

Ο ρόλος της p53 στη συμπεριφορά της απορρυθμισμένης λειτουργίας του E2F1 στα Οστεοσαρκώματα*

Λιόντος Μ.¹, Νηφόρου Κ.¹, Βουγάς Κ.², Ευαγγέλου Κ.¹,
Αποστολοπούλου Κ.¹, Κοτσίνας Α.¹, Κοντοβαζενίτης Κ.¹, Βελιμέζη Γ.¹,
Δρούγου Α.^{1,3}, Κυπαρίδου Ε.⁴, Θωμά-Τσαγλή Ε.⁵, Μπαρμπάτη Κ.³,
Τσάνγκαρης Γ.Τ.², Παπαβασιλείου Α.Γ.⁶, Κίττας Χ.¹, Γοργούλης Β.Γ.¹

p53 role in the deregulated overexpression of E2F1 in osteosarcomas

Liontos M.¹, Niforou K.¹, Vougas K.², Evangelou K.¹, Apostolopoulou K.¹, Kotsinas A.¹,
Kontovazenitis K.¹, Velimezi G.¹, Drougou A.^{1,3}, Kyparidou E.⁴, Thoma-Tsaglis E.⁵,
Barbatis C.³, Tsangaris G.T.², Papavasiliou A.G.⁶, Kittas C.¹, Gorgoulis V.G.¹

¹Molecular Carcinogenesis Group, Department of Histology and Embryology, School of Medicine, University of Athens, ²Division of Biotechnology, Centre of Basic Research II, Foundation for Biomedical Research of the Academy of Athens, ³Department of Pathology, "Korgialenio-Mpenakio" Hospital, Greek Red Cross, Athens, ⁴2nd Department of Pathology, Konstantopoulou General Hospital, Athens, ⁵Department of Pathology, Asklepeion Voula Hospital, Athens, ⁶Department of Biochemistry, School of Medicine, University of Athens

The aim of the present study is the in vivo and in vitro investigation of the correlation between E2F1 and osteosarcoma kinetics, as well as of the cellular response after E2F1 overexpression. Based on the results it is suggested that p53 is a central regulator of E2F1 expression regarding the osteosarcoma kinetics. The overexpression of E2F1 finally leads to activation of p53.

Key words: Osteosarcoma, E2F1, proteomics

¹Ομάδα Μοριακής Καρκινογένεσης, Εργ. Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, ²Τομέας Βιοτεχνολογίας, Κέντρο Βασικής Έρευνας II, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, ³Τμήμα Παθολογικής-Ανατομικής, Νοσοκομείο «Κοργιαλένιο-Μπενάκειο Ε.Ε.Σ, Αθήνα, ⁴2^ο Τμήμα Παθολογικής-Ανατομικής, Γενικό Νοσοκομείο Κωνσταντινουπόλειο, Αθήνα, ⁵Τμήμα Παθολογικής-Ανατομικής, Νοσοκομείο Βούλας Ασκληπιείο, Αθήνα, ⁶Εργ. Βιοχημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών

*«Η εργασία αυτή δημοσιεύεται στα Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής κατόπιν προσκλήσεως μετά από βράβευση για το έπαθλο στη μνήμη του Καθηγητού Νικόλαου Ξ. Παπαχαράλαμπος και θα αποτελέσει μέρος ξενόγλωσσης εργασίας, η οποία θα υποβληθεί για δημοσίευση σε διεθνές περιοδικό».

ΣΚΟΠΟΣ: Το οστεοσάρκωμα είναι η συχνότερη πρωτοπαθής κακοήθεια των οστών. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *RB* αποτελούν συχνές μοριακές διαταραχές σε αυτό το νεόπλασμα. Λόγω των μεταλλάξεων, η ενεργότητα του βασικού ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου *E2F1* απελευθερώνεται από την ανασταλτική επίδραση της *pRb*. Μελέτες σε μοντέλα ζώων και σε ανθρώπινους καρκίνους έχουν δείξει ότι η απορρυθμισμένη υπερέκφραση του *E2F1* κατέχει είτε «ογκογόνες» είτε «ογκοκατασταλτικές» ιδιότητες, ανάλογα με το κυτταρικό περιβάλλον. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η *in vivo* και *in vitro* διερεύνηση της σχέσης του *E2F1* με τις κινητικές παραμέτρους των οστεοσαρκωμάτων (δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού και απόπτωσης), καθώς και η συνολική κυτταρική απόκριση μετά από υπερέκφραση του *E2F1*. **ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.** 57 περιστατικά οστεοσαρκώματος μελετήθηκαν ανοσοϊστοχημικά για την έκφραση των *pRb*, *pRb-pS795*, *E2F1*, *Ki67*, *p53*, *γH2AX*, *CHK2-pT68*, ενώ το ποσοστό της απόπτωσης εκτιμήθηκε με τη μέθοδο TUNEL. Η επαγώγιμη κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος U2OS-*E2F1*-ER χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της σχέσης του *E2F1* με τις κινητικές παραμέτρους σε μοριακό επίπεδο. Στα κύτταρα αυτά διενεργήθηκε πρωτεωμική ανάλυση. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:** Η έκφραση του *E2F1* εμφανίζει αρνητική σχέση με τον πολλαπλασιασμό στις περιπτώσεις οστεοσαρκώματος με φυσιολογικό *p53*. Τα περιστατικά με υψηλή έκφραση *E2F1* και φυσιολογικό *p53* εμφανίζουν μεγαλύτερο ποσοστό απόπτωσης από εκείνα με μεταλλαγμένο *p53*. Η επαγωγή του *E2F1* στα κύτταρα U2OS περιορίζει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού μέσω ενεργοποίησης του μηχανισμού απόκρισης στις δικλωνικές θραύσεις του DNA. Η πρωτεωμική ανάλυση κατέδειξε 64 πρωτεΐνες που υπερκεφράζονται και 18 που καταστέλλονται μετά από την επαγωγή του *E2F1*. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:** Το *p53* αποτελεί κομβικό ρυθμιστή της έκφρασης του *E2F1* στις κινητικές παραμέτρους του όγκου στα οστεοσαρκώματα. Η υπερέκφραση του *E2F1* επιφέρει μια συνολική κυτταρική απάντηση, στην οποία η πλειονότητα των πρωτεϊνών που μεταβάλλονται οδηγεί σε ενεργοποίηση του *p53*.

Λέξεις κλειδιά: Οστεοσάρκωμα, *E2F1*, πρωτεωμική

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το οστεοσάρκωμα είναι μια μεσεγχειματική κακοήθεια κατά την οποία τα κύτταρα παράγουν οστικό στρώμα. Είναι ο πιο συχνός πρωτοπαθής καρκίνος των οστών και αφορά στο 20% των περιπτώσεων. Εμφανίζεται κυρίως κατά τη διάρκεια της εφηβικής ηλικίας με κορύφωση κατά τη διάρκεια της ταχείας ανάπτυξης, στην ηλικία των 15-19 χρόνων. Προσβάλλει περισσότερο τους άνδρες από ότι τις γυναίκες σε μια αναλογία 1.6:1. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα περισσότερα οστεοσαρκώματα αναπτύσσονται στα σημεία με μεγαλύτερη ανάπτυξη οστού, όπου ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων βρίσκεται στο αποκορύφωμά του. Τέτοιες περιοχές είναι οι μεταφύσεις των μακρών οστών των άκρων¹.

Σε μοριακό επίπεδο, μια από τις πιο συχνές

αλλοιώσεις που εμφανίζονται στα οστεοσαρκώματα είναι οι αλλοιώσεις του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος, *RB*. Ασθενείς με κληρονομικό ρετινοβλάστωμα έχουν μέχρι και 10³ φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν τέτοια νεοπλασία. Στις σποραδικές περιπτώσεις, οι αλλοιώσεις στο *RB* αγγίζουν περίπου το 70% αυτών². Το κύριο βιοχημικό χαρακτηριστικό της πρωτεΐνης *pRB* είναι ο έλεγχος του μεταγραφικού παράγοντα *E2F1*, κεντρικού ρυθμιστή της προαγωγής του κυτταρικού κύκλου, με την οποία δημιουργεί σύμπλεγμα κατά τη διάρκεια της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου. Μετά από επίδραση μιτογόνων ερεθισμάτων το *pRB* υπερφωσφορυλιώνεται από τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες και απελευθερώνει το *E2F1* από το σύμπλεγμα, επιτρέποντάς του να ενεργοποιήσει τα γονίδια-στόχους του, που κυρίως οδηγούν το κύτταρο στην πρόοδο

του κυτταρικού κύκλου, την S φάση³. Πέρα από τον κρίσιμο ρόλο που έχει στη μετάβαση από την G1 στην S φάση, ο E2F1 έχει επίσης την ικανότητα να επάγει την απόπτωση μέσω p53-εξαρτώμενων και p53-ανεξάρτητων μονοπατιών³. Το χαρακτηριστικό ενός κυτταρικού παράγοντα να προκαλεί τόσο τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όσο και την απόπτωση φαίνεται παράδοξο. Ωστόσο, η λογική πίσω από τη σύνδεση δύο αντίθετων λειτουργιών από τον ίδιο παράγοντα είναι ότι το κύτταρο καταναλώνει λιγότερη ενέργεια για τον έλεγχο της μετάβασης από τον πολλαπλασιασμό στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο σε περίπτωση μη αναστρέψιμης κυτταρικής βλάβης, ειδικότερα κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του DNA. Μια προβλεπόμενη συνέπεια, σε βιοχημικό επίπεδο, της αλλοιωμένης έκφρασης της pRB είναι η αποδέσμευση του E2F1 από την ανασταλτική δράση της pRB. Στην περίπτωση αυτή, η ευαίσθητη ισορροπία μεταξύ των δύο ιδιοτήτων του E2F1 για προαγωγή ή καταστολή της ανάπτυξης θα διαταραχθεί και το τελικό αποτέλεσμα θα υπαγορευτεί από το αντίστοιχο μοριακό υπόβαθρο του κυττάρου³. Η διττή συμπεριφορά του E2F1 έχει δείχτει σε ποικίλα *in vitro* κυτταρικά συστήματα και *in vivo* μοντέλα ζώων³. Χαρακτηριστικά, απώλεια του E2F1 σε *RB*^{+/-} ποντίκια αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης νεοπλασίας σε μερικούς ιστούς και τη μειώνει σε άλλους⁴. Παρόμοιο πολυποίκιλο μοτίβο απόκρισης του E2F1 φαίνεται να ισχύει και στους ανθρώπινους όγκους. Σε μερικούς τύπους καρκινωμάτων, όπως αυτούς που προέρχονται από τον πνεύμονα, το μαστό, τον θυρεοειδή και το πάγκρεας, ο E2F1 φαίνεται να δρα σαν ογκοπρωτεΐνη⁵⁻⁸, ενώ σε άλλους, όπως αυτούς που προέρχονται από το παχύ έντερο και τον προστάτη, σαν ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη⁶. Η εμβρυολογική προέλευση του οργάνου, όπως επισημαίνεται στον καρκίνο του οισοφάγου^{9,10}, μπορεί επίσης να παίζει ρόλο για το ποια δράση θα «επιλέξει» ο E2F1 σε συγκεκριμένο τύπο καρκίνου.

