

Παρουσίαση για το πρόγραμμα ΠΕΝΕΔ: «Οίνος και υγεία».
4/7/03



Μελέτη της χημειοπροστατευτικής δράσης φαινολικών ουσιών σε in vitro κυτταρικά συστήματα.

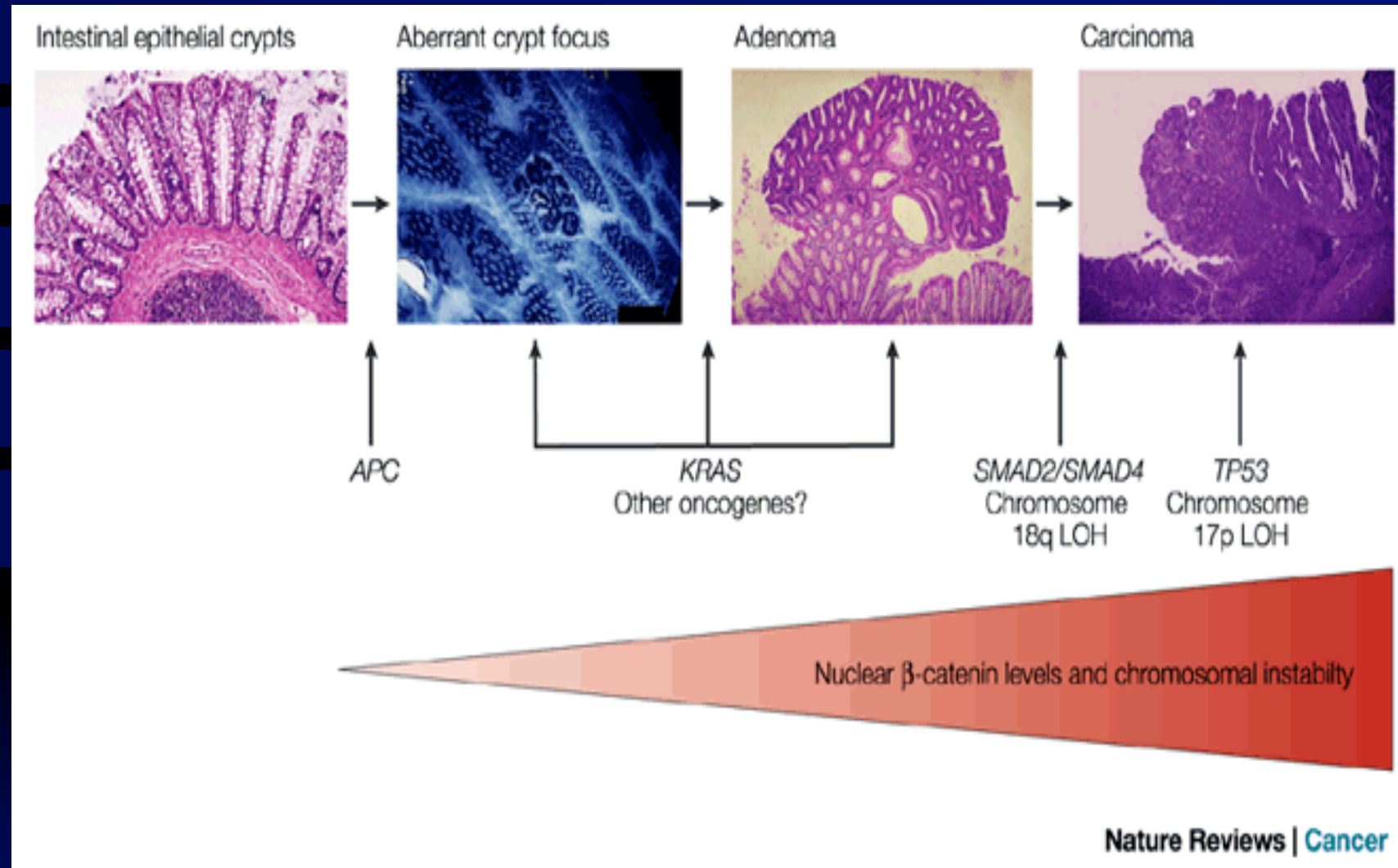
Ψαχούλια Φαίη
Εργαστήριο Γονιδιακής Ρύθμισης
Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας
Εθνικό Ιδρυμα Ερευνών

Ιατρική Σχολή
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λίγα λόγια για τον καρκίνο.

- Ο καρκίνος είναι μία ασθένεια όπου οι βασικοί κανόνες της κυτταρικής συμπεριφοράς αναιρούνται. Τα καρκινικά κύτταρα αναπαράγονται αυτόνομα και διαρκώς και βασικά εισβάλλουν και διακόπτουν τις λειτουργίες των κανονικών ιστών.
- Η ανάπτυξη του καρκίνου μπορεί να είναι αποτέλεσμα της μη ομαλής έκφρασης ή λειτουργίας ειδικών κυτταρικών γονιδίων όπως τα ογκογονίδια (π.χ. *ras*) και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια (π.χ. *p53*, *Rb*).

Το πολυσταδιακό σύστημα της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου.



CRC κυτταρικές σειρές: Αδένωμα-Καρκίνωμα

AAC1	RGC2	CACO2	DLD1	HT29
RasV12	TP53 R283W	TP53 stop204	RasL61 TP53 S241F	TP53 R273H
CFE 0 %	CFE 0.5 %	CFE 6 %	CFE 16 %	CFE 36 %
Tumors: Nil	Tumors: Nil	Tumors >6mo	Tumors~3mo	Tumors~1mo
del. (Ch 1p) 1n: Ch 18	1n: Ch 6,7,14,17 18,22	4n: Ch 1,2,3 3n: Ch 8,9,16	dupl. (Ch 2) 3n: Ch 20	4n: Ch 11,15,20 3n: Ch 1,2,5,7,10 12,16 1n: Ch 3,6,14,18

CFE: Colony Forming Efficiency (score of carcinogenesis)

Συστήματα-Εργαλεία της μελέτης μας.

- Κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου με ενδογενείς μεταλλαγές από διάφορα στάδια καρκινογένεσης.

Πλεονέκτημα: Μελέτη μονοπατιών σε κάθε ένα από τα βήματα του πολυσταδιακού συστήματος της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου.

- Σύστημα μελέτης χημειοπροστατευτικής δράσης in vitro. Χρήση κυττάρων-κλώνων στους οποίους έχουμε ενεργοποιήσει το *ras* γονίδιο.

