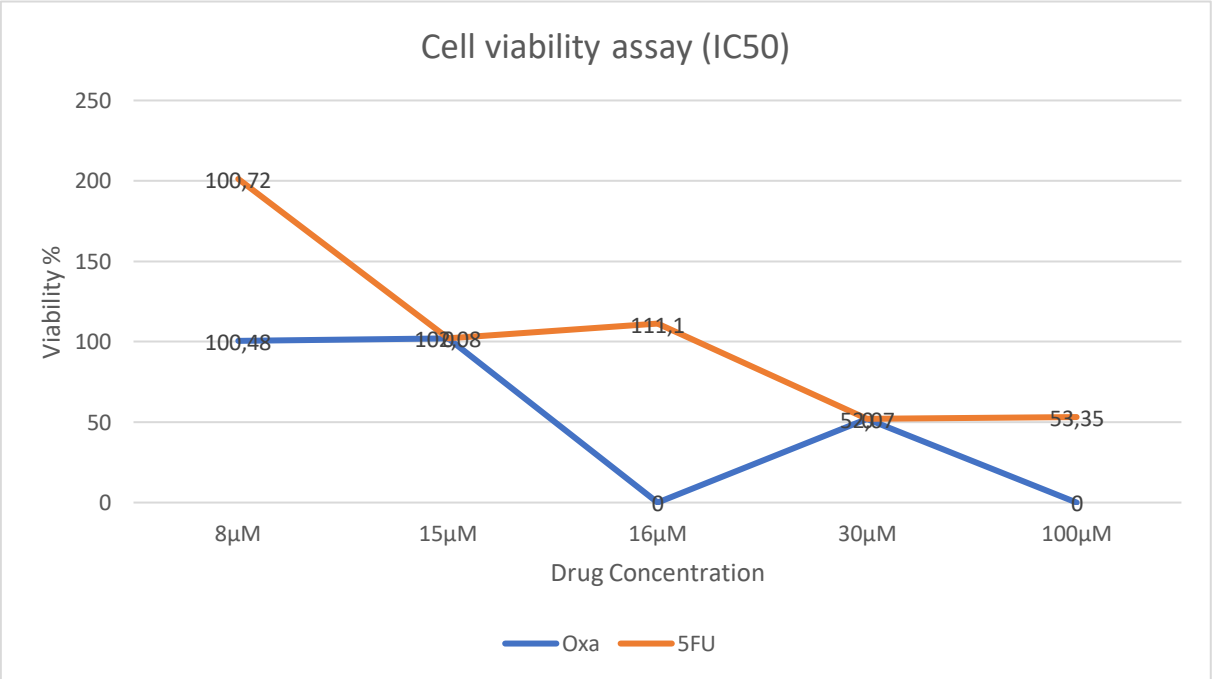
Γράφ. 4: Αναπαράσταση cell viability assay καρκινικής κυτταρικής σειράς A-549 για Oxaliplatin και 5FU.

Colo205

Οι συγκεντρώσεις "IC50" για την οξαλιπλατίνη και το 5FU για την καρκινική κυτταρική σειρά Colo205, έπειτα από επώαση για 72 ώρες σε 96well plate βρέθηκαν στα 30μM και 100μM αντίστοιχα(γράφημα 5) και οι τιμές απορρόφησης παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

Concentration Oxa.	**8μM**	**15μM**	**30μM**
Viability %	100,77	102,72	67,48
	100,2	101,45	52,07
	100,48	102,05	59,77
Concentration 5FU.	**8μM**	**16μM**	**100μM**
Viability %	102,04	100,08	61,27
	99,4	122,12	45,44
	100,72	111,1	53,35

Πιν. 7: Παρουσίαση της μέσης τιμής του ποσοστού επιβίωσης των κυττάρων Colo205 για κάθε συγκέντρωση φαρμάκου.



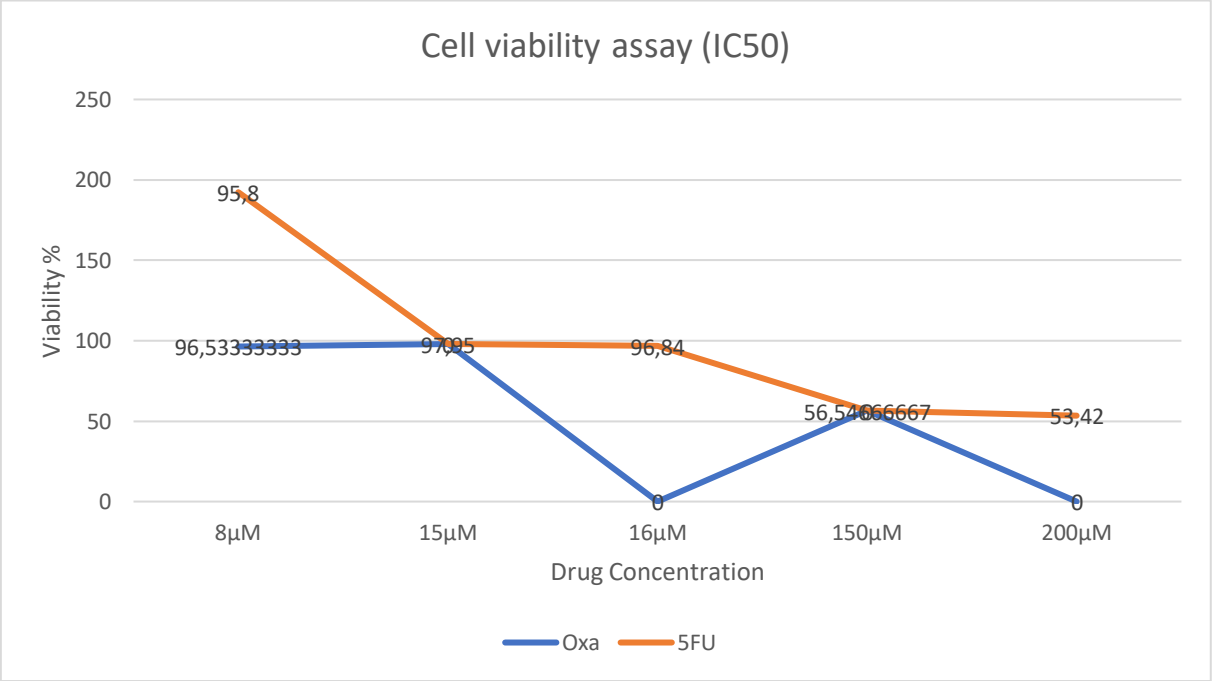
Γράφ. 5: Αναπαράσταση cell viability assay καρκινικής κυτταρικής σειράς Colo205 για Oxaliplatin και 5FU.

SW480

Παρομοίως, αναφορικά με την καρκινική κυτταρική σειρά SW480, οι συγκεντρώσεις "IC50" για οξαλιπλατίνη και 5FU είναι 150μM και 200μM αντίστοιχα για 72 ώρες επώαση (γράφημα 6). Οι αντίστοιχες τιμές απορρόφησης για την κυτταρική σειρά SW480 παρουσιάζονται στον πίνακα 8.

Concentration Oxa.	**8μM**	**15μM**	**150μM**
Viability %	96,4	98,07	54,8
	96,7	97,83	65,14
	96,5	97,95	49,7
Concentration 5FU.	**8μM**	**16μM**	**200μM**
Viability %	95,18	94,64	64,8
	96,42	99,04	55,3
	95,8	96,84	53,42

Πιν. 8: Παρουσίαση της μέσης τιμής του ποσοστού επιβίωσης των κυττάρων SW480 για κάθε συγκέντρωση φαρμάκου.



Γράφ. 6: Αναπαράσταση cell viability assay καρκινικής κυτταρικής σειράς SW480 για Oxaliplatin και 5FU.

CCD112 Con

Αντίστοιχα, για την κυτταρική σειρά CCD112, οι συγκεντρώσεις των δύο φαρμάκων που πλησιάζουν στην τιμή βιωσιμότητας IC50 είναι στα 100 και 200 μM για Oxaliplatin και 5FU.

Οι τελικές συγκεντρώσεις και μέρες επώασης φαρμάκων και το θρεπτικό για την κάθε κυτταρική σειρά παρουσιάζονται στον πίνακα 9.

Cell Line	Cancer Type	Oxaliplatin	5FU	Days	Medium
LoVo	**Colorectal Adeno**	8μM	10μM	2	F 12 Hams
SW480	**Colorectal Adeno**	150μM	200μM	3	Mc Coys
HT29	**Colorectal Adeno**	20μM	12μM	2	RPMI 1640
Skov3	**Ovarian Adeno**	100μM	100μM	3	Mc Coys
Colo205	**Colorectal Adeno**	30μM	100μM	3	RPMI 1640
A549	**Lung epithelial**	20μM	30μM	3	F 12 K Nut
CCD112 Con	**Colorectal Healthy**	100μM	200μM	2	MEM Eagle's

Πιν. 9: Βέλτιστες συγκεντρώσεις και μέρες επώασης φαρμάκων ανά κυτταρική σειρά.

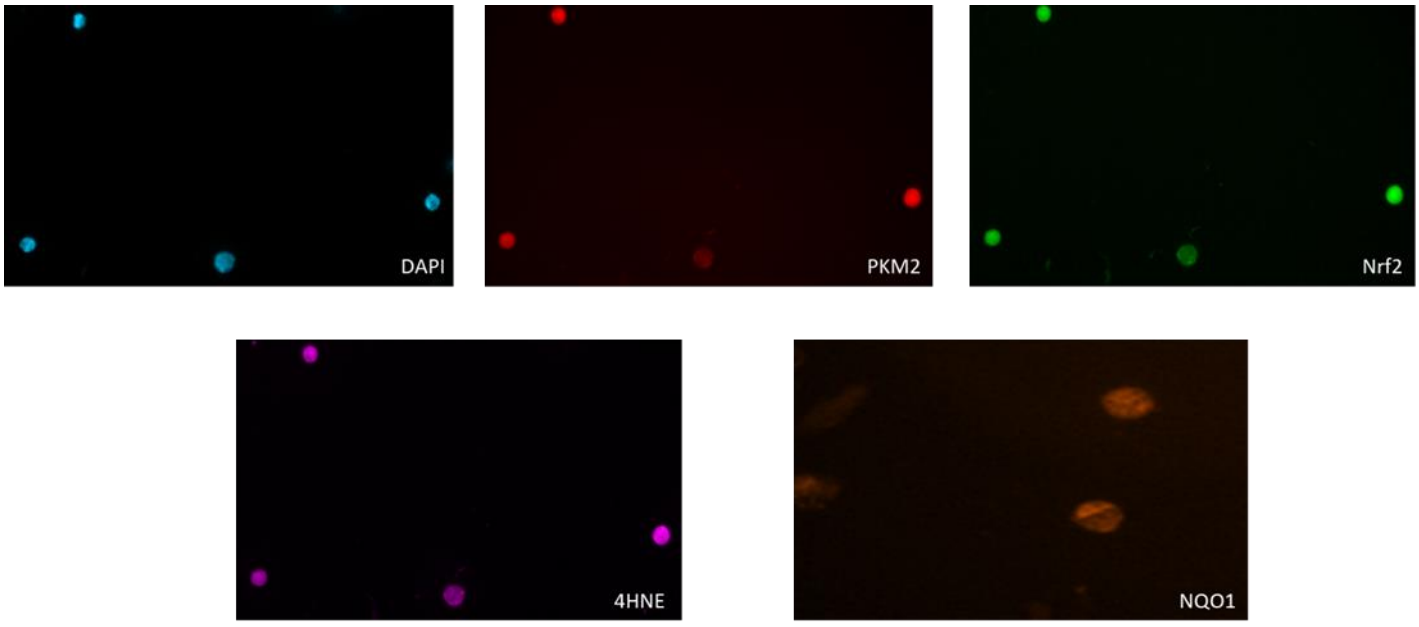
4.2 Βελτιστοποίηση του ανοσοφθορισμού για τον εντοπισμό των: *PKM2, NRF2, NQO1* και *4HNE*

Για την βελτιστοποίηση των συγκεντρώσεων του ανοσοφθορισμού, για την ανίχνευση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος (*PKM2, Nrf2, NQO1* και *4HNE*), έγινε χρώση σε πλακάκια με μονιμοποιημένα καρκινικά κύτταρα σε διάφορες συγκεντρώσεις αντισωμάτων**.** Τα πειράματα με τις συγκεντρώσεις που παρείχαν τα βέλτιστα αποτελέσματα επαναλήφθηκαν με σκοπό την επαλήθευση των αποτελεσμάτων, τα οποία φαίνονται στον πίνακα 10, καθώς επίσης και τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν (πρωτογενή και δευτερογενή).

Πρωτογενές Αντισώματα	Βέλτιστες συγκεντρώσεις	Δευτερογενές Αντίσωμα	Βέλτιστες συγκεντρώσεις
PKM2 (rabbit)	1/400	**Alexa Fluor 488 (**anti-mouse)	1/300
Nrf2 (mouse)	1/100	**Alexa Fluor 633** (anti-rabbit)	1/400
NQO1(rabbit)	1/800	**Alexa Fluor 633** (anti-rabbit)	1/400
4HNE (goat)	1/50	**Alexa Fluor 546** (anti-goat)	1/400

Πιν. 10: Βέλτιστες συγκεντρώσεις ανοσοφθορισμού για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος.

Παρακάτω φαίνονται τυπικές εικόνες του ανοσοφθορισμού (Εικ. 19) για κάθε πρωτεΐνη ενδιαφέροντος (με πράσινο χρώμα), όπως επίσης και η χρώση των πυρήνων των ζωντανών κυττάρων με DAPI/ Antifade (μπλε χρώμα).



Εικ. 19: Ανίχνευση των πρωτεϊνών *PKM2,Nrf2,4HNE,NQO1* με την τεχνική του ανοσοφθορισμού.

4.3 Τεχνική τριπλού ανοσοφθορισμού

4.3.1 Κυτταρικές σειρές χωρίς Hepes

Κατά την τεχνική του τριπλού ανοσοφθορισμού, για κάθε πλακάκι μελετήθηκε ίσος αριθμός μικροσκοπικών πεδίων. Η παρατήρηση έγινε σε zeiss axio imager a2 μικροσκόπιο και οι εικόνες ελήφθησαν με ZEISS Axiocam 503 mono κάμερα (ZEISS,

Jena,Germany). Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα εξής κριτήρια:

1) Η ένταση των πρωτεϊνών σε κλίμακα φθορισμού negative, low και high.
2) Η υποκυτταρική εντόπιση της έκφρασης των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος σε τέσσερα διαμερίσματα του κυττάρου (πυρήνας, κυτταρόπλασμα, πυρηνική μεμβράνη, πλασματική μεμβράνη).
3) Η κατανομή του ανοσοφθορισμού των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος με ποιοτικούς χαρακτήρες (στικτή ή διάχυτη χρώση).

Παρακάτω, στους πίνακες 11-17 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού για κάθε κυτταρική σειρά.

LoVo	**Nrf2**			**PKM2**			**NQO1**			**HO8G**		
ΧΦ	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*
	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**	N:- C:-	N:- C:-	**N:+** **C:+**	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**
oxa	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*
	N:- C:-	N:- **C:+**	**N:+** C:-	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**	N:- C:-	**N:+** **C:+**	N:- C:-	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**
5FU	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*
	N:+ C:-	N:- C:-	N:- **C:+**	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**	**N:+** C:-	N:- **C:+**	N:- C:-	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**

Πίν. 11: Επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών *Nrf2, PKM2, NQ01* και *HO-8G* στην κυτταρική σειρά LoVo (ΧΦ: χωρίς προσθήκη φαρμάκου, N: nuclear, C: cytoplasmic)

HT29	**Nrf2**			**PKM2**			**NQO1**			**HO8G**		
ΧΦ	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*
	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**
oxa	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*
	N:- C:-	**N:+** **C:+**	N:- C:-	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**	N:- C:-	N:- C:-	**N:+** **C:+**	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**
5FU	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*
	N:- C:-	**N:+** **C:+**	N:- C:-	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**	N:- C:-	N:- C:-	**N:+** **C:+**	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**

Πίν. 12: Επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών *Nrf2, PKM2, NQ01* και *HO-8G* στην κυτταρική σειρά HT29 (ΧΦ: χωρίς προσθήκη φαρμάκου, N: nuclear, C: cytoplasmic)

Colo205	**Nrf2**			**PKM2**			**NQO1**			**HO8G**		
ΧΦ	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*

	N:- C:-	**N:**+ C:-	N:- **C:**+	N:- C:-	**N:**+ C:-	N:- **C:**+	N:- C:-	**N:**+ C:-	N:- **C:**+	N:- C:-	**N:**+ **C:**+	N:- C:-
oxa	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*
	N:- C:-	**N:**+ **C:**+	N:- C:-	N:- C:-	N:- **C:**+	**N:**+ C:-	N:- C:-	**N:**+ C:-	N:- **C:**+	N:- C:-	N:- **C:**+	**N:**+ C:-
5FU	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*
	N:- C:-	**N:**+ **C:**+	N:- C:-	N:- C:-	**N:**+ **C:**+	N:- C:-	N:- C:-	**N:**+ **C:**+	N:- C:-	N:- C:-	**N:**+ **C:**+	N:- C:-

Πίν. 13: Επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών *Nrf2, PKM2, NQ01* και *HO-8G* στην κυτταρική σειρά Colo205 (ΧΦ: χωρίς προσθήκη φαρμάκου, N: nuclear, C: cytoplasmic)

SW480	**Nrf2**			**PKM2**			**NQO1**			**HO8G**		
ΧΦ	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*
	N:- C:-	**N:**+ **C:**+	N:- C:-	N:- C:-	**N:**+ **C:**+	N:- C:-	N:- C:-	N:- C:-	**N:**+ **C:**+	N:- C:-	**N:**+ **C:**+	N:- C:-
oxa	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*
	N:- C:-	**N:**+ **C:**+	N:- C:-	N:- C:-	**N:**+ C:-	N:- **C:**+	N:- C:-	**N:**+ C:-	N:- **C:**+	N:- C:-	**N:**+ C:-	N:- **C:**+
5FU	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*
	N:- C:-	**N:**+ C:-	N:- **C:**+	N:- C:-	**N:**+ C:-	N:- **C:**+	N:- C:-	**N:**+ C:-	N:- **C:**+	N:- C:-	**N:**+ C:-	N:- **C:**+

Πίν. 14: Επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών *Nrf2, PKM2, NQ01* και *HO-8G* στην κυτταρική σειρά SW-480 (ΧΦ: χωρίς προσθήκη φαρμάκου, N: nuclear, C: cytoplasmic)

Skov3	**Nrf2**			**PKM2**			**NQO1**			**HO8G**		
ΧΦ	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*
	N:- C:-	**N:**+ **C:**+	N:- C:-	N:- C:-	**N:**+ C:-	N:- **C:**+	**N:**+ C:-	N:- C:-	N:- **C:**+	N:- C:-	**N:**+ C:-	N:- **C:**+
oxa	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*
	N:+ C:-	N:- C:-	N:- **C:**+	**N:**+ C:-	N:- C:-	N:- **C:**+	N:- C:-	**N:**+ C:-	N:- **C:**+	**N:**+ C:-	N:- C:-	N:- **C:**+
5FU	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*
	N:+ C:-	N:- C:-	N:- **C:**+	**N:**+ C:-	N:- C:-	N:- **C:**+	N:- C:-	**N:**+ C:-	N:- **C:**+	**N:**+ C:-	N:- C:-	N:- **C:**+

Πίν. 15: Επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών *Nrf2, PKM2, NQ01* και *HO-8G* στην κυτταρική σειρά Skov-3 (ΧΦ: χωρίς προσθήκη φαρμάκου, N: nuclear, C: cytoplasmic)

A549	Nrf2			PKM2			NQO1			HO8G		
ΧΦ	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*
	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**	**N:+** C:-	N:- C:-	**N:+** **C:+**	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**
oxa	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*
	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**	**N:+** C:-	N:- C:-	N:- **C:+**	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**
5FU	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*
	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**

Πίν. 16: Επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών *Nrf2*, *PKM2*, *NQ01* και *HO-8G* στην κυτταρική σειρά A549 (ΧΦ: χωρίς προσθήκη φαρμάκου, N: nuclear, C: cytoplasmic)

CCD-112Con	Nrf2			PKM2			NQO1			HO8G		
ΧΦ	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*	*neg*	*low*	*high*
	N:- C:-	N:- **C:+**	**N:+** C:-	N:- C:-	N:- C:-	**N:+** **C:+**	N:- C:-	**N:+** C:-	N:- **C:+**	N:- C:-	N:- **C:+**	**N:+** C:-

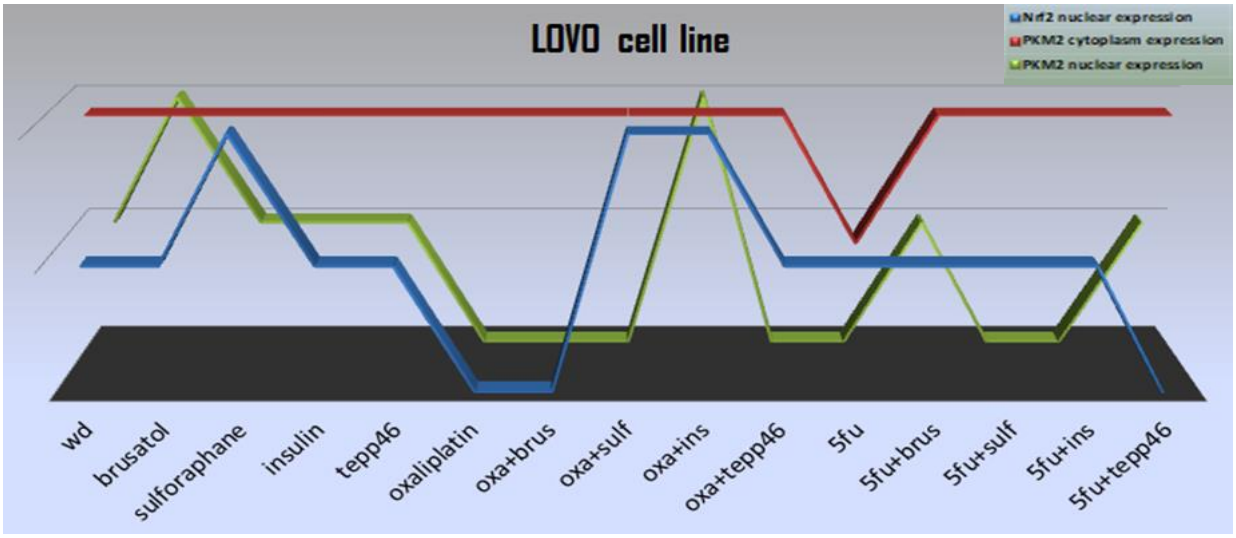
Πίν. 17: Επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών *Nrf2*, *PKM2*, *NQ01* και *HO-8G* στην κυτταρική σειρά CCD112 CON (ΧΦ: χωρίς προσθήκη φαρμάκου, N: nuclear, C: cytoplasmic)

4.3.2 Κυτταρικές σειρές με προσθήκη Hepes και ρυθμιστών ενεργότητας *PKM2-Nrf2*

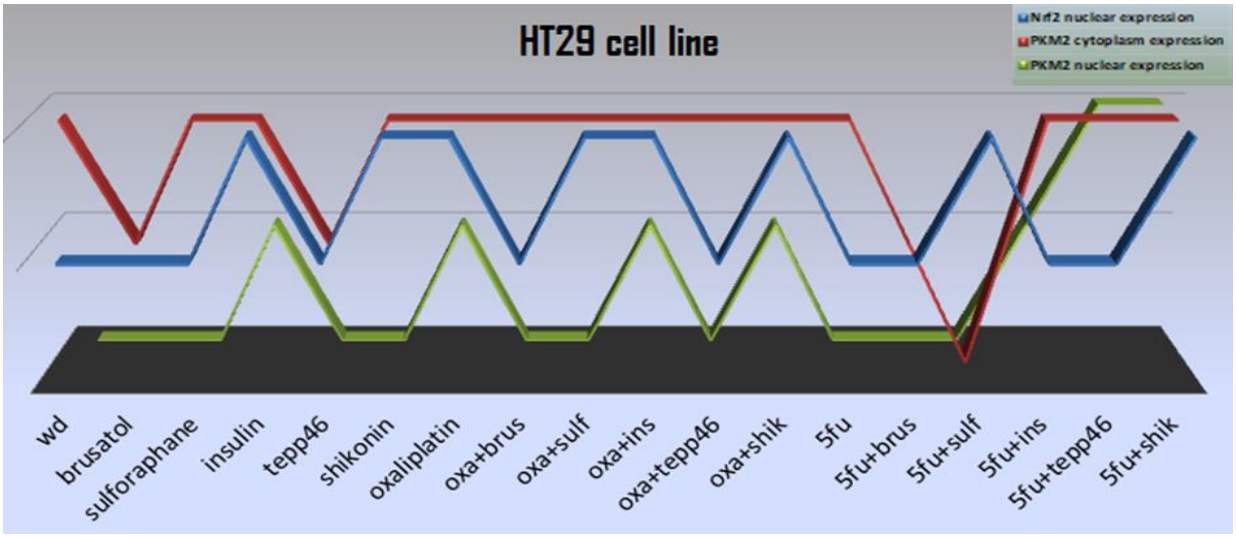
Για την πειραματική διαδικασία έγινε χρήση Hepes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) και επαγωγέων/αναστολέων της PKM2 (Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, USA) και του Nrf2 (Santa Cruz Biotechnology, California) με και χωρίς τη χρήση φαρμάκων (Oxaliplatin και 5FU) κατά την καλλιέργεια των κυττάρων. Από αυτές τις καλλιέργειες, ένα μέρος των κυττάρων στρώθηκε σε αντικειμενοφόρους πλάκες για ανοσοφθορισμό και ένα άλλο μέρος χρησιμοποιήθηκε για cell viability. Τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού για κάθε κυτταρική σειρά, για κάθε συνθήκη ρυθμιστή/φαρμάκου καθώς και για τον υποκυτταρικό εντοπισμό (πυρήνας-κυτταρόπλασμα) των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος (PKM2/Nrf2) παρουσιάζονται στα γραφήματα 7 - 12 παρακάτω. Οι συγκεντρώσεις των ρυθμιστών και του Hepes παρουσιάζονται στον πίνακα 18.

Αντιδραστήριο	**Brutasol**	**Shikonin**	**Sulforaphane**	**TEPP.46**	**Insulin**	**Hepes**
Συγκέντρωση	0,5μM	5μM	15μM	50μM	50nM	15mM

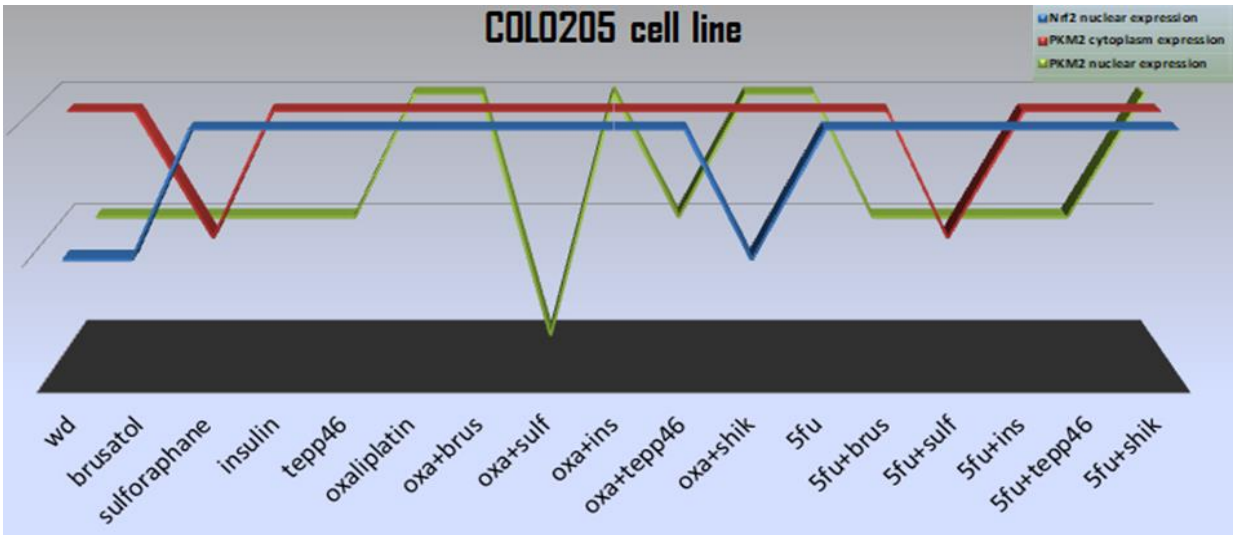
Πιν. 18: Συγκέντρωση Hepes και ρυθμιστών ενεργότητας της *PKM2* και του *Nrf2*.



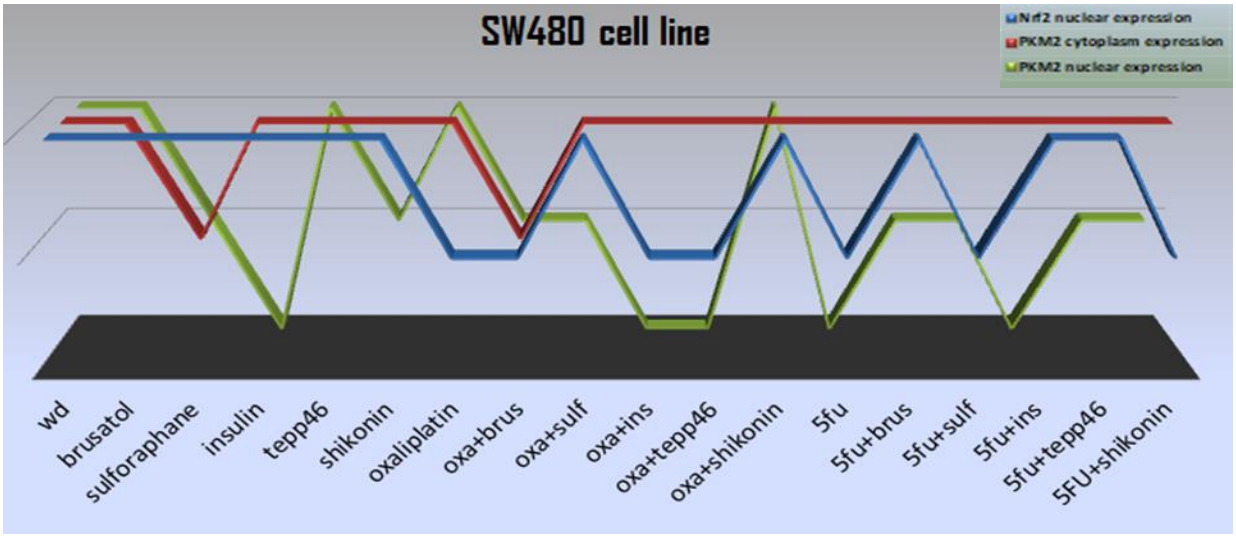
Γράφ. 7: Ανοσοφθορισμός κυτταρικής σειράς LoVo. 1) Πυρηνική έκφραση του *Nrf2*. 2) Πυρηνική και κυτταροπλασματική έκφραση της *PKM2*.



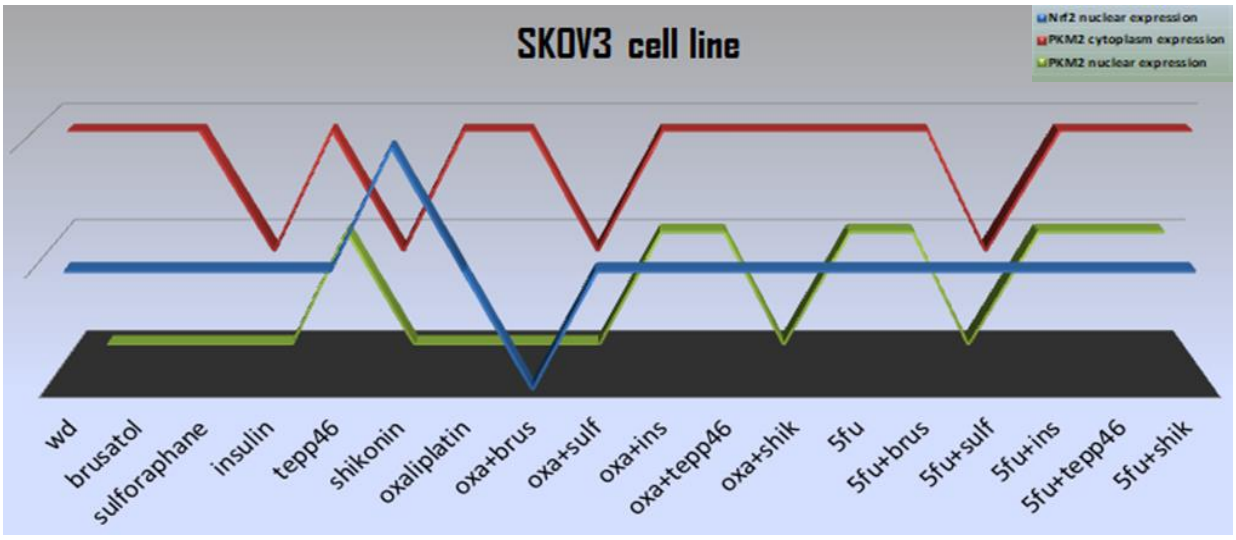
Γράφ. 8: Ανοσοφθορισμός κυτταρικής σειράς HT29. 1) Πυρηνική έκφραση του *Nrf2*. 2) Πυρηνική και κυτταροπλασματική έκφραση της *PKM2*.