Δεδομένα που να σχετίζονται με την κατάσταση της έκφρασης και τον ρόλο του ενδογενούς E2F1 σε όγκους μεσεγχυματικής προέλευσης, δεν υπάρχουν. Η πληροφορία αυτή είναι σημαντική υπό το πρίσμα του ρόλου του E2F1 στην ευαισθητοποίηση των κυττάρων σε διάφορους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες¹¹. Για τη διαλεύκανση του παραπάνω θέματος εξετάσαμε την έκφραση του E2F1 σε σχέση

με τις κινητικές παραμέτρους αύξησης (κυτταρικός πολλαπλασιασμός και απόπτωση) του καρκίνου και τους κομβικούς ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, pRB και p53, σε μια ομάδα οστεοσαρκωμάτων. Ακολούθως, η λειτουργική βάση αυτών των ευρημάτων διερευνήθηκε σε μια E2F1-επαγόμενη κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος, ακολουθούμενη από πρωτεομική ανάλυση. Σκοπός της πρωτεομικής ανάλυσης είναι η αποκάλυψη επιπλέον δικτύων σχετιζόμενων με το E2F1 που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση της πολύπλευρης φύσης της απόκρισής του και στο σχεδιασμό πιο κατάλληλων θεραπειών με βάση τον παράγοντα αυτό.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Συλλογή υλικού

Συλλέχθησαν 57 δείγματα μονιμοποιημένα σε φορμαλίνη και εγκλεισμένα σε παραφίνη από περιπτώσεις χειρουργικά εξηρημένων οστεοσαρκωμάτων. Τα δείγματα προέρχονται από ασθενείς που δεν είχαν υποστεί χημειο- ή ακτινοθεραπεία πριν από τη χειρουργική επέμβαση. Η διάγνωση των ασθενών και η θεραπεία τους έγινε σε ένα από τα παρακάτω νοσοκομεία: Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Μεταξάς, Νοσοκομείο Παιδών Α&Π Κυριακού, Κωνσταντοπούλειο Γενικό Νοσοκομείο και Γενικό Νοσοκομείο Βούλας.

Ανοσοϊστοχημεία

Η ανοσοϊστοχημεία διενεργήθηκε σύμφωνα με την έμμεση μέθοδο της στρεπταβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοϊστοχημική μελέτη είναι τα εξής: anti-E2F-1 (KH95) (Santa Cruz, Bioanalytica, Ελλάδα), anti-Ki-67 (MIB-1) (DAKO, Kalifronas, Ελλάδα), anti-p53 (DO7) (DAKO, Kalifronas, Ελλάδα), anti-RB (IF8) (Santa Cruz, Bioanalytica, Ελλάδα), και anti-phospho-Rb (Ser795)-R (Santa Cruz, Bioanalytica, Ελλάδα), anti-phospho-H2AX (Ser139) (Millipore, Lab Supplies, Ελλάδα), anti-phospho-Chk2 (Thr68) (Cell Signaling, Bioline, Ελλάδα).

Επαγώγιμο κυτταρικό σύστημα και η καλλιέργειά του

Για τις λειτουργικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος U2OS η οποία έφερε κλωνοποιημένο το γονίδιο

E2F1 κάτω από επαγωγίμο έλεγχο ταμοξιφένης. Τα κύτταρα του επαγωγίμου συστήματος U2OS E2F1-ER καλλιεργήθηκαν σε Dulbecco's τροποποιημένο κατά Eagle's θρεπτικό υλικό, με την προσθήκη 10% ορού βόειων εμβρύων και η καλλιέργεια έγινε σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂.

Πλασμίδια και Διαμόλυνση

1,5x10⁶ κύτταρα Phoenix επιστρώθηκαν σε τριβλία των 60mm και την επόμενη μέρα επιμολύνθηκαν είτε με pRETROSUPER-shp53 είτε με pRETROSUPER-shLacZ χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο διαμόλυνσης με φωσφορικό ασβέστιο. 24 ώρες μετά, 2x10⁵ κύτταρα U2OS E2F1-ER, επιστρώθηκαν σε τριβλίο των 60mm και την επόμενη μέρα διαμολύνθηκαν δύο φορές σε διάστημα 12 ωρών με ρετροϊό που προέρχεται από υπερκείμενο κυττάρων Phoenix και φιλτραρισμένο από φίλτρο 45μm. 48 ώρες αργότερα τα κύτταρα διαχωρίστηκαν για καμπύλη ανάπτυξης και ανάλυση με κυτταρομετρητή ροής (BD-FACS).

In situ εκτίμηση του δείκτη απόπτωσης (TUNEL)

Η εφαρμογή της μεθόδου πραγματοποιήθηκε με βάση προηγούμενα δημοσιευμένο πρωτόκολλο⁶.

Καμπύλες ανάπτυξης

Η καμπύλη ανάπτυξης εκτιμήθηκε με βάση πρωτόκολλα που έχουν προηγούμενα δημοσιευθεί.

Ανάλυση FACS

Η ανάλυση FACS έγινε όπως έχει περιγραφεί σε άλλη δημοσίευση.

Ανάλυση έκφρασης πρωτεϊνών με στύπωμα κατά Western

Η απομόνωση των ολικών πρωτεϊνών από τα κύτταρα και η ανοσοαποτύπωση εκτελέστηκαν σύμφωνα με προηγούμενα πρωτόκολλα. Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντισώματα: anti-p53 (1:500) (DO7) (DAKO, Kalifronas, Ελλάδα); anti-phospho-Chk2 (Thr68) (Cell Signaling, Bioline, Ελλάδα), anti-Chk2 (1:20) (ευγενική προσφορά του Δρ. Θ. Χαλαζονίτη, Ινστιτούτο Wistar, ΗΠΑ), και p73 (1:300) (NeoMarkers, Bioanalytica, Ελλάδα), anti-β-actin (1:1000) (AC-15) (Abcam, Anti-Sel, Ελλάδα), anti-Cyclin B1 (1:500) (Santa Cruz,

Bioanalytica, Ελλάδα).

Χρώση Sa-β-Γαλακτοσιδάσης

Η χρώση έγινε με βάση προηγούμενο πρωτόκολλο.

Αντιδραστήρια δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης

Επιστρωμένα strip διαβαθμισμένου pH (IPG) και τα διαλύματα αυτών (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA), διάλυμα ακρυλαμίδης/πιπεραζίνης-δισ-ακρυλαμίδης (PDA) (37.5:1, w/v) (Biosolve Ltd., Valkenswaard, the Netherlands), τα υπόλοιπα αντιδραστήρια για την παρασκευή των πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης παραλήφθηκαν από την BioRad. CHAPS (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), ουρία (AppliChem, Darmstadt, Germany), θειουρία (Fluka, Buchs, Switzerland), 1,4-διθειοερυθρίτολη (DTE) και EDTA (Merck, Darmstadt, Germany).

Ανάλυση έκφρασης πρωτεϊνών με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση μετά από επαγωγή του U2OS E2F1-ER κυτταρικού συστήματος

Η απομόνωση πρωτεϊνών και η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα εκτελέστηκαν όπως αναφέρεται στους¹².

Αποτύπωση της μάζας των πεπτιδίων (PMF) και βαθμιαία αποικοδόμηση μετά τη λήψη (PSD)

Η ανάλυση των πεπτιδίων καθώς και η αναγνώριση των πρωτεϊνών έγινε όπως αναφέρεται στους.¹³

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η σχέση της έκφρασης του E2F1 και των κινητικών παραμέτρων των οστεοσαρκωμάτων εξαρτάται από το p53. Ο έλεγχος της έκφρασης του E2F1 έγινε με την τεχνική της ανοσοϊστοχημείας, σε 57 περιστατικά οστεοσαρκώματος (Συμπληρωματικός Πίνακας 1). Η έκφραση του E2F1 υπολογίστηκε ως το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων με θετικό πυρηνικό σήμα. και κυμαινόταν μεταξύ 9 και 97% (Εικόνα 1α, Συμπληρωματικός Πίνακας 2α). Στις περιπτώσεις όπου το pRB δεν είχε μεταβολή στην έκφρασή του (απουσία ή πολύ χαμηλή έκφραση) (Συμπληρωματικός Πίνακας 2α), η χρώση του E2F1 συνοδευόταν από

Συμπληρωματικός Πίνακας 1: Κλινικοπαθολογικά δεδομένα

Ηλικία	Εύρος 7-82 χρόνια		Μέσος όρος 22,8 χρόνια	
Φύλο	Άρρεν 32 (56,1%)		Θήλυ 25 (43,9%)	
Ιστολογικός τύπος	Οστεοβλαστικός 42 (73,7%)	Χονδροβλαστικός 6 (10,5%)	Μεικτός 9 (15,8%)	
Grade	Low 18 (31,6%)	Moderate 20 (35,1%)	High 19 (33,3%)	
Επιβίωση	Ναι 13 (22,8%)	Όχι 44 (77,2%)		
Αρχικό σύμπτωμα	Άλγος 22 (38,6%)	Οίδημα 4 (7%)	Άλγος και οίδημα 21 (36,8%)	Άλγος, οίδημα και χλωτότητα 10 (17,6%)
Εντόπιση όγκου	Κατώτερο τριτημόριο Μηριαίου 22 (38,6%)	Ανώτερο τριτημόριο Κνήμης 15 (26,3%)	Υπόλοιπο μηριαίο 11 (19,3%)	Άλλες εντοπίσεις* 9 (15,8%)
Χρόνος διάγνωσης**	≤ 3 Μ^ηνες 29 (50,8%)	3-6 Μήνες 22 (38,6%)	> 6 Μήνες 6 (10,6%)	
Νέκρωση	Εύρος (%) 20-96	Μέσος όρος (%) 71,2	SD (%) 25,4	
Έκταση	90% 20 (35,1%)	80% 8 (14%)	70-50% 17 (29,9%)	≤ 50% 12 (21%)

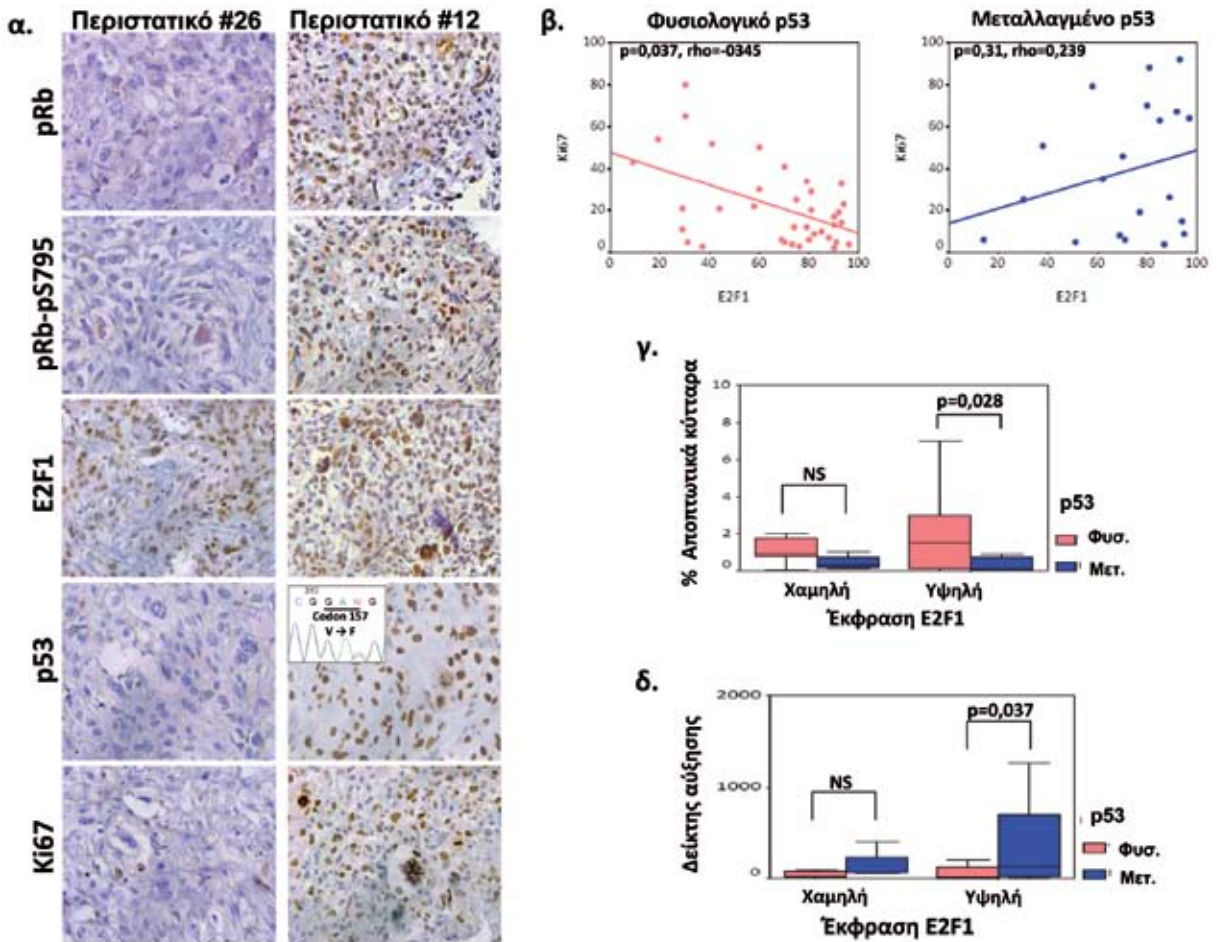
* 5 Βραχιόνιο, 3 Φάλαγγες αντίχειρα, 1 Περώνη

** ο χρόνος που μεσολάβησε ανάμεσα στην εμφάνιση του πρώτου συμπτώματος και την τελική διάγνωση

SD:Standard Deviation (Σταθερά Απόκλισης)

φωσφορυλίωση της pRB, καταδεικνύοντας ότι το θετικό σήμα του E2F1 οφείλεται στην ελεύθερη και ενεργή μορφή της πρωτεΐνης (Εικόνα 1α). Η αρχική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο σύνολο των περιστατικών και η σχέση του E2F1 με τις κινητικές παραμέτρους του όγκου - πολλαπλασιασμό και απόπτωση - που αξιολογήθηκαν με βάση τη χρώση Ki67 και τη μέθοδο TUNEL αντίστοιχα, δεν έδειξε καμία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση (Συμπληρωματικός Πίνακας 2α). Εν τούτοις, η προσέγγιση αυτή, θα μπορούσε να αποκρύπτει την ύπαρξη σχέσης της έκφρασης του E2F1 με τις κινητικές παραμέτρους, εάν τα περιστατικά

ομαδοποιηθούν με βάση την κατάσταση κατώτερων τελεστών του μονοπατιού του E2F1. Η υψηλή συχνότητα αλλοιώσεων της p53 σε διάφορες μελέτες, όπως και στην παρούσα (Εικόνα 1α, Συμπληρωματικός Πίνακας 2α, 2β) μας οδήγησε στην υπόθεση ότι η p53 θα μπορούσε να τροποποιήσει τη σχέση μεταξύ της υπερέκφρασης του E2F1 και των κινητικών παραμέτρων του όγκου. Πράγματι, σε περιπτώσεις οστεοσαρκωμάτων με φυσιολογικό p53, η έκφραση του E2F1 σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με τον πολλαπλασιασμό (Εικόνα 1β, $p=0.037$). Επιπλέον οι περιπτώσεις όπου υπάρχει υψηλό E2F1 και μεταλλαγμένο p53, έχουν



Εικόνα 1. Η κατάσταση του p53 καθορίζει τη σχέση της έκφρασης του E2F1 με τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση στα οστεοσαρκώματα. **α.** Ανοσοϊστοχημική ανάλυση δυο αντιπροσωπευτικών περιπτώσεων οστεοσαρκώματος για pRb, pRb-pS795, E2F1, p53 and Ki-67. Στο ένθετο, η επιβεβαίωση της μετάλλαξης του p53 με ανάλυση της αλληλουχίας του. **β.** Σκεδαστικά διαγράμματα που απεικονίζουν τη σχέση της έκφρασης του E2F1 και του Ki67 με βάση την κατάσταση του p53. **γ.** Ιστογράμματα που δείχνουν ότι οι περιπτώσεις με υψηλή έκφραση E2F1 σχετίζονται με αυξημένη απόπτωση όταν το p53 ήταν φυσιολογικό. **δ.** Περιστατικά με υψηλή έκφραση E2F1 εμφάνιζαν στατιστικά υψηλότερο δείκτη αύξησης όταν το p53 ήταν μεταλλαγμένο. (NS=απουσία στατιστικής σημαντικότητας).

σημαντικά χαμηλότερη απόπτωση από εκείνες που διατηρούν φυσιολογικό p53 (Εικόνα 1γ, $p=0.028$). Αυτά τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι στα οστεοσαρκώματα η απορρυθμισμένη υπερέκφραση του E2F1 ακολουθείται από μια ανασταλτική της ανάπτυξης απόκριση εξαρτώμενη από το p53 (Εικόνα 1δ, $p=0.037$). Καθώς η υπερέκφραση του E2F1 μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση του p53 μέσω της επαγωγής του μηχανισμού της απόκρισης στις δικλωνικές θραύσεις του DNA (DNA Damage Response, DDR), μελετήθηκε η έκφραση της γH2AX και της Chk2-pT68, ως δεικτών ενεργ-

γοποίησης του μηχανισμού DDR. Πράγματι βρέθηκε υψηλό ποσοστό έκφρασης και των δύο μοριών στο σύνολο σχεδόν των περιστατικών που μελετήθηκαν (Εικόνα 3γ).

Η επαγωγή του E2F1 επιβραδύνει την ανάπτυξη της κυτταρικής σειράς οστεοσαρκώματος U2OS. Η λειτουργική βάση των παραπάνω συσχετισμών εξετάστηκε στην κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος U2OS, στην οποία το E2F1 είναι συνδεδεμένο με την περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη του υποδοχέα οιστρογόνων του ποντικού (ER), έτσι ώστε η προσθήκη ταμοξιφένης να επιφέρει μετακίνηση του E2F1 στον

Συμπληρωματικός Πίνακας 2: α) Ανοσοϊστοχημικά δεδομένα, β) Γονιδιακές αλλοιώσεις του TP53 που ανευρέθησαν σε 14 περιστατικά οστεοσαρκώματος

α) **Ανοσοϊστοχημική ανάλυση**

	Μέσος όρος (%)	SE
E2F1	68,43	3,23
Ki67	27,87	3,3
TUNEL	1,68	0,33
GI	339,27	124,72
γH2AX	65,72	4,22
Chk2-pT68	59,63	4,53
	Απουσία έκφρασης	Θετική έκφραση
p53	37 (64,9%)	20 (35,1%)
pRb	29 (47,4%)	28 (52,6%)

SE: Standard Error

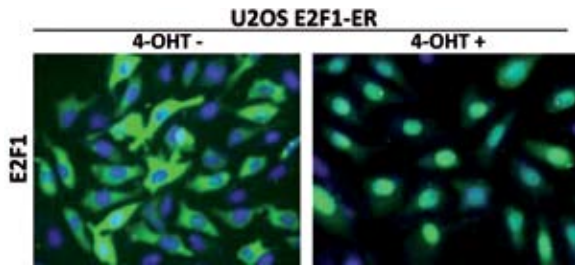
GI: Growth Index (Δείκτης Αύξησης)

β) Περιστατικό	Εξώνιο	Κωδικόνιο	Αλλαγή βάσης	Αποτέλεσμα	Κατάσταση αλληλομόρφων
21	4	43	TTG/TAG	Leu → Stop	LOH
5	4	47	CCG/CTG	Pro → Leu	No LOH
14	5	157	GTC/TTC	Val → Phe	No LOH
31	5	175	CGC/CAC	Arg → His	No LOH
15	6	216	GTG/ATG	Val → Met	LOH
49	6	220	TAT/TGT	Tyr → Cys	LOH
25	7	237	ATG/ATA	Met → Ile	LOH
54	7	242	TGC/TAC	Cys → Tyr	LOH
34	7	241	1bp deletion	Frameshift	LOH
3	7	250	CCC/CTC	Pro → Leu	No LOH
41	8	273	CGT/CAT	Arg → His	No LOH
11	8	281	GAC/CAC	Asp → His	No LOH
20	8	281	GAC/AAC	Asp → Asn	LOH
44	10	337	CGC/TGC	Arg → Cys	LOH

* Η ανάλυση των αλληλομόρφων διενεργήθηκε με τη χρήση του πολυμορφικού δείκτη D17S179E που εντοπίζεται μέσα στο γονίδιο p53 όπως έχει ήδη περιγραφεί (Gorgoulis et al, Mol Med 2000).

πυρήνα και ενεργοποίησή του (Συμπληρωματική Εικόνα 1). Εξετάζοντας τις καμπύλες αύξησης των κυττάρων, παρατηρήσαμε προφανή επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού στα κύτταρα που έγινε επαγωγή του E2F1 σε σχέση με τα μη επαγόμενα (Εικόνα 2α). Η επιβράδυνση

της αύξησης συνοδευόταν, από την 1^η ημέρα επαγωγής του E2F1, με αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που πέθαιναν από απόπτωση (Εικόνα 2β), ποσοστό που στη συνέχεια μειώθηκε ελάχιστα και σταθεροποιήθηκε περίπου την 7^η ημέρα. Επιπλέον, μεταξύ των ημερών 5

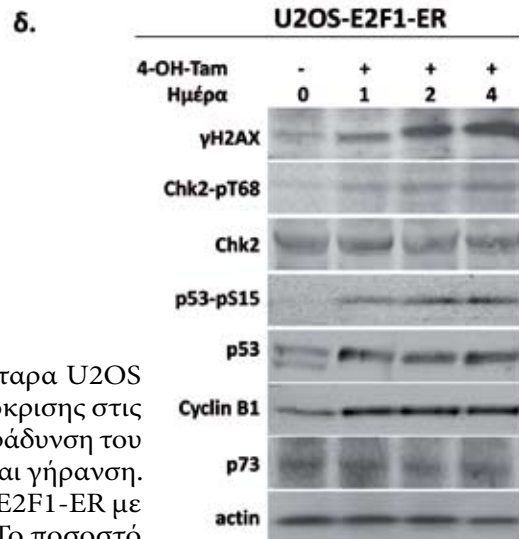
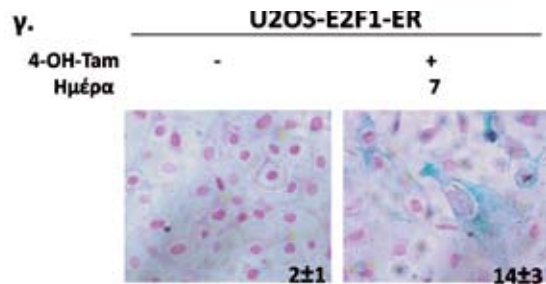
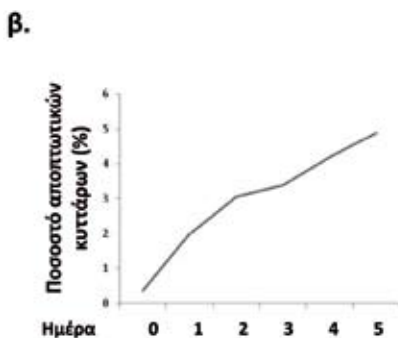
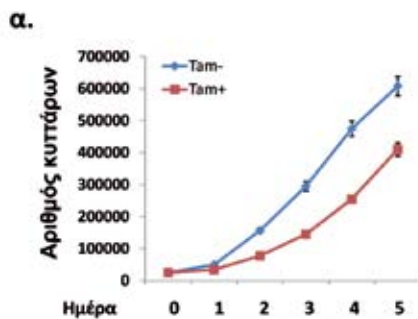


Συμπληρωματική Εικόνα 1. Το E2F1 μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα μετά την προσθήκη της 4-OH-Tamoxifen στα κύτταρα U2OS-E2F1-ER, όπως καταδεικνύεται με ανοσοφθορισμό για το E2F1 (πράσινο). Οι πυρήνες έχουν χρωστεί με DAPI (μπλε).

και 10, αυξήθηκε το ποσοστό των κυττάρων που εμφάνισαν φαινότυπο κυτταρικής γήρανσης, όπως καταδεικνύεται από τη χρώση

Sa-β-gal (Εικόνα 2γ). Τέλος, την πρώτη μέρα μετά την επαγωγή του E2F1, παρατηρήθηκε ταχεία αύξηση του αριθμού των κυττάρων που πέθαιναν με μορφολογικά χαρακτηριστικά μιτωτικής καταστροφής (μεγάλα κύτταρα, με πολλαπλούς μικροπυρήνες και αποσυμπυκνωμένη χρωματίνη) (Συμπληρωματική Εικόνα 2α) (Suppl. Figure 2a)^{14,15}. Η εμφάνιση κυττάρων με χαρακτηριστικά μιτωτικής καταστροφής συνοδευόταν από αντίστοιχη αύξηση των επιπέδων της κυκλίνης B (Εικόνα 2δ) και τη μετατόπιση της στον πυρήνα (Συμπληρωματική Εικόνα 2β). Τα κύτταρα αυτά μειώθηκαν την δεύτερη μέρα και εξαφανίστηκαν εντελώς την τρίτη.

Η υπερέκφραση του E2F1 οδήγησε σε ενεργοποίηση του μηχανισμού απόκρισης στις δικλωνικές θραύσεις του DNA όπως φαίνεται από τα ανοσοστυλώματα κατά Western για τις γH2AX και Chk2-pT68 (Εικόνα 2δ), όπως έχει



Εικόνα 2. Η υπερέκφραση του E2F1 σε κύτταρα U2OS οδηγεί σε ενεργοποίηση του μηχανισμού απόκρισης στις δικλωνικές θραύσεις του DNA (DDR), σε επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού, σε αυξημένη απόπτωση και γήρανση.

α. Καμπύλες αύξησης των κυττάρων U2OS-E2F1-ER με ή χωρίς την προσθήκη 4-OH-Tamoxifen. **β.** Το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων όπως προσδιορίστηκε από την ανάλυση FACS και χρώση Sa-β-Gal (**γ.**) σε κύτταρα ελέγχου U2OS-E2F1-ER και 7 ημέρες μετά την επίδραση με 4-OH-Tamoxifen. **δ.** Στυλώματα κατά Western για δείκτες DDR, Cyclin B1 και p73 σε κύτταρα με και χωρίς προσθήκη 4-OH-Tamoxifen. Η ακτίνη χρησιμεύει για τον έλεγχο του φορτώματος των πρωτεϊνών. (Tam/4-OH-Tam= 4-OH-Tamoxifen).

Συμπληρωματικός Πίνακας 3 (Συνέχεια) : Υπερεκφρασμένες πρωτεΐνες στα U2OS κύτταρα μετά την επαγωγή του E2F1

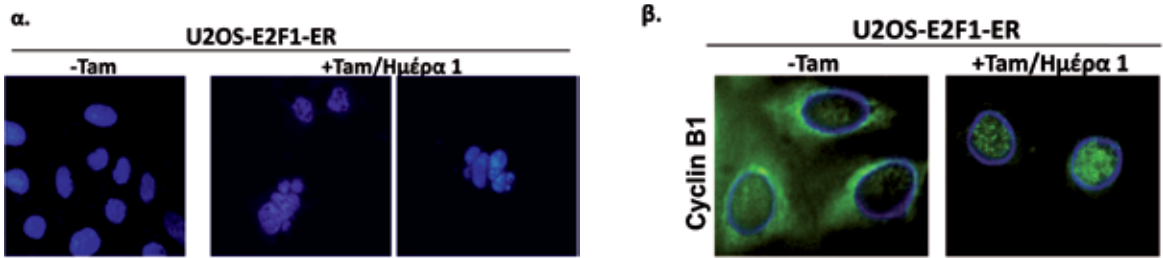
Αριθμός πρόσβασης	Όνομα πρωτεΐνης	Σύμβολο πρωτεΐνης στη διαδοστική ηλεκτροφόρηση	Όνομα στο πρόγραμμα Pathway Studio	Περιγραφή πρωτεΐνης	Μοριακό Βάρος	Σκορ Mascot	Αριθμός πεπτιδίων που ταυτοποιήθηκαν	Λειτουργία	Υποκυτταρική εντόπιση	Θέσεις πρόσδεσης E2F1
O75489	NDUS3_HUMAN	NDUS3		NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial [Precursor], Cl-30kD	30242	121	13, NUGM	Enzyme	Mitochondrial	2
P02452	CO1A1_HUMAN	CO1A1		Collagen alpha-1(I) chain [Precursor]	138911	57	8 of 27	Structural	Extracellular	2
P28072	PSB6_HUMAN	PSB6		Proteasome subunit beta type-6 [Precursor], Macropain delta chain	25358	62	4 of 8	Enzyme	Cytoplasmic, Nuclear	
P78330	SERB_HUMAN	SERB		Phosphoserine phosphatase, PSP	25008	103	6 of 9	Enzyme	Cytoplasmic	
P07954	FUMH_HUMAN	FUMH		Fumarate hydratase, mitochondrial [Precursor], Fumarase	54637	67	13 of 81	Enzyme, Antioncogene	Mitochondrial	2
P31939	PUR9_HUMAN	PUR9		Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	64616	118	17	Enzyme	Cytoplasmic	2
Q9HC38	Q96B89_HUMAN	GL0D4		Glyoxalase domain-containing protein 4	34793	73		Enzyme	Mitochondrial	
Q13838	UAP56_HUMAN	UAP56		Spliceosome RNA helicase BAT1, DEAD box protein UAP56	48991	92	12	RNA associated	Nuclear	2
P62158	CALM_HUMAN	CALM		Calmodulin, CaM,CALM1	16838	56	6	Enzyme, Regulatory, Signaling, Receptor membrane ligand ion channel	Cytoplasmic	3
P62820	RAB1A_HUMAN	RAB1A	RAB1A	Ras-related protein Rab-1A, YPT1-related protein	22678	66	5	Transport carrier	Endoplasmic reticulum, Golgi apparatus	3
Q4VBQ4	Q4VBQ4_HUMAN	Q4VBQ4	PFN2	Profilin 2	15088	63	7 of 43	Regulatory	Cytoskeletal	3
Q13011	ECH1_HUMAN	ECH1		Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial [Precursor]	35816	61	5 of 33	Enzyme, Regulatory	Peroxisomal	4
Q99627	CSN8_HUMAN	CSN8	COP8	COP9 signalosome complex subunit 8	23226	57	4 of 31	Regulatory	Cytoplasmic, Nuclear	4
P46109	CRKL_HUMAN	CRKL	CRKL	Crk-like protein	33777	59	6 of 33	Adaptor, Protooncogene		6
Q05682	CALD1_HUMAN	CALD1		Caldesmon	93250	65	7	Structural	Cytoskeletal	6
P13995	MTDC_HUMAN	MTDC		Bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolyase, mitochondrial [Precursor]	37895	64	6	Enzyme, Transcription factor, Transport	Mitochondrial	No
P25789	PSA4_HUMAN	PSA4		Proteasome subunit alpha type 4, Macropain subunit C9	29484	57	5 of 19	Enzyme	Cytoplasmic, Proteasomal, Nuclear	No
P51991	ROA3_HUMAN	ROA3		Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3, hnRNP A3	39595	86	13 of 67	RNA associated	Nuclear	No
P82650	RT22_HUMAN	RT22		Mitochondrial 28S ribosomal protein S22, MRP-S22	41280	96	12 of 33	Structural, RNA associated	Mitochondrial	No
P16930	FAAA_HUMAN	FAAA		Fumarylacetoacetase, FAA	46374	62	8 of 37	Enzyme	Cytoplasmic	
P17812	PYRG1_HUMAN	PYRG1		CTP synthase 1	66690	73	11 of 42	Enzyme	Cytoplasmic	
P21281	VATB2_HUMAN	VATB2		Vacuolar ATP synthase subunit B, brain isoform, V-ATPase B2 subunit	56501	57	4 of 12	Enzyme, Transport carrier	Lysosomal, Membranic	
P26368	U2AF2_HUMAN	U2AF2	U2AF2	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit, hU2AF(65)	53501	67	7 of 36	RNA associated	Nuclear	
P32969	RL9_HUMAN	RL9		60S ribosomal protein L9	21863	67	6 of 34	RNA associated	Cytoplasmic	
P40855	PEX19_HUMAN	PEX19		Peroxisomal biogenesis factor 19, Peroxin-19	32807	57	5 of 41	Chaperone/stress, Receptor membrane, Transport carrier	Peroxisomal	
P47755	CAZA2_HUMAN	CAZA2		F-actin capping protein subunit alpha-2, CapZ alpha-2	32949	57	5	Structural		
P53582	AMPM1_HUMAN	AMPM1		Methionine aminopeptidase 1	43215	81	7	Enzyme	Cytoplasmic	
Q14696	MESD2_HUMAN	MESD2		Mesoderm development candidate 2	26077	60	5 of 39	Chaperone/stress	Endoplasmic reticulum, Membranic	
Q15003	CND2_HUMAN	CND2	BRRN1	Condensin complex subunit 2, hCAP-H	82563	66	9 of 78	Regulatory	Nuclear, Cytoplasmic	
Q15075	EEA1_HUMAN	EEA1	EEA1	Early endosome antigen 1	162466	121	21 of 54	Antigen	Cytoplasmic, Endosomal	
Q15185	TEBP_HUMAN	TEBP		Prostaglandin E synthase 3, Telomerase-binding protein p23, Hsp90 co-chaperone	18697	57	6 of 33	Chaperone/stress	Cytoplasmic, Nuclear, Chromosome	
Q5U4P6	Q5U4P6_HUMAN	Q5U4P6		KHSRP protein	72897	70	8	Regulatory, RNA associated	Cytoplasmic, Nuclear	
Q6QA25	Q6QA25_PIG	Q6QA25		Tropomyosin 3	29033	132	19 of 89	Motor/contractile	Cytoplasmic	
Q96KB5	TOPK_HUMAN	TOPK		T-lymphokine-activated killer cell-originated protein kinase, PDZ-binding kinase	36085	67	6 of 41	Enzyme, Receptor membrane serine/threonine kinase	Cytoskeletal	
Q9BRA2	TXNL5_HUMAN	TXNL5	TXNL5	Thioredoxin-like protein 5, TRP14	13941	70	4	Enzyme, Signaling	Cytoplasmic, Cytoskeletal	
Q9HB71	CYBP_HUMAN	CYBP		Calcyclin-binding protein, SIA	26210	91	7 of 25	Unknown/unspecified	Nuclear, Cytoplasmic	

Συμπληρωματικός Πίνακας 3: Υπερεκφρασμένες πρωτείνες στα U2OS κύτταρα μετά την επαγωγή του E2F1