Πλεονέκτημα: In vitro προσέγγιση των αλλαγών που επιφέρει η ενεργοποίηση του *ras* ογκογονιδίου - άμεση διαπίστωση της **χημειοπροστατευτικής δράσης των ουσιών** που μας ενδιαφέρουν στην εξέλιξη - πρόληψη του καρκίνου.



Στόχοι των πειραμάτων μας.

- Μελέτη του μηχανισμού επαγωγής σημάτων από το *ras* προς τις μικρές GTPάσες και τον πυρήνα του κυττάρου.
- Ικανότητα εκχυλισμάτων και καθαρών αντιοξειδωτικών ουσιών να επιδρούν στο ογκογονικό σήμα του ογκογονιδίου.
- Δημιουργία ενός νέου *in vitro* δυναμικού συστήματος μελέτης χημειοπροστατευτικής δράσης με στόχο την πιθανή χρήση ουσιών στην πρόληψη του ανθρώπινου καρκίνου.

Το νέο αυτό σύστημα θα μας προσφέρει τη δυνατότητα να έχουμε μία καθαρή προσέγγιση σε αυτό που ονομάζουμε «**χημειοπροστασία**» και «**πρόληψη**» ενάντι της μελέτης της «**χημειοθεραπείας**» που μας παρέχουν οι ήδη μετασχηματισμένοι ιστοί.

Γιατί το *ras* στον καρκίνο του παχέος εντέρου;

- Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί ένα σύστημα –μοντέλο με το οποίο μπορούμε να εξετάζουμε τους μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην καρκινογένεση. Τα διαφορετικά στάδια της προόδου της ασθένειας αντιπροσωπεύονται από μία ευδιάκριτη εξέλιξη από το αδένωμα στο καρκίνωμα, όπου τα διάφορα στάδια του όγκου εμφανίζονται στον ίδιο ασθενή. Ετσι μας δίνεται η δυνατότητα να εξετάζουμε το μηχανισμό με τον οποίο κάθε γενετική αλλαγή προάγει τη καρκινογένεση.
- Το *ras* πρωτο-ογκογονίδιο παρουσιάζεται μεταλλαγμένο στο 50% περίπου των όγκων του παχέος εντέρου: από τις 3 ισομορφές του *ras* ογκογονιδίου (H-, K- και N-), το *K-ras* εμφανίζεται μεταλλαγμένο στο 90% των περιπτώσεων.
- Στην περίπτωση που καταφέρουμε να ανατρέψουμε τις συνέπειες των αλλαγών που επιφέρει η μεταλλαγή αυτή με φαρμακολογικούς (φυσικούς ή τεχνητούς) παράγοντες, τότε ίσως να καταφέρουμε να ελαττώσουμε τα ποσοστά θνησιμότητας που οφείλονται στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Καρκίνος και χημειοπροστασία.

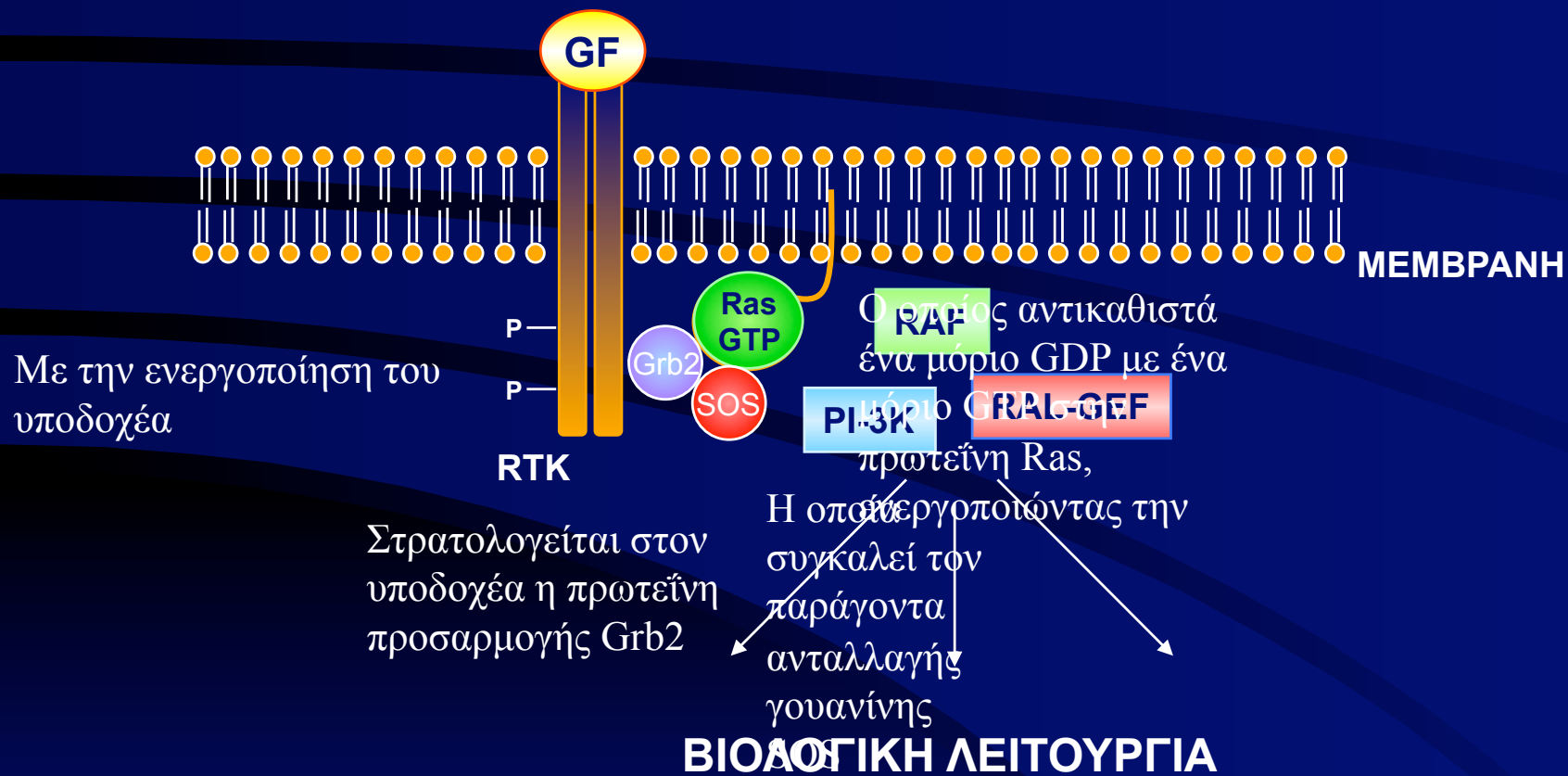
- Επιδημιολογικές μελέτες του καρκίνου του παχέος εντέρου προτείνουν ότι η εξέλιξη της ασθένειας επηρεάζεται από διαιτητικούς παράγοντες. Σημαντική αποτελεσματικότητα στην πρόληψη των όγκων παρουσιάζουν τα φαινολικά αντιοξειδωτικά που βρίσκονται στα φρούτα, τα λαχανικά και το κόκκινο κρασί.
- Η χημειοπροστατευτική δράση των ουσιών αυτών μελετάται σε επίπεδο:
 - επίδρασης των ενώσεων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό
 - παρεμπόδισης μεταλλακτικής ικανότητας μεταλλαξογόνων
 - επαγωγής αποπτωτικών διαδικασιών σε καρκινικά κύτταρα

Από προηγούμενες μελέτες...

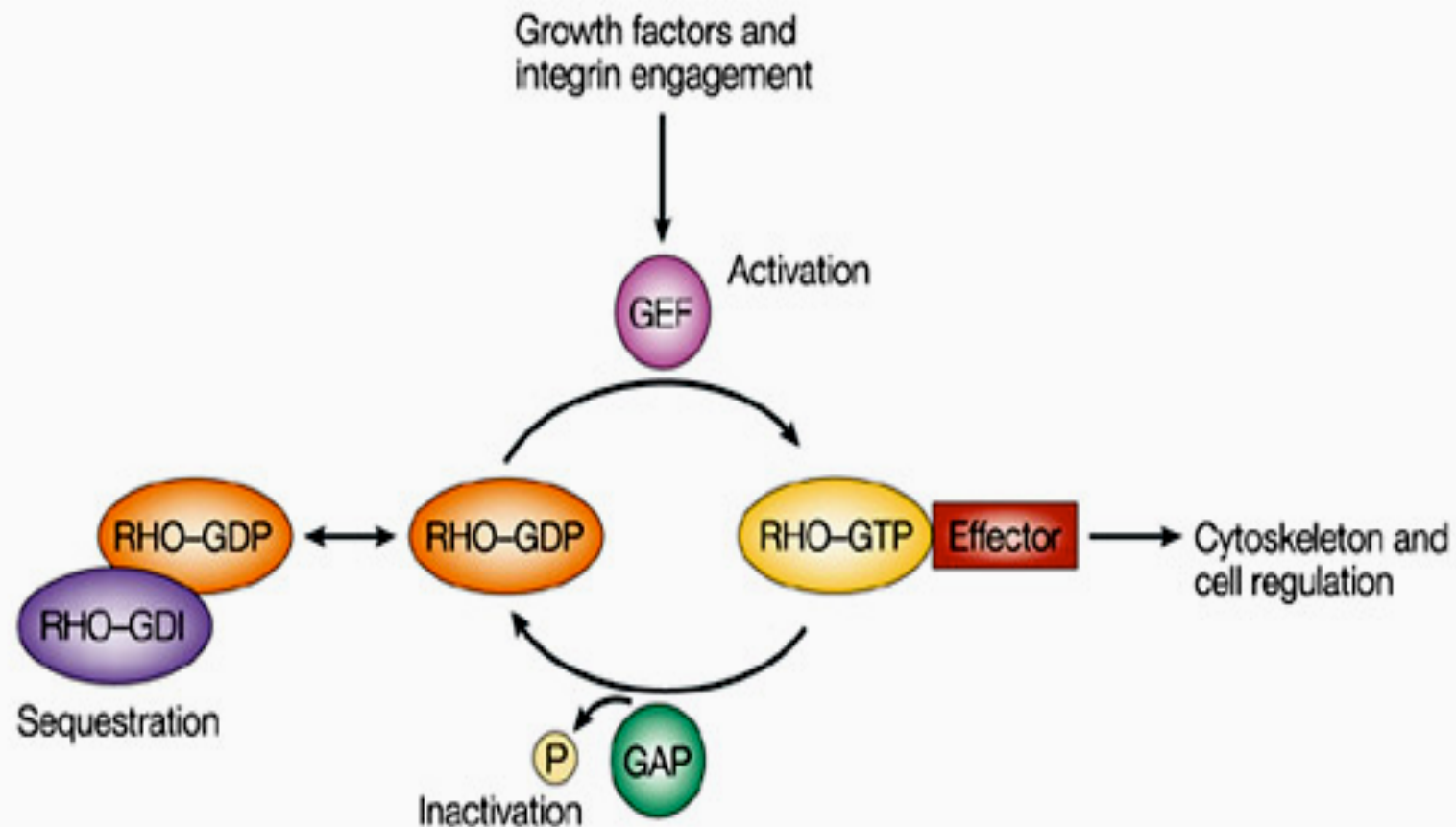
- «Η κερσετίνη και το gallic acid εμποδίζουν το σχηματισμό όγκων σε ποντίκια.» *Soleas et al., 2002*
- «In vivo χημειοπροστατευτική δράση των εστέρων του καφεϊκού οξέος στην εξέλιξη του παχέος εντέρου ποντικών» *Mahmoud et al., 2000*
- «Η κερσετίνη οδηγεί σε απόπτωση αδενωματικά κύτταρα του παχέος εντέρου.» *Pawlikowska et al., 2002*
- «Η προσθήκη φαινολικών ουσιών σε H-Ras NIH3T3 μετασχηματισμένα κύτταρα επαναφέρει τα κύτταρα από το μετασχηματισμένο τους φαινότυπο.» *Kuo et al., 1994*

Βασιζόμενοι στις προηγούμενες έρευνες, θα εστιάσουμε την προσοχή μας στην επίδραση φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στο κόκκινο κρασί σε ανθρώπινα κυτταρικά συστήματα.

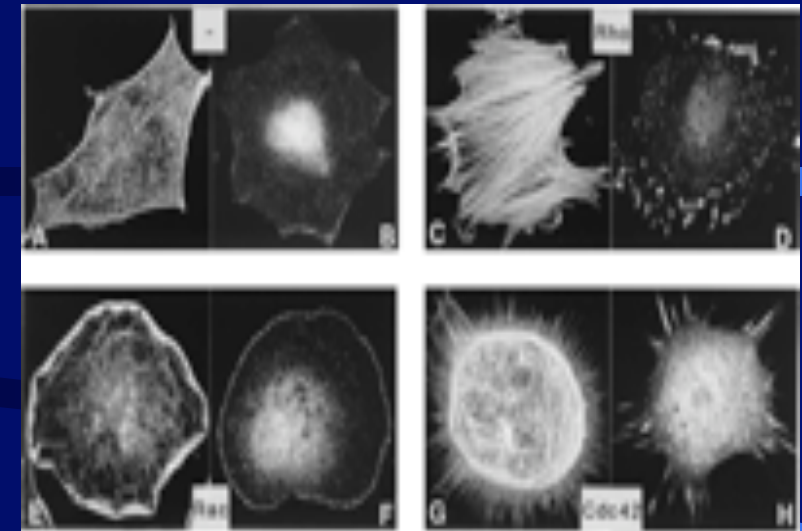
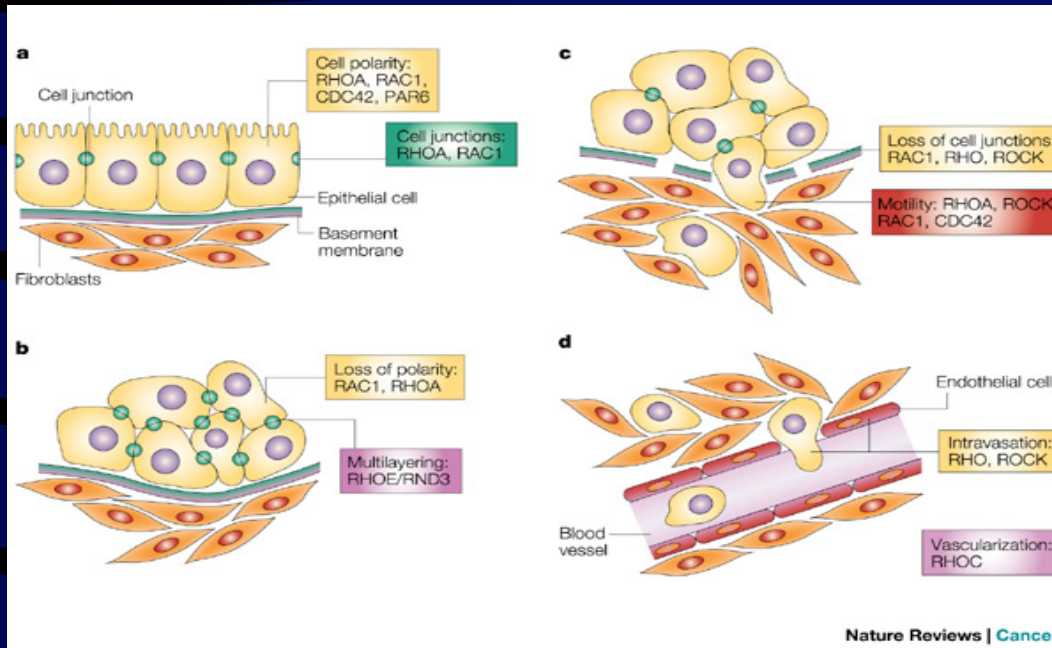
Ενεργοποίηση και σηματοδότηση μέσω της πρωτεΐνης Ras



Οι Rho GTPασες.



Οι μικρές GTPases και η ρύθμιση του κυτταροσκελετού.



Οι Rho, Rac, και Cdc42 ελέγχουν τη διαμόρφωση και την οργάνωση του κυτταροσκελετού.

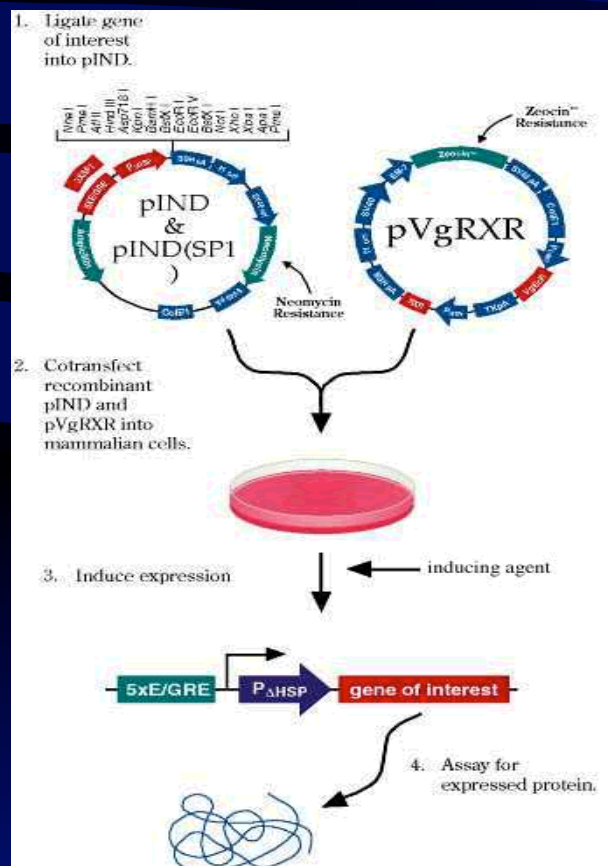
Προσθήκη του αυξητικού παράγοντα λιποφωσφατιδικό οξύ ενεργοποιεί τη Rho, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ινιδίων stress (C) και εστιακών προσκολλήσεων (D). Μικροένεση ενεργής Rac επάγει το σχηματισμό λαμελλιποδίων (E) και την κυτταρική προσκόλληση (F). Η Cdc42 οδηγεί στο σχηματισμό φιλοποδίων. (G) και προσκόλλησης μεταξύ των κυττάρων (H). Η Cdc42 ενεργοποιεί τη Rac; έτσι, τα φιλοπόδια προσδένονται στενά με τα λαμελλιπόδια, όπως φαίνεται στην εικόνα (G). Στις (A), (C), (E), και (G), τα ινίδια ακτίνης φαίνονται με χρώση ροδαμίνης φαλλοιδίνης; στις (B), (D), (F), και (H), τα συμπλέγματα κυτταρικών προσκολλήσεων φαίνονται με αντίσωμα έναντι της βινκουλίνης..

