

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΤΗΝ ΠΟΛΥΣΤΑΔΙΑΚΗ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

Α. Παπαευαγγελίου, Σ. Σολακίδη, Π. Παπασάβα, Α. Πίντζας, Π. Μουτσάτσου, Κ.Ε. Σέκερης, Β. Ζουμπουρλής

Η καρκινογένεση είναι μια πολυσταδιακή διαδικασία, κατά την οποία γενετικά και επιγενετικά γεγονότα καθορίζουν τη μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά. Το πολυσταδιακό σύστημα της επιδερμίδας του ποντικού είναι ένα *in vivo* σύστημα που επιτρέπει τη μελέτη της έναρξης, της προαγωγής και της καρκινικής εξέλιξης, παρέχοντας χρήσιμα στοιχεία για το χρόνο ενεργοποίησης των ογκογονιδίων και απενεργοποίησης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, καθώς και των στεροειδών ορμονών.

Το σύστημα αυτό αναπτύχθηκε στο εργαστήριο του Allan Balmain και περιλαμβάνει κυτταρικές σειρές που αντιπροσωπεύουν διακριτά στάδια της καρκινογένεσης και έχουν προκύψει μετά από κατεργασία της επιδερμίδας του ποντικού με τον πολυκυκλικό αρωματικό υδρογονάνθρακα διμεθυλοβενζοανθρακένιο (DMBA) και το φορβολικό εστέρα (TPA), που είναι καρκινικός προαγωγέας. Πρόκειται για αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα (κυτταρική σειρά C50), καλόηδες θήλωμα (κυτταρική σειρά P1), πλακώδες καρκίνωμα που δημιουργεί δευτερογενείς όγκους μετά από ένεση σε αθυμικούς ποντικούς (κυτταρική σειρά B9) και αναπλαστικές, ατρακτοειδείς κυτταρικές σειρές που δημιουργούν όγκους που έχουν τη δυνατότητα να μεθίστανται (A5, CarB).

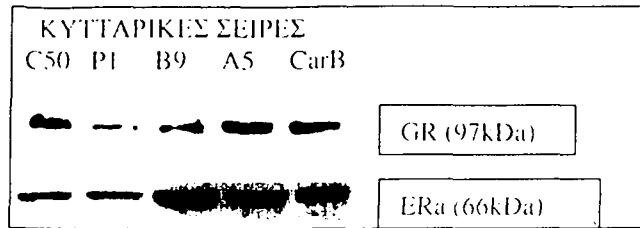
Οι στεροειδείς ορμόνες συμμετέχουν στη μεταγραφική διαδικασία αλληλεπιδρώντας με τους αντίστοιχους κυτταροπλασματικούς υποδοχείς τους, GR (Glucocorticoid Receptor, Υποδοχέας Γλυκοκορτικοειδών) και ERα (Estrogen Receptor, Υποδοχέας Οιστρογόνων) οι οποίοι, στην ανενεργό τους μορφή, συγκροτούν ένα ετεροπολυμερές σύμπλοκο με κυτταρικές πρωτεΐνες. Η πρόσδεση της ορμόνης ακολουθείται από διάσπαση του συμπλόκου και ενεργοποίηση των υποδοχέων, οι οποίοι διμερίζονται και μετατοπίζονται στον πυρήνα. Εκεί δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες μετά από πρόσδεση στα αντίστοιχα ορμονοανταποκρινόμενα στοιχεία GRE (Glucocorticoid Response Element) και ERE (Estrogen Response Element) των γονιδίων που ρυθμίζονται από τις ορμόνες. Στο μηχανισμό συμμετέχουν και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες, καθώς και πρωτεΐνες της βασικής μεταγραφικής μηχανής, αλληλεπιδρώντας με τους υποδοχείς είτε άμεσα είτε έμμεσα (1,2).

Τα οιστρογόνα ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αύξηση, τη διαφοροποίηση και την κυτταρική απόκριση στη φλεγμονή, αλληλεπιδρώντας με τους υποδοχείς τους. Οι υποδοχείς των οιστρογόνων δέχονται μηνύματα και από άλλα ρυθμιστικά μόρια, εκτός από τα οιστρογόνα. Τελικό αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι η επαγωγή πρωτεϊνών που στην παθολογική τους απόκλιση έχουν ρόλο στις διεργασίες της καρκινογένεσης.

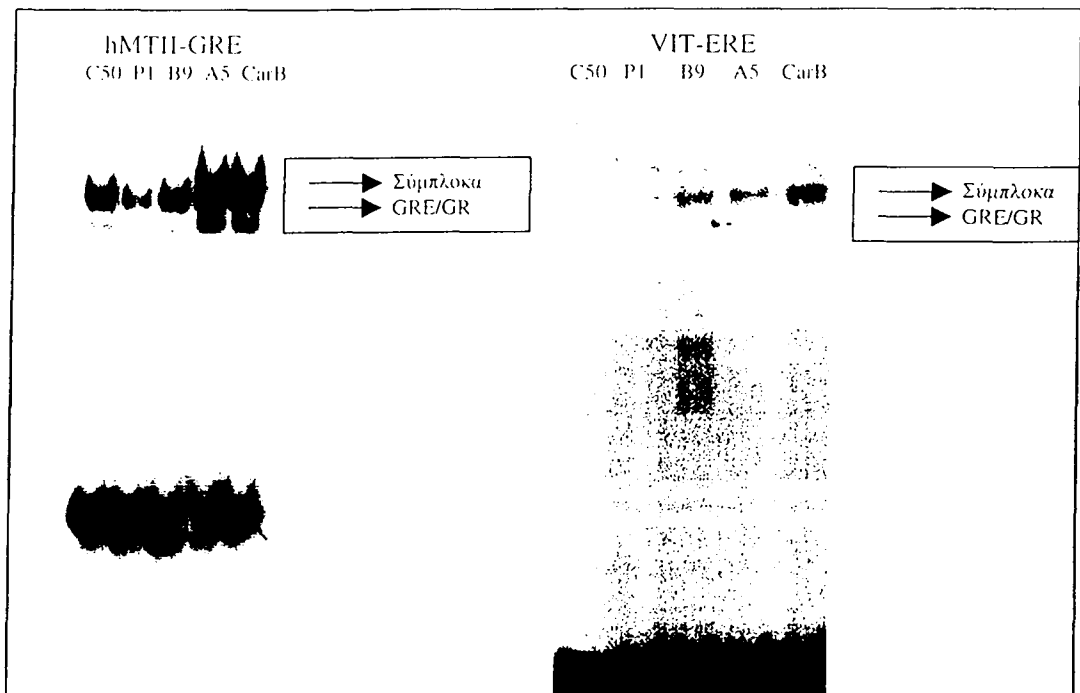
Τα γλυκοκορτικοειδή προάγουν την κυτταρική διαφοροποίηση και αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό. Όσον αφορά το ρόλο τους στην επιδερμίδα, αναστέλλουν τη

ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

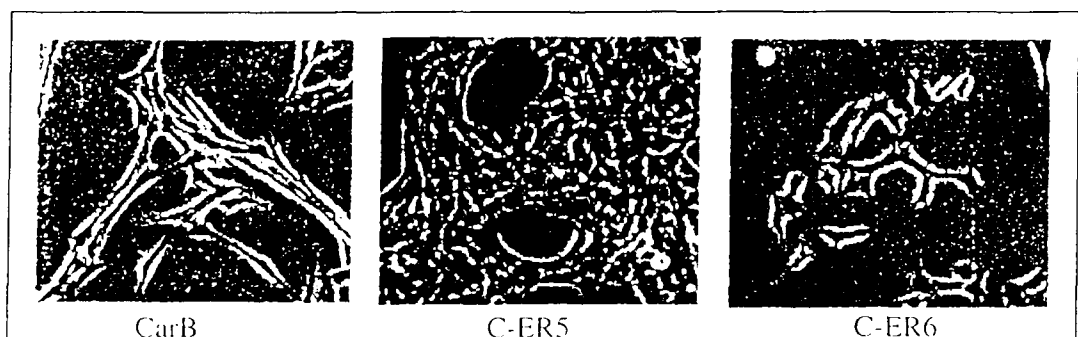
Εικόνα 1. Επίπεδα GR και ERα στις κυτταρικές σειρές της επιδερμίδας του ποντικού (καλλιέργεια παρουσία ορού)



Εικόνα 2. Ενεργότητα πρόσδεσης των GR και ERα στις συναινετικές τους αλληλουχίες



Εικόνα 3. Συγκριτική παρουσίαση κλώνων και πατρικών κυττάρων



σύνθεση του γενετικού υλικού σε φυσιολογικά κερατινοκύτταρα *in vivo* (3). Τα γλυκοκορτικοειδή αποτρέπουν τη δημιουργία φλεγμονής από φορβολικό εστέρα και την υπερπλασία του δέρματος (4). Επίσης, είναι πολύ ισχυροί αναστολείς δημιουργίας όγκων στην επιδερμίδα, ιδιαίτερα στο στάδιο της προαγωγής της καρκινογένεσης (5).

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η διαλεύκανση του ρόλου των GR και ERα στα διακριτά στάδια της καρκινογένεσης του ποντικού.

Υλικά και Μέθοδοι

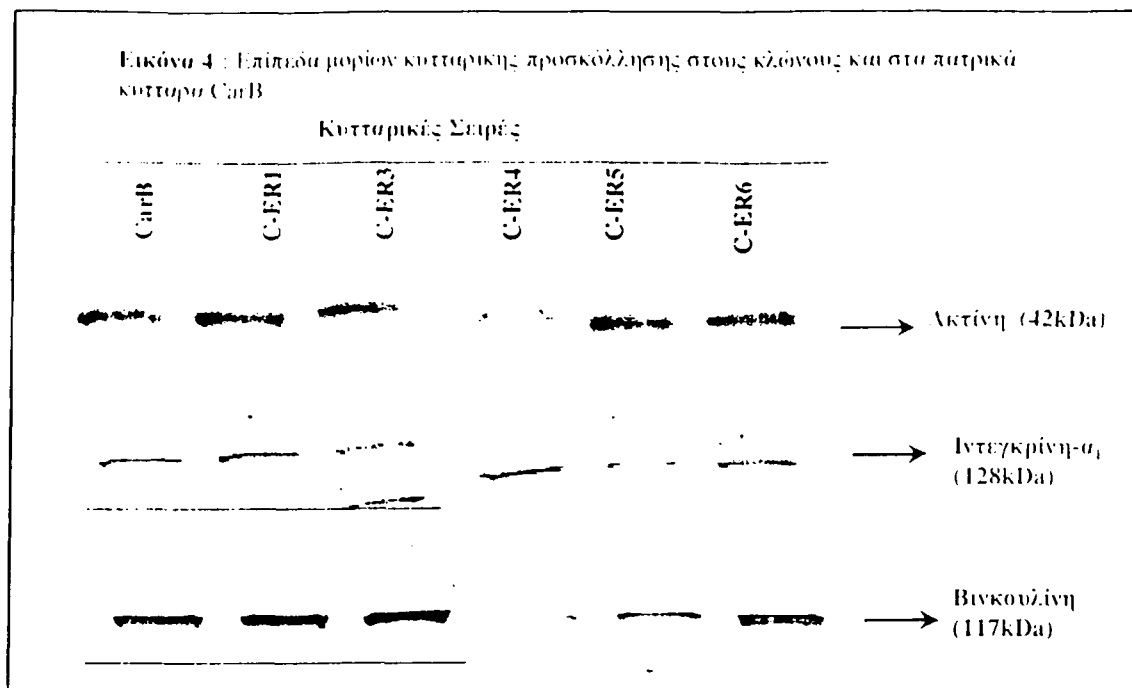
Στις κυτταρικές σειρές της επιδερμίδας του ποντικού που αναφέρθηκαν (C50, P1, B9, A5, CarB) πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των επιπέδων των GR και ERα με την τεχνική του ανοσοστυπώματος (Western Blot). Ακολούθησε μελέτη της ενεργότητας πρόσδεσης των GR και ERα στις αντίστοιχες συναινετικές αλληλουχίες GRE και ERE, με τη μέθοδο κατακράτησης πρωτεϊνών (Gel Mobility Shift Assay). Η ικανότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης από τον GR μελετήθηκε με επιμόλυνση των κυττάρων με πλασμίδιο που περιέχει τη θέση πρόσδεσης GRE, η οποία ρυθμίζει τη μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση των ατρακτοειδών κυττάρων CarB με επικρατή αρνητικό μεταλλάκτη του ERα (S554fs) (6), που χαρακτηρίζεται από αλλαγή πλαισίου ανάγνωσης, ως αποτέλεσμα επίδρασης χημικών μεταλλαξογόνων στην περιοχή πρόσδεσης της ορμόνης. Οι κλώνοι που προέκυψαν εξετάστηκαν ως προς το φαινότυπό τους, το πρότυπο αύξησης (με χρώση Crystal violet), τα χαρακτηριστικά μετασχηματισμού (μέσω της ικανότητας ανάπτυξης αποικιών σε μαλακό άγαρ) και τα επιθηλιακά τους χαρακτηριστικά (προσδιορισμός επιπέδων ακτίνης, βινκουλίνης και ιντεγκρίνης-α₁ με τη μέθοδο του ανοσοστυπώματος).

Αποτελέσματα

Με την τεχνική του ανοσοστυπώματος παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα των GR και ERα στις κυτταρικές σειρές με ατρακτοειδή φαινότυπο, τόσο παρουσία όσο και απουσία ορού (Εικόνα 1). Επίσης, αυξημένη ενεργότητα πρόσδεσης των GR και ERα στα GRE και ERE αντιστοίχως, διαπιστώθηκε στα προχωρημένα στάδια της καρκινογένεσης (Εικόνα 2). Επιπλέον, με τη μέθοδο της λουσιφεράσης προσδιορίστηκε αυξημένη ικανότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης από τον GR στις κακοήθεις κυτταρικές σειρές.

Από την επιμόλυνση των ατρακτοειδών κυττάρων CarB με τον επικρατή αρνητικό μεταλλάκτη ERα προέκυψαν οι κλώνοι C-ER1-7, οι οποίοι είχαν μειωμένα επίπεδα ενδογενούς ERα (όπως προσδιορίστηκαν με την τεχνική του ανοσοστυπώματος) και διαφορετικό φαινότυπο σε σχέση με τα πατρικά κύτταρα CarB. Όπως αποτυπώνεται στην Εικόνα 3, η επιμόλυνση οδήγησε στην αναστροφή του ατρακτοειδούς φαινοτύπου προς πλακώδη. Οι κλώνοι χαρακτηρίζονταν από μικρότερο ρυθμό αύξησης και μικρότερη ικανότητα δημιουργίας αποικιών σε μαλακό άγαρ, σε σχέση με τα πατρικά κύτταρα. Τέλος, παρατηρήθηκαν στους κλώνους διαφορετικά επίπεδα έκφρασης ακτίνης, βινκουλίνης και ιντεγκρίνης-α₁ (Εικόνα 4). Πρόκειται για μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, δηλαδή ουσίες που συμμετέχουν στην ανάπτυξη, την πήξη του αίματος, τη φλεγμονή, την καρκινική διήθηση και μετάσταση και αποτελούν διαγνωστικούς δείκτες νεοπλασμάτων (7).



Συζήτηση

Η αύξηση των επιπέδων έκφρασης των GR και ERα στις κακοήθεις κυτταρικές σειρές με μεταστατικό δυναμικό, συνηγορεί υπέρ του ρόλου των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών στην εξέλιξη της καρκινογένεσης της επιδερμίδας του ποντικού. Ειδικότερα, το γεγονός ότι ο επικρατής αρνητικός μεταλλάκτης της πρωτεΐνης ERα δύναται να αναστρέψει το βιολογικά επιθετικό καρκίνωμα ατρακτοειδούς μορφολογίας σε πλακώδες καρκίνωμα με ηπιότερα χαρακτηριστικά μετασχηματισμού, υπογραμμίζει τη σημασία του ERα κατά τη μετάβαση του πλακώδους φαινοτύπου προς ατρακτοειδή. Η συσχέτιση συγκεκριμένων γενετικών αλλοιώσεων (όπως είναι ο ανενεργός ERα) με τα διακριτά στάδια της καρκινογένεσης του ποντικού έχει αντίκτυπο στην κατανόηση των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στους πολυσταδιακούς καρκίνους στον άνθρωπο. Η ταυτοποίηση αντίστοιχων γονιδίων στον άνθρωπο μπορεί να οδηγήσει στην εύρεση μοριακών στόχων χρήσιμων στην πρόγνωση, διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Parker MG. Steroid and related receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 499-504 (1993).
- Beato M, Herrlich P, Schultz G. Steroid hormone receptors : Many actors in search of a plot. *Cell* 83: 851-857 (1995).
- Schwarz JA, Viaje A, Slaga TJ. Fluocinolone acetonide: a potent inhibitor of mouse skin tumour promotion and epidermal DNA synthesis. *Chem Biol Interact* 17: 331-47 (1994).
- Slaga TJ. Can tumour promotion be effectively inhibited? *IARC Sci Publ* 56: 497-506 (1984).
- Hennings H. Tumor promotion and progression in mouse skin. In: Barrett JC (ed), *Multistep models of carcinogenesis*. CRC Press, Boca Raton, FL: 59-71 (1987).
- Ince BA, Zhuang Y, Wrenn CK, Shapiro DJ and Katzenellenbogen BS. Powerful dominant negative mutants of the human estrogen receptor. *J Biol Chem* 268(19): 14026-32 (1993).
- Desplaces A, Poupon MF. The metastatic process. *Bull Cancer* 81(9): 751-4 (1994).