Αριθμός πρόσβασης	Όνομα πρωτεΐνης	Σύμβολο πρωτεΐνης στη δισιδάστατη ηλεκτροφόρηση	Όνομα στο πρόγραμμα Pathway Studio	Περιγραφή πρωτεΐνης	Μοριακό Βάρος	Score Mascot	Αριθμός πεπτιδίων που ταυτοποιήθηκαν	Λειτουργία	Υποκυτταρική εντόπιση	Θέσεις πρόσδεσης E2F1
P16188	1A30_HUMAN	1A30		HLA class I histocompatibility antigen, A-30 alpha chain [Precursor], MHC class I antigen A*30	40905	75	7 of 25	Antigen	Membranic	No
P30453	1A34_HUMAN	1A34		HLA class I histocompatibility antigen, A-34 alpha chain [Precursor], MHC class I antigen A*34	41055	66	6 of 20	Antigen	Membranic	No
A0S012	A0S012_CEREL	A0S012		Beta-actin	25700	71	4 of 10	Structural	Cytoplasmic	1
P00505	AATM_HUMAN	AATM		Aspartate aminotransferase, mitochondrial [Precursor], Transaminase A	47476	63	8 of 39	Enzyme	Mitochondrial	1
P00813	ADA_HUMAN	ADA	mgc108610	Adenosine deaminase, Adenosine aminohydrolase	40764	90	8 of 22	Enzyme	Cytoplasmic	No
P09525	ANXA4_HUMAN	ANXA4		Annexin A4, PAP-II, Endonexin I	35883	90	9 of 24	Regulatory, Transport	Cytoplasmic	2
P02511	CRYAB_HUMAN	CRYAB	CRYAB	Alpha crystallin B chain	20159	61	7 of 45	Chaperone/stress, Motor/contractile	Cytoplasmic, Nuclear	1
Q99653	CHP1_HUMAN	CHP1	CHP	Calcium-binding protein p22	22456	62	4 of 18	Regulatory	Cytoplasmic	
Q99829	CPNE1_HUMAN	CPNE1		Copine-1	59059	56	7 of 27	Transport	Cytoplasmic	
P11177	ODPB_HUMAN	ODPB		Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial [Precursor], PDHE1-B	39233	75	13 of 59	Enzyme	Mitochondrial	1
P53673	CRBA4_HUMAN	CRBA4		Beta-crystallin A4	22374	57	4 of 13	Structural	Cytoplasmic	
P02787	TRFE_HUMAN	TRFE	TF	Serotransferrin [Precursor], Siderophilin	77050	55	10 of 40	Transport carrier	Cytoplasmic	
P00167	CYB5_HUMAN	CYB5	CYB5	Cytochrome b5	15330	80	5 of 14	Enzyme	Mitochondrial	1
Q99832	TCPH_HUMAN	TCPH		T-complex protein 1 subunit eta, CCT-eta	59367	82	12 of 52	Chaperone/stress	Cytoplasmic	
Q8NBJ7	SUMF2_HUMAN	SUMF2		Sulfatase-modifying factor 2 [Precursor], C-alpha-formylglycine-generating enzyme 2	33857	75	5 of 8	Enzyme	Endoplasmic reticulum	
Q9NR28	DBLOH_HUMAN	DBLOH		Diablo homolog, mitochondrial [Precursor], Smac protein	27131	111	8 of 12	Regulatory	Mitochondrial	
O95865	DDAH2_HUMAN	DDAH2	DDHA2	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2, DDAHII, S-phase protein	29644	87	6 of 12	Enzyme	Cytoplasmic	2
P45880	VDAC2_HUMAN	VDAC2		Voltage-dependent anion-selective channel protein 2, VDAC-2	38093	76	6 of 19	Transport channel	Mitochondrial	1
P61158	ARP3_HUMAN	ARP3		Actin-like protein 3	47371	87	12	Structural	Cytoskeletal	1
P40939	ECHA_HUMAN	ECHA		Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial [Precursor], TP-alpha	83000	59	7 of 17	Enzyme	Mitochondrial	
Q12906	ILF3_HUMAN	ILF3	ILF3	Interleukin enhancer-binding factor 3, TCP80, Double-stranded RNA-binding protein 76	95338	67	7 of 13	Transcription factor	Cytoplasmic, Nuclear	
P29218	IMPA1_HUMAN	IMPA1		Inositol monophosphatase, IMP	30189	69	5 of 9	Enzyme	Cytoplasmic	No
P02533	K1C14_HUMAN	K1C14		Keratin, type I cytoskeletal 14, CK-14	51622	123	10 of 16	Structural	Cytoskeletal	No
P08779	K1C16_HUMAN	K1C16	KRT16	Keratin, type I cytoskeletal 16, CK-16	51268	235	17 of 24	Structural	Cytoskeletal	
P04264	K2C1_HUMAN	K2C1		Keratin, type II cytoskeletal 1, CK-1	66018	77	7 of 17	Structural	Cytoskeletal	1
P62633	CNBP_HUMAN	CNBP		Cellular nucleic acid-binding protein, CNBP, Zinc finger protein 9	19463	56	6 of 40	RNA associated, Transcription factor	Endoplasmic reticulum, Nuclear, Chromosome	1
Q15233	NONO_HUMAN	NONO	NONO	Non-POU domain-containing octamer-binding protein, 55 kDa nuclear protein	54232	68	13 of 32	RNA associated	Nuclear, Chromosome	1
Q15435	PP1R7_HUMAN	PP1R7		Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	41564	85	12 of 57	Regulatory	Cytoplasmic, Nuclear	1
Q99714	HCD2_HUMAN	HCD2	HADH2	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2, Type II HADH	26923	140	14	Enzyme	Mitochondrial, Endoplasmic reticulum	1

Συμπληρωματικός Πίνακας 4: Κατεσταλαμένες πρωτείνες στα U2OS κύτταρα μετά την επαγωγή του E2F1

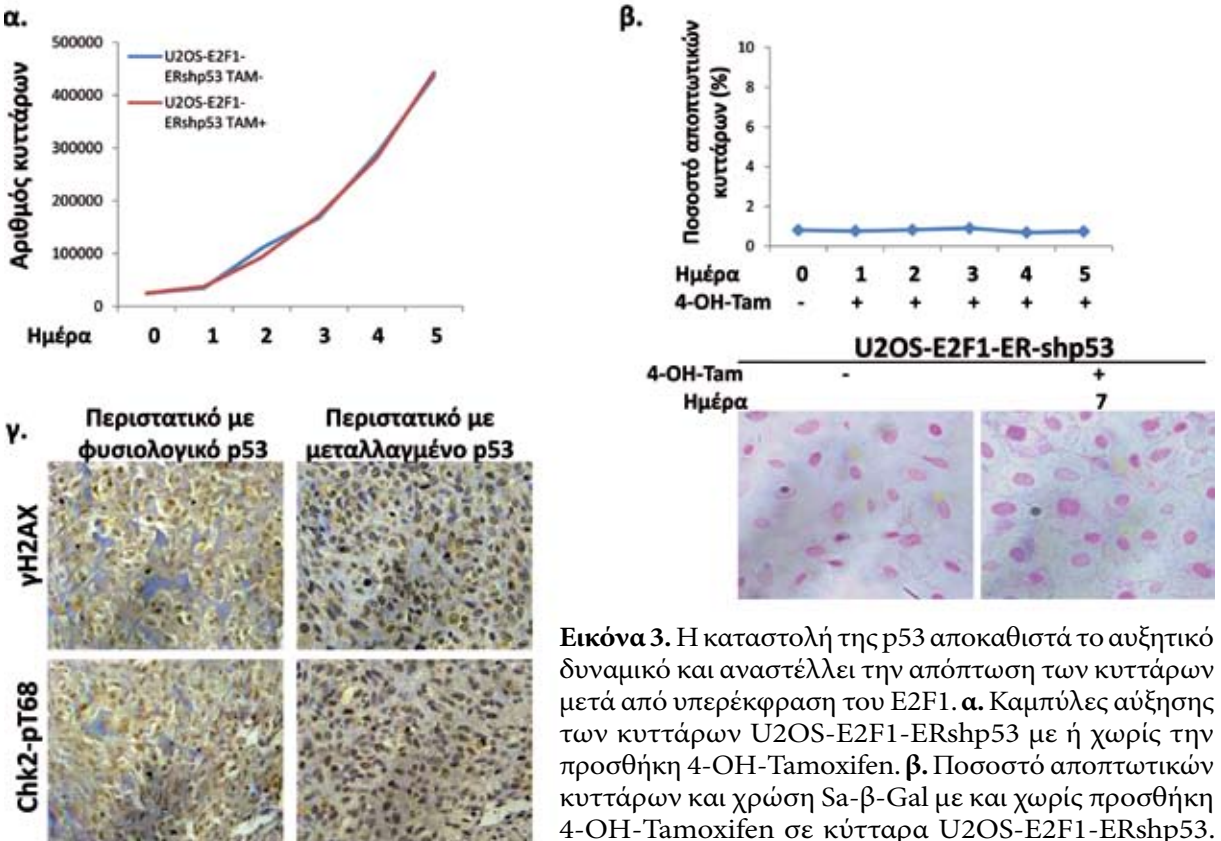
Αριθμός πρόσβασης	Όνομα πρωτεΐνης	Σύμβολο πρωτεΐνης στη διασίσταση ηλεκτροφόρηση	Όνομα στο πρόγραμμα Pathway Studio	Περιγραφή πρωτεΐνης	Μοριακό Βάρος	Score Mascot	Αριθμός πεπτιδίων που ταυτοποιήθηκαν	Λειτουργία	Υποκυτταρική εντόπιση	Θέσεις πρόσδεσης E2F1
P24534	EF1B_HUMAN	EF1B		Elongation factor 1-beta, EF-1-beta	24764	68	7	RNA associated, Transcription factor	Endoplasmic reticulum	1
O43390	HNRPR_HUMAN	HNRPR	HNRPR	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R, hnRNP R	70943	61	9 of 82	RNA associated	Cytoplasmic, Nuclear	2
P09496	CLCA_HUMAN	CLCA	CLTA	Claithrin light chain A, Lca	27077	83	6 of 13	Regulatory, Structural	Cytoplasmic	1
P61604	CH10_HUMAN	CH10		10 kDa heat shock protein, mitochondrial, Hsp10	10932	137	11	Chaperone/stress	Mitochondrial, Matrix	2
P84090	ERH_HUMAN	ERH		Enhancer of rudimentary homolog	12259	64	7 of 27	Regulatory		3
Q00610	CLH1_HUMAN	CLH1	CLTC	Claithrin heavy chain 1, CLH-17	191615	93	13 of 19	Transport	Membranic, Cytoplasmic	
P04632	CPNS1_HUMAN	CPNS1		Calpain small subunit 1, Calcium-dependent protease small subunit 1, CDPS	28316	56	5 of 23	Enzyme, Regulatory	Cytoplasmic	
P09104	ENOG_HUMAN	ENOG		Gamma-enolase, NSE	47269	106	11	Enzyme	Cytoplasmic, Membranic	12
O95881	TXD12_HUMAN	TXD12		Thioredoxin domain-containing protein 12 [Precursor], Erp18	19206	68	8 of 35	Enzyme, Transport	Endoplasmic reticulum	
P15311	EZRI_HUMAN	EZRI	VIL2	Ezrin, p81, Cytovillin	69413	60	6 of 8	Structural	Cytoskeletal	
Q8NC51	PAIRB_HUMAN	PAIRB		Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein, PAI-RBP1	44965	99	16 of 62	RNA associated	Cytoplasmic, Nuclear	
Q9UJ30	TR112_HUMAN	TR112		TRM112-like protein	14199	64	4 of 24		Nuclear, Golgi apparatus	
Q9UNZ2	NSF1C_HUMAN	NSF1C		NSFL1 cofactor p47	40573	90	10 of 49	Adaptor		
Q96AY3	FKB10_HUMAN	FKB10		FK506-binding protein 10 [Precursor], Rotamase	64246	57	6 of 11	Enzyme, Regulatory, Transport	Endoplasmic reticulum	
P31150	GDIA_HUMAN	GDIA		Rab GDP dissociation inhibitor alpha, GDI-1	50583	67	7 of 11	Regulatory, Signaling neurotransmitter, Transport	Cytoplasmic	No
Q00839	HNRPU_HUMAN	HNRPU	HNRPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U, hnRNP U, SAF-A	90513	57	6 of 10	RNA associated	Nuclear	
Q9Y4L1	HYOU1_HUMAN	HYOU1	HYOU1	Hypoxia up-regulated protein 1 [Precursor], Orp150	111335	72	13 of 23	Chaperone/stress, Protooncogene	Endoplasmic reticulum	
Q9Y2Z0	SUGT1_HUMAN	SUGT1		Suppressor of G2 allele of SKP1 homolog	41024	67	5 of 10	Adaptor, DNA associated	Nuclear	



Συμπληρωματική Εικόνα 2. α. Χρώση DAPI των κυττάρων U2OS-E2F1-ER 24 ώρες μετά την προσθήκη 4-OH-Tamoxifen και των κυττάρων ελέγχου. Ευμεγέθη κύτταρα με πολλαπλούς μικροπυρήνες ανευρέθησαν συχνά ανάμεσα στα κύτταρα που προστέθηκε 4-OH-Tamoxifen. **β.** Ανοσοφθορισμός για την Κυκλίνη B1 σε κύτταρα ελέγχου και κύτταρα U2OS-E2F1-ER 24 ώρες μετά την προσθήκη 4-OH-Tamoxifen.

δειχθεί και παλιότερα¹⁶. Καθώς είναι γνωστό ότι ο μηχανισμός αυτός μεσολαβεί την εμφάνιση της απόπτωσης και της γήρανσης¹⁶⁻¹⁸, αναζητήσαμε αυτή την αιτιολογική σχέση στο κυτταρικό μας σύστημα. Χρησιμοποιώντας την τεχνική καταστολής της έκφρασης ενός γονιδίου με τη χρήση siRNA (short interfer-

ence RNA), αποσιωπήσαμε το γονίδιο p53 στην κυτταρική σειρά U2OS-E2F1-ER και διαπιστώσαμε ότι η επαγωγή του E2F1 δεν είχε αυτή τη φορά επίπτωση στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Εικόνα 3α), ενώ εξαφανίστηκαν και τα φαινόμενα της απόπτωσης και της γήρανσης (Εικόνα 3β) στον πληθυσμό. Τέλος,



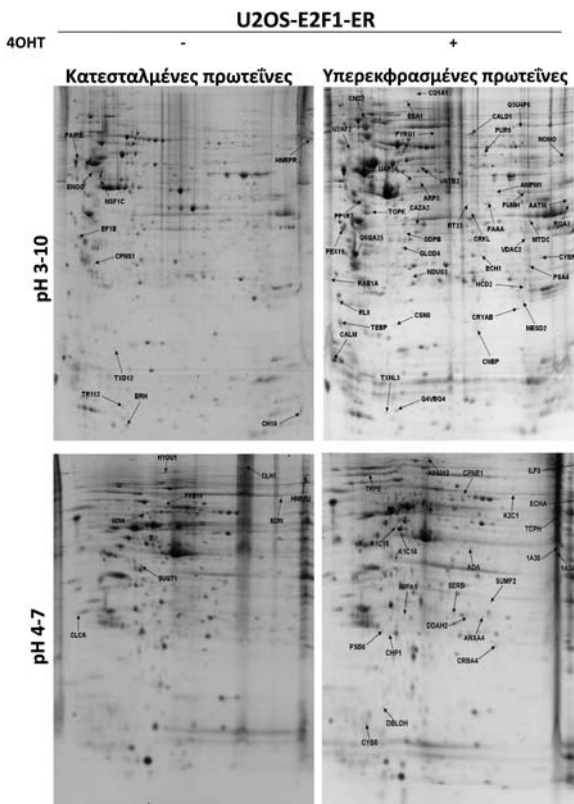
Εικόνα 3. Η καταστολή της p53 αποκαθιστά το αυξητικό δυναμικό και αναστέλλει την απόπτωση των κυττάρων μετά από υπερέκφραση του E2F1. **α.** Καμπύλες αύξησης των κυττάρων U2OS-E2F1-ERshp53 με ή χωρίς την προσθήκη 4-OH-Tamoxifen. **β.** Ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων και χρώση Sa-β-Gal με και χωρίς προσθήκη 4-OH-Tamoxifen σε κύτταρα U2OS-E2F1-ERshp53. **γ.** Ανοσοϊστοχημική ανάλυση για γH2AX και Chk2-

pT68 σε αντιπροσωπευτικά περιστατικά οστεοσαρκώματος με φυσιολογικό και μεταλλαγμένο p53 αντίστοιχα.

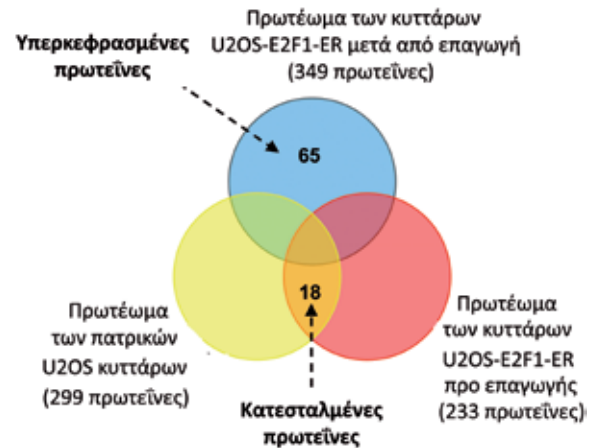
η έκφραση της p73, που είναι πιθανός μεσο-λαβητής της E2F1-επαγόμενης απόπτωσης, δεν αυξήθηκε ύστερα από επαγωγή του E2F1, αποκλείοντας την πιθανότητα η απόπτωση να είναι εξαρτώμενη της p73.

Πρωτεωμική ανάλυση της επαγόμενης κυτταρικής σειράς U2OS-E2F1-ER αποκάλυπτει νέες υποψήφιες οδούς για τη σύνδεση της ενεργοποίησης του E2F1 με τη ρύθμιση του p53. Για να αποκτήσουμε σφαιρική άποψη των μοριακών αλλαγών που συμβαίνουν στα

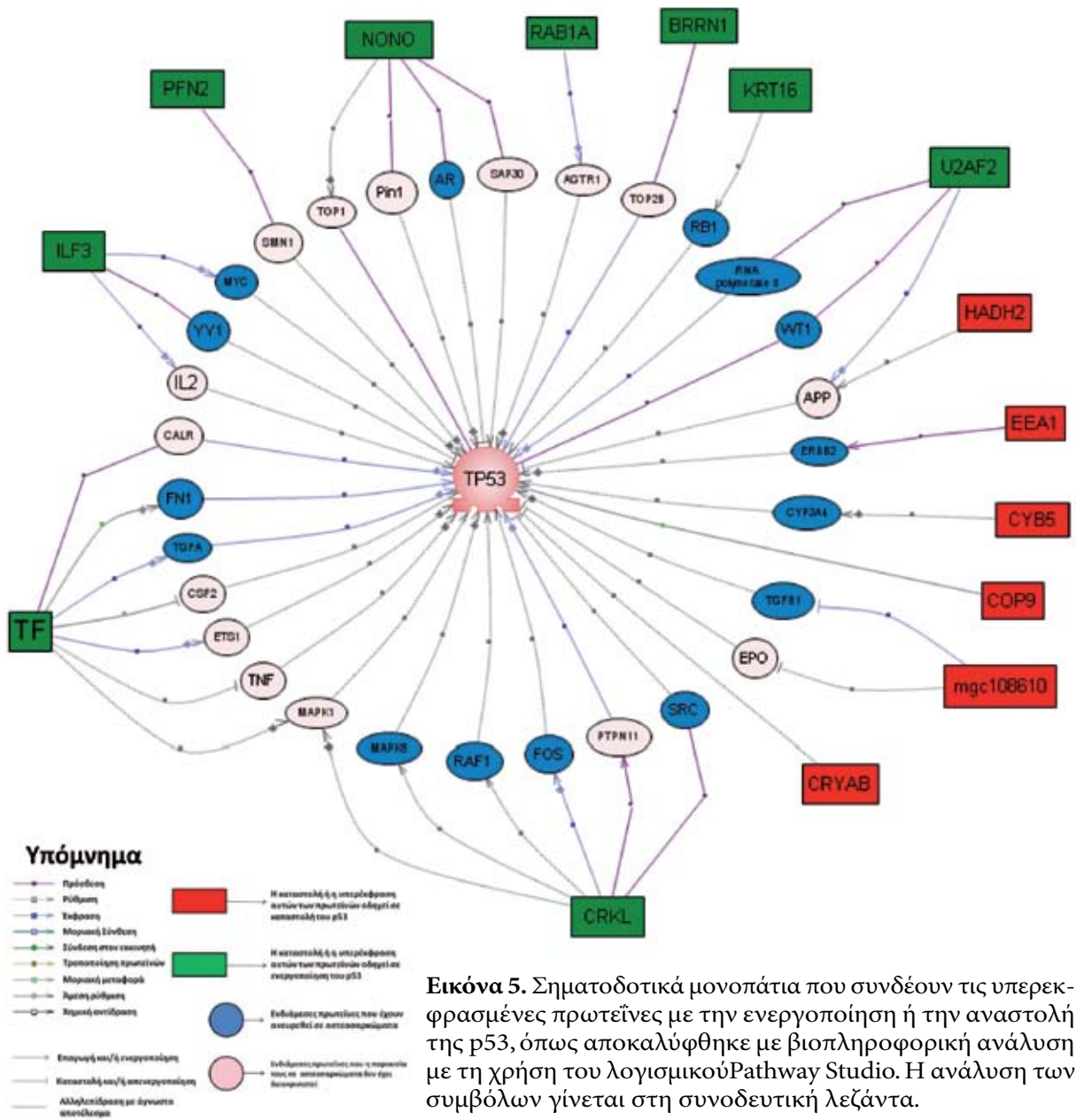
κύτταρα U2OS ύστερα από επαγωγή του E2F1, και ειδικά σε σχέση με το p53, αναλύσαμε τα επαγόμενα, μη επαγόμενα και πατρικά κύτταρα U2OS με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση. Για το πείραμα αυτό επιλέχτηκε το χρονικό σημείο των 48h για την επαγωγή του E2F1, γιατί πιθανοί παράγοντες που επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο και είναι ανεξάρτητοι του E2F1, θεωρείται ότι είναι ελάχιστοι και επιπλέον το μονοπάτι απόκρισης σε βλάβες του DNA είναι πλήρως ενεργοποιημένο. Ανάλυση των τριών αυτών πρωτεωμάτων έγινε με φασματογράφο μάζας MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption-Time of Flight-Mass Spectrometry). Ακολουθώντας έναν αφαιρετικό αλγόριθμο προσδιορίσαμε τις πρωτεΐνες που επάγονται ή καταστέλλο-



Εικόνα 4. Αντιπροσωπευτικά πηκτώματα 2-DE πρωτεϊνών από κύτταρα U2OS-E2F1-ER χωρίς 4-OH-Tαμοξιφέν ή 48 ώρες μετά την προσθήκη της. Οι πρωτεΐνες είχαν απομονωθεί και διαχωριστεί σε ταινίες IPG pH 3-10 ή pH 4-7 μη γραμμικά, και ακολουθήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 12% SDS-polyacrylamide. Το πήκτωμα έχει χρωστεί με Coomassie blue. Η αναγνώριση των στιγμάτων των πρωτεϊνών έγινε με ανάλυση PMF και/ή PSD-MS-MS. Σημειώνονται οι πρωτεΐνες που βρέθηκαν κατεσταλμένες ή υπερεκφρασμένες. Το εύρος του pH range ήταν είτε 3-10 (άνω τμήμα) ή 4-7 (κάτω τμήμα). Βλέπε **Συμπληρωματικούς Πίνακες 3 και 4** για το όνομα και την περιγραφή κάθε σημασμένης πρωτεΐνης.



Συμπληρωματική Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση του αλγόριθμου που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό των υπερεκφρασμένων και των κατεσταλμένων πρωτεϊνών μεταξύ αυτών που ανιχνεύθηκαν με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση μετά την επαγωγή του E2F1. Οι διαφορές μεταξύ των κυττάρων που έγινε ή όχι επαγωγή του E2F1, συγκρίθηκαν επίσης με το πρωτέωμα των κυττάρων της πατρικής σειράς U2OS για να αποκλειστεί κάθε μεταβολή που μπορεί να οφείλεται στη διαδικασία διαμόλυνσης. Οι πρωτεΐνες που υπήρχαν μόνο στο πρωτέωμα των κυττάρων U2OS-E2F1-ER που έγινε επαγωγή αλλά ήταν απύσες από τα κύτταρα ελέγχου και τα πατρικά κύτταρα θεωρήθηκαν ως υπερεκφρασμένες. Σε αντίθεση, οι κοινές πρωτεΐνες των πατρικών κυττάρων και των κυττάρων ελέγχου που δεν εντοπίστηκαν στο πρωτέωμα των κυττάρων U2OS-E2F1-ER μετά την επαγωγή του E2F1, θεωρήθηκαν ως κατεσταλμένες.



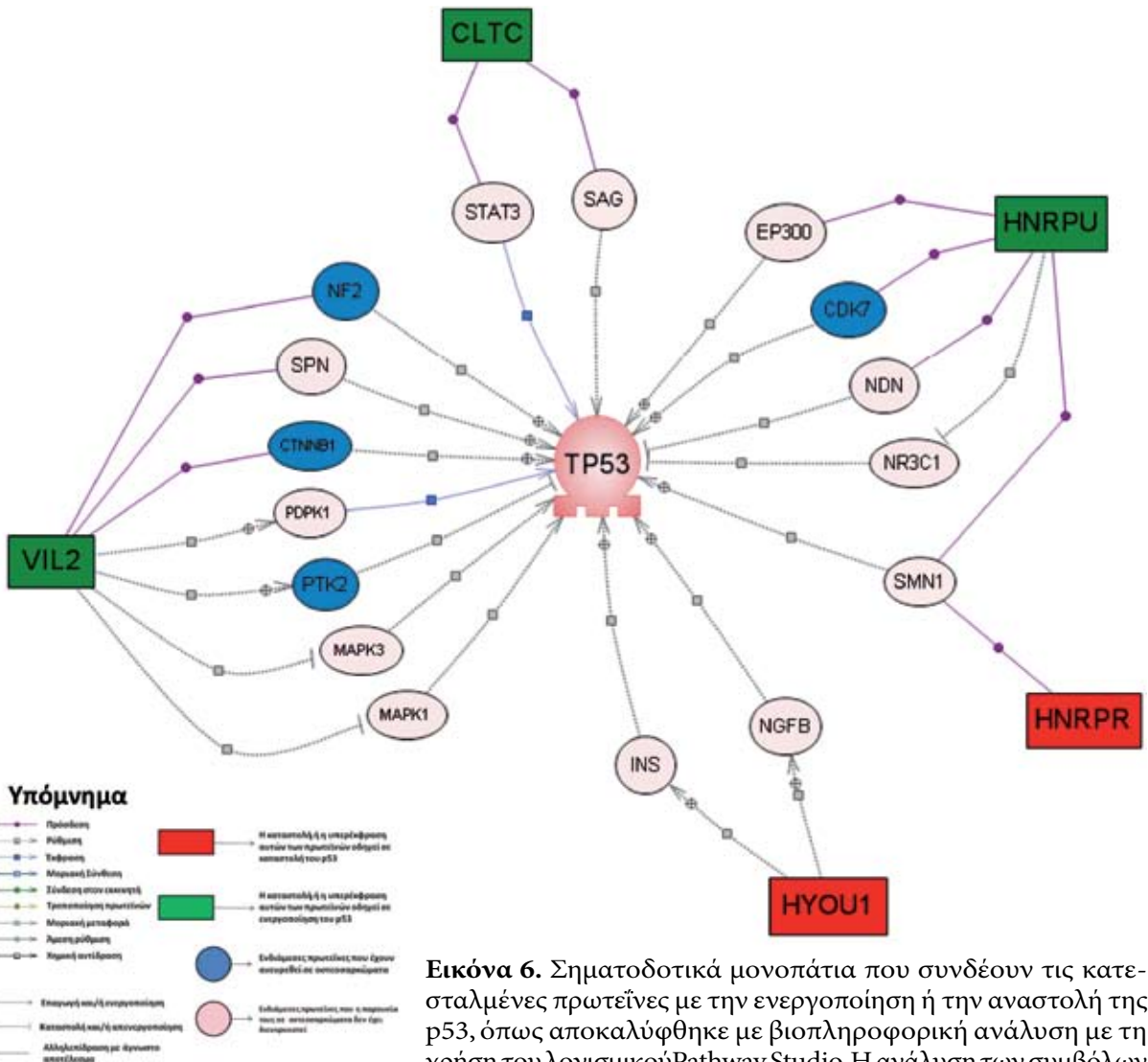
Εικόνα 5. Σηματοδοτικά μονοπάτια που συνδέουν τις υπερεκφρασμένες πρωτεΐνες με την ενεργοποίηση ή την αναστολή της p53, όπως αποκαλύφθηκε με βιοπληροφορική ανάλυση με τη χρήση του λογισμικού Pathway Studio. Η ανάλυση των συμβόλων γίνεται στη συνοδευτική λεζάντα.

νται ύστερα από επαγωγή του E2F1. Βρήκαμε συνολικά 64 πρωτεΐνες να επάγονται και 18 πρωτεΐνες να καταστέλλονται. Η ανάλυση της αλληλουχίας των εκκινητών των πρωτεϊνών που άλλαξαν έκφραση, αποκάλυψε ότι 26/64 επαγόμενες πρωτεΐνες και 6/18 κατασταλμένες πρωτεΐνες έχουν στοιχείο απόκρισης (responsive element) για τον E2F1. Για να διερευνηθεί η σχέση των πρωτεϊνών που αλλάζουν έκφραση μετά την επαγωγή του E2F1, με την p53, έγινε βιοπληροφορική μελέτη με τη χρήση του προγράμματος Pathway Studio.

Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι σχεδόν το 30% των πρωτεϊνών αυτών, που προφανώς είναι κάτω από την επίδραση του E2F1, αποτελούν μέρος διαδοχικών σηματοδοτικών μονοπατιών που μπορεί να ρυθμίζουν το p53.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ρόλος του E2F1 είναι ιδιαίτερα σημαντικός στα οστεοσαρκώματα, καθώς πρόκειται για νεοπλάσματα με συχνές αλλοιώσεις στο μονοπάτι του pRb² που καθιστούν ουσιαστικά τον



Εικόνα 6. Σηματοδοτικά μονοπάτια που συνδέουν τις κατεσταλμένες πρωτεΐνες με την ενεργοποίηση ή την αναστολή της p53, όπως αποκαλύφθηκε με βιοπληροφορική ανάλυση με τη χρήση του λογισμικού Pathway Studio. Η ανάλυση των συμβόλων γίνεται στη συνοδευτική λεζάντα.

E2F1 διαρκώς μεταγραφικά ενεργό. Η ανάλυση της έκφρασης του E2F1 στα οστεοσαρκώματα έδειξε ότι η σχέση του με τις κινητικές παραμέτρους του όγκου καθορίζεται από το p53. Αντίστοιχα, σε παλιότερες μελέτες η σχέση της έκφρασης του E2F1 με τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση διέφερε ανάλογα με τον υπό μελέτη ιστό⁵⁻⁸ ή με την εμβρυοογική προέλευση του όγκου^{9,10}. Το κυτταρικό περιβάλλον εκτρέπει επομένως το αποτέλεσμα της αυξημένης δραστηριότητας του E2F1 είτε προς την αύξηση του όγκου είτε προς τον κυτταρικό θάνατο³, ώστε περιστατικά με υψηλή έκφραση E2F1 και φυσιολογικό p53 να εμφανίζουν μειωμένο πολλαπλασιασμό και αυξημένη απόπτωση,

ενώ η σχέση αυτή καταργείται και τείνει να αντιστραφεί όταν το p53 είναι μεταλλαγμένο. Τα δεδομένα αυτά συνάδουν με πρόσφατες μελέτες που εξαρτούν από το κυτταρικό περιβάλλον την ογκογόνο ή ογκοκατασταλτική δράση του E2F1.

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και *in vitro* καθώς η υπερέκφραση του E2F1 στην κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος U2OS που διαθέτει ακέραιο p53 οδήγησε σε μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού και αύξηση του ποσοστού των αποπτωτικών και γηρασμένων κυττάρων. Τόσο η απόπτωση όσο και η κυτταρική γήρανση αποτελούν φραγμούς στην καρκινογενετική διαδικασία και έχει δει-

χθεί ότι εγείρονται μετά από ενεργοποίηση του μηχανισμού απόκρισης στις δικλωνικές θραύσεις του DNA (DDR)¹⁶⁻¹⁸. Ο μηχανισμός αυτός ενεργοποιείται από την υπερέκφραση του E2F1 όπως φαίνεται από την παρούσα αλλά και παλιότερες μελέτες¹⁶ και καταλήγει σε σταθεροποίηση και αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας της p53. Επιπλέον, στην κυτταρική σειρά U2OS ο γενετικός τόπος INK4A που κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες p16 (σχετίζεται με την εμφάνιση κυτταρικής γήρανσης^{19,20}) και p14 (πρωτεΐνη αισθητήρας των ογκογόνων σημάτων που ενεργοποιεί την p53 αίροντας την ανασταλτική επίδραση της MDM2²¹) είναι υπερμεθυλιωμένος και δεν μεταγράφεται. Επομένως η ενεργοποίηση του μηχανισμού DDR μετά την επαγωγή του E2F1 μπορεί να υποθεθεί ότι είναι ο μηχανισμός που μεσολαβεί την πρόκληση απόπτωσης και γήρανσης των κυττάρων. Η αποκατάσταση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων U2OS-E2F1-ER στα οποία έχει αποσιωπηθεί το γονίδιο p53, μετά την επαγωγή του E2F1 με ταυτόχρονη μείωση του ποσοστού των αποπτωτικών και γηρασμένων κυττάρων επιβεβαιώνει τον παραπάνω ισχυρισμό.

Ο μηχανισμός DDR βρέθηκε επίσης να είναι ενεργοποιημένος στο σύνολο σχεδόν των περιστατικών που εξετάστηκαν. Καθώς, υπήρχαν περιστατικά οστεοσαρκώματος που δεν εμφάνισαν αυξημένη έκφραση E2F1, όπως προέκυψε από την ανοσοϊστοχημική ανάλυση, θα πρέπει να υπάρχουν άλλα μιτογόνα ερεθίσματα που οδήγησαν στην ενεργοποίηση του DDR. Τέτοια ερεθίσματα θα μπορούσε να είναι η υπερέκφραση γονιδίων όπως το c-erb-B2, το myc και το MET τα οποία έχουν βρεθεί να συμμετέχουν στην παθογένεση της νόσου²². Το σημαντικό ποσοστό ενεργοποίησης του μηχανισμού DDR και η υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων του p53 που βρέθηκαν στα περιστατικά οστεοσαρκώματος που αναλύθηκαν, υποστηρίζουν μία από τις βασικές προβλέψεις της θεωρίας μας ότι ο μηχανισμός απόκρισης στις δικλωνικές θραύσεις του DNA μπορεί να δράσει σαν δύναμη επιλογής επιφέροντας μεταλλάξεις του p53 κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της κακοήθειας^{16,17,23,24}.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η παρατήρηση της εμφάνισης κυττάρων με φαινότυπο μιτωτικής καταστροφής την πρώτη μέρα μετά την επαγωγή του E2F1 στην κυτταρική σειρά U2OS και η ταχεία εξαφάνιση τους τις επόμενες ημέρες. Η

μιτωτική καταστροφή έχει χαρακτηριστεί σαν μορφή κυτταρικού θανάτου που οφείλεται σε πρώιμη είσοδο του κυττάρου στη φάση της μίτωσης μετά από επίδραση μιτογόνων ερεθισμάτων. Ένα τέτοιο ερέθισμα μπορεί να είναι η πρώιμη ενεργοποίηση του συμπλόκου κυκλίνης B-cdk1, καθώς η υπερέκφραση του E2F1 αυξάνει τα επίπεδα της κυκλίνης B²⁵ και όπως φαίνεται από την παρούσα μελέτη προάγει την αναδιανομή της από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Είναι γνωστό όμως ότι η πρόκληση βλάβης στο DNA – όπως αυτή που επιφέρει η επαγωγή του E2F1 – και η επακόλουθη ενεργοποίηση του μηχανισμού απόκρισης στις δικλωνικές θραύσεις διακόπτουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και αποτρέπουν την είσοδο στη μίτωση. Αυτό επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της φωσφορυλιωμένης μορφής της κινάσης Chk2 και της p53, οι οποίες αναστέλλουν το σύμπλοκο κυκλίνης B-Cdk1 είτε απενεργοποιώντας την ενεργοποιητική για το σύμπλοκο πρωτεΐνη Cdc25C²⁶, είτε αποτρέποντας την είσοδο του συμπλόκου στον πυρήνα²⁷, είτε τέλος καταστέλλοντας την ενεργότητα του ίδιου του συμπλόκου²⁸. Η ενεργοποίηση του μηχανισμού DDR μετά την πρώτη μέρα της επαγωγής του E2F1 παρεμποδίζει την πρώιμη είσοδο στη μίτωση που επάγεται από τα αυξημένα επίπεδα της κυκλίνης B και οδηγεί τελικά στην εξαφάνιση των κυττάρων με χαρακτηριστικά μιτωτικής καταστροφής.

Η πρωτεωμική ανάλυση έδειξε ότι 64 πρωτεΐνες επάγονται και 18 πρωτεΐνες καταστέλλονται λόγω της υπερέκφρασης του E2F1. Οι πρωτεΐνες αυτές ανήκουν σε διάφορες λειτουργικές ομάδες όπως οι πρωτεΐνες συνοδοί (chaperones), ένζυμα του μεταβολισμού, πρωτεΐνες σχετικές με την επεξεργασία του RNA, πρωτεΐνες που συμμετέχουν στους μηχανισμούς αποικοδόμησης/ανακύκλωσης (turnover) αυτών, πρωτεΐνες σχετικές με τον κυτταροσκελετό και την κινητικότητα/συστατικότητα του κυττάρου, ρύθμιση και μετάδοση κυτταρικών σημάτων, μεταφορικοί φορείς (transport carrier) και δίαυλοι (channels) καθώς και πιθανά ογκογονίδια. Μεταξύ των πρωτεϊνών που άλλαξαν έκφραση αρκετές φαίνεται να έχουν κάποιο ρόλο στη διαδικασία της ογκογένεσης. Για παράδειγμα η Crk-like πρωτεΐνη εμπλέκεται στη μετατροπή των κυττάρων από επιθηλιακά σε μεσεγγυματικά, διαδικασία κρίσιμη για τη διήθηση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων²⁹. Η PBK/

TOPK έχει δειχθεί να αυξάνεται σε λεμφώματα και στον καρκίνο του μαστού, να ελέγχεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F και να δημιουργεί σύμπλοκο με το p53 πιθανώς εμποδίζοντας έτσι τη δράση του τελευταίου³⁰. Με τη σειρά του, το σύμπλοκο σηματοδότησης (signalosome) COP9 απενεργοποιεί την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p27^{Kip1}, εξάγοντάς την από τον πυρήνα, και προωθεί την αποικοδόμηση του p53 μέσω του μονοπατιού της ουμπικιτίνης³¹. Άλλη πρωτεΐνη που αυξάνεται είναι η γλυκόζη-6-φωσφοδεϋδρογενάση (G6PDH), κεντρικό ένζυμο του γλυκολυτικού κύκλου, το οποίο έχει δειχθεί να εμποδίζει τον κυτταρικό θάνατο από τις δραστικές ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species)³². Α λύση των πρωτεϊνών, που αλλάζουν έκφραση ύστερα από επαγωγή του E2F1, με το πρόγραμμα Pathway Studio δείχνει, κάποιες από αυτές να σχετίζονται και να επηρεάζουν την έκφραση του p53 μέσω διαφόρων σηματοδοτικών μηχανισμών. Έτσι σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια που αναδείχθηκαν περιλαμβάνουν αυτά της πρωτεΐνης μη-υποδοχέα τυροσινικής κινάσης src, των ογκογονιδίων *myc*, *fos* και *raf1*, των αυξητικών παραγόντων *c-erb-B2* και TGF-beta 1, των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών PTEN και WT1, των κυτοκινών tumor necrosis factor (TNF) και IL-6 και των πρωτεϊνικών κινάσων ενεργοποιούμενες από τα μιτογόνα (mitogen-activated protein kinases). Η παραπάνω βιοπληροφορική επεξεργασία έδωσε μια σημαντική πληροφορία που αφορά στην έκφραση του p53: η πλειοψηφία των πιθανών σηματοδοτικών μονοπατιών οδηγεί σε ενεργοποίηση του p53; πληροφορία που συμβαδίζει με τα *in vitro* και *in vivo* πειράματα που έχουμε κάνει μέχρι τώρα.

Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή δείχνει τις ιδιότητες του E2F1 για καταστολή του πολλαπλασιασμού στα οστεοσαρκώματα, η οποία είναι βασικά p53-εξαρτώμενη και παρουσιάζονται πιθανοί στόχοι του E2F1, καθώς και πιθανά σηματοδοτικά μονοπάτια που θα μπορούσαν να είναι χρήσιμα σε μελλοντικές κλινικές εφαρμογές.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Meyers PA GR. Osteosarcoma. *Pediatr Clin North Am* 44(4):973-989, 1997.
- Wadayama B-I, Toguchida J, Shimizu T, Ishizaki K, Sasaki MS, Kotoura Y, et al. Mutation Spectrum of the Retinoblastoma Gene in Osteosarcomas. *Cancer Research* 54(11):3042-3048, 1994.
- Tsantoulis PK, Gorgoulis VG. Involvement of E2F transcription factor family in cancer. *European Journal of Cancer* 41(16):2403-14, 2005.
- Yamasaki L, Bronson R, Williams BO, Dyson NJ, Harlow E, Jacks T. Loss of E2F-1 reduces tumorigenesis and extends the lifespan of Rb1(+/-) mice. *Nat Genet* 18(4):360-4, 1998.
- Gorgoulis GV, Mariatos G, Kotsinas A, Bouda M, Kletsas D, Asimacopoulos JP, et al. Transcription factor E2F-1 acts as a growth-promoting factor and is associated with adverse prognosis in non-small cell lung carcinomas. *J Pathol* 198(2):142-56, 2002.
- Zacharatos PAK, Evangelou K, Karakaidos P, Vassiliou L-V, Rezaei N, Kyroudi A, et al. Distinct expression patterns of the transcription factor E2F-1 in relation to tumour growth parameters in common human carcinomas. *J Pathol* 203(3):744-53, 2004.
- Saiz D, Antonio MO, Sherif Rezk, Barbara A. Florentine, Althea McCourty, Russell K. Brynes. Immunohistochemical expression of cyclin D1, E2F-1, and Ki-67 in benign and malignant thyroid lesions. *J Pathol* 198(2):157-62, 2002.
- Yamazaki KYT, Nagao T, Shinkawa H, Kondo F, Hanami K, Asoh A, et al. Expression of transcription factor E2F-1 in pancreatic ductal carcinoma: an immunohistochemical study. *Pathol Res Pract* 199(1):23-8, 2003.
- Yamazaki K, Hasegawa M, Ohoka I, Hanami K, Asoh A, Nagao T, et al. Increased E2F-1 expression via tumour cell proliferation and decreased apoptosis are correlated with adverse prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus. *J Clin Pathol* 58(9):904-10, 2005.
- Evangelou KKA, Mariolis-Sapsakos T, Giannopoulos A, Tsantoulis P, Constantinides C, Troupis TG, et al. E2F-1 overexpression correlates with decreased proliferation and better prognosis in adenocarcinomas of Barrett's oesophagus. *J Clin Pathol* 2007 October 1, 2007; Epub ahead of print: jcp.2007.050963.
- Banerjee D, Schnieders B, Fu JZ, Adhikari D, Zhao S-C, Bertino JR. Role of E2F-1 in Chemosensitivity. *Cancer Research* 58(19):4292-6, 1998.
- Fountoulakis MCN, Lubec G. Increased levels of 14-3-3 gamma and epsilon proteins in brain of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *J Neural Transm Suppl* 57:323-5, 1999.
- Berndt PHU, Langen H. Reliable automatic protein identification from matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide fingerprints. *Electrophoresis* 20:3521-6, 1999.
- Castedo M, Perfettini J-L, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*

- 23(16):2825-37, 2004.
15. Roninson IB, Broude EV, Chang B-D. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resistance Updates* 4(5):303-13, 2001.
 16. Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Kramer A, Tort F, Zieger K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434(7035):864-70, 2005.
 17. Gorgoulis VG, Vassiliou L-VF, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 434(7035):907-13, 2005.
 18. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444(7119):633-7, 2006.
 19. Serrano AWLM, McCurrach EM, Beach D, Lowe WS. Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 88(5):593-602, 1997.
 20. Collado BMM, Serrano M. Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell* 130(2):223-33, 2007.
 21. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin H-K, Dotan ZA, Niki M, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436(7051):725-30, 2005.
 22. Papachristou DJ, Papavassiliou AG. Osteosarcoma and chondrosarcoma: New signaling pathways as targets for novel therapeutic interventions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39(5):857-62, 2007.
 23. Halazonetis T, Gorgoulis VBJ. An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development. *Science* 319(5868):1352-5, 2008.
 24. Halazonetis TD. Constitutively active DNA damage checkpoint pathways as the driving force for the high frequency of p53 mutations in human cancer. *DNA Repair* 3(8-9):1057-62, 2004.
 25. Russo AJ, Magro PG, Hu Z, Li W-W, Peters R, Mandola J, et al. E2F-1 Overexpression in U2OS Cells Increases Cyclin B1 Levels and cdc2 Kinase Activity and Sensitizes Cells to Antimitotic Agents. *Cancer Research* 66(14):7253-60, 2006.
 26. Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ. Linkage of ATM to Cell Cycle Regulation by the Chk2 Protein Kinase. *Science* 282(5395):1893-7, 1998.
 27. Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3[σ] is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 401(6753):616-20, 1999.
 28. Qimin Zhan MJA, Xin Wei Wang, France Carrier, Martin L Smith, Curtis C Harris and Albert J Fornace Jr. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 18(18):2892-900, 1999.
 29. Lamorte L, Royal I, Naujokas M, Park M. Crk Adapter Proteins Promote an Epithelial-Mesenchymal-like Transition and Are Required for HGF-mediated Cell Spreading and Breakdown of Epithelial Adherens Junctions. *Mol Cell Biol* 13(5):1449-61, 2002.
 30. Park J-H, Lin M-L, Nishidate T, Nakamura Y, Katagiri T. PDZ-Binding Kinase/T-LAK Cell-Originated Protein Kinase, a Putative Cancer/Testis Antigen with an Oncogenic Activity in Breast Cancer. *Cancer Research* 66(18):9186-95, 2006.
 31. Dawadschargal Bech-Otschir RK, Huang X, Henklein P, Kapelari B, Pollmann C, Wolfgang Dubiel. COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *EMBO J* 20(7):1630-9, 2001.
 32. Tian Wang-Ni, Braunstein Leigh D, Apse Kira, Pang Jiongdong, Rose Mark, Tian Xiaoni, et al. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *Am J Physiol* 276(5):C1121-31, 1999.

Corresponding author:

Dr Vassilios G Gorgoulis
 56 Antaiou street,
 Lamprini, Ano Patissia,
 11146, Athens, Greece
 Tel: 210-7462352
 Fax: 210-6535894
 E-mail: histoclub@ath.forthnet.gr, vgorg@med.uoa.gr

Υπεύθυνος αλληλογραφίας:

Δρ. Βασίλης Γ. Γοργούλης
 Ανταίου 56,
 Λαμπρινή, Άνω Πατήσια,
 ΤΚ. 11146, Αθήνα, Ελλάδα
 Τηλ: 210-7462352
 Fax: 210-6535894
 E-mail: histoclub@ath.forthnet.gr, vgorg@med.uoa.gr