Δημιουργία in vitro δυναμικού συστήματος μελέτης χημειοπροστατευτικής δράσης.



Το σύστημα της Εκδυσόνης.

Η έκφραση του *ras* ογκογονιδίου επάγεται από την πρόσδεση της ποναστερόνης στο διμερές των υποδοχέων EcR και RXR οι οποίοι έχουν δεθεί με τον υποκινητή του γονιδίου.

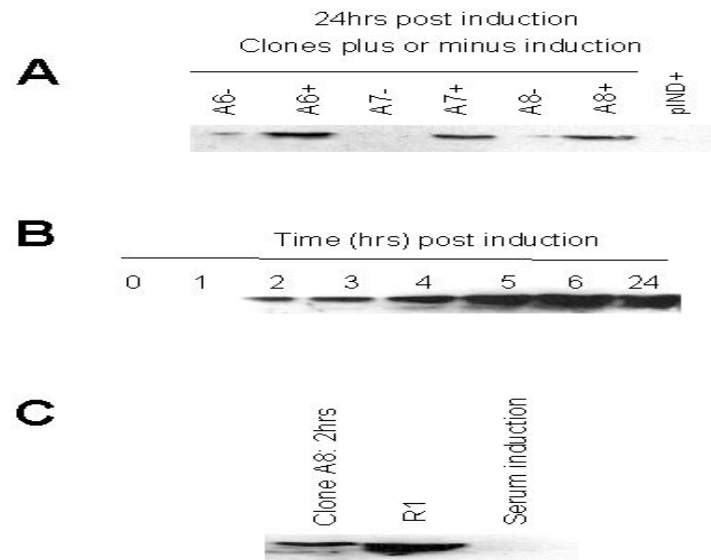


- pVgRXR encodes drosophila ecdysone receptor
- Gene of interest is cloned into pIND
- Cells are co-transfected with pVgRXR and pIND-X
- Addition of ponasterone (homologue of ecdysone) permits the binding of the ecdysone receptor to the promoter in pIND
- Gene of interest is expressed.

Επαγόμενη έκφραση NIH 3T3 Ras κλώνων.



Figure 1



A επιλογή κλώνων μετά από επαγωγή του Ha-Ras με ποναστερόνη.

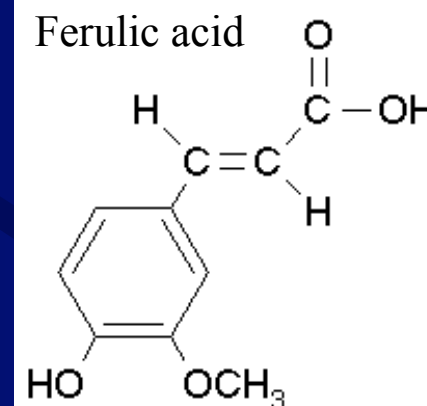
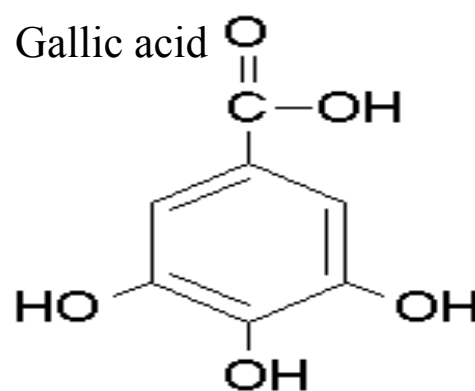
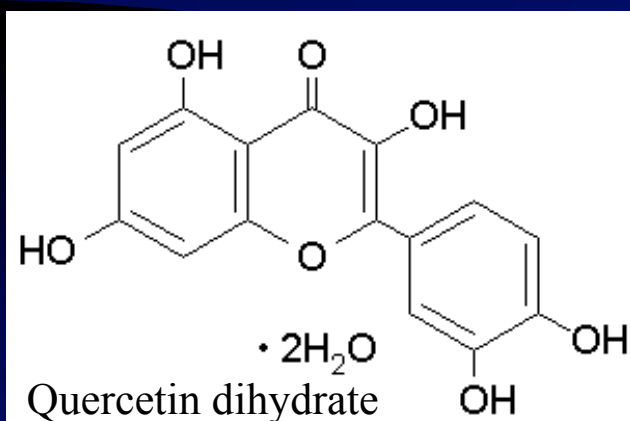
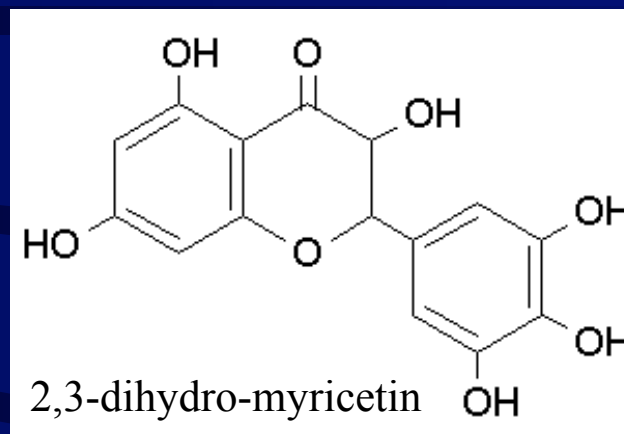
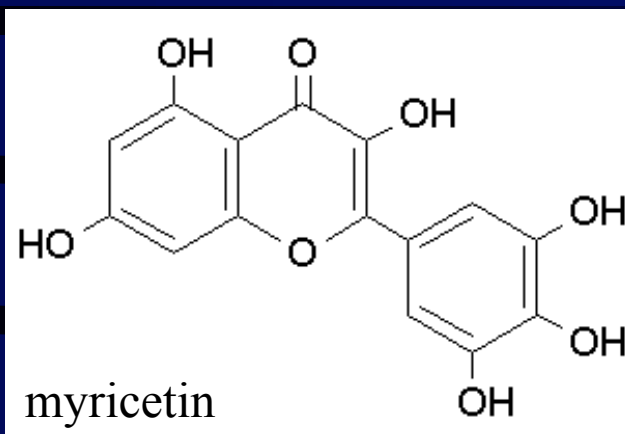
B. Εκφραση του Ha-Ras γονιδίου σε συνάρτηση με το χρόνο.

C. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του Ha-Ras στους κλώνους σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου Ki-Ras σε σταθερά μετασχηματισμένα κύτταρα..

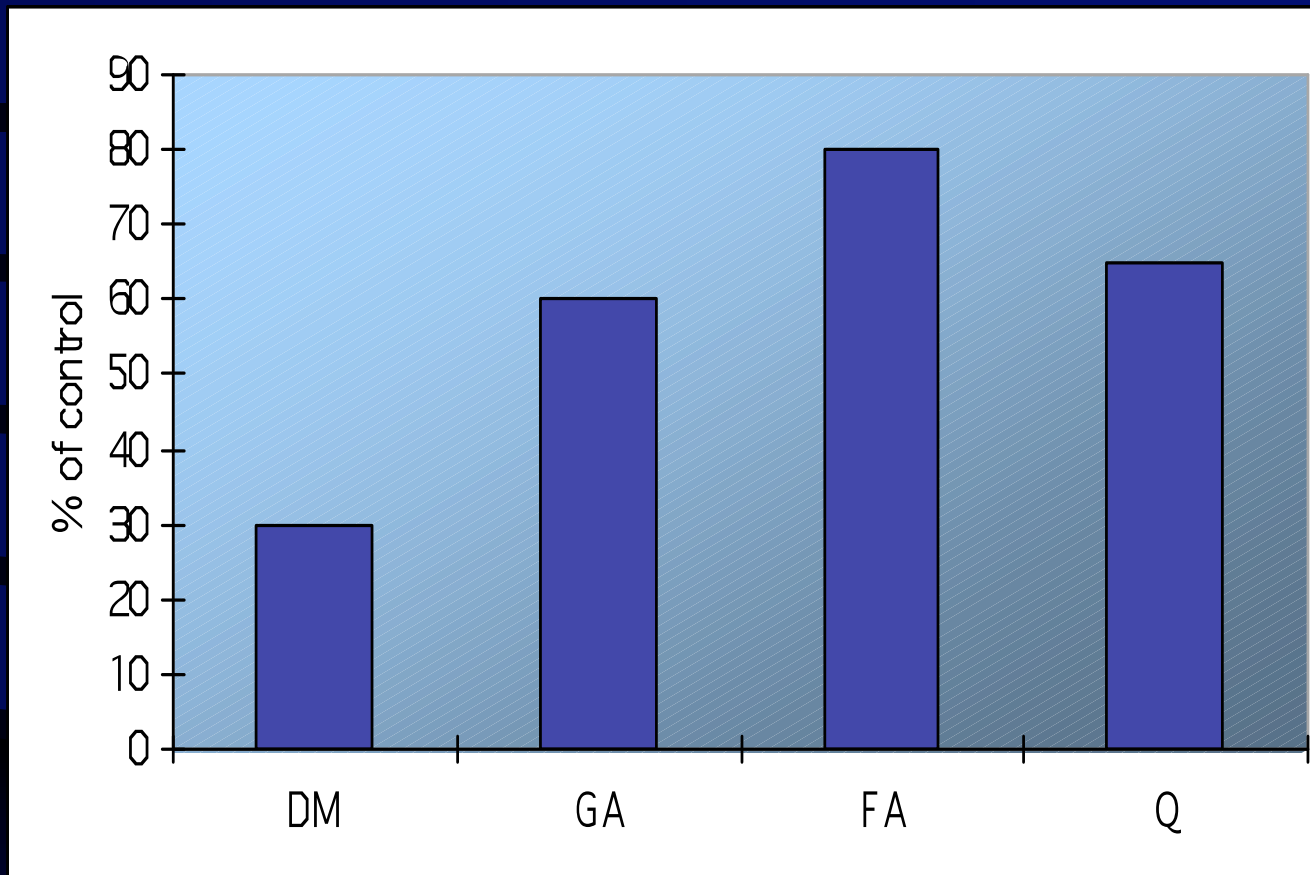
Χρήση φαινολικών συστατικών σε κυτταρικά συστήματα.



Συντακτικοί τύποι.

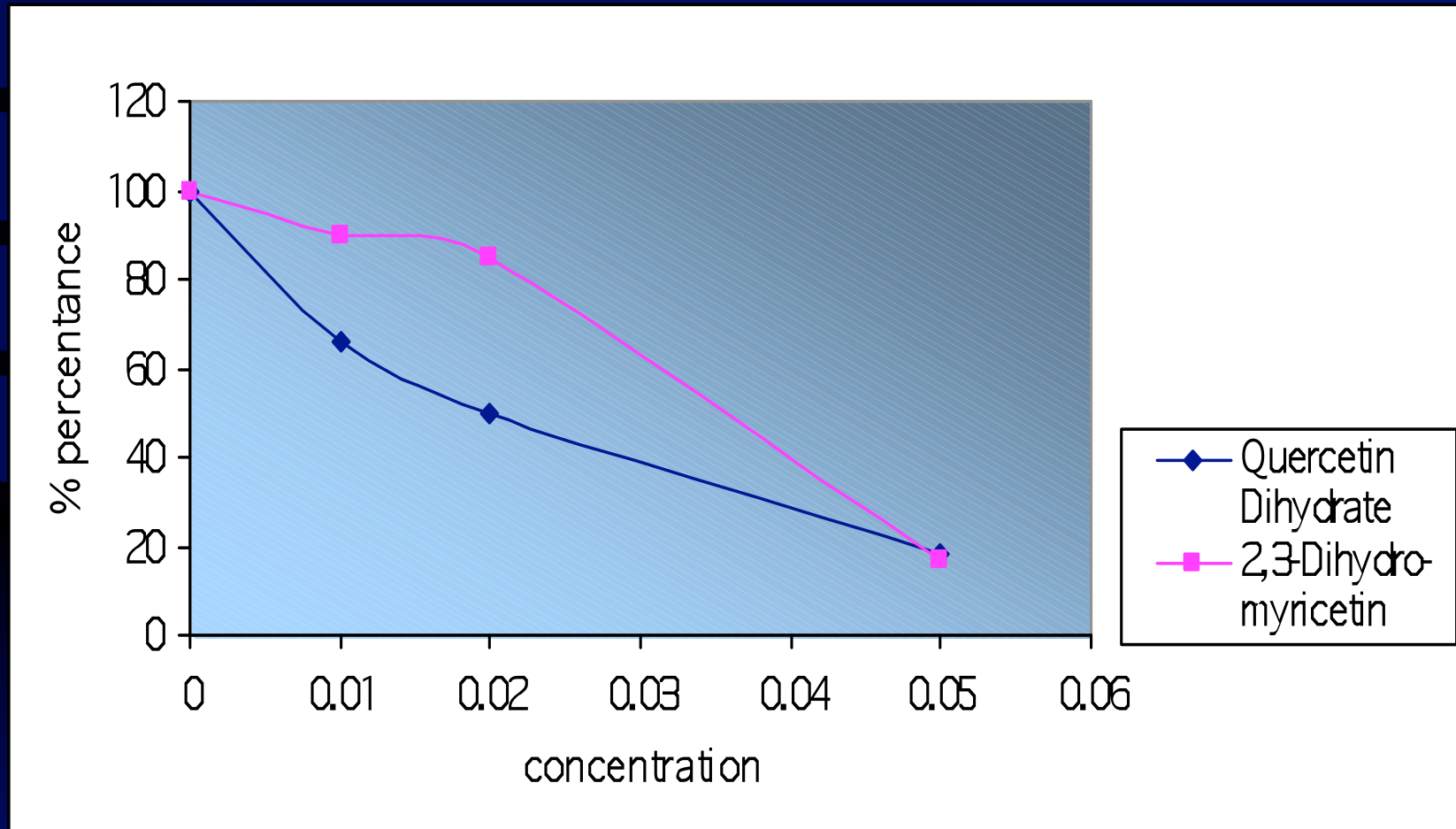


48h επώαση CACO-2 κυττάρων με πολυφαινόλες.

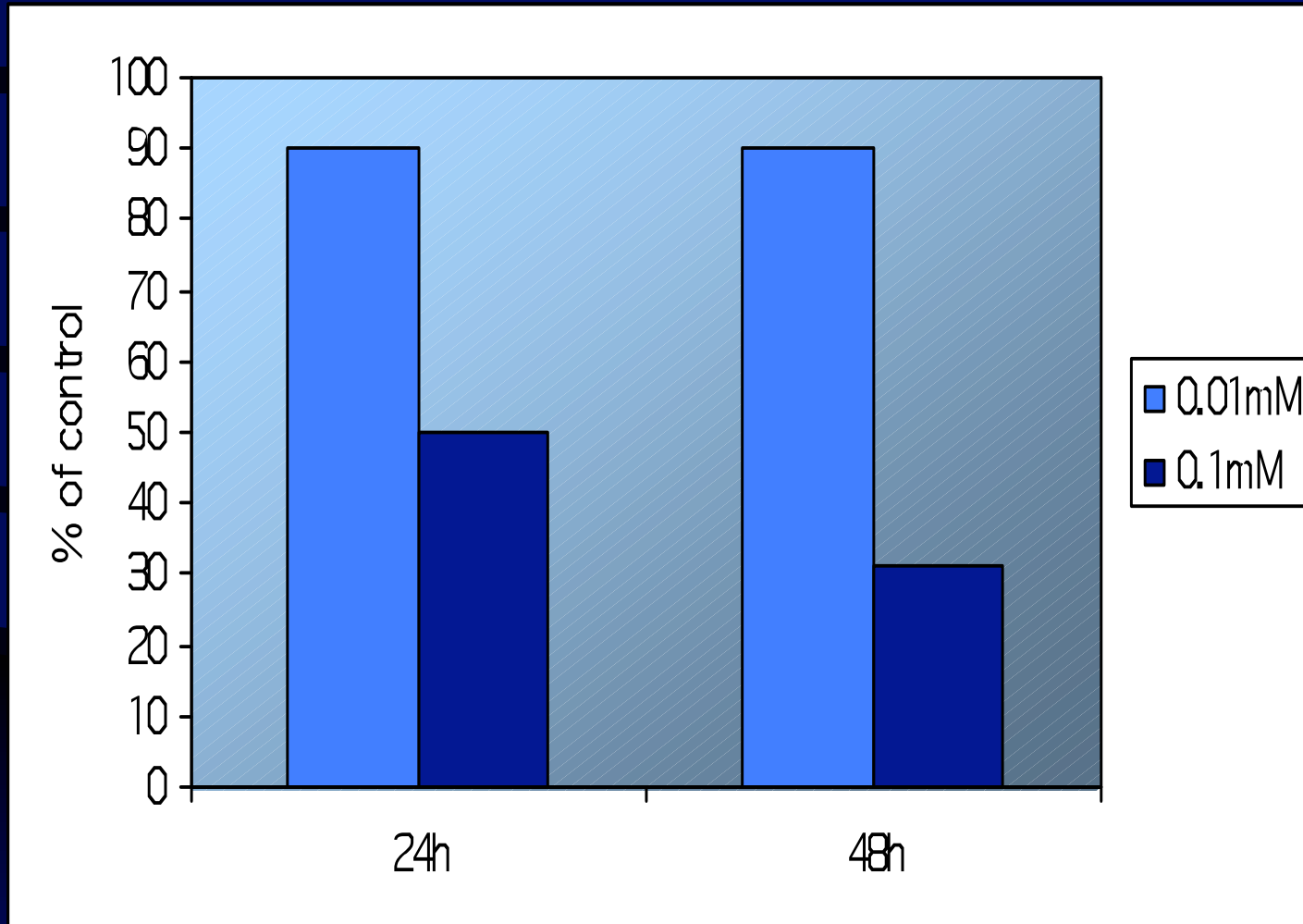


- DM: 2,3-dihydro-myricetin
- GA: gallic acid
- FA: ferulic acid
- Q: quercetin dihydrate

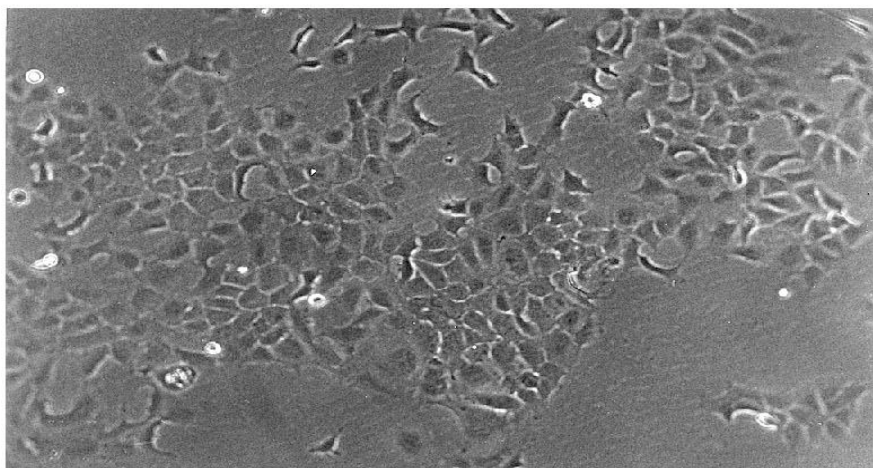
Επίδραση της συγκέντρωσης της Quercetin dihydrate και της 2,3-dihydro-Myricetin σε CACO-2 κύτταρα μετά από 5 μέρες επώαση.



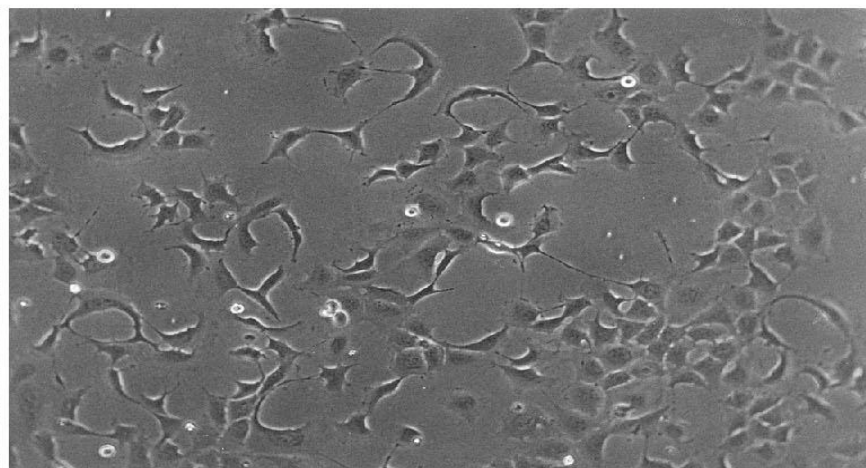
Επώαση HT29 κυττάρων με Myricetin.



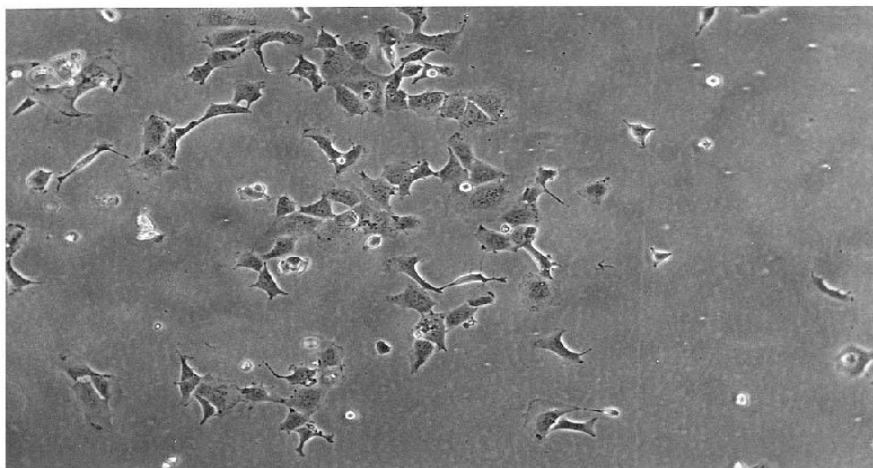
Επίδραση της κερσετίνης σε H-ras 293 μετασχηματισμένα κύτταρα.



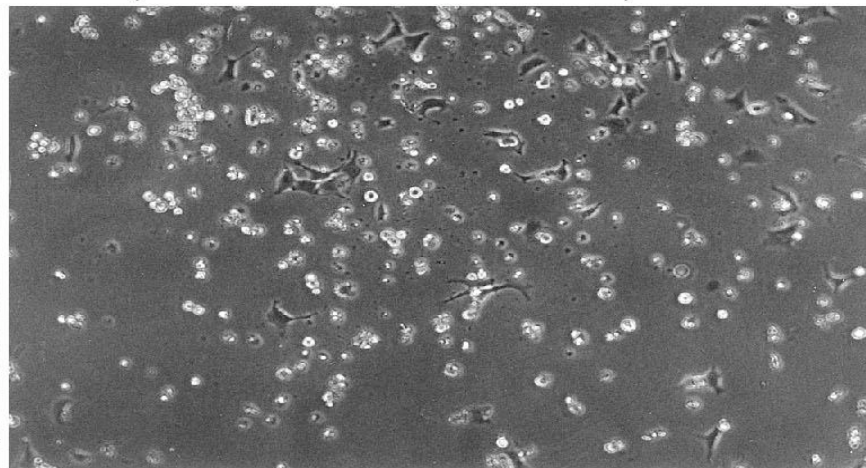
Control (no induction with Ponasterone)



Induction of H-Ras expression
(48h treatment with Ponasterone)



48h treatment with 20μM Quercetin



48h treatment with Ponasterone and 20μM Quercetin

Μελλοντικοί στόχοι των πειραμάτων μας:

- Μελέτη της ικανότητας εκχυλισμάτων και καθαρών αντιοξειδωτικών ουσιών να επιδρούν στο ογκογονικό σήμα του ras ογκογονιδίου.

Πιο συγκεκριμένα, η επίδραση των ουσιών θα μας απασχολήσει σε επίπεδο:

- Κυτταρικής μορφολογίας
- Κυτταροσκελετικών αλλαγών
- Μονοπατιών μεταγωγής σημάτων στα οποία εμπλέκονται μέλη της οικογένειας ras

Σκοπός μας η πρόληψη των αλλαγών που επιφέρει η ενεργοποίηση των μονοπατιών και που οδηγούν σε καρκινικό φαινότυπο καθώς και η πιθανή προληπτική χορήγηση τέτοιων ουσιών σε χημειοπροστατευτικοί παράγοντες ενάντια στον καρκίνο του παχέος εντέρου.



Μέλη του εργαστηρίου - Συνεργάτες

- **Conditional Ras systems and microarray analysis**

Michael Roberts, PhD

Sophy Moutzi, MPhil

Prof. C. Paraskeva, U.K.

- **Rho pathway in tumour progression**

E. Psichari, PhD

F. Psahoulia, BSc

Prof A. Balmain, UCSF Cancer Center

Alex Pintzas, PhD

- **Pathways in apoptosis vs. carcinogenesis**

Kostas Drosopoulos, BSc

Sophy Moutzi, MPhil

L. Andera, PhD (Czech Acad. Sci., Prague)