

**Συμβολή της διασταυρούμενης συνομιλίας
μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων AP-1,
PPAR γ και NF- κ B στην υπερέκφραση
της κυκλικοξυγενάσης-2 από
τα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου**

ΣΚΟΠΟΣ Ο ακριβής ρόλος των μεταγραφικών παραγόντων AP-1, NF- κ B και PPAR γ στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου δεν είναι πλήρως εξακριβωμένος. Είναι γνωστό ότι ο υποκινητής του γονιδίου *cox-2* περιλαμβάνει περιοχές πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων AP-1 και NF- κ B. Με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου των AP-1, NF- κ B και PPAR γ στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου, εξετάστηκε η έκφραση των c-FOS, p-c-JUN (φωσφορυλιωμένος-ενεργός c-JUN), pI κ B- α (φωσφορυλιωμένος I κ B- α – δείκτης ενεργοποίησης του μονοπατιού του NF- κ B), CBP (κοινός μεταγραφικός συνενεργοποιητής των AP-1, NF- κ B και PPAR γ), EGFR, p53, PPAR γ και COX-2, τόσο στο φυσιολογικό εντερικό βλεννογόνο όσο και σε αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου. ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ Εφαρμόστηκε ανοσοϊστοχημική μεθοδολογία σε τομές μονιμοποιημένες σε ουδέτερη φορμόλη και εγκλισησμένες σε παραφίνη από 60 ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου. Για κάθε ασθενή δημιουργήθηκε ένα «μοριακό προφίλ», τόσο για τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα όσο και για τα καρκινικά. Οι στατιστικές σχέσεις μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων και των γονιδίων-στόχων μελετήθηκαν με τη χρήση του Spearman's rho συντελεστή συσχέτισης και έγινε περαιτέρω ανάλυση και επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια μη παραμετρικής ανάλυσης Kruskal-Wallis. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Ο pI κ B- α βρέθηκε υπερέκφρασμένος στο 81,7% των αδενοκαρκινωμάτων σε σχέση με το γειτονικό φυσιολογικό επιθήλιο και η έκφρασή του συσχετιζόταν θετικά με την COX-2 (Spearman's rho=0,513, P<0,001). Η έκφραση του PPAR γ βρέθηκε ελαττωμένη στο 77,3% των αδενοκαρκινωμάτων και παρουσίαζε αρνητική συσχέτιση με την έκφραση της COX-2 (Spearman's rho=-0,412, P<0,001) και του pI κ B- α (Spearman's rho=-0,444, P<0,001). Ο CBP βρέθηκε υπερέκφρασμένος στο 50% των αδενοκαρκινωμάτων σε σχέση με το γειτονικό φυσιολογικό επιθήλιο και η έκφρασή του συσχετιζόταν θετικά με την COX-2 (Spearman's rho=0,461, P<0,001). Οι EGFR και p-c-JUN βρέθηκαν υπερέκφρασμένοι στο 41,7% και στο 43,3% των αδενοκαρκινωμάτων, αντίστοιχα, σε σχέση με το γειτονικό φυσιολογικό επιθήλιο και η έκφρασή τους συσχετιζόταν θετικά με την COX-2 (Spearman's rho=0,444, P<0,001 και Spearman's rho=0,431, P<0,001, αντίστοιχα). Επιπλέον, η έκφραση του p53 εμφάνιζε θετική συσχέτιση με την έκφραση της COX-2 (Spearman's rho=0,435, P=0,004). ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ Η ανάλυση των παραπάνω αποτελεσμάτων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η επαγωγή του μονοπατιού EGFR-MAPK-AP-1 και του μονοπατιού του NF- κ B, καθώς και η ελάττωση της έκφρασης του PPAR γ , είναι σημαντικά γεγονότα κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου. Οι σχέσεις μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων AP-1, NF- κ B, PPAR γ και της COX-2 οδήγησαν στη δημιουργία ενός μοριακού μοντέλου, το οποίο εξηγεί την υπερέκφραση της COX-2 στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου. Η κλινική σημασία αυτού του μοντέλου για τη χημειοπροφύλαξη και τη θεραπεία του καρκίνου παχέος εντέρου συζητείται διεξοδικά.

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2007, 24(2):155-169
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2007, 24(2):155-169

Π.Α. Κωνσταντινίδης,^{1*}
Γ.Π. Βανδώρας,^{2,3*}
Μ.Δ. Γκέρμπου,²
Γ. Σωτηροπούλου-Μπονίκου,³
Α.Γ. Παπαβασιλείου^{1,4}

¹Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα
²Παθολογοανατομικό Τμήμα, Γενικό Νοσοκομείο Αιγίου, Αίγιο
³Εργαστήριο Ανατομίας και Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα
⁴Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

Contribution of AP-1/PPAR γ /NF- κ B cross talk to COX-2 overexpression in colon adenocarcinomas

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Διασταυρούμενη συνομιλία
Καρκίνος παχέος εντέρου
Κυκλικοξυγενάση-2
Μεταγραφικοί παράγοντες
Μοριακές αντικαρκινικές θεραπείες

Α' Βραβείο
Επαθλο «Σωτήρης Παπασταμάτης» 2006

*Οι Π.Α. Κωνσταντινίδης και Γ.Π. Βανδώρας είχαν ισοδύναμη συμμετοχή

Ο μεταγραφικός παράγοντας AP-1 (activator protein-1) είναι ένα ετεροδιμερές ή ομοδιμερές σύμπλοκο, αποτελούμενο από μέλη των JUN, FOS και ATF (activating transcription factor) DNA-προσδεσόμενων πρωτεϊνών.^{1,2} Ο AP-1 αποτελεί κύριο στόχο των βιοχημικών μονοπατιών των MAPKs (mitogen-activated protein kinases), τα οποία ενεργοποιούνται σε απάντηση διαφόρων ερεθισμάτων, όπως αναπτυξιακών παραγόντων, νευροδιαβιβαστών και περιβαλλοντικού stress.³ Η ενεργοποίηση των μονοπατιών των MAPKs ενισχύει τη μεταγραφική δράση του AP-1 με δύο τρόπους: (α) αυξάνοντας τη συγκέντρωση των συστατικών του AP-1 συμπλόκου και (β) διεγείροντας τη δράση των συστατικών του AP-1 συμπλόκου μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων.⁴ Οι ERKs (extracellular signal-regulated kinases), οι JNKs (JUN N-terminal kinases) και η p38 MAPK φωσφορυλιώνουν τον Elk-1 και αυξάνουν την ελεγχόμενη από το SRE (serum response element) μεταγραφή του γονιδίου *c-fos*. Η JNK ενεργοποιεί τους ATF-2 και c-JUN και αυξάνει την ελεγχόμενη από το TRE (TPA response element) μεταγραφή του γονιδίου *c-jun*.⁵ Οι JNKs φωσφορυλιώνουν τον c-JUN σε δύο σερίνες στην αμινοτελική του περιοχή (Ser-63 και Ser-73), αυξάνοντας τη μεταγραφική του δραστηριότητα.⁶ Η μεταγραφική δραστηριότητα του AP-1 διεκπεραιώνεται μέσω σύνδεσης με άλλους συνενεργοποιητές, όπως η πρωτεΐνη CBP [c-AMP response element-binding (CREB)-binding protein], η οποία συνδέει τον AP-1 με τη βασική μεταγραφική μηχανή.⁷ Υπερέκφραση του CBP έχει συσχετιστεί με καρκινογένεση.⁸

Ο AP-1 έχει τόσο ογκογόνες όσο και ογκοκατασταλτικές ιδιότητες, μέσω ρύθμισης πολλών και σημαντικών γονιδίων τα οποία ενέχονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση, την αγγειογένεση, τη διείσδυση και τη μετάσταση.⁹⁻¹¹ Η ακριβής δράση του AP-1 στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως και αρκετές μελέτες έχουν δώσει αντικρουόμενα αποτελέσματα.¹²⁻¹⁴

Το γονίδιο της κυκλοοξυγενάσης-2 (*cox-2*) είναι από τα πλέον καλά μελετημένα γονίδια-στόχους του AP-1.^{15,16} Ο υποκινητής του γονιδίου *cox-2* περιέχει ρυθμιστικές μεταγραφικές περιοχές, στις οποίες προσδέονται διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες, όπως ο AP-1 και ο NF-κB.^{17,18} Επιπρόσθετα, ο συμπαράγοντας CBP φαίνεται ότι είναι σημαντικός για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου *cox-2* από τον AP-1.^{19,20}

Ο NF-κB (nuclear factor-κB) είναι ένας επαγόμενος μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος διεγείρει τη μεταγραφή του γονιδίου *cox-2* ως απάντηση σε διάφορες

κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες.^{21,23} Ο NF-κB παραμένει ανενεργός στο κυτταρόπλασμα ως σύμπλοκο με την ανασταλτική πρωτεΐνη IκB-α, η οποία παρεμποδίζει μια NLS (αλληλουχία εντοπισμού στον πυρήνα, nuclear localization sequence) περιοχή πάνω στον NF-κB που περιέχει το σήμα ελέγχου της μετακόμισης του NF-κB στον πυρήνα. Διάφορα ερεθίσματα προκαλούν φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης IκB-α οδηγώντας στην αποσυνδεσή της από τον NF-κB, με αποτέλεσμα τη μετατόπιση του NF-κB στον πυρήνα και τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων του. Ο NF-κB είναι ενεργός σε πολλαπλά νεοπλάσματα και φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση.²⁴

Διάφορες μελέτες καταδεικνύουν ότι οι μεταγραφικές δραστηριότητες του AP-1 και του NF-κB επηρεάζονται αρνητικά από τον PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) και ότι αυτή η αρνητική «διασταυρούμενη συνομιλία» εμπλέκεται στην καρκινογένεση και στη φλεγμονή. Ο PPARγ ανήκει στην υπερκοικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων, οι οποίοι επάγονται από προσδέματα όπως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ) και θειαζολιδινεδιόνες (TZDs, γνωστά αντιδιαβητικά φάρμακα).²⁵ Υπάρχουν πολλές μελέτες που έχουν αποδείξει την αρνητική διασταυρούμενη συνομιλία μεταξύ PPARγ/AP-1 και PPARγ/NF-κB σε διάφορα μοντέλα, ενώ έχουν προταθεί πολλοί μοριακοί μηχανισμοί οι οποίοι εξηγούν αυτό το φαινόμενο.²⁶⁻³¹

Ο κύριος σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διαλεύκανση του ρόλου των NF-κB, AP-1 και PPARγ στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου και στην έκφραση της πρωτεΐνης COX-2 (προϊόν του γονιδίου *cox-2*). Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε ανοσοϊστοχημικά το διαφορετικό προφίλ έκφρασης όλων αυτών των παραγόντων μεταξύ φυσιολογικού βλεννογόνου και αδενοκαρκινωμάτων του παχέος εντέρου. Στην περίπτωση του AP-1 μελετήθηκε η έκφραση του c-FOS και του pc-JUN (φωσφορυλιωμένος-ενεργός c-JUN), ενώ η ενεργοποίηση του μονοπατιού του NF-κB μελετήθηκε μέσω της έκφρασης του pIκB-α (φωσφορυλιωμένος IκB-α - η φωσφορυλίωσή του, όπως αναφέρθηκε, οδηγεί σε μετακίνηση του NF-κB στον πυρήνα και ενεργοποίηση της μεταγραφικής του δραστηριότητας). Μελετήθηκε, επίσης, η έκφραση του κοινού μεταγραφικού συμπαράγοντα CBP καθώς και του EGFR (epidermal growth factor receptor), ο οποίος (EGFR) ενεργοποιεί το μονοπάτι MAPK-AP-1. Τέλος, μελετήθηκε και η έκφραση της p53 ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης, η οποία, σύμφωνα με μελέτες σε άλλες κακοήθειες, εμπλέκεται στη ρύθμιση της έκφρασης της COX-2.³²⁻³⁴

Η μελέτη και η στατιστική ανάλυση του διαφορικού προφίλ έκφρασης όλων αυτών των παραγόντων μεταξύ φυσιολογικού βλεννογόνου και αδενοκαρκινωμάτων του παχέος εντέρου οδήγησε στη διαμόρφωση ενός μοριακού μοντέλου ρύθμισης της έκφρασης της COX-2, το οποίο εξηγεί αρκετές γνωστές παρατηρήσεις που αφορούν στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου και έχει σημαντικές κλινικές εφαρμογές.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Ασθενείς και κλινικοπαθολογικά στοιχεία

Στην παρούσα μελέτη συμπεριελήφθησαν 60 περιπτώσεις χειρουργηθέντων ασθενών με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου. Πρόκειται για 36 άνδρες και 24 γυναίκες ασθενείς, η ηλικία των οποίων κυμαινόταν μεταξύ 39–90 ετών (μέση ηλικία ανδρών: 71,6 έτη, μέση ηλικία γυναικών: 71,3 έτη, συνολική μέση ηλικία: 71,5 έτη).

Τα μελετηθέντα αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου ταξινομήθηκαν ως υψηλού βαθμού διαφοροποίησης (9 περιπτώσεις), μέσου βαθμού διαφοροποίησης (40 περιπτώσεις) και χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης (11 περιπτώσεις). Η παραπάνω ταξινόμηση έγινε με τα κλασικά ιστοπαθολογικά κριτήρια και η σταδιοποίηση σύμφωνα με το σύστημα TNM της American Joint Committee on Cancer (AJCC). Τα υπό μελέτη περιστατικά ανά στάδιο ήταν: TNM I=8 περιπτώσεις, TNM II=23 περιπτώσεις, TNM III=12 περιπτώσεις και TNM IV=17 περιπτώσεις.

Το χειρουργικό υλικό μονιμοποιήθηκε σε ουδέτερη φορμόλη (neutral buffered formalin) για χρονικό διάστημα 22–24 ωρών. Ακολούθησε η λήψη αντιπροσωπευτικών τομών από τις θέσεις των όγκων και από θέσεις του γειτονικού φυσιολογικού βλεννογόνου. Έγινε επεξεργασία και εγκλεισμός των παραπάνω τομών σε παραφίνη και ακολούθησε διαδοχική λήψη τομών πάχους 4 μm για ιστοπαθολογική εκτίμηση με χρώση

ρουτίνας αιματοξυλίνης-πωσίνης, καθώς επίσης και για διεργεία ανοσοϊστοχημικών χρώσεων του υπό μελέτη υλικού.

Ανοσοϊστοχημική μεθοδολογία

Τα 8 πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, καθώς και οι πηγές και τα επιμέρους χαρακτηριστικά τους, απεικονίζονται στον πίνακα 1.

Οι τομές που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοϊστοχημική χρώση τοποθετήθηκαν για 24 ώρες σε επωαστικό κλίβανο στους 37 °C. Ακολούθησε αποπαραφίνωση των τομών σε ξυλόλη και κατιούσα σειρά αλκοολών. Στη συνέχεια, οι τομές τοποθετήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού 0,01 M (pH 6,0) με χρήση φούρνου μικροκυμάτων για ανάδειξη αντιγονικότητας. Εξαιρέση στην παραπάνω μέθοδο ήταν οι τομές για την ανίχνευση του EGFR, οι οποίες επώαστηκαν για 10 min σε διάλυμα πεψίνης σε κλίβανο θερμοκρασίας 37 °C (DIGEST ALL, ZYMED Labs Inc). Για την αραίωση όλων των πρωτογενών αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκε το ChemMate DAKO Antibody Diluent. Η επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα σε όλες τις υπό εξέταση τομές έγινε για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανοσοαντίδραση στα υπό μελέτη αντισώματα ανιχνεύτηκε με τη χρήση του πρωτοκόλλου του πολυμερούς EnVision (DAKO) για όλα τα αντισώματα, εκτός εκείνων έναντι των EGFR και PPARγ, όπου χρησιμοποιήθηκε το πολυμερές SuperPicture Polymer Detection Kit (ZYMED Labs Inc) για το αντι-EGFR και το PowerVision (ImmunoVision Technologies Co) για το αντι-PPARγ.

Ίδιες τομές από τους υπό εξέταση όγκους, χωρίς επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα, χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες.