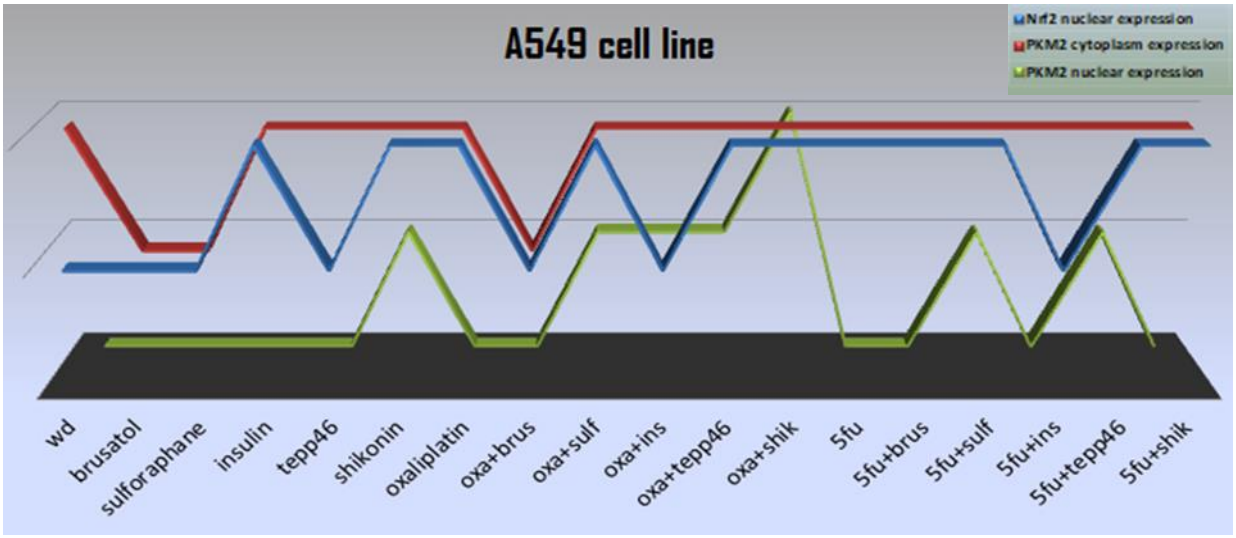
Γράφ. 9: Ανοσοφθορισμός κυτταρικής σειράς CoLo205. 1) Πυρηνική έκφραση του *Nrf2*. 2) Πυρηνική και κυτταροπλασματική έκφραση της *PKM2*.



Γράφ. 10: Ανοσοφθορισμός κυτταρικής σειράς SW480. 1) Πυρηνική έκφραση του *Nrf2*. 2) Πυρηνική και κυτταροπλασματική έκφραση της *PKM2*.



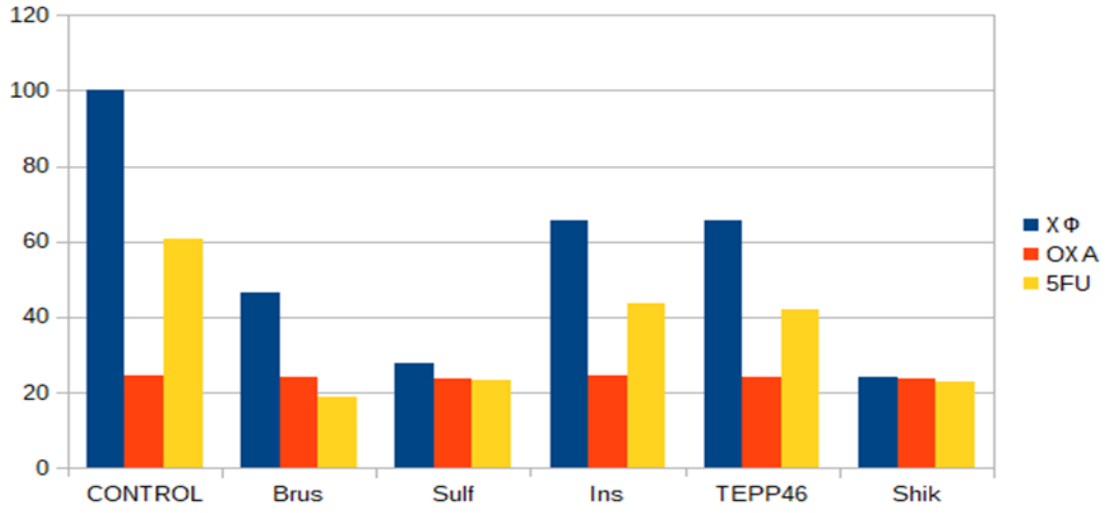
Γράφ. 11: Ανοσοφθορισμός κυτταρικής σειράς Skov3. 1) Πυρηνική έκφραση του *Nrf2*. 2) Πυρηνική και κυτταροπλασματική έκφραση της *PKM2*.



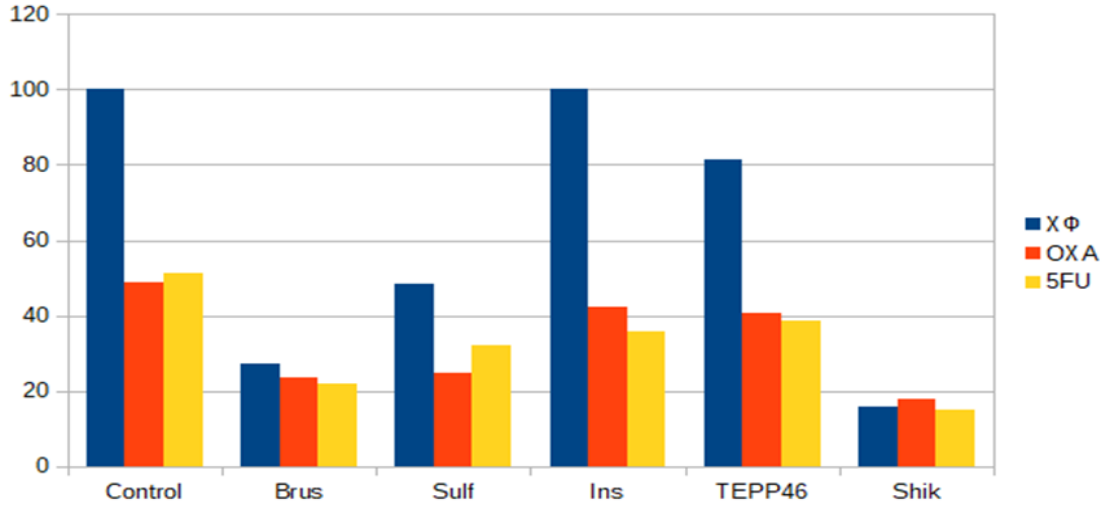
Γράφ. 12: Ανοσοφθορισμός κυτταρικής σειράς A549. 1) Πυρηνική έκφραση του *Nrf2*. 2) Πυρηνική και κυτταροπλασματική έκφραση της *PKM2*.

4.4 Βιωσιμότητα κυττάρων (Cell Viability)

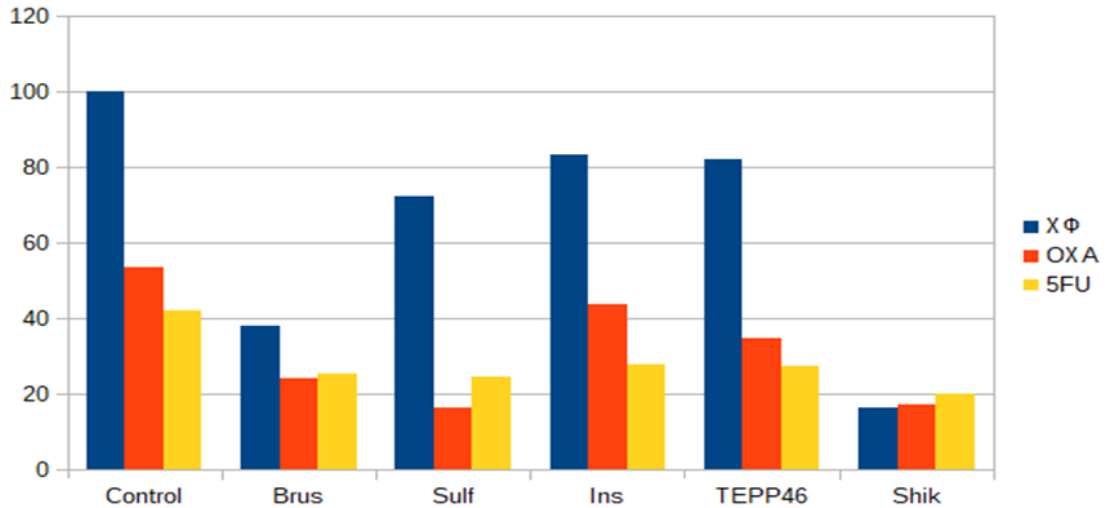
Για την βιωσιμότητα των κυττάρων, έπειτα από την επίδραση ενεργοποιητών και αναστολέων των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος (PKM2-Nrf2) με και χωρίς τη χρήση χημειο-φαρμάκων (Oxaliplatin-5FU) έγινε επανάληψη των πειραμάτων τρεις φορές. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων φαίνονται στα γραφήματα 13 - 19.



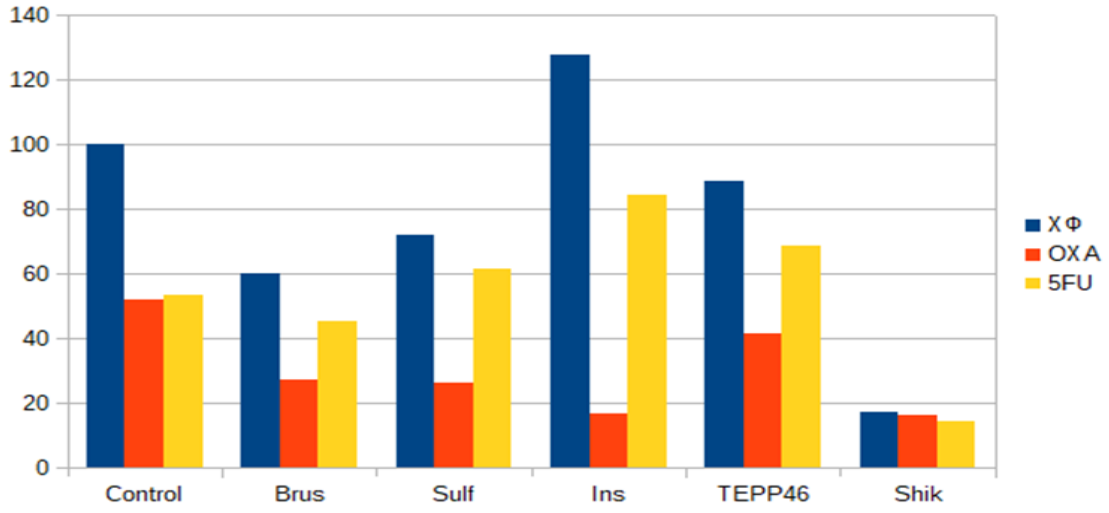
Γράφ. 13: Βιωσιμότητα των κυττάρων της καρκινικής κυτταρικής σειράς LoVo. ΧΦ: Χωρίς φάρμακο, Oxa: Oxaliplatin, Brus: Brusatol, Sulf: Sulforaphane, Ins: Insulin, Shik: Shikonin.



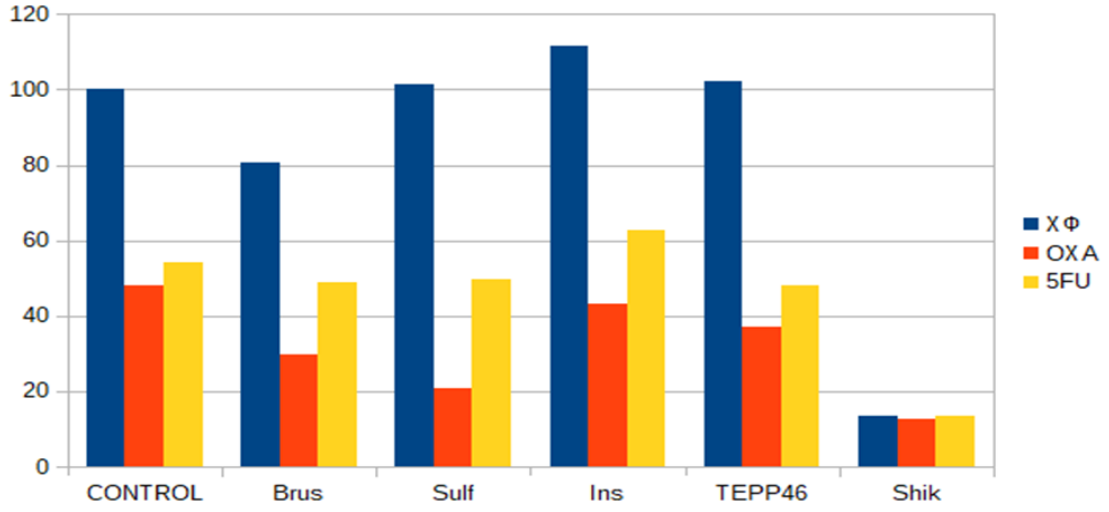
Γράφ. 14: Βιωσιμότητα των κυττάρων της καρκινικής κυτταρικής σειράς HT29. ΧΦ: Χωρίς φάρμακο, Oxa: Oxaliplatin, Brus: Brusatol, Sulf: Sulforaphane, Ins: Insulin, Shik: Shikonin.



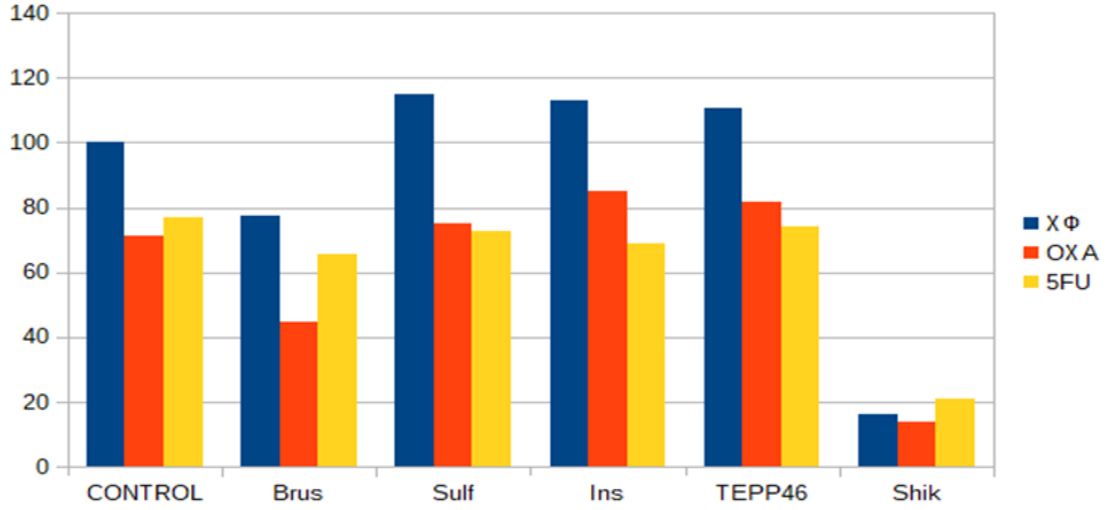
Γράφ. 15: Βιωσιμότητα των κυττάρων της καρκινικής κυτταρικής σειράς CoLo205. ΧΦ: Χωρίς φάρμακο, Oxa: Oxaliplatin, Brus: Brusatol, Sulf: Sulforaphane, Ins: Insulin, Shik: Shikonin.



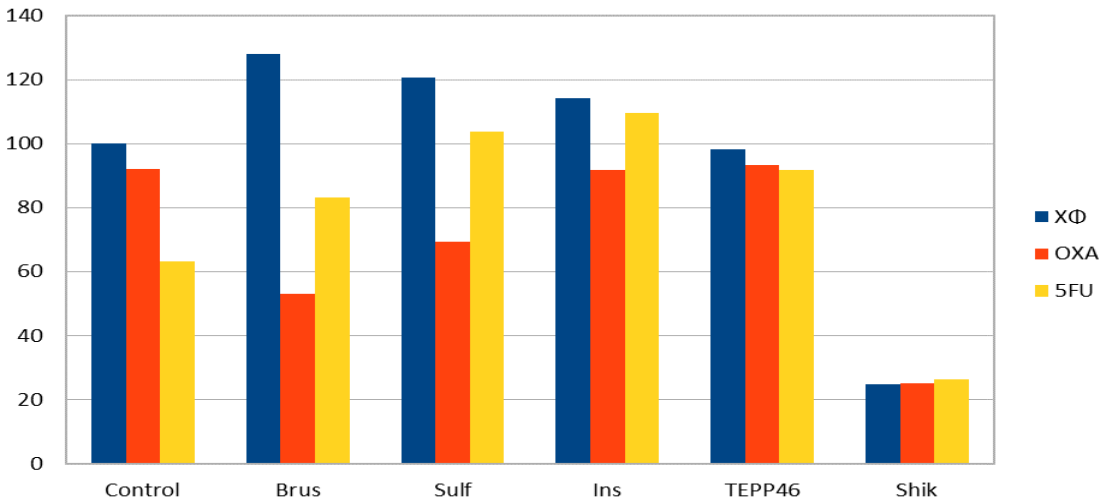
Γράφ. 16: Βιωσιμότητα των κυττάρων της καρκινικής κυτταρικής σειράς SW480. ΧΦ: Χωρίς φάρμακο, Oxa: Oxaliplatin, Brus: Brusatol, Sulf: Sulforaphane, Ins: Insulin, Shik: Shikonin.



Γράφ. 17: Βιωσιμότητα των κυττάρων της καρκινικής κυτταρικής σειράς Skov3. ΧΦ: Χωρίς φάρμακο, Oxa: Oxaliplatin, Brus: Brusatol, Sulf: Sulforaphane, Ins: Insulin, Shik: Shikonin.



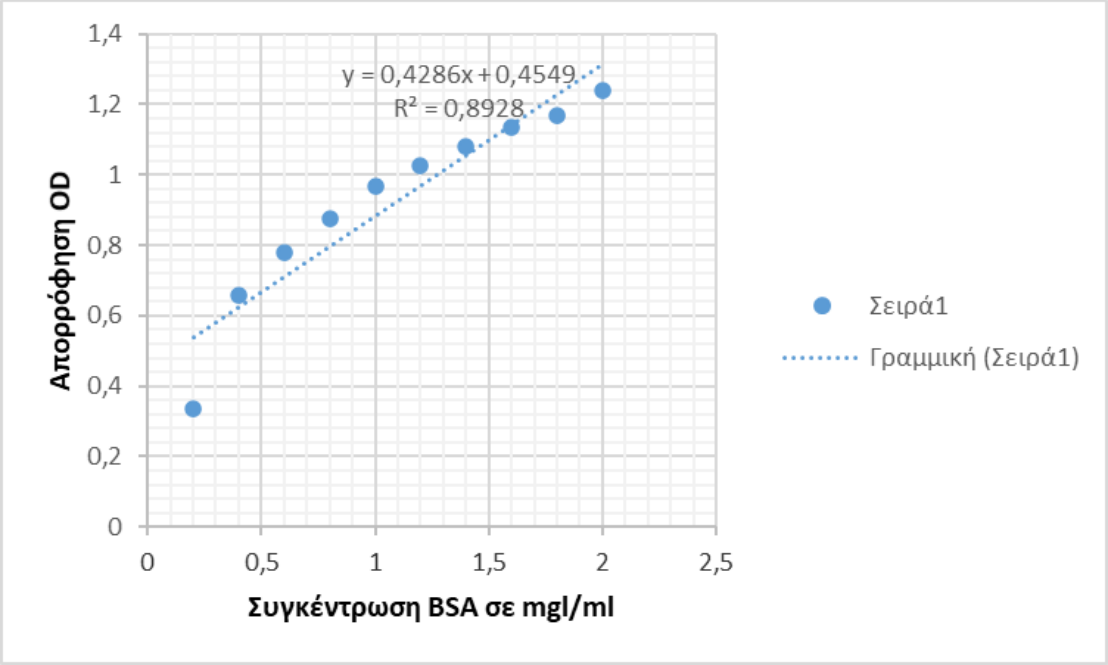
Γράφ. 18: Βιωσιμότητα των κυττάρων της καρκινικής κυτταρικής σειράς A549. ΧΦ: Χωρίς φάρμακο, Oxa: Oxaliplatin, Brus: Brusatol, Sulf: Sulforaphane, Ins: Insulin, Shik: Shikonin.



Γράφ. 19: Βιωσιμότητα των κυττάρων της καρκινικής κυτταρικής σειράς CCD112 CON. ΧΦ: Χωρίς φάρμακο, Oxa: Oxaliplatin, Brus: Brusatol, Sulf: Sulforaphane, Ins: Insulin, Shik: Shikonin.

4.5 Bradford ποσοτικοποίηση

Για την μέτρηση και τον υπολογισμό της ποσότητας του κάθε δείγματος πρωτεΐνης στην μέθοδο Western blot, είναι απαραίτητη η ποσοτικοποίηση της χρωστικής Bradford (Bio-Rad,Quick Start Bradford 1x *Dye Reagent)*. Για την κατασκευή της απαιτούμενης «πρότυπης καμπύλης» έγινε λήψη τριών μετρήσεων για κάθε συγκέντρωση και τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνονται στο γράφημα 20.



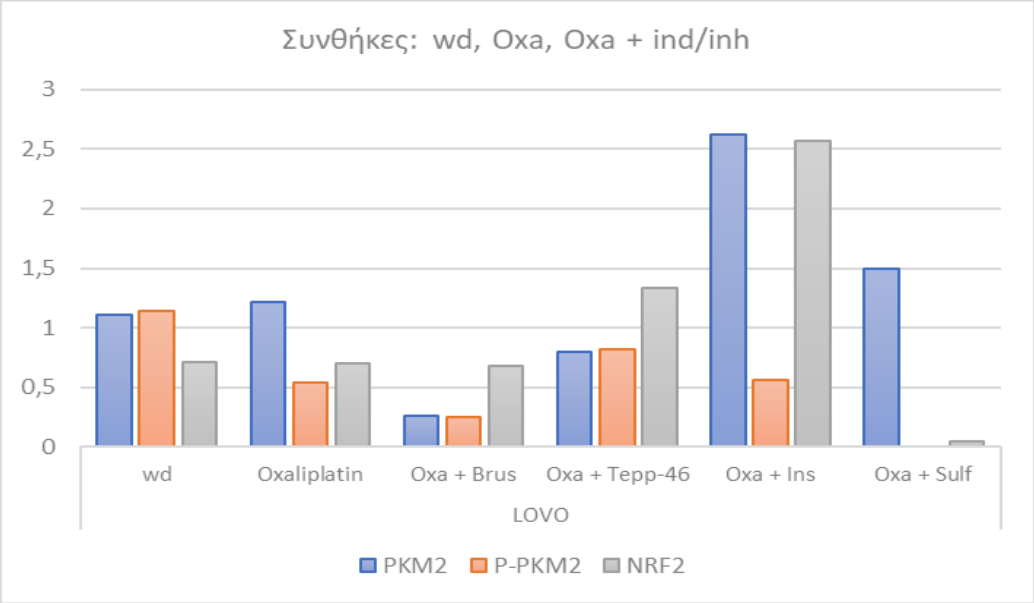
Γράφ. 20: Πρότυπη καμπύλη BSA.

4.6 Western blot

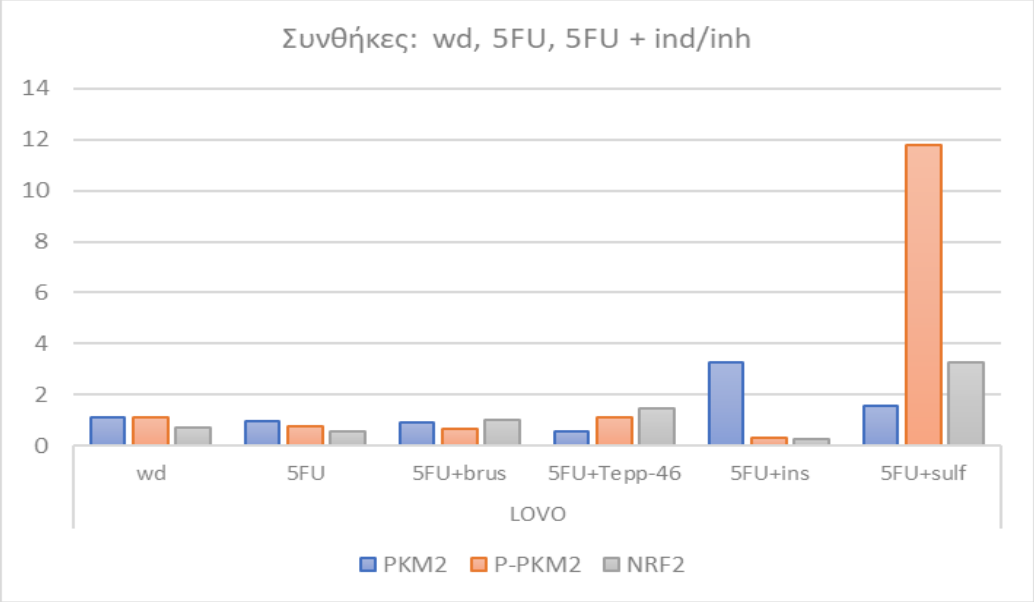
Η μέθοδος Western blot για κάθε κυτταρική σειρά έγινε δύο φορές για κάθε συνθήκη φαρμάκου-επαγωγέα-αναστολέα. Ανάμεσα στα κριτήρια αξιολόγησης των αποτελεσμάτων που μελετήθηκαν είναι ο μοριακός φαινότυπος της κάθε κυτταρικής σειράς σε σύγκριση με την ένταση έκφρασης των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος (*PKM2-Nrf2*) καθώς επίσης και της φωφορυλιωμένης μορφής της *PKM2* (*p-PKM2*). Η *p-PKM2* σχετίζεται άμεσα με το φαινόμενο Warburg, καθώς μπορεί και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων στον πυρήνα που εμπλέκονται στην αερόβιο γλυκόλυση. Ακόμη, τα αποτελέσματα συναξιολογήθηκαν με τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού και της βιωσιμότητας των κυττάρων (cell viability) έπειτα από τη χορήγηση επαγωγέων/αναστολέων, που διεξάχθηκαν σε προηγούμενες πειραματικές

διαδικασίες. Τα αποτελέσματα από το Western blot για κάθε κυτταρική σειρά παρουσιάζεται παρακάτω στα γραφήματα 21 - 35.

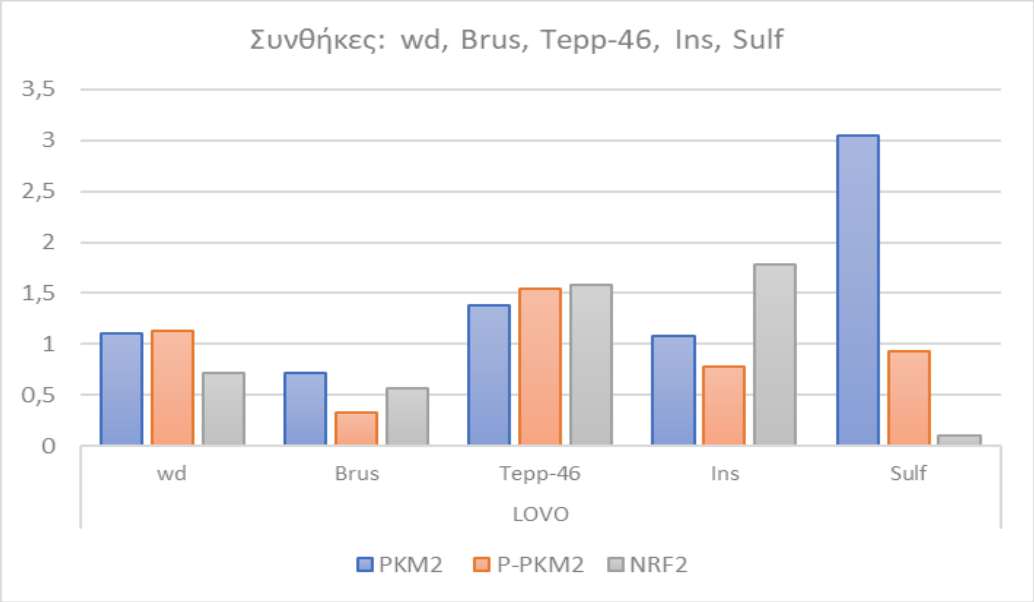
Lovo: Μοριακός φαινότυπος: *KRAS*mt/ MSI/ CIMPneg



Γράφ. 21: Έκφραση των πρωτεϊνών *PKM2*, *p-PKM2* και *Nrf2* στην κυτταρική σειρά LoVo στις συνθήκες wd (without drug), oxaliplatin και oxaliplatin + inducer/inhibitor.



Γράφ. 22: Έκφραση των πρωτεϊνών *PKM2*, *p-PKM2* και *Nrf2* στην κυτταρική σειρά LoVo στις συνθήκες wd (without drug), 5FU και 5FU + inducer/inhibitor



Γράφ. 23: Έκφραση των πρωτεϊνών *PKM2*, *p-PKM2* και *Nrf2* στην κυτταρική σειρά LoVo στις συνθήκες wd (without drug), brusatol, Tepp-46, insulin και sulforaphane.

Με την προσθήκη οξαλιπλατίνης (oxa) στην κυτταρική σειρά LoVo παρατηρείται μείωση στην έκφραση της *p-PKM2* αλλά όχι των *PKM2* και *Nrf2*. Με προσθήκη 5FU εμφανίζεται μείωση της *PKM2* και της *p-PKM2*, ενώ ο *Nrf2* έχει τάση μείωσης.

Με προσθήκη ινσουλίνης και χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (Oxa-5FU) παρατηρείται έντονη αύξηση της *PKM2*, ενώ η έκφραση της *p-PKM2* μειώνεται. Με την προσθήκη ινσουλίνης και Oxa+ινσουλίνης, ο *Nrf2* αυξάνεται σημαντικά, ενώ εμφανίζει μείωση με την προσθήκη 5FU+ινσουλίνης. Ακόμη, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού, ο *Nrf2* βρίσκεται εντοπισμένος στον πυρήνα. Αυτό υποδεικνύει ότι βρίσκεται σε ενεργή κατάσταση ανεξάρτητα από το είδος του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου.

Στην περίπτωση προσθήκης TEPP-46, η έκφραση της *PKM2* αυξάνεται όταν το μόριο βρίσκεται μόνο του στην καλλιέργεια και μειώνεται όταν το μόριο χορηγείται σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικό φάρμακο. Η έκφραση της *p-PKM2* διατηρείται σταθερή με την προσθήκη 5FU+tepp46 και μειώνεται με προσθήκη Oxa+tepp46. Επίσης, η έκφραση του *Nrf2* αυξάνεται αρκετά, δίχως όμως να μετατοπίζεται στον πυρήνα (πράγμα που σημαίνει ότι είναι ανενεργός), έπειτα από την ενεργοποίηση της *PKM2* με TEPP-46.

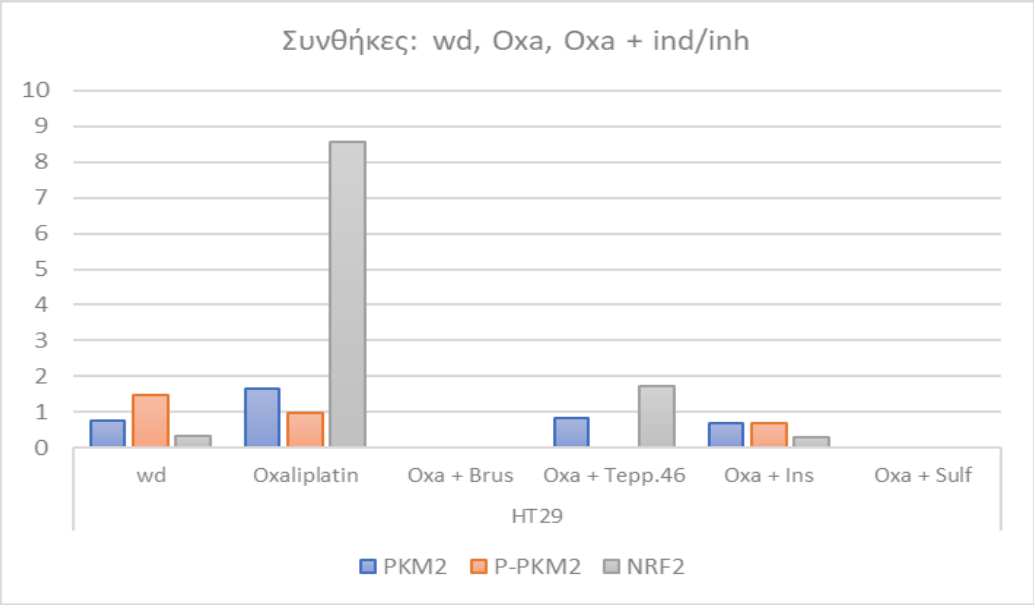
Με προσθήκη σουλφοραφάνης παρουσιάζεται έντονη αύξηση της *PKM2*. Υπό τις ίδιες συνθήκες, η έκφραση της *p-PKM2* αυξάνεται και μάλιστα έντονα μόνο όταν η

σουλφοραφάνη συνχορηγείται μαζί με 5FU. Η ένταση έκφρασης του *Nrf2* παρουσιάζει χαμηλά επίπεδα με προσθήκη σουλφοραφάνης, παρόμοια με την *p-PKM2*.

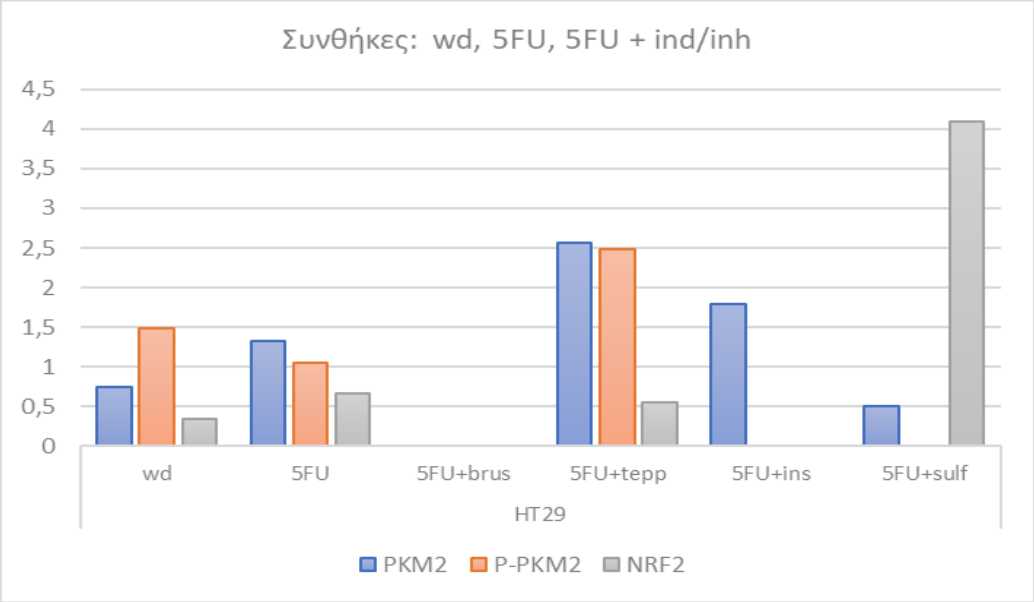
Η έκφραση της *PKM2* και *p-PKM2* μειώνεται σε όλες τις περιπτώσεις όπου χορηγείται μπρουσατόλη, η οποία σύμφωνα με το cell viability, ενδέχεται να παίζει ρόλο στην ευαισθητοποίηση και θανάτωση των καρκινικών κυττάρων.

Τέλος, η μειωμένη έκφραση της *p-PKM2* με ή χωρίς την προσθήκη χημειοθεραπείας και η σταθερή ή μειωμένη επίδραση του *Nrf2*, ενδέχεται να παίζουν ρόλο στην αυξημένη χημειοευαισθησία της κυτταρικής σειράς.

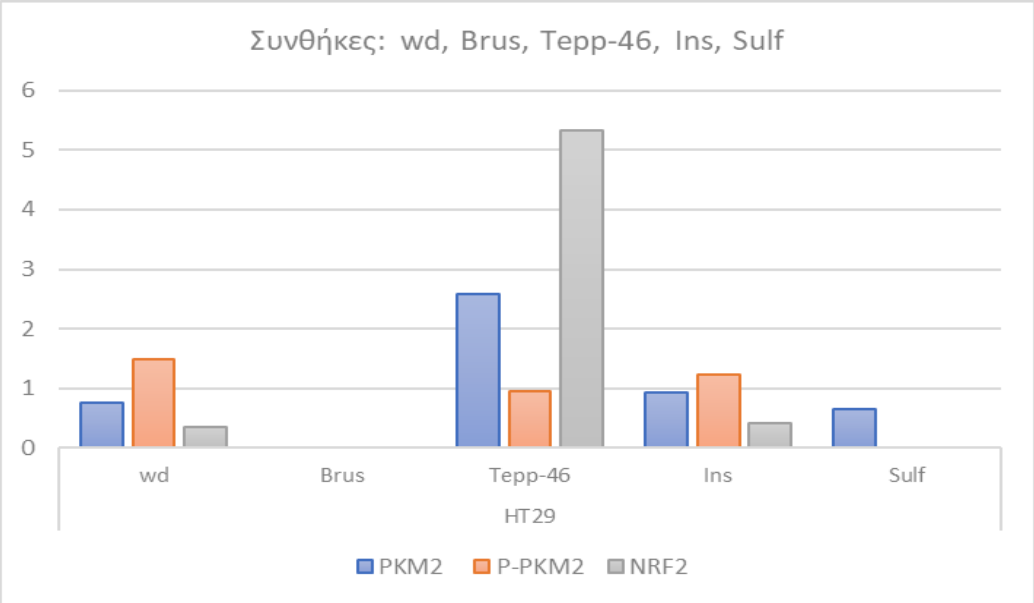
HT29: Μοριακός φαινότυπος: *BRAF*mt/ *Tp53*mt/ MSS



Γράφ. 24: Έκφραση των πρωτεϊνών *PKM2*, *p-PKM2* και *Nrf2* στην κυτταρική σειρά HT29 στις συνθήκες wd (without drug), oxaliplatin και oxaliplatin + inducer/inhibitor.



Γράφ. 25: Έκφραση των πρωτεϊνών *PKM2*, *p-PKM2* και *Nrf2* στην κυτταρική σειρά HT29 στις συνθήκες wd (without drug), 5FU και 5FU + inducer/inhibitor.



Γράφ. 26: Έκφραση των πρωτεϊνών *PKM2*, *p-PKM2* και *Nrf2* στην κυτταρική σειρά HT29 στις συνθήκες wd (without drug), brusatol, Tepp-46, insulin και sulforaphane.

Με προσθήκη οξαλιπλατίνας παρουσιάζεται αύξηση της έκφρασης της *PKM2*, παρόμοια επίπεδα αύξησης της *p-PKM2* και σημαντική αύξηση του *Nrf2*. Η αυξημένα έκφραση του *Nrf2* ενδέχεται να παίζει ρόλο στην χημειοανθεκτικότητα της σειράς στην οξαλιπλατίνα. Με χορήγηση 5FU τα *PKM2* και *p-PKM2* εκφράζονται αρκετά αλλά σε ίδια περίπου επίπεδα με το control, ενώ εμφανίζεται σχετική αύξηση στην έκφραση του *Nrf2*.

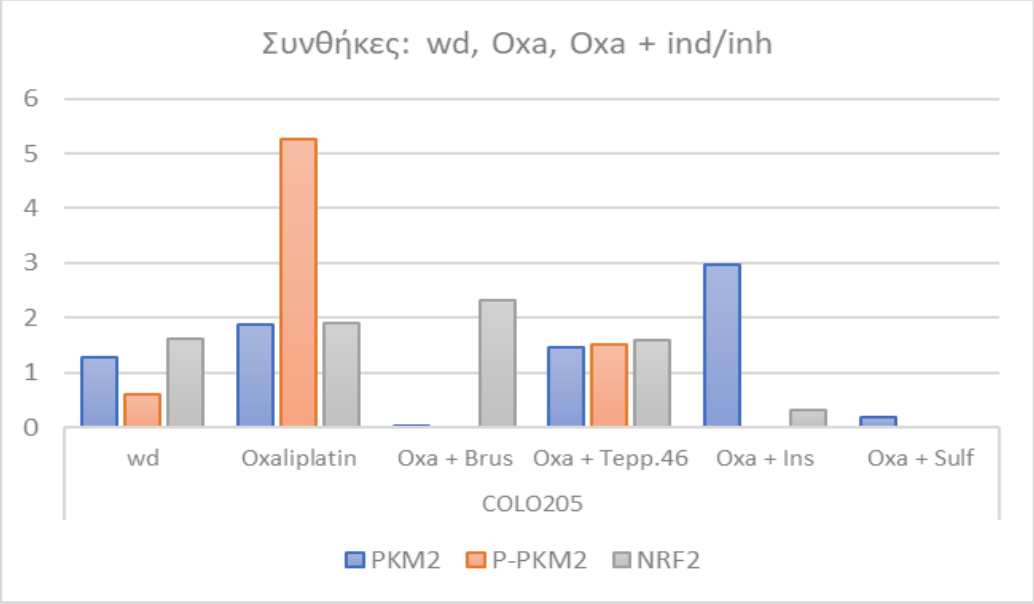
Όταν προστίθεται ινσουλίνη, παρουσιάζονται αυξημένα επίπεδα *PKM2* και πυρηνική εντόπιση αυτής. Αυτό πιθανόν να δικαιολογεί την αυξημένη επιβίωση των κυττάρων, στην αντίστοιχη συνθήκη, στο cell viability. Η συγχορήγηση ινσουλίνης με χημειοθεραπευτικό φάρμακο αυξάνει περισσότερο τα επίπεδα της *PKM2* και παρουσιάζει μείωση στην έκφραση του *Nrf2*. Αναφορικά με την *p-PKM2*, όταν προστίθεται ινσουλίνη, παρουσιάζει τάση μείωσης στην έκφραση της, ενώ τα επίπεδα της *p-PKM2* σχεδόν εκμηδενίζονται όταν μαζί με ινσουλίνη χορηγείται και κάποιο χημειοθεραπευτικό φάρμακο.

Η προσθήκη tepp46 επάγει την έκφραση του *NRF2* και υπάρχει παράδοξη αύξηση της *p-PKM2* στην συνθήκη 5fu+tepp46, καθώς το TEPP-46 δεν επάγει τη διμερή μορφή της *PKM2*.

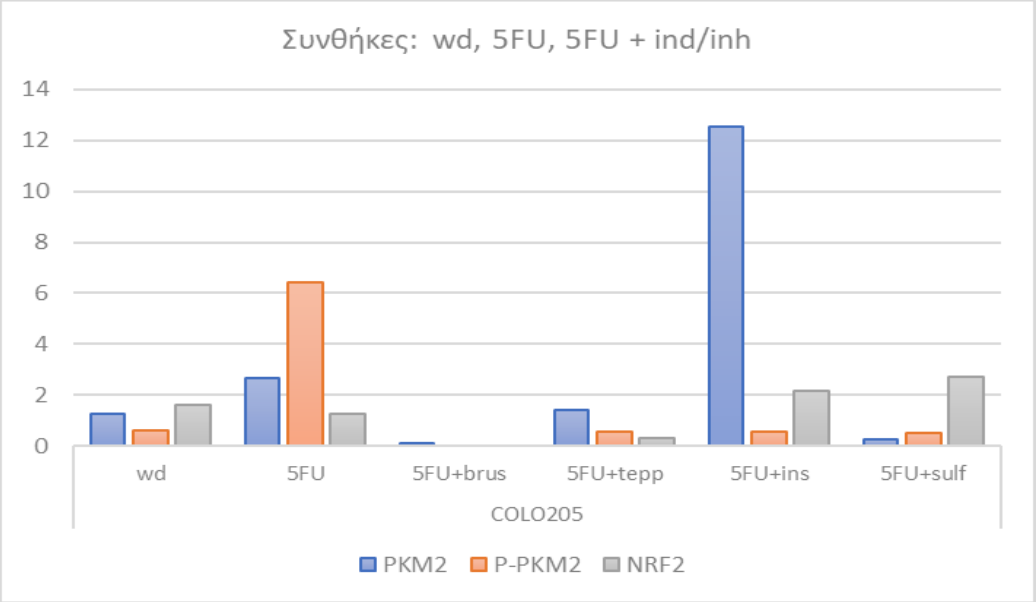
Με προσθήκη σουλφοραφάνης μειώνονται τα επίπεδα *PKM2* και *p-PKM2*, ενώ δεν παρουσιάζεται επίδραση στην έκφραση του *Nrf2*. Ωστόσο, με προσθήκη sulf + 5FU υπάρχει πολύ έντονη αύξηση του *Nrf2*.

Τέλος, με αναστολή του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, μέσω της μπρουσατόλης, μειώνονται σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης συνολικά της *PKM2*.

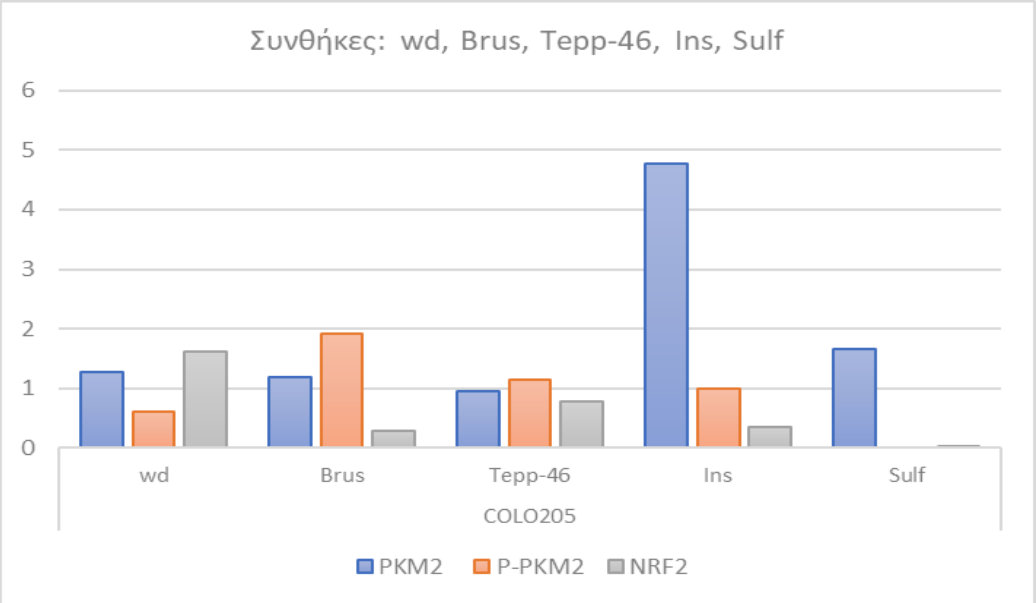
Colo205: Μοριακός φαινότυπος: *BRAF*mt/ *PI3K*mt/ *Tp53*mt/ MSS/ CIMPneg



Γράφ. 27: Έκφραση των πρωτεϊνών *PKM2*, *p-PKM2* και *Nrf2* στην κυτταρική σειρά Colo205 στις συνθήκες wd (without drug), oxaliplatin και oxaliplatin + inducer/inhibitor.



Γράφ. 28: Έκφραση των πρωτεϊνών *PKM2*, *p-PKM2* και *Nrf2* στην κυτταρική σειρά Colo205 στις συνθήκες wd (without drug), 5FU και 5FU + inducer/inhibitor.



Γράφ. 29: Έκφραση των πρωτεϊνών *PKM2*, *p-PKM2* και *Nrf2* στην κυτταρική σειρά Colo205 στις συνθήκες wd (without drug), brusatol, Tepp-46, insulin και sulforaphane.

Στην κυτταρική σειρά CoLo205 παρουσιάζονται αυξημένα επίπεδα έκφρασης όλων των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος με προσθήκη χημειοθεραπείας. Ακόμη, παρουσιάζονται μικρότερα επίπεδα έκφρασης *p-PKM2* και μεγαλύτερα επίπεδα *Nrf2* όταν χορηγείται οξαλιπλατίνη σε σχέση με τη χορήγηση 5FU. Αυτό μπορεί να εξηγεί την ανθεκτικότητα της κυτταρικής σειράς στην Oxa.

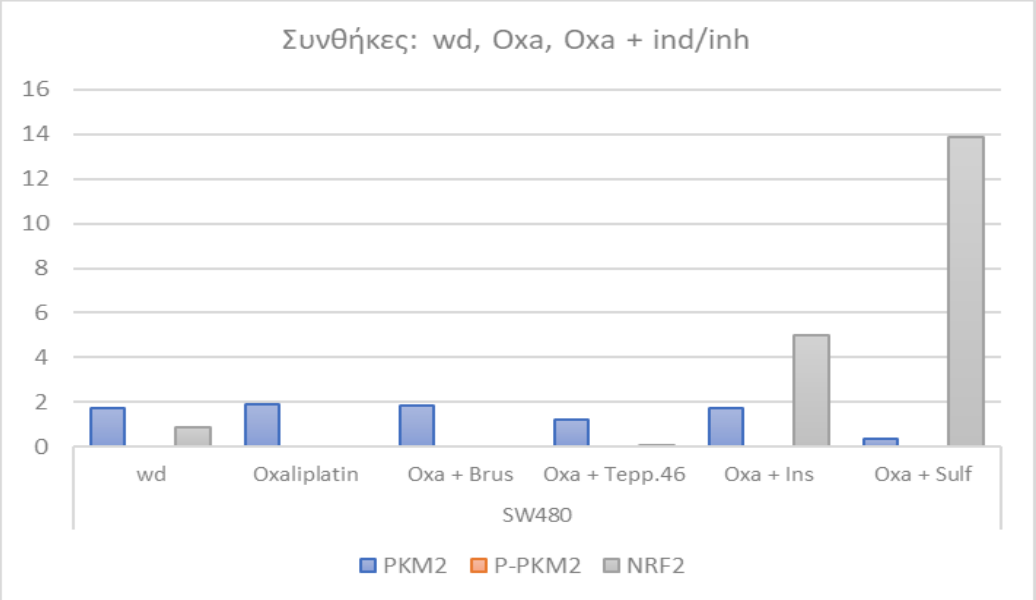
Με την προσθήκη ινσουλίνης και ιδιαίτερα σε συνδυασμό με 5FU παρουσιάζεται αύξηση της *PKM2*. Τα επίπεδα της *p-PKM2* παραμένουν χαμηλά, υπό τις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας, ενώ μειώνονται περαιτέρω με προσθήκη Ins + Oxa. Επιπλέον, η έκφραση του *Nrf2* αυξάνεται με το συνδυασμό Ins + 5FU και μειώνεται στους συνδυασμούς Ins, Ins + Oxa.

Με προσθήκη Tepp-46, μειώνεται συνολικά η έκφραση της *PKM2* ενώ αυξάνεται και πάλι παραδόξως η έκφραση της *p-PKM2* και του *Nrf2*.

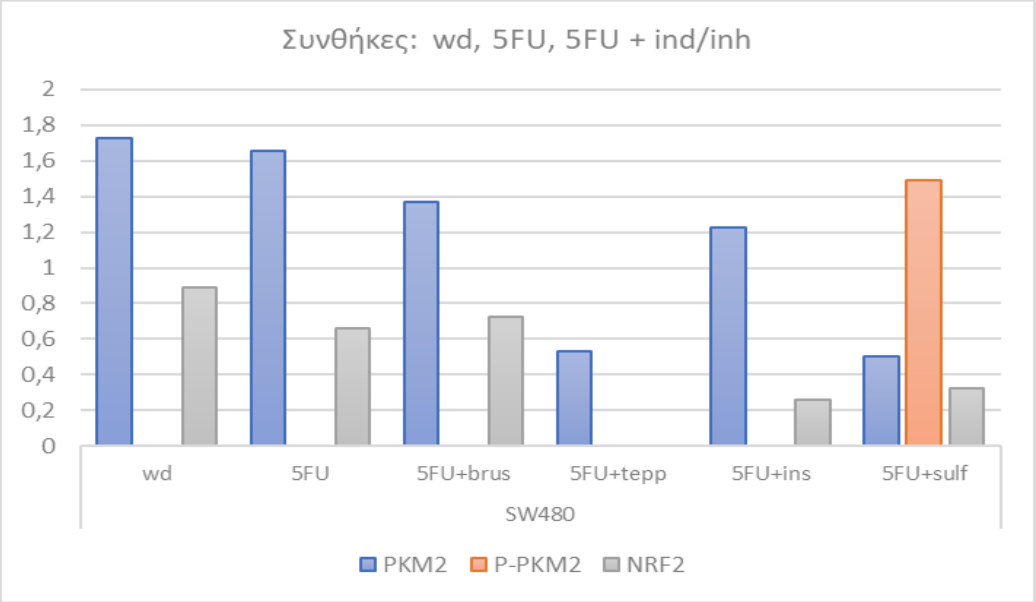
Με προσθήκη Sulf + 5FU παρουσιάζεται έκφραση του *Nrf2*, μειωμένα επίπεδα *PKM2*, σε αντίθεση με τη συνθήκη Sulf + Oxa, όπου υπάρχει μείωση της έκφρασης και των δύο παραπάνω πρωτεϊνών.

Με προσθήκη μπρουσατόλης παρουσιάζετα μείωση του *Nrf2* και της *PKM2*. Ωστόσο, με προσθήκη Brus + Oxa υπάρχει μείωση στην έκφραση της *PKM2* και αυξητική τάση στον *Nrf2*. Τα αποτελέσματα του Western blot συμφωνούν και με αυτά από το Cell Viability, όπου η μπρουσατόλη αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων στη χημειοθεραπεία.

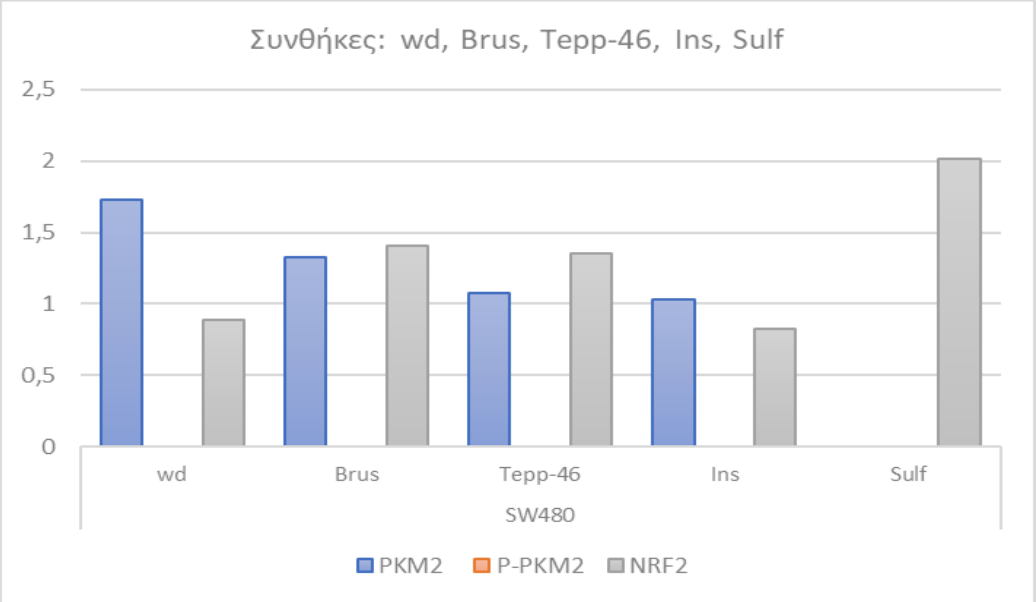
SW480: Μοριακός φαινότυπος: *KRAS*mt/ *Tp53*mt/ MSS



Γράφ. 30: Έκφραση των πρωτεϊνών *PKM2*, *p-PKM2* και *Nrf2* στην κυτταρική σειρά SW480 στις συνθήκες wd (without drug), oxaliplatin και oxaliplatin + inducer/inhibitor.



Γράφ. 31: Έκφραση των πρωτεϊνών *PKM2*, *p-PKM2* και *Nrf2* στην κυτταρική σειρά SW480 στις συνθήκες wd (without drug), 5FU και 5FU + inducer/inhibitor.



Γράφ. 32: Έκφραση των πρωτεϊνών *PKM2*, *p-PKM2* και *Nrf2* στην κυτταρική σειρά SW480 στις συνθήκες wd (without drug), brusatol, Tepp-46, insulin και sulforaphane.

Στην περίπτωση της σειράς SW480, η οξαλιπλατίνη μειώνει την έκφραση του *Nrf2* και επάγει την έκφραση της *PKM2*. Με προσθήκη 5FU μειώνεται η έκφραση των *PKM2* και *Nrf2* και εκμηδενίζεται η έκφραση της *p-PKM2* σε συνδυασμό με φάρμακα.

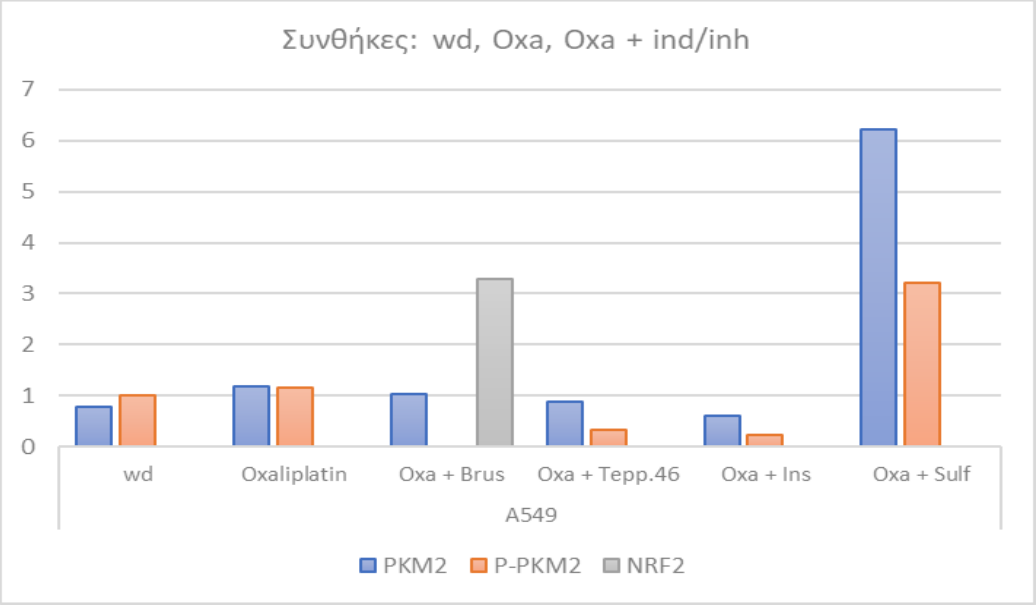
Με προσθήκη Ins + Oxa αυξάνονται τα επίπεδα του *Nrf2*, ο οποίος σύμφωνα με τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού, εντοπίζεται στον πυρήνα. Με προσθήκη Ins + 5FU προκαλείται μείωση όλων των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος.

Με προσθήκη TEPP-46 μαζί με Oxa ή 5FU παρατηρείται μείωση των επιπέδων *Nrf2* και *PKM2*.

Η προσθήκη σουλφοραφάνης προκαλεί έκφραση του Nrf2, όταν χορηγείται μόνη της ή με οξαλιπλατίνα και μείωση της *PKM2* και *p-PKM2*. Με Sulf + 5FU αυξάνεται ελάχιστα ο *Nrf2* και αρκετά η *p-PKM2*.

Με προσθήκη Brus και Brus + 5FU παρατηρείται μείωση της *PKM2*, ενώ με προσθήκη Brus + Oxa αυξάνεται η έκφραση της *PKM2* και μειώνεται αυτή του *Nrf2*.

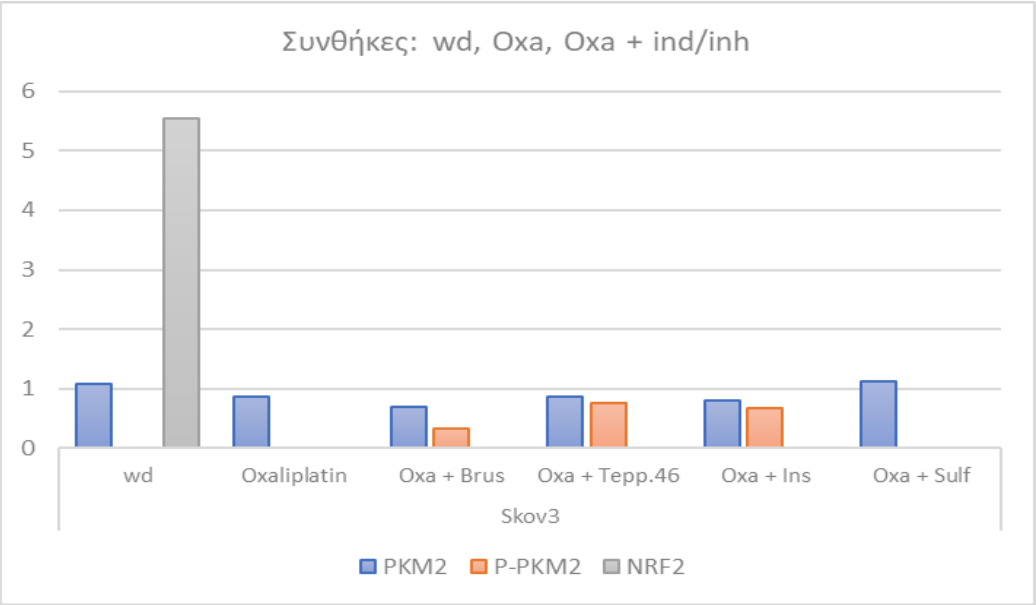
A549, Skov3 και CCD112: Κυτταρικές σειρές ελέγχου



Γράφ. 33: Έκφραση των πρωτεϊνών *PKM2*, *p-PKM2* και *Nrf2* στην κυτταρική σειρά A549 στις συνθήκες wd (without drug), oxaliplatin και oxaliplatin + inducer/inhibitor.

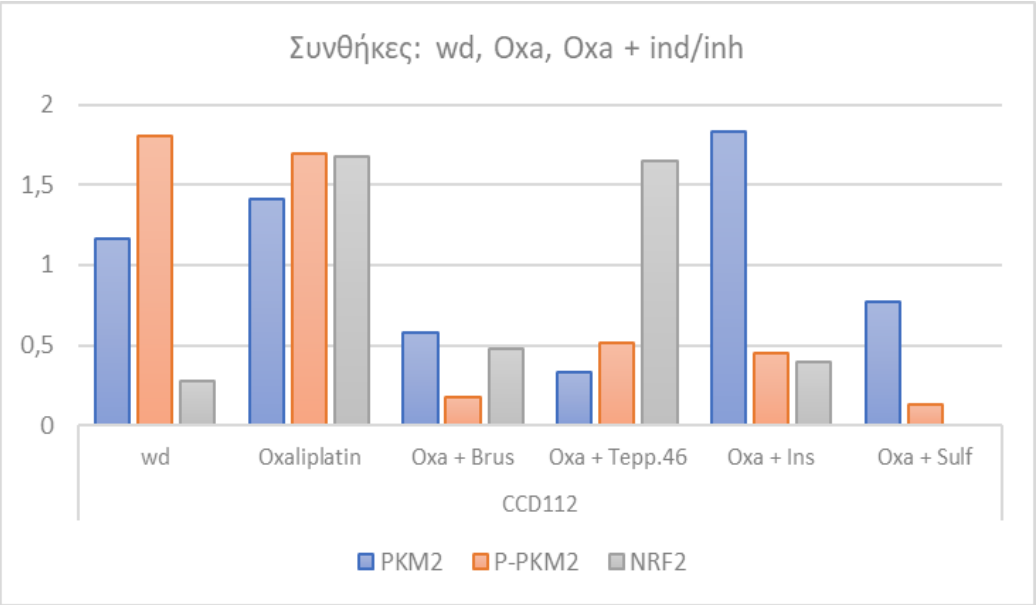
Έπειτα από χορήγηση Oxa στην κυτταρική σειρά A549 παρατηρείται αύξηση των επιπέδων *PKM2*, *p-PKM2* και δραματική μείωση του *Nrf2*. Με σύγχρονη χορήγηση Oxa και Ins παρουσιάζεται μείωση των *PKM2* και *p-PKM2*. Από την άλλη, με χορήγηση TEPP-46 + Oxa αυξάνεται μόνο η ένταση της *PKM2*. Με προσθήκη Sulf + Oxa αυξάνονται οι *PKM2* και *p-PKM2*, αλλά όχι ο *Nrf2*, όπως αναμενόταν. Αντιθέτως, η έκφραση της *p-PKM2* είναι μη ανιχνεύσιμη και η ένταση του *Nrf2*

υψηλή, παρουσία μπρουσατόλης. Αυτή η παράδοξη έκφραση του *Nrf2* χρίζει περαιτέρω μελετών.



Γράφ. 34: Έκφραση των πρωτεϊνών *PKM2*, *p-PKM2* και *Nrf2* στην κυτταρική σειρά Skov3 στις συνθήκες wd (without drug), oxaliplatin και oxaliplatin + inducer/inhibitor.

Στην σειρά Skov3, η οξαλιπλατίνα σχετίζεται με μείωση της *PKM2*. Με Ins + Oxa αυξάνεται αισθητά η ένταση της *p-PKM2*. Η χορήγηση Sulf + Oxa δεν επηρεάζει την έκφραση της *PKM2*. Το αντίθετο συμβαίνει με Brus + Oxa. Τέλος, η έκφραση του *Nrf2* βρίσκεται σε ανιχνεύσιμα και μάλιστα αρκετά υψηλά επίπεδα μόνο στην περίπτωση των 5FU και Sulf + 5FU.



Γράφ. 35: Έκφραση των πρωτεϊνών *PKM2*, *p-PKM2* και *Nrf2* στην κυτταρική σειρά CCD112 στις συνθήκες wd (without drug), oxaliplatin και oxaliplatin + inducer/inhibitor.

Για την κυτταρική σειρά CCD112 CON, με προσθήκη Ins +/- Oxa υπάρχει αύξηση στην *PKM2* και μείωση στον *Nrf2*. Το αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση προσθήκης TEPP-46 +/- Oxa. Τέλος, προσθήκη Sulf + Oxa και Brus + Oxa υπάρχει μείωση της έκφρασης *PKM2*.

Κεφάλαιο 5: Συζήτηση –Συμπεράσματα

Πλέον, είναι γνωστό ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν οι πρωτεΐνες *PKM2* και *Nrf2* (μεταβολικό και αντιοξειδωτικό μονοπάτι αντίστοιχα) επιδρούν στο μεταβολισμό των κυττάρων και στην αντίσταση τους στη χημειοθεραπεία. Παρόλο που η *PKM2* ελέγχεται από τον *Nrf2*, μέσω στοιχείων ARE, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο αλληλοεπιδρούν είναι ακόμη άγνωστος.

Αναφορικά με τις συγκεντρώσεις "IC50", όλα τα αποτελέσματα των πειραμάτων συμφωνούν με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας.[59,60,61,62,63,64,65] Σε ό,τι αφορά την κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος ωοθήκης Skov-3, η αυξημένη ανθεκτικότητα που παρουσιάζει ταιριάζει με τη βιβλιογραφία και αυτό είναι δικαιολογημένο, καθώς η χημειοθεραπεία με οξαλιπλατίνη και 5FU (FOLFOX) είναι εγκεκριμένη ΚΠΕ και όχι για καρκίνο των ωοθηκών. Τέλος, σχετικά με τον ανοσοφθορισμό, οι βέλτιστες συγκεντρώσεις για κάθε αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε, φάνηκε ότι ταιριάζουν με τις προτεινόμενες δοσολογίες της εταιρίας.

Σχετικά με την ημιποσοτική μελέτη του Western blot, παρατηρήθηκε ότι το πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών *PKM2/p-PKM2/Nrf2* αλλάζει μαζί με τον μοριακό τους φαινότυπο, έπειτα από την επίδραση χημειοθεραπείας (Oxa – 5FU). Έτσι, για τις κυτταρικές σειρές ΚΠΕ (LoVo, HT-29, Colo-205, SW-480), η έκφραση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος αυξάνεται όσο αυξάνεται και η χημειοανθεκτικότητα των σειρών.

Επιπλέον, στις πιο χημειοευαισθητες κυτταρικές σειρές, η επαγωγή ή αναστολή του γλυκολιτικού μονοπατιού σχετίζεται με αύξηση των επιπέδων έκφρασης του *Nrf2*. Από την άλλη, η επαγωγή του αντιοξειδωτικού μονοπατιού μέσω *Nrf2* σχετίζεται με αύξηση της *PKM2* και κυμαινόμενα επίπεδα *p-PKM2*, ενώ με καταστολή του *Nrf2* υπάρχει μείωση και ων επιπέδων έκφρασης της *PKM2*. Ακόμη,

με επαγωγή του φαινομένου Warburg ο *Nrf2* εντοπίζεται ενεργός στον πυρήνα, ενώ με καταστολή του Warburg effect ο *Nrf2* παραμένει ανενεργός στο κυτταρόπλασμα.

Στις πιο χημειοανθεκτικές κυτταρικές σειρές, η επαγωγή του *Nrf2* σχετίζεται πάλι με αυξημένα επίπεδα *PKM2* και κυμαινόμενα επίπεδα *p-PKM2*, ενώ με καταστολή του *Nrf2* παρατηρείται μείωση και της *PKM2*. Ωστόσο, στις χημειοανθεκτικές κυτταρικές σειρές υπάρχει μη παράλληλη σχέση μεταξύ *PKM2* και *Nrf2*, καθώς ο *Nrf2* φαίνεται σταθερά ενεργός στον πυρήνα στην πλειονότητα των περιπτώσεων, όπου γίνεται χρήση φαρμάκων και επέμβαση στην ενεργότητα της *PKM2*.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η σχέση της *PKM2* με τον *Nrf2* μεταβαίνει από παράλληλη σε μη παράλληλη όσο αυξάνεται η χημειοανθεκτικότητα των κυττάρων. Έτσι, στις χημειοευαίσθητες κυτταρικές σειρές, η *PKM2* φαίνεται να συνεργάζεται με τον *Nrf2* για την καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες, συμπεριλαμβανομένου αυτού που προκαλείται από την επίδραση των φαρμάκων (Oxa – 5FU). Από την άλλη, στις πιο χημειοάντοχες κυτταρικές σειρές, ο *Nrf2* είναι κατά βάση ενεργός, και η *PKM2* ενδεχομένως να αλληλοεπιδρά με άλλα μονοπάτια που σχετίζονται με την ογκογένεση. Εντούτοις, με καταστολή του *Nrf2* παρουσιάζεται μείωση και της *PKM2* και αυτό πιθανότατα εξηγείται λόγω του ότι ο *Nrf2* ελέγχει την έκφραση της *PKM2* μέσω αλληλουχίας ARE, όπως έχει δειχθεί και βιβλιογραφικά.

Βιβλιογραφία

1. Keum, N. N. & Giovannucci, E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 713–732 (2019).

2. Stoffel, E. M. & Murphy, C. C. Epidemiology and Mechanisms of the Increasing Incidence of Colon and Rectal Cancers in Young Adults. *Gastroenterology* **158**, 341–353 (2020).

3. Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F. & Wang, H. L. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J. Gastrointest. Oncol.* **3**, 153–173 (2012).

4. Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W. & Burt, R. W. Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology* **138**, 2044–2058 (2010).

5. Rawla, P., Sunkara, T. & Barsouk, A. Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz. Gastroenterol.* **14**, 89–103 (2019).

6. Haggar, F. A. & Boushey, R. P. Colorectal cancer epidemiology: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin. Colon Rectal Surg.* **22**, 191–197 (2009).

7. Messaritakis, I. *et al.* The prognostic value of the detection of microbial translocation in the blood of colorectal cancer patients. *Cancers (Basel).* **12**, 1–14 (2020).

8. Lansdorp-Vogelaar, I. *et al.* Contribution of screening and survival differences to racial disparities in colorectal cancer rates. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **21**, 728–736 (2012).

9. Edwards, B. K. *et al.* Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer

trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer* 116, 544–573 (2010).

10. Lutgens, M. W. M. D. *et al.* Declining risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease: an updated meta-analysis of population-based cohort studies. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 789–799 (2013).

11. Nottage, K. *et al.* Secondary colorectal carcinoma after childhood cancer. *J. Clin. Oncol.* 30, 2552–2558 (2012).

12. Karahalios, A. *et al.* Change in weight and waist circumference and risk of colorectal cancer: Results from the Melbourne Collaborative Cohort Study. *BMC Cancer* 16, 1–7 (2016).

13. O'Keefe, S. J. D. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 691–706 (2016).

14. Botteri, E. *et al.* Smoking and Colorectal Cancer. *Jama* 300, 2765 (2008).

15. Bagnardi, V. *et al.* Alcohol consumption and site-specific cancer risk: A comprehensive dose-response meta-analysis. *Br. J. Cancer* 112, 580–593 (2015).

16. Chang, W. C. L. *et al.* Differential preventive activity of sulindac and atorvastatin in Apc+/Min-FCCCmice with or without colorectal adenomas. *Gut* 67, 1290–1298 (2018).

17. Leach, F. S. *et al.* Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75, 1215–1225 (1993).

18. Bottaro, Larsen, B. NIH Public Access. *Bone* 23, 1–7 (2008).

19. Zhao, P., Li, L., Jiang, X. & Li, Q. Mismatch repair

deficiency/microsatellite instability-high as a predictor for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy efficacy. *J. Hematol. Oncol.* **12**, 1–14 (2019).

20. Kastrinos, F. & Syngal, S. Recently Identified Colon Cancer Predispositions: MYH and MSH6 Mutations. *Semin. Oncol.* **34**, 418–424 (2007).

21. Issa, J. P. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 988–993 (2004).

22. Siena, S., Sartore-Bianchi, A., Di Nicolantonio, F., Balfour, J. & Bardelli, A. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **101**, 1308–1324 (2009).

23. Gupta, R., Sinha, S. & Paul, R. N. The impact of microsatellite stability status in colorectal cancer. *Curr. Probl. Cancer* **42**, 548–559 (2018).

24. Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D. & Perucho, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* **363**, 558–561 (1993).

25. Le, D. T. *et al.* PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2509–2520 (2015).

26. Warburg, O. & Minami, S. Versuche an Überlebendem Carcinom-gewebe. *Klinische Wochenschrift* vol. 2 776–777 (1923).

27. Elwood, J. C., Lin, Y. C., Cristofalo, V. J., Weinhouse, S. & Morris, H. P. Glucose Utilization in Homogenates of the Morris Hepatoma 5123 and Related Tumors. *Cancer Res.* **23**, 906–913 (1963).

28. Paolicchi, E. *et al.* Targeting hypoxic response for cancer

therapy. *Oncotarget* **7**, 13464–13478 (2016).

29. Crabtree, H. G. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem. J.* **23**, 536–545 (1929).

30. Spectroscopic Evidence Metabolic Control of Rapid measurements of intracellular events afford. **129**, 700–708 (2009).

31. CHANCE, B., GARFINKEL, D., HIGGINS, J. & HESS, B. Metabolic control mechanisms. 5. A solution for the equations representing interaction between glycolysis and respiration in ascites tumor cells. *J. Biol. Chem.* **235**, 2426–2439 (1960).

32. Schreiber, J. R., Balcavage, W. X., Morris, H. P. & Pedersen, P. L. Enzymatic and spectral analysis of cytochrome oxidase in adult and fetal rat liver and Morris hepatoma 3924A. *Cancer Res.* **30**, 2497–2501 (1970).

33. Arora, K. K. & Pedersen, P. L. Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism. Evidence for preferential phosphorylation of glucose by intramitochondrially generated ATP. *J. Biol. Chem.* **263**, 17422–17428 (1988).

34. Pascale, R. M., Calvisi, D. F., Simile, M. M., Feo, C. F. & Feo, F. The warburg effect 97 years after its discovery. *Cancers (Basel).* **12**, 1–33 (2020).

35. Zhang, Z. *et al.* PKM2, function and expression and regulation. *Cell Biosci.* **9**, 1–25 (2019).

36. Sun, Q. *et al.* Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4129–4134 (2011).

37. Wong, N., Ojo, D., Yan, J. & Tang, D. PKM2 contributes to

cancer metabolism. *Cancer Lett.* 356, 184–191 (2015).

38. Yang, W. *et al.* PKM2 phosphorylates histone H3 and promotes gene transcription and tumorigenesis. *Cell* 150, 685–696 (2012).

39. Bayley, J. P. & Devilee, P. The Warburg effect in 2012. *Curr. Opin. Oncol.* 24, 62–67 (2012).

40. Rahal, A. *et al.* Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *Biomed Res. Int.* 2014, (2014).

41. Gorrini, C., Harris, I. S. & Mak, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 931–947 (2013).

42. Hayes, J. D. & Dinkova-Kostova, A. T. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 39, 199–218 (2014).

43. Tonelli, C., Chio, I. I. C. & Tuveson, D. A. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants Redox Signal.* 29, 1727–1745 (2018).

44. Itoh, K. *et al.* Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13, 76–86 (1999).

45. Katoh, Y. *et al.* Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes to Cells* 6, 857–868 (2001).

46. Rada, P. *et al.* Structural and Functional Characterization of Nrf2 Degradation by the Glycogen Synthase Kinase 3/ -TrCP Axis. *Mol. Cell. Biol.* 32, 3486–3499 (2012).

47. Wang, H. *et al.* RXRα inhibits the NRF2-ARE signaling

pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2. *Cancer Res.* 73, 3097–3108 (2013).

48. Wakabayashi, N. *et al.* Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat. Genet.* 35, 238–245 (2003).

49. Ramos-Gomez, M. *et al.* Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3410–3415 (2001).

50. Sivinski, J., Zhang, D. D. & Chapman, E. Targeting NRF2 to treat cancer. *Semin. Cancer Biol.* 76, 61–73 (2021).

51. Jiménez-Osorio, A. S., González-Reyes, S. & Pedraza-Chaverri, J. *Natural Nrf2 activators in diabetes*. *Clinica Chimica Acta* vol. 448 (Elsevier B.V., 2015).

52. Houghton, C. A., Fassett, R. G. & Coombes, J. S. Sulforaphane and Other Nutrigenomic Nrf2 Activators: Can the Clinician's Expectation Be Matched by the Reality? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, (2016).

53. Wang, X. J. *et al.* Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* 29, 1235–1243 (2008).

54. Lawrence, M. S. *et al.* Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 505, 495–501 (2014).

55. Kitamura, H. & Motohashi, H. NRF2 addiction in cancer cells. *Cancer Sci.* 109, 900–911 (2018).

56. Wang, H. *et al.* NRF2 activation by antioxidant antidiabetic agents accelerates tumor metastasis. *Sci. Transl. Med.* 8, (2016).

57. Damasceno, L. E. A. *et al.* PKM2 promotes Th17 cell differentiation and autoimmune inflammation by fine-tuning STAT3 activation. *J. Exp. Med.* **217**, (2020).

58. Iqbal, M. A. *et al.* Insulin enhances metabolic capacities of cancer cells by dual regulation of glycolytic enzyme pyruvate kinase M2. *Mol. Cancer* **12**, 1–12 (2013).

59. Seyed Hosseini, E. *et al.* Studies on combination of oxaliplatin and dendrosomal nanocurcumin on proliferation, apoptosis induction, and long non-coding RNA expression in ovarian cancer cells. *Cell Biol. Toxicol.* **35**, 247–266 (2019).

60. Gach, K. *et al.* Combined effects of anticancer drugs and new synthetic α-methylene-δ-lactones on MCF-7 cells. *Tumor Biol.* **36**, 5971–5977 (2015).

61. Wiegering, A. *et al.* Reactivating p53 and Inducing Tumor Apoptosis (RITA) Enhances the Response of RITA-Sensitive Colorectal Cancer Cells to Chemotherapeutic Agents 5-Fluorouracil and Oxaliplatin. *Neoplasia (United States)* **19**, 301–309 (2017).

62. Wang, T. *et al.* Glycolysis is essential for chemoresistance induced by transient receptor potential channel C5 in colorectal cancer. *BMC Cancer* **18**, 1–9 (2018).

63. Wu, T. *et al.* Interleukin 22 protects colorectal cancer cells from chemotherapy by activating the STAT3 pathway and inducing autocrine expression of interleukin 8. *Clin. Immunol.* **154**, 116–126 (2014).

64. Hsu, H. H. *et al.* Oxaliplatin resistance in colorectal cancer cells is mediated via activation of ABCG2 to alleviate ER stress induced apoptosis. *J. Cell. Physiol.* **233**, 5458–5467 (2018).

65. Handali, S., Moghimipour, E., Rezaei, M., Saremy, S. & Dorkoosh, F. A. Co-delivery of 5-fluorouracil and oxaliplatin in novel poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for colon cancer therapy. *Int. J. Biol. Macromol.* 124, 1299–1311 (2019).

Παράρτημα Α' Κεφ. 3.1 ΥΛΙΚΑ

3.1.1 Αντιδραστήρια

Για την πραγματοποίηση της παρούσας πτυχιακής χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Θρεπτικά υλικά για τις κυτταροκαλλιέργειες (GIBCO) :

1. Κύτταρα HT29 : RPMI 1640(L-Glutamine) + 10%FBS(Heat Inactivated) + 1% P/S (Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη : 5,000 Units /ml Penicillin , 5,000 μg/ml Streptomycin)
2. Κύτταρα LoVo: Ham's F-12 K (L-Glutamine) + 1,5g/L Sodium Bicarbonate + 10% FBS +1% P/S
3. Κύτταρα Colo205: RPMI 1640(L-Glutamine) + 10%FBS(Heat Inactivated) + 1% P/S
4. Κύτταρα A549: F-12 Ham's K mixture + 10% FCS(Heat Inactivated) + 1% P/S
5. Κύτταρα Skov-3: McCoy's 5a + 10% FCS(Heat Inactivated) + 1% P/S
6. Κύτταρα SW-480: McCoy's 5a + 10% FCS(Heat Inactivated) + 1% P/S

•Αντισώματα

1) Antibody PKM2 rabbit / Alexa 633 goat anti-rabbit or Alexa 555 goat anti-rabbit
2) Antibody NRF2 mouse / Alexa 555 donkey anti-mouse (Thermo Fisher)
3) Antibody p-PKM2 rabbit (Thermo Fisher)
4) Antibody 0H.8G goat/ Alexa 546 donkey anti-goat (Thermo Fisher)
5) Antibody NQO1 rabbit / Alexa 555 goat anti-rabbit (Thermo Fisher)
6) HRP anti-mouse Cell Signaling
7) HRP anti-rabbit Cell Signaling
8) Actin clone C4 rabbit Millipore Corp.

•Αντιδραστήρια ανοσοφθορισμού

1) Methanol Scharlau
2) NaCl/MgCl Scharlau
3) PBS tablets Gibco

4) FBS/FCS

5) 2-propanole Scharlau

6) DAPI antifade reagent Invitrogen

•Λοιπά αντιδραστήρια

1) DMSO Thermo Scientific

2) Trypan Blue

3) Trypsin-EDTA

4) MTS-PMS solution Promega

5) Bradford Quick Start Bio-Rad

3.1.2 Αναλώσιμα υλικά

1. Γάντια Fisher Scientific Medium
2. Πιπέτες 5ml, 10ml, 25 ml Stripette Disposable Serological Pipette Corning Inc.
3. Biosphere Filter tips Type Gilson /Eppendorf
4. Biosphere safe seal micro tubes SARSTEDT
5. Plates (96-well) Cell culture cluster Corning Inc.
6. 9 Inch Polypropylene Plasteur pipets
7. Vials microtube 2ml, SARSTEDT
8. Centrifuge tubes 15ml, 50ml Corning
9. Φλάσκες καλλιέργειας T25 ,T75 Nunclon Surface ,nunc
10. Cell scraper 25cm SARSTEDT
11. Insulin Syringes

3.1.3 Εργαστηριακός εξοπλισμός

1. Απαγωγός BioAir Safemate 1.2
2. Επωαστήρας Nafco 5300
3. Υδατόλουτρο Techne TE-10D tempette

4. Gilson Pipetman

5. Φυγόκεντρος Eppendorf Jouan B3.11

6. Freezing Container: Nalgene Mr frosty

7. Hotplate magnetic stirrer 34532 Snijders

8. Πιπέτες gilson 10μl, 20μl, 100μl, 200μl, 1000μl

9. Microplate reader Biorad Model 680

10. Vortex Labnet Vx100

11. Οπτικό μικροσκόπιο (ανάστροφο) BX40

12. Οπτικό μικροσκόπιο (ανάστροφο): OLYMPUS LH50A

13. Μικροσκόπιο φθορισμού: Leica DM 2500

14. Severin folio sealer

3.1.4 Φαρμακευτικές ουσίες

1. Oxaliplatin/Teva 50mg/10ml

2. Fluorouracil (5FU) anaBIOsis 5g/100ml

3. Brusatol SIGMA

4. TEPP- 46 Calbiochem

5. DL-Sulforaphane SIGMA

6. Shikonin SIGMA

Παράρτημα Β' Κεφ. 3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων

3.2.1.1 *Ξεπάγωμα καρκινικών κυττάρων*

• Μεταφορά του vial από τους – 80 ºC, σε υδατόλουτρο στους 37 ºC (αφού πρώτα έχουμε προθερμάνει το θρεπτικό)
• Προσθήκη στάγδην 1 ml θρεπτικού στο vial
• Πιπετάρισμα και μεταφορά των κυττάρων σε falcon

• Προσθήκη στάγδην 10 ml θρεπτικού
• Φυγοκέντρηση για 5 min στις 750-800 rpm
• Απομάκρυνση του θρεπτικού με το DMSO με πιπέτα pasteur
• Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας με 1 ml θρεπτικού
• Μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα T25 (μικρή φλάσκα) και προσθήκη 4 ml θρεπτικού
• Ανακίνηση σε οριζόντια θέση, ώστε να καλυφθεί όλος ο πάτος από το θρεπτικό
• Επώαση των κυττάρων στον incubator στους 37 ºC 5% CO_2.

3.2.1.2 *Σπάσιμο και συγκομιδή καρκινικών κυττάρων*

• Απομάκρυνση του θρεπτικού με πιπέτα pasteur
• Ξέπλυμα της φλάσκας με 2 ml PBS και απομάκρυνση με τον ίδιο τρόπο
• Προσθήκη 500μl θρυψίνης και ανακίνηση ώστε να καλύψει όλο τον πάτο
• Επώαση για 5-8 min (αναλόγως την κυτταρική σειρά)
• Σε περίπτωση που δεν ξεκολλάνε τα κύτταρα μπορεί να γίνει χρήση cell scraper
• Προσθήκη 9,5 ml θρεπτικού για αδρανοποίηση της θρυψίνης
• Μεταφορά των κυττάρων σε falcon
• Φυγοκέντριση στα 1200 rpm για 5 min
• Αφαίρεση του υπερκείμενου
• Επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας με 1 ml θρεπτικού (*για μέτρηση των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο)
* Για μέτρηση στο αιμοκυτταρόμετρο γίνεται ανάμειξη 10 μl κυτταρικού διαλύματος με 90 μl Trypan Blue και μέτρηση των κυττάρων σε ανάστροφο μικροσκόπιο.

3.2.2.1 Στρώσιμο καρκινικών κυττάρων σε plate και μεταχείριση τους με 5FU και Oxaliplatin

• Αραίωση των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο. Για τα “fast growing” υπολογίζεται συγκέντρωση 5000 cells/well, ενώ για τα “slow growing” 7500 cells/well
• Προσθήκη 100 μl/well κυτταρικού αιωρήματος σε 96 well plates
• Φυγοκέντριση των plates για 5 min στις 1200 rpm

• Αφαίρεση του υπερκείμενου με πιπέτα gilson και προσθήκη αραιώσεων φαρμάκου σε θρεπτικό μέσο 100μl/well
• Επώαση των κυττάρων στον κλίβανο σε συνθήκες 37 ºC και 5% CO_2

3.2.2.2 *Μέτρηση επιβίωσης των κυττάρων (Cell Viability Assay)*

• Ξεπάγωμα των διαλυμάτων PMS και MTS σε υδατόλουτρο στους 37 ºC για 15 min ή σε θερμοκρασία δωματίου για 90 min
• Ανάμειξη των δύο διαλυμάτων υπό ασηπτικές συνθήκες
• Προσθήκη 20μl σε κάθε πηγαδάκι με κύτταρα στο plate και επώαση για 1-4 h
• Φωτομέτρηση του plate στα 490 nm.

3.2.2 Πάγωμα καρκινικών κυττάρων

• Σπάσιμο και συγκομιδή κυττάρων
• Μεταφορά 500 μl κυτταρικού διαλύματος σε tubes (10^6 cells/tube)
• Προσθήκη 500 μl 90% FBS / 10% DMSO στάγδην
• Μεταφορά των tubes σε δοχείο "Mister Frosty" στους -20 ºC για μία ημέρα και ακολούθως αποθήκευση στους -80 ºC.

3.2.3 Τεχνική ανοσοφθορισμού σε μονιμοποιημένες κυτταρικές σειρές

Πειραματική διαδικασία:
1)Τοποθέτηση των πλακιδίων με τα κύτταρα σε διάλυμα με ακετόνη-μεθανόλη για 20 min
2)Ξέπλυμα των πλακιδίων με το διάλυμα 2 για 3 min δύο φορές
3)Επώαση με το διάλυμα 2 για 1 h ή 24 h στο ψυγείο
4)Επώαση με το πρώτο αντίσωμα για 1 h
5)Ξέπλυμα των πλακιδίων με το διάλυμα 2 για 3 min X3
6)Επώαση με το ειδικό για το αντίσωμα φθοριόχρωμα για 1 h
7)Ξέπλυμα των πλακιδίων με το διάλυμα 2 για 3 min X3
8)Τοποθέτηση σταγόνας DAPI/Antifade

9)Κλείσιμο με καλυπτρίδα

*Για ανοσοφθορισμό με αντισώματα περισσότερα του ενός επαναλαμβάνονται τα βήματα 4 έως 7. Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις των αντισωμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 19.

** DAPI/Antifade συντελεί στη σήμανση των πυρήνων των ζωντανών κυττάρων.

Πρωτογενή αντισώματα	**Βέλτιστες συγκεντρώσεις**	**Δευτερογενή αντισώματα**	**Βέλτιστες συγκεντρώσεις**
Nrf2 (mouse)	1/100	**Alexa Fluor 488 or 555 (**anti-mouse)	1/300
PKM2 (rabbit)	1/200	**Alexa Fluor 633** (anti-rabbit)	1/400
NQO1 (rabbit)	1/800	**Alexa Fluor 633** (anti-rabbit)	1/400
0H.8G (goat)	1/400	**Alexa Fluor 546** (anti-goat)	1/400

Πίν. 19: Βέλτιστες συγκεντρώσεις πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων για τον ανοσοφθορισμό.

3.2.4 Εξαγωγή ολικής πρωτεΐνης

• Τοποθέτηση της καλλιέργειας στον πάγο

• Αφαίρεση του θρεπτικού με πιπέτα Pasteur

• Πλύσιμο με PBS και αφαίρεση του Χ2

• Προσθήκη 150 μl RIPA solution

• Προσθήκη Protease inhibitors 1:100 και phosphatase inhibitors 1:200

• Επώαση για 15 min

• Απόξεση του κυτταρικού διαλείμματος με scraper και συλλογή σε eppendorfs

• Φυγοκέντρηση για 15 min στους 4 ºC

• Μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρά eppendorfs

• Φύλαξη στους -80 ºC

3.2.5 Western blot

1) Σύνθεση του Resolving gel* και τοποθέτηση του ανάμεσα από τα τζαμάκια (1,5mm) μέχρι την τη χαραγή από τα χτενάκια

2) Αφαίρεση του νερού μόλις πήξει το gel και προσθήκη του Stacking gel*

3) Τοποθετούμε τα κτενάκια στο πάνω μέρος από το stacking gel

4) Αφού πήξει το gel, αφαιρούνται τα κτενάκια και τα τζαμάκια με το τζελ τοποθετούνται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης

5) Προσθήκη Running buffer** μέχρι το πάνω μέρος της συσκευής

6) Τοποθέτηση των δειγμάτων στα πηγαδάκια, αφού αφαιρεθούν τα κτενάκια

7) Προσθήκη 5μl Ladder σε ένα από τα πηγαδάκια

8) Κλείσιμο της συσκευής και ηλεκτροφόρηση στα 80 V αρχικά κι έπειτα στα 120 V μέχρι να κατέβουν οι πρωτεΐνες

9) Μεταφορά του Gel σε σάντουιτς (σφουγγαράκι – whatman – gel – μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF – whatman – σφουγγαράκι)

10) Τοποθέτηση του σάντουιτς στη συσκευή για το protein transfer

11) Προσθήκη Transfer buffer*** μέχρι το πάνω μέρος της συσκευής

12) Μεταφορά του συστήματος στους 4°C και ηλεκτροφόρηση στα 100 V για 1 h

13) Μεταφορά της μεμβράνης σε TBST****, 0,05% Tween 20, 5% γάλα για 1 h στα 40 REV/ min (Blocking)

14) Κόψιμο της μεμβράνης ανάμεσα από την μπάντα της Actin και της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος

15) Αραίωση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος σε TBST 0,1% Tween20, 5% BSA και της Actin σε TBST 0,05% Tween20 (πίνακας 21)

16) Επώαση των μεμβρανών με τα αντισώματα overnight στους 4°C, 60REV/min

17) Ξέπλυμα των μεμβρανών με TBST 0,05% Tween20 5 min, 50REV/min X3 (τα αντισώματα είναι φωτοευαίσθητα και γι’ αυτό το λόγο πρέπει να προστατεύονται από το φως)

18) Μεταφορά των μεμβρανών σε TBST 0,1% Tween20, 2% γάλα, HRP 1:1000 για τις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος και TBST 0,05% Tween20, 5% γάλα, HRP 1:2000 για την Actin

19) Ανακίνηση στα 60REV/min για 45 min

20) Ξέπλυμα των μεμβρανών με TBST 0,05% Tween20 5 min, 50REV/min X3 (τα αντισώματα είναι φωτοευαίσθητα και γι’ αυτό το λόγο πρέπει να προστατεύονται από το φως)

21) Τοποθέτηση των μεμβρανών σε κασετίνα φύλαξης και μεταφορά τους στο εμφανιστικό μηχάνημα

22) Προσθήκη 800 μl ECL και εμφάνιση των μεμβρανών

* Οι συνταγές για το Resolving και το Stacking gel παρουσιάζονται στον πίνακα 20 παρακάτω.

** Running Buffer (σε τελικό όγκο 1L):

- 25mM Tris Base 3gr
- 250mM Glycine (pH 8,3) 18,8gr
- 10%SDS 10ml

***Transfer Buffer (σε τελικό όγκο 1L):

- 192mM Glycine 14,4gr
- 250mM Tris Base 3,03gr
- 20% Methanol 200ml

******** TBST 0,05% Tween20 (σε τελικό όγκο 1L):

- Tris Base 2,42gr
- NaCl 8,76gr
- Tween20 500μl

	Resolving gel 10% (1x)		Stacking gel (1x)
ddH_20	3,95ml	ddH_20	2,1ml
Acrylamide 30%	3,35ml	Acrylamide 30%	0,5ml
Tris Base 1,5M (pH8.8)	2,5ml	Tris Base 1M (pH6.8)	380μl
SDS 10%	100μl	SDS 10%	30μl
APS 10%	96μl	APS 10%	30μl
TEMED	4μl	TEMED	3μl

Πίν. 20: Συνταγή για παρασκευή resolving και stacking gel.

PKM2 (rabbit)	p-PKM2 (rabbit)	Nrf2 (mouse)	Actin (mouse)
1:1000	1:300	1:100	1:2000

Πίν. 21: Βέλτιστες αραιώσεις πρωτογενών αντισωμάτων για το Western blot.