Στη μελέτη έγινε εκτίμηση της πρωτεϊνικής έκφρασης στις «διηθητικές παρυφές» των όγκων, σε θέσεις όπου υπήρχε σχετικά μεγάλος αριθμός νεοπλασματικών βλαστών χωρίς στοιχεία νέκρωσης. Μελετώντας όλους τους όγκους, σε πρώτη φάση, στις τομές ρουτίνας αιματοξυλίνης-πωσίνης, επιλέχθηκαν για

Πίνακας 1. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Αντίσωμα	Πηγή	Τύπος	Ανοσογόνο	Αραίωση
c-FOS	Santa Cruz Biotechnology	Πολυκλωνικό	Πεπτιδίο σε συντηρημένη περιοχή του ανθρώπινου c-FOS p62	1:80
pc-JUN	Santa Cruz Biotechnology	Μονοκλωνικό	Πεπτιδίο που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 59-69 του ανθρώπινου φωσφορυλιωμένου c-JUN στη θέση Ser-63	1:80
EGFR	Zymed Laboratories Inc	Μονοκλωνικό	Ανθρώπινος EGFR από A-431 κύτταρα	1:80
CBP	Santa Cruz Biotechnology	Μονοκλωνικό	Πεπτιδίο που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 2422-2441 της καρβοξυτελικής περιοχής του ανθρώπινου CBP	1:60
pIκB-α	Santa Cruz Biotechnology	Μονοκλωνικό	Συνθετικό πεπτιδίο που αντιστοιχεί σε αμινοξική αλληλουχία, η οποία περιέχει τη φωσφορυλιωμένη Ser-32 ανθρώπινου IκB-α	1:80
p53	DAKO	Μονοκλωνικό	Ανασυνδυασμένο φυσιολογικό ανθρώπινο p53	1:80
PPARγ	Santa Cruz Biotechnology	Μονοκλωνικό	Πεπτιδίο που αντιστοιχεί στην καρβοξυτελική περιοχή ανθρώπινου PPARγ	1:30
COX-2	Assay Designs Inc	Πολυκλωνικό	Συνθετικό πεπτιδίο μέρους της ανθρώπινης COX-2	1:60

τελική ανοσοϊστοχημική αξιολόγηση εκείνες οι θέσεις όπου συνυπήρχε διηθητική παρυφή και γειτονικός φυσιολογικός βλεννογόνος στην ίδια τομή. Αυτό ήταν εφικτό σε 49 περιπτώσεις. Στις υπόλοιπες 11 περιπτώσεις, χρησιμοποιήθηκαν δύο τομές ανά περιστατικό (μία με διηθητική παρυφή και μία με γειτονικό φυσιολογικό βλεννογόνο).

Η βαθμολόγηση της έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών σε όλες τις εξετασθείσες περιπτώσεις έγινε με χρήση κλίμακα πέντε επιπέδων, όπως περιγράφεται στον πίνακα 2. Ένας ελάχιστος αριθμός 1000 κυττάρων ανιχνεύτηκε ανά περίπτωση. Τομές με ποσοστό μέχρι 50% ανοσοθετικών κυττάρων βαθμολογήθηκαν με βάση το ποσοστό ανοσοθετικών κυττάρων [(0): <1%, (+1): 1-25%, (+2): 26-50%]. Τομές με ανοσοθετικότητα >50% στον εξεταζόμενο κυτταρικό πληθυσμό βαθμολογήθηκαν ως (+3) ή (+4), ανάλογα με την ένταση χρώσης (μέτρια-ισχυρή). Δεν ανιχνεύθηκαν περιπτώσεις με χαμηλή ένταση χρώσης και ανοσοθετικότητα >50%. Δύο ανεξάρτητοι παθολογοανατόμοι (ΓΠΒ και ΜΓ) εκτίμησαν και βαθμολόγησαν όλες τις υπό μελέτη τομές, χωρίς να έχουν εκ των προτέρων γνώση των επιμέρους κλινικο-ιστολογικών χαρακτηριστικών των περιπτώσεων αυτών. Στις περιπτώσεις μη συμφωνίας των δύο παθολογοανατόμων, έγινε ταυτόχρονη επανεξέταση των τομών σε μικροσκόπιο συμπαρατήρησης.

Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η σύγκριση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των c-FOS, pc-JUN, CBP, PPAR γ , pIkB- α και της COX-2 μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων έγινε με τη βοήθεια της στατιστικής δοκιμασίας Wilcoxon (Wilcoxon signed-rank test). Το επίπεδο έκφρασης για όλους αυτούς τους παράγοντες ανάλογα με τη διαφοροποίηση των αδενοκαρκινωμάτων μελετήθηκε με ανάλυση Kruskal-Wallis ANOVA. Η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των c-FOS, pc-JUN, CBP, PPAR γ , pIkB- α , EGFR και p53 και της COX-2 εξετάστηκε με τη βοήθεια του Spearman's rho μη παραμετρικού παράγοντα συσχέτισης (Spearman's rho correlation coefficient). Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 9,0 for Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η έκφραση του PPAR γ μειώνεται στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου και συσχετίζεται αντίστροφα με την έκφραση της COX-2

Η έκφραση του PPAR γ ήταν στατιστικώς σημαντικά αυξημένη στους πυρήνες των επιθηλιακών κυττάρων του φυσιολογικού βλεννογόνου του παχέος εντέρου, σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση στους πυρήνες των καρκινικών κυττάρων ($P < 0,001$).

Ελαττωμένη έκφραση του PPAR γ σε αδενοκαρκινώματα σε σχέση με φυσιολογικό γειτονικό βλεννογόνο

Πίνακας 2. Βαθμολόγηση ανοσοϊστοχημείας.

Βαθμολογία	Κριτήριο
0	<1% των κυττάρων θετικά
(+1)	1-25% των κυττάρων θετικά
(+2)	26-50% των κυττάρων θετικά
(+3)	>50% των κυττάρων θετικά <i>ΚΑΙ</i> μέση ένταση χρώσης
(+4)	>50% των κυττάρων θετικά <i>ΚΑΙ</i> ισχυρή ένταση χρώσης

παρατηρήθηκε σε 44 περιπτώσεις, σταθερή έκφραση σε 15 περιπτώσεις, ενώ αυξημένη έκφραση στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με το επιθήλιο του γειτονικού φυσιολογικού βλεννογόνου διαπιστώθηκε σε μία περίπτωση.

Αυτά τα αποτελέσματα απεικονίζονται στον πίνακα 6 και στην εικόνα 1α, όπου αποτυπώνεται μια τυπική εικόνα ελαττωμένης έκφρασης του PPAR γ σε νεοπλασματικό επιθήλιο, σε σχέση με την έκφρασή του στο γειτονικό φυσιολογικό επιθήλιο.

Στη γραφική παράσταση της εικόνας 3β απεικονίζεται η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του PPAR γ σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης της COX-2.

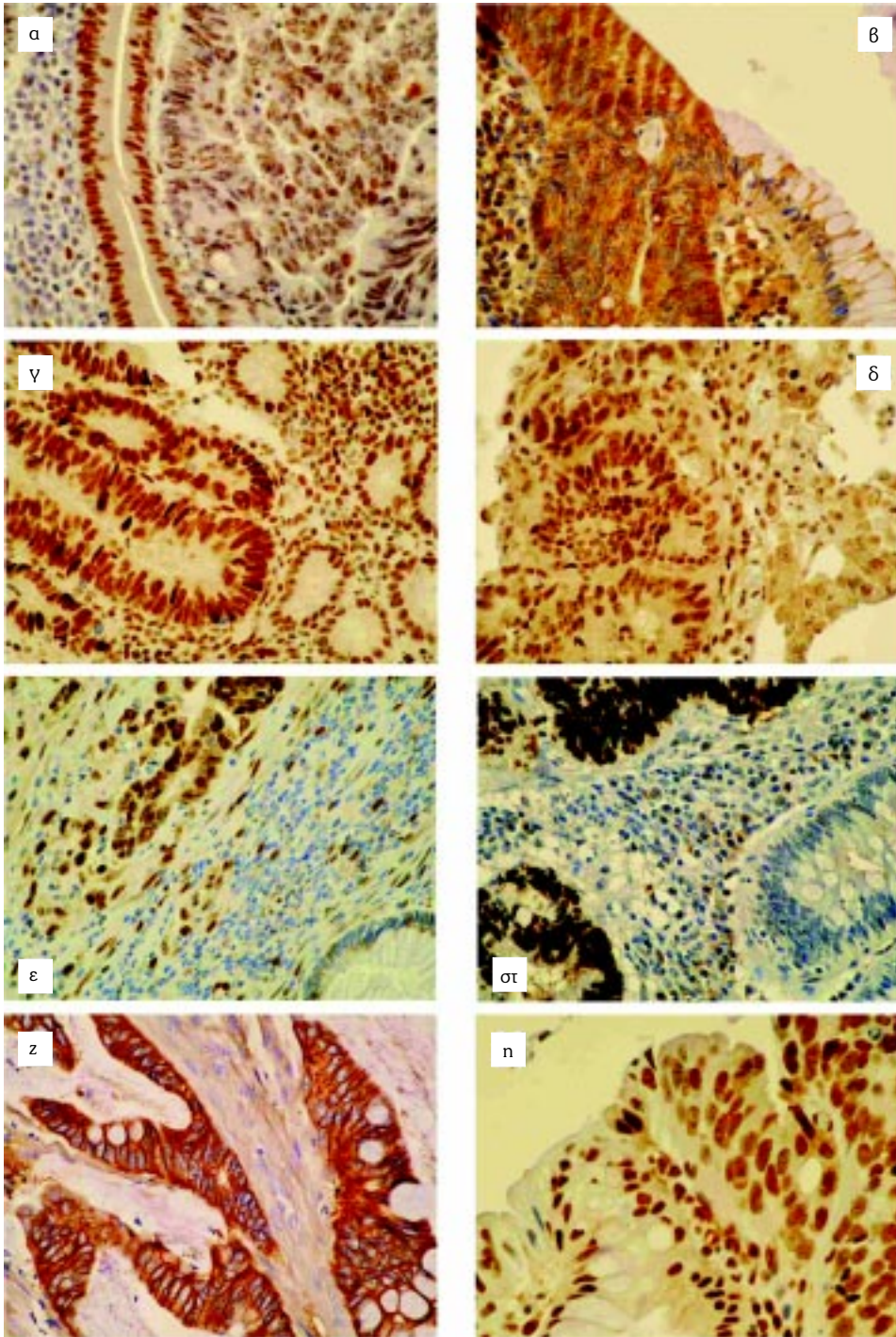
Η μη παραμετρική ανάλυση αποκάλυψε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του PPAR γ και της COX-2 (Spearman's rho = -0,412, $P = 0,001$).

Για την επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε περαιτέρω μη παραμετρική ανάλυση με τη χρήση της ανάλυσης Kruskal-Wallis, η οποία αποκάλυψε ότι η έκφραση του PPAR γ ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετική ανάμεσα στα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης της COX-2 ($P = 0,002$). Ένα από τα πλέον σημαντικά ευρήματα της μελέτης ήταν η διαπίστωση ότι η ελάττωση της έκφρασης του PPAR γ σχετιζόταν άμεσα με αυξημένη έκφραση του pIkB- α . Ειδικότερα, αναγνωρίστηκε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του PPAR γ και του pIkB- α στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου (Spearman's rho = -0,444, $P < 0,001$).

Η έκφραση του pIkB- α επάγεται στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου και συσχετίζεται θετικά με την έκφραση της COX-2

Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής αξιολόγησης για τον pIkB- α και την COX-2 περιγράφονται στον πίνακα 3.

Στην περίπτωση του pIkB- α και της COX-2 διαπιστώθηκε στατιστικά αυξημένη έκφραση στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου σε σχέση με το φυσιολογικό



Εικόνα 1. (α) Ελάττωση της έκφρασης του PPAR γ σε ένα αδενοκαρκίνωμα μέσης διαφοροποίησης σε σχέση με το γειτονικό φυσιολογικό κόλον ($\times 40$). (β) Επαγωγή της έκφρασης της COX-2 σε ένα μέσης διαφοροποίησης αδενοκαρκίνωμα σε σχέση με το γειτονικό φυσιολογικό κόλον ($\times 40$). (γ) Επαγωγή της έκφρασης του CBP σε ένα υψηλής διαφοροποίησης αδενοκαρκίνωμα σε σχέση με το γειτονικό φυσιολογικό κόλον ($\times 40$). (δ) Επαγωγή της έκφρασης του pI κ B- α σε ένα μέσης διαφοροποίησης αδενοκαρκίνωμα ($\times 40$). (ε) Επαγωγή της έκφρασης του c-FOS σε ένα χαμηλής διαφοροποίησης αδενοκαρκίνωμα σε σχέση με το γειτονικό φυσιολογικό κόλον ($\times 40$). (στ) Ισχυρή έκφραση του p53 σε ένα υψηλής διαφοροποίησης αδενοκαρκίνωμα και μηδενική έκφραση του p53 στο γειτονικό φυσιολογικό κόλον ($\times 40$). (ζ) Επαγωγή της έκφρασης του EGFR σε ένα μέσης διαφοροποίησης αδενοκαρκίνωμα ($\times 40$). (η) Ισοδύναμη έκφραση του p-c-JUN σε δυσπλαστικό και γειτονικό φυσιολογικό κόλον ($\times 40$).

βλεννογόνο (pI κ B- α , $P < 0,001$ και COX-2, $P < 0,001$). Η επαγωγή του pI κ B- α και της COX-2 φαίνεται στην εικόνα 1 (1β και 1δ, αντίστοιχα).

Η έκφραση του pI κ B- α και της COX-2 φαίνεται και στην εικόνα 2 (2γ και 2στ, αντίστοιχα), όπου απεικονίζεται το «μοριακό προφίλ» 74χρονης ασθενούς με υψηλού βαθμού διαφοροποίησης αδενοκαρκίνωμα παχέος

εντέρου. Από το συνολικό αριθμό των 60 περιστατικών της μελέτης, διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση της COX-2 σε 52 περιπτώσεις και αυξημένη έκφραση του pI κ B- α σε 49 περιπτώσεις, σε σχέση με την έκφραση των ίδιων παραγόντων στο γειτονικό φυσιολογικό βλεννογόνο.

Διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του pI κ B- α στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου ήταν σε παραλληλία

Πίνακας 3. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των p1kB-α, COX-2 και PPARγ στα αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου των ασθενών της μελέτης.

Αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου		Αρνητικό	+1	+2	+3	+4
p1kB-α	Υψηλής διαφοροποίησης (n=9)	-	1 (1,7%)	-	6 (10%)	2 (3,3%)
	Μέσης διαφοροποίησης (n=40)	-	2 (3,3%)	6 (10%)	23 (38,3%)	9 (15%)
	Χαμηλής διαφοροποίησης (n=11)	-	-	2 (3,3%)	7 (11,7%)	2 (3,3%)
	Σύνολο περιπτώσεων (n=60)	-	3 (5%)	8 (13,3%)	36 (60%)	13 (21,7%)
COX-2	Υψηλής διαφοροποίησης (n=9)	-	-	1 (1,7%)	4 (6,7%)	4 (6,7%)
	Μέσης διαφοροποίησης (n=40)	-	-	1 (1,7%)	14 (23,6%)	25 (41,7%)
	Χαμηλής διαφοροποίησης (n=11)	-	-	1 (1,7%)	6 (10%)	4 (6,7%)
	Σύνολο περιπτώσεων (n=60)	-	-	3 (5%)	24 (40%)	33 (55%)
PPARγ	Υψηλής διαφοροποίησης (n=9)	3 (5%)	2 (3,3%)	1 (1,7%)	2 (3,3%)	1 (1,7%)
	Μέσης διαφοροποίησης (n=40)	9 (15%)	16 (26,7%)	8 (13,3%)	7 (11,7%)	-
	Χαμηλής διαφοροποίησης (n=11)	2 (3,3%)	6 (10%)	1 (1,7%)	2 (3,3%)	-
	Σύνολο περιπτώσεων (n=60)	14 (23,3%)	24 (40%)	10 (16,7%)	11 (18,3%)	1 (1,7%)

με την έκφραση της COX-2 (δηλαδή, η αύξηση του p1kB-α ακολουθεί την αύξηση έκφρασης της COX-2). Η γραφική παράσταση στην εικόνα 3α εμφανίζει την έκφραση του p1kB-α σε σχέση με διαφορετικά επίπεδα έκφρασης της COX-2. Ο p1kB-α εμφάνιζε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με την έκφραση της COX-2 (Spearman's rho=0,513, P<0,001), ενώ ταυτόχρονα η έκφραση του p1kB-α ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετική ανάμεσα στα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης της COX-2 (Kruskall-Wallis P<0,001).

Ο CBP υπερεκφράζεται στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου σε σχέση με το φυσιολογικό βλεννογόνο και συσχετίζεται θετικά με την έκφραση της COX-2.

Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής αξιολόγησης της έκφρασης του CBP περιγράφονται στους πίνακες 4 και 5.

Στη μελέτη βρέθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του CBP στους πυρήνες των νεοπλασματικών κυττάρων στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου, σε σχέση με την έκφραση της πρωτεΐνης στους πυρήνες των επιθηλιακών κυττάρων του φυσιολογικού βλεννογόνου (P<0,001). Η επαγωγή του CBP απεικονίζεται στις εικόνες 1γ και 2α. Συνολικά, σε 30 από τις 60 υπό μελέτη περιπτώσεις αδενοκαρκινωμάτων παχέος εντέρου ανιχνεύτηκε αυξημένη έκφραση του CBP (πίν. 5).

Στην εικόνα 3γ παρουσιάζονται γραφικές παραστάσεις της έκφρασης του CBP ανάμεσα σε διαφορετικά επίπεδα έκφρασης της COX-2. Στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου, η έκφραση του CBP παρουσίαζε θετική συσχέτιση με την έκφραση της COX-2 (Spearman's rho=0,461, P=0,005).

Σημαντικό εύρημα θεωρείται ότι η έκφραση του CBP ήταν διαφορετική ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της

COX-2 (Kruskall-Wallis P=0,001 και P=0,002, αντίστοιχα) (εικ. 3γ).

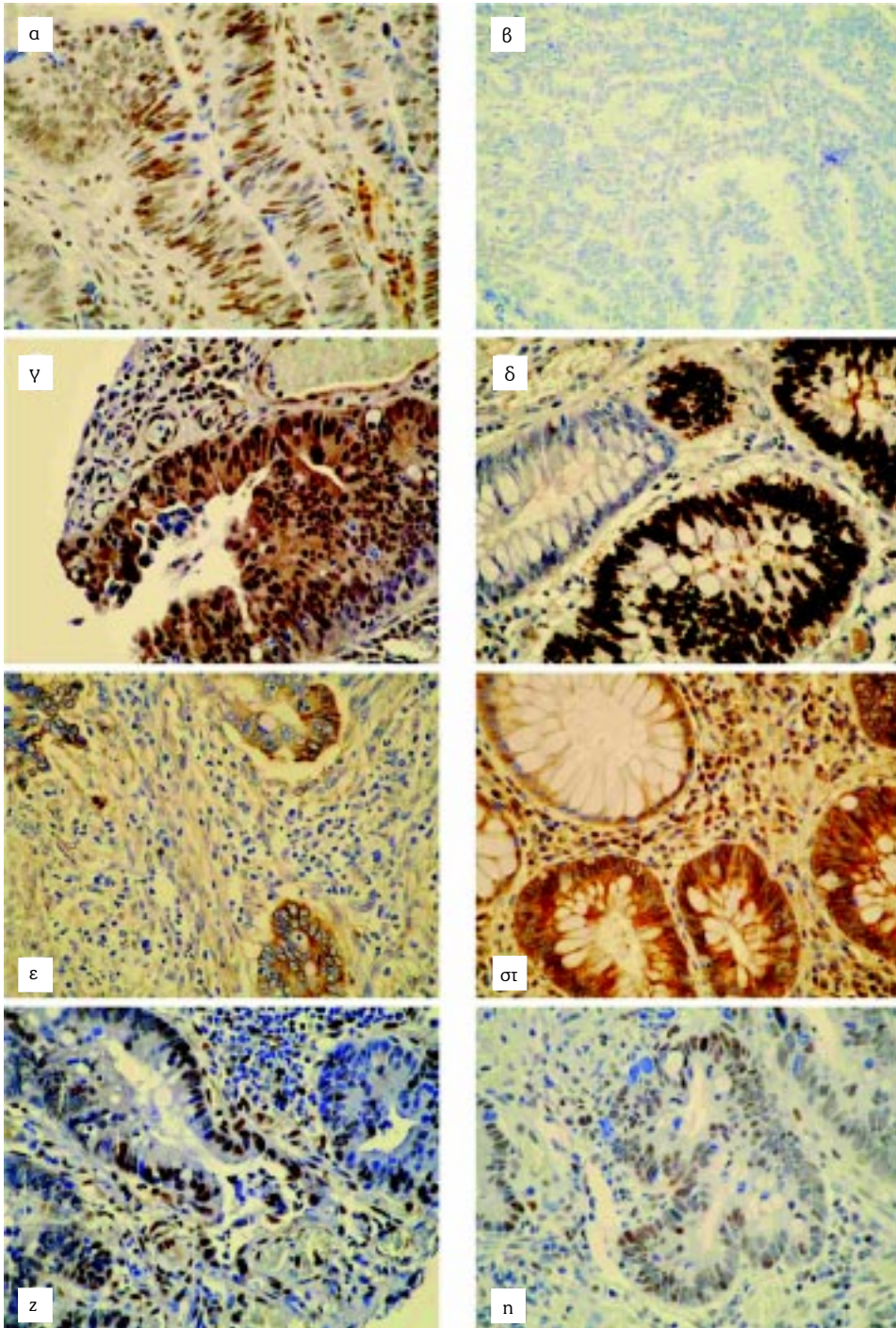
Ο EGFR υπερεκφράζεται στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου σε σχέση με το γειτονικό φυσιολογικό βλεννογόνο και συσχετίζεται θετικά με την έκφραση της COX-2

Τα αποτελέσματα της εκτίμησης του ανοσοϊστοχημικού ελέγχου του EGFR παρουσιάζονται στον πίνακα 6. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του EGFR παρουσιάζεται στις εικόνες 1z και 2ε.

Στατιστικά μεγαλύτερη έκφραση του EGFR παρατηρήθηκε στα νεοπλασματικά επιθηλιακά κύτταρα στα υπό μελέτη αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου, σε σχέση με το επιθήλιο του γειτονικού φυσιολογικού βλεννογόνου (P<0,001).

Συνολικά, σε 25 από τα 60 υπό μελέτη περιστατικά παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη έκφραση του EGFR στα νεοπλασματικά κύτταρα, σε σχέση με τα επιθηλιακά κύτταρα του γειτονικού φυσιολογικού βλεννογόνου (41,7%) (πίν. 5).

Η έκφραση του EGFR εμφάνιζε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με την έκφραση της COX-2 (Spearman's rho=0,431, P<0,001). Επιπρόσθετα, σημαντικό εύρημα ήταν το γεγονός ότι η έκφραση του EGFR παρουσίαζε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με την έκφραση των c-FOS και pc-JUN (Spearman's rho=0,476, P<0,001 και Spearman's rho=0,431, P=0,001, αντίστοιχα), γεγονός που καταδεικνύει την ύπαρξη μιας ενδοκυτταρικής ενεργοποίησης των EGFR, c-FOS και pc-JUN στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου.



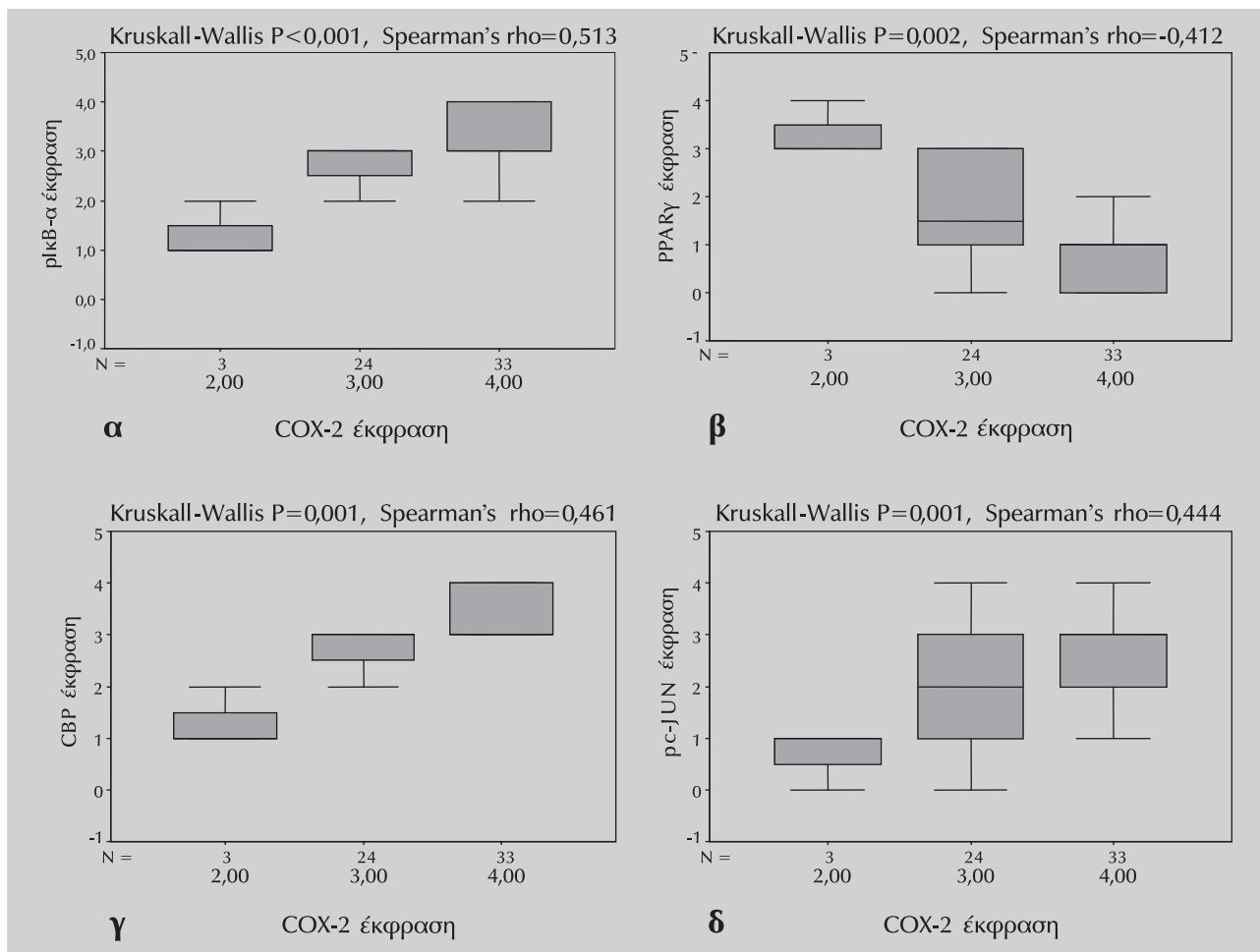
Εικόνα 2. «Μοριακό προφίλ» ασθενούς 74 ετών με αδενοκαρκίνωμα υψηλής διαφοροποίησης. (α) Έκφραση CBP (+3). (β) Έκφραση PPAR γ (αρνητική/0). (γ) Έκφραση p16B-a (+4). (δ) Έκφραση p53 (+4). (ε) Έκφραση EGFR (+2). (στ) Έκφραση COX-2 (+4). (ζ) Έκφραση p-c-JUN (+2). (η) Έκφραση c-FOS (+1).

Η έκφραση του p53 συσχετίζεται θετικά με την έκφραση της COX-2

Τα αποτελέσματα της εκτίμησης του ανοσοϊστοχημικού ελέγχου του p53 εμφανίζονται στον πίνακα 6. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του p53 απεικονίζεται στις εικόνες 1στ και 2δ.

Είναι γνωστό ότι η ανίχνευση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 στα

νεοπλασματικά κύτταρα υποδηλώνει απενεργοποίηση ή και μετάλλαξη του εν λόγω γονιδίου. Το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για την ανοσοϊστοχημική διερεύνηση του p53, αναγνωρίζει τόσο τη φυσιολογική όσο και τη μεταλλαγμένη μορφή του p53 σε όλες τις συνθήκες. Η υπερέκφραση του p53, η οποία ανιχνεύτηκε στα αδενοκαρκινώματα, αναδεικνύει κυρίως την παρουσία ανενεργού/μεταλλαγμένου p53 στα καρκινικά κύτταρα. Η αυξημένη έκφρα-



Εικόνα 3. (α-δ) Γραφικές παραστάσεις boxplots (ιστογράμματα), τα οποία αναδεικνύουν την έκφραση των PPARγ, pIkB-α, CBP και pc-JUN σε σχέση με τα διάφορα επίπεδα έκφρασης της COX-2. Ο αριθμός των ασθενών (N) φαίνεται στον άξονα X. Η στατιστική σχέση μεταξύ των PPARγ, pIkB-α, CBP, pc-JUN και της COX-2 μελετήθηκε με τη βοήθεια του συντελεστή συσχέτισης ρ (rho) (Spearman's rho correlation coefficient). Το πρόσημο του συντελεστή ρ (rho) καταδεικνύει την κατεύθυνση της σχέσης (θετικό: ανάλογη σχέση, αρνητικό: αντιστρόφως ανάλογη σχέση). Μη παραμετρική ανάλυση Kruskal-Wallis κατέδειξε σε όλες τις περιπτώσεις (α-δ) ότι η έκφραση των PPARγ, pIkB-α, CBP και pc-JUN ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετική ανάμεσα στα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης της COX-2 (το Kruskal-Wallis P φαίνεται σε κάθε περίπτωση).

Πίνακας 4. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των CBP, c-FOS και pc-JUN στα αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου των ασθενών της μελέτης.

Αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου		Αρνητικό	+1	+2	+3	+4
CBP	Υψηλής διαφοροποίησης (n=9)	-	-	2 (3,3%)	4 (6,7%)	3 (5%)
	Μέσης διαφοροποίησης (n=40)	-	2 (3,3%)	3 (5%)	22 (36,7%)	13 (21,7%)
	Χαμηλής διαφοροποίησης (n=11)	2 (3,3%)	1 (1,7%)	-	6 (10%)	2 (3,3%)
	Σύνολο περιπτώσεων (n=60)	2 (3,3%)	3 (5%)	5 (8,3%)	32 (53,3%)	18 (30%)
c-FOS	Υψηλής διαφοροποίησης (n=9)	-	3 (5%)	2 (3,3%)	2 (3,3%)	2 (3,3%)
	Μέσης διαφοροποίησης (n=40)	5 (8,3%)	2 (3,3%)	14 (23,3%)	9 (15%)	10 (16,7%)
	Χαμηλής διαφοροποίησης (n=11)	-	-	5 (8,3%)	5 (8,3%)	1 (1,7%)
	Σύνολο περιπτώσεων (n=60)	5 (8,3%)	5 (8,3%)	21 (35%)	16 (26,7%)	13 (21,7%)
pc-JUN	Υψηλής διαφοροποίησης (n=9)	1 (1,7%)	-	2 (3,3%)	3 (5%)	3 (5%)
	Μέσης διαφοροποίησης (n=40)	-	7 (11,7%)	12 (20%)	15 (25%)	6 (10%)
	Χαμηλής διαφοροποίησης (n=11)	2 (3,3%)	3 (5%)	4 (6,7%)	2 (3,3%)	-
	Σύνολο περιπτώσεων (n=60)	3 (5%)	10 (16,7%)	18 (30%)	20 (33,3%)	9 (15%)

Πίνακας 5. Σύγκριση της έκφρασης μεταξύ φυσιολογικού κόλου και αντίστοιχων αδενοκαρκινωμάτων στους ασθενείς της μελέτης.

Παράγοντες	Σύνολο περιπτώσεων (N=60)		
	Επαγωγή έκφρασης Καρκίνος > Φυσιολογικό	Ισοδύναμη έκφραση Καρκίνος = Φυσιολογικό	Ελάττωση έκφρασης Καρκίνος < Φυσιολογικό
c-FOS	30 (50%)	17 (28,3%)	13 (21,7%)
pc-JUN	26 (43,3%)	21 (35%)	13 (21,7%)
EGFR	25 (41,7%)	35 (58,3%)	-
CBP	30 (50%)	30 (50%)	-
pIkB-α	49 (81,7%)	11 (18,3%)	-
PPARγ	1 (1,7%)	15 (25%)	44 (73,3%)
COX-2	52 (86,7%)	8 (13,3%)	-

Πίνακας 6. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των EGFR και p53 στα αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου των ασθενών της μελέτης.

Αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου		Αρνητικό	+1	+2	+3	+4
EGFR	Υψηλής διαφοροποίησης (n=9)	2 (3,3%)	2 (3,3%)	1 (1,7%)	3 (5%)	1 (1,7%)
	Μέσης διαφοροποίησης (n=40)	10 (16,7%)	6 (10%)	8 (13,3%)	11 (18,3%)	5 (8,3%)
	Χαμηλής διαφοροποίησης (n=11)	2 (3,3%)	3 (5%)	2 (3,3%)	4 (6,7%)	-
	Σύνολο περιπτώσεων (n=60)	14 (23,3%)	11 (18,3%)	11 (18,3%)	18 (30%)	6 (10%)
p53	Υψηλής διαφοροποίησης (n=9)	1 (1,7%)	-	2 (3,3%)	6 (10%)	-
	Μέσης διαφοροποίησης (n=40)	2 (3,3%)	6 (10%)	7 (11,7%)	14 (23,3%)	11 (18,3%)
	Χαμηλής διαφοροποίησης (n=11)	1 (1,7%)	1 (1,7%)	2 (3,3%)	4 (6,7%)	3 (5%)
	Σύνολο περιπτώσεων (n=60)	4 (6,7%)	7 (11,7%)	11 (18,3%)	24 (40%)	14 (23,3%)

ση του p53 που διαπιστώθηκε υποδηλώνει την παρουσία είτε μετάλλαξης είτε απενεργοποίησης του γονιδίου στον υπό μελέτη κυτταρικό πληθυσμό.

Στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου, η έκφραση του p53 εμφάνιζε θετική συσχέτιση με την έκφραση της COX-2 (Spearman's $\rho=0,435$, $P=0,004$), ενώ η έκφραση του p53 ήταν διαφορετική ανάμεσα στα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης της COX-2 (Kruskall-Wallis $P=0,001$ και $P=0,002$, αντίστοιχα).

Διαπιστώθηκε, επίσης, ότι η έκφραση του p53 ήταν στατιστικώς σημαντικά αυξημένη σε όγκους προχωρημένου σταδίου ($P=0,035$), ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του p53 και το βαθμό διαφοροποίησης των αδενοκαρκινωμάτων.

Η έκφραση των πρωτεϊνών του συμπλόκου AP-1 (c-FOS και pc-JUN) αυξάνεται στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου και συσχετίζεται θετικά με την έκφραση της COX-2

Τα αποτελέσματα της εκτίμησης του ανοσοϊστοχημικού ελέγχου των c-FOS και pc-JUN παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

Τα αποτελέσματα της σύγκρισης της έκφρασης των c-FOS και pc-JUN στους πυρήνες των φυσιολογικών και των καρκινικών κυττάρων στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου παρουσιάζονται στον πίνακα 5. Στην εικόνα 1η απεικονίζεται περίπτωση όμοιας έκφρασης του pc-JUN σε δυσπλαστικό και γειτονικό φυσιολογικό επιθήλιο, ενώ στην εικόνα 1ε απεικονίζεται η επαγωγή του c-FOS. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση των pc-JUN και c-FOS φαίνεται και στην εικόνα 2 (2z και 2n, αντίστοιχα), στα πλαίσια ανάδειξης του «μοριακού προφίλ» 74χρονης ασθενούς με υψηλού βαθμού διαφοροποίησης αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου.

Συνολικά, παρατηρήθηκε στατιστικά αυξημένη έκφραση των c-FOS και pc-JUN στο καρκινικό σε σχέση με το φυσιολογικό αδενικό επιθήλιο ($P=0,04$ και $P=0,04$, αντίστοιχα). Η έκφραση του pc-JUN εμφάνιζε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με την έκφραση της COX-2 (Spearman's $\rho=0,444$, $P<0,001$), ενώ η έκφραση του pc-JUN ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετική ανάμεσα στα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης της COX-2 (Kruskall-Wallis $P=0,001$). Στην εικόνα 3δ αποτυπώνεται η έκφραση των επιπέδων του pc-JUN ανάμεσα στα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης της COX-2. Σε

αντίθεση, η έκφραση του c-FOS δεν εμφάνιζε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την έκφραση της COX-2.

Στατιστικά σημαντική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της έκφρασης του pc-JUN και του βαθμού διαφοροποίησης των όγκων ($P=0,035$), με εμφανή τάση των όγκων υψηλής διαφοροποίησης να παρουσιάζουν ισχυρότερη έκφραση του pc-JUN. Παρόμοια, στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($P=0,006$) παρατηρήθηκε μεταξύ της έκφρασης του pc-JUN και του σταδίου των όγκων, με τάση των όγκων προχωρημένου σταδίου να εκφράζουν χαμηλότερα επίπεδα pc-JUN.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη μορφολογική εκτίμηση της έκφρασης των pIκB-α, pc-JUN, c-FOS (οι οποίοι αποτελούν δυναμικούς δείκτες της ενεργοποίησης του NF-κB και του AP-1, αντίστοιχα), PPARγ και CBP στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου. Η ανοσοϊστοχημική μεθοδολογία δίνει τη δυνατότητα μελέτης όχι μόνο της έκφρασης αλλά, ταυτόχρονα, και της υποκυτταρικής εντόπισης διαφόρων πρωτεϊνών, προσφέροντας σημαντικά μηχανιστικά στοιχεία, τα οποία μπορούν δυνητικά να οδηγήσουν στη δημιουργία δυναμικών μοριακών μοντέλων που εξηγούν το φυσιολογικό ρόλο αυτών των πρωτεϊνών.

Σημασία της υπερέκφρασης της COX-2 στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου

Σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές,³⁵ η παρούσα μελέτη ανέδειξε ότι στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου υπάρχει υπερέκφραση της COX-2 σε σχέση με το φυσιολογικό κόλον. Ο ρόλος της COX-2 στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου είναι πολλαπλός. Η COX-2 καταλύει την παραγωγή προσταγλανδίνης E2 (PGE2), η οποία έχει γνωστή ογκογόνο δραστηριότητα. Η PGE2 αναστέλλει την κυτταρική απόπτωση, ενισχύει τη μετανάστευση και τη διείσδυση των καρκινικών κυττάρων και είναι σημαντικός αγγειογενετικός παράγοντας (συμβάλλει στη δημιουργία νέων αγγείων, τα οποία τροφοδοτούν το νεόπλασμα).^{36,37} Ο ρόλος της COX-2 στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου έχει αναδειχθεί και από μεγάλες κλινικές μελέτες, οι οποίες έχουν δείξει ότι οι αναστολείς της COX-2 προστατεύουν από την εμφάνιση του νεοπλασματος.

Ο κύριος σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν, όχι μόνο η εξέταση της έκφρασης της COX-2 στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου, αλλά και η διερεύνηση

των παραγόντων που σχετίζονται με την υπερέκφρασή της σε αυτά.

Σημασία της υπερέκφρασης του NF-κB και του AP-1 στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου

Η παρούσα μελέτη απέδειξε για πρώτη φορά ότι στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου επάγεται η έκφραση του pIκB-α, γεγονός που υποδεικνύει ότι υπάρχει ενεργοποίηση του μονοπατιού του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και ενεργοποίηση της μεταγραφικής του δραστηριότητας. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης IκB-α (σε pIκB-α) οδηγεί στην αποσύνδεσή της από τον NF-κB, με αποτέλεσμα τη μετατόπιση του τελευταίου στον πυρήνα και τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων του. Η φωσφορυλίωση του IκB-α αποτελεί κομβικό σημείο για την ενεργοποίηση του NF-κB και έχει αποδειχθεί ότι τα ΜΣΑΦ δρουν σε αυτό ακριβώς το σημείο για να αναστείλουν το μονοπάτι του NF-κB.³⁸

Ο NF-κB συμβάλλει στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου μέσω μεταγραφικής ενεργοποίησης πληθώρας αντιαποπτωτικών γονιδίων και μέσω ενίσχυσης της δυνατότητας των νεοπλασματικών κυττάρων για μεταστατική διείσδυση.^{39,40} Διάφορες κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες, όπως η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και ο αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης β (transforming growth factor β, TGF-β), καθώς και προϊόντα βακτηρίων μέσα στον εντερικό αυλό, οδηγούν στη φωσφορυλίωση του IκB-α και την ενεργοποίηση του NF-κB.^{21,22,41}

Το γεγονός ότι η έκφραση του pIκB-α αυξανόταν παράλληλα με την αύξηση της έκφρασης της COX-2 καταδεικνύει ότι η ενεργοποίηση του NF-κB στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου πιθανότατα συμβάλλει στην υπερέκφραση της COX-2 από τα νεοπλασματικά κύτταρα. Είναι, άλλωστε, γνωστό ότι το *cox-2* αποτελεί γονίδιο-στόχο του NF-κB (ο υποκινητής του περιέχει ρυθμιστική περιοχή στην οποία προσδέεται ο NF-κB).¹⁷

Ένα άλλο, εξαιρετικά σημαντικό εύρημα της μελέτης ήταν ότι η έκφραση των pc-JUN και c-FOS αυξανόταν σημαντικά στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου, σε σχέση με το φυσιολογικό κόλον. Αυτή η επαγωγή της έκφρασης των pc-JUN και c-FOS παρακολουθούσε την υπερέκφραση του EGFR στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου, γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι υπάρχει μια ενδοχρηστρομένη ενεργοποίηση του μονοπατιού EGFR-MAPK-AP-1 στα νεοπλασματικά κύτταρα. Είναι γνωστό ότι ο ενεργοποιημένος EGFR οδηγεί στη δημιουργία του συμπλέγματος Grb2-SOS (cytoplasmic growth factor receptor-bound protein 2-son of seven-

less), το οποίο ενεργοποιεί την πρωτεΐνη RAS, που με τη σειρά της «πυροδοτεί» το μονοπάτι των MAPKs.^{4,5} Η ενεργοποίηση των ERKs και JNKs οδηγεί, τελικά, στην αύξηση της έκφρασης των c-FOS και c-JUN.

Το γεγονός ότι η υπερέκφραση του pc-JUN σχετιζόταν στατιστικώς σημαντικά με την υπερέκφραση της COX-2, καταδεικνύει ότι η ενεργοποίηση του AP-1 στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου πιθανότατα συμβάλλει στην υπερέκφραση της COX-2 από τα νεοπλασματικά κύτταρα. Είναι γνωστό ότι το *cox-2*, εκτός από γονίδιο-στόχο του NF-κB, αποτελεί γονίδιο-στόχο και του AP-1 (ο υποκινητής του περιέχει ρυθμιστική περιοχή στην οποία προσδέεται ο AP-1).¹⁷ Το ότι η έκφραση του c-FOS δεν συσχετιζόταν στατιστικώς σημαντικά με την έκφραση της COX-2, οδηγεί στην υπόθεση ότι τα pc-JUN • pc-JUN ομοδιμερή πιθανόν αποτελούν το πρωταρχικό σύμπλοκο του AP-1, το οποίο διεγείρει τη μεταγραφή του *cox-2* (τα c-FOS • pc-JUN ετεροδιμερή φαίνεται ότι παίζουν μικρότερο ρόλο).

Ο ρόλος της ελάττωσης της έκφρασης του PPAR γ και ο ρόλος του CBP

Ένα εξίσου σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν η ελάττωση της έκφρασης του PPAR γ στα αδενοκαρκινώματα σε σχέση με το φυσιολογικό κόλον, στη μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών. Έχει βρεθεί, ήδη, ότι η απώλεια ενός *ppar γ* αλληλομόρφου οδηγεί σε αύξηση της ευαισθησίας στη χημική καρκινογένεση και αρκετές μελέτες υποστηρίζουν έναν ογκοκατασταλτικό ρόλο για τον PPAR γ στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου.⁴² Μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας (loss-of-function mutations) στο γονίδιο *ppar γ* έχουν ταυτοποιηθεί στο 10% των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου.⁴³ Επιπρόσθετα, μεταλλάξεις και απώλεια της χρωμοσωμικής περιοχής όπου εδράζεται το *ppar γ* έχουν βρεθεί σε αρκετές κακοήθειες.^{44,45} Υπερμεθυλίωση του υποκινητή του *ppar γ* είναι επίσης πιθανό να εξηγήσει την ελάττωση της έκφρασης του PPAR γ στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου.

Το γεγονός ότι παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική αντίστροφη σχέση μεταξύ έκφρασης PPAR γ και COX-2 ήταν ένα σημαντικό και καινούργιο εύρημα της παρούσας μελέτης. Είναι γνωστό ότι υπάρχει μια αρνητική διασταυρούμενη συνομιλία μεταξύ PPAR γ /AP-1 και PPAR γ /NF-κB, όπου ο PPAR γ ανταγωνίζεται με διάφορους μηχανισμούς τη μεταγραφική δράση των AP-1 και NF-κB. Η ελάττωση της έκφρασης του PPAR γ

στα νεοπλασματικά κύτταρα οδηγεί στη μη ανταγωνιστική δράση των NF-κB και AP-1, με αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης της COX-2.

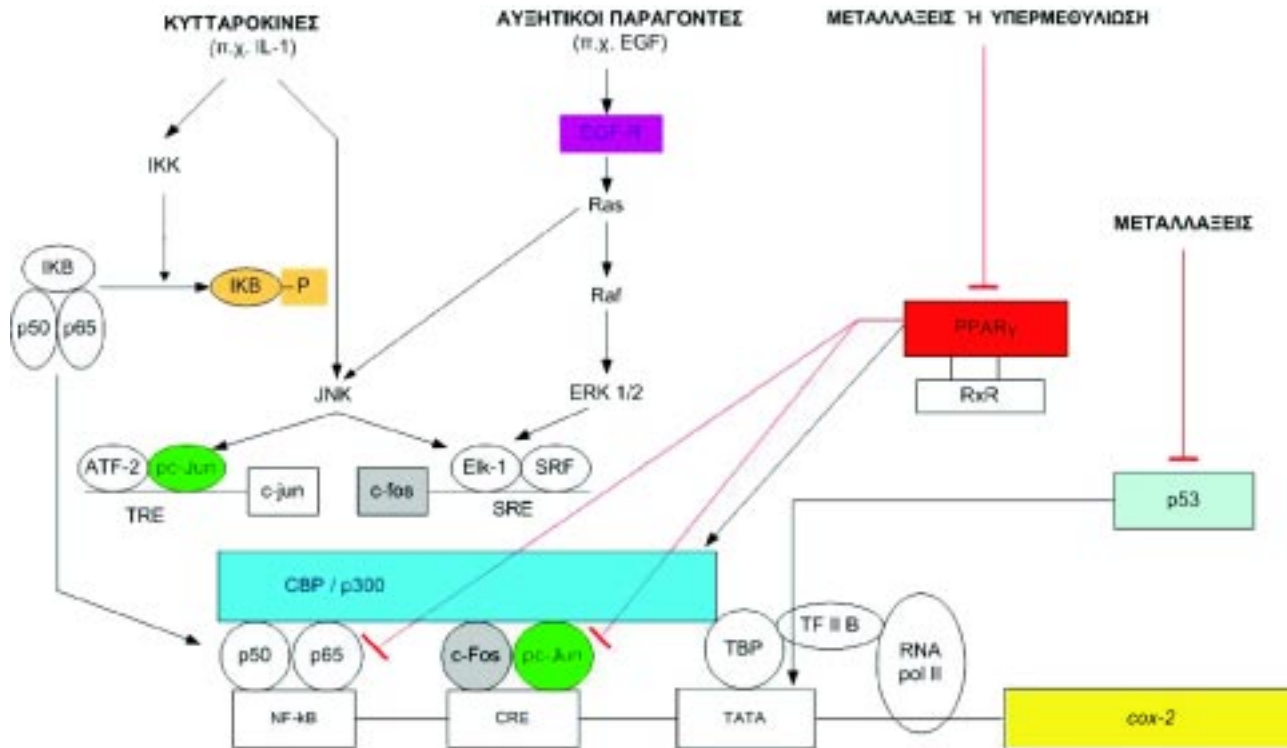
Ο CBP είναι ένας μεταγραφικός συνενεργοποιητής των AP-1 και NF-κB. Το ότι η έκφραση του CBP αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση της έκφρασης της COX-2 καταδεικνύει ότι ο CBP παίζει σπουδαίο ρόλο ως συνενεργοποιητής των NF-κB και AP-1, οδηγώντας στην υπερέκφραση της COX-2 από τα νεοπλασματικά κύτταρα.

Μοριακό μοντέλο υπερέκφρασης της COX-2 στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου

Με βάση τα παραπάνω ευρήματα και τη στατιστική ανάλυση προτείνεται το ακόλουθο μοντέλο, το οποίο εξηγεί την υπερέκφραση της COX-2 στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου (εικ. 4).

Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, στα επιθηλιακά κύτταρα του φυσιολογικού εντέρου ο PPAR γ εκφράζεται σε αυξημένα επίπεδα, ενώ ο NF-κB και ο AP-1 είναι ελάχιστα ενεργοποιημένοι. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η παραγωγή COX-2 από τα κύτταρα αυτά να είναι ελάχιστη. Επιπλέον, στα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 δεν είναι μεταλλαγμένη και καταστέλλει τη μεταγραφή του γονιδίου *cox-2* μέσω ανταγωνισμού με την πρωτεΐνη TBP –η οποία προσδέεται στην αλληλουχία TATA του υποκινητή (TATA-binding protein)– για πρόσδεση στην περιοχή TATA.

Αντίθετα, στα καρκινικά κύτταρα (εικ. 4), κυτταροκίνες οδηγούν σε ενεργοποίηση του μονοπατιού του NF-κB, αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν τον EGFR ο οποίος υπερεκφράζεται, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK–AP-1. Ταυτόχρονα, μεταλλάξεις ή υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *ppar γ* οδηγούν σε ελάττωση της έκφρασης του PPAR γ . Η ενεργοποίηση των NF-κB και AP-1 οδηγεί σε επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου *cox-2*, ενώ η ελάττωση της έκφρασης του PPAR γ αίρει την κατασταλτική του επίδραση στη μεταγραφική ενεργότητα των NF-κB και AP-1, ενισχύοντας περαιτέρω τη μεταγραφή του *cox-2*. Επιπρόσθετα, η υπερέκφραση του μεταγραφικού συνενεργοποιητή CBP αυξάνει τη μεταγραφή του γονιδίου *cox-2*. Τέλος, η μεταλλαγμένη, ανενεργής ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 αδυνατεί να καταστείλει τη μεταγραφή του p53 (όπως μπορεί η φυσιολογική p53 στα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα), ενισχύοντας επίσης τη μεταγραφή του γονιδίου *cox-2*.



Εικόνα 4. Μοριακό μοντέλο που εξηγεί την υπερέκφραση της COX-2 στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου (λεπτομέρειες στο κείμενο).

Κλινική σημασία του μοντέλου – Εφαρμογές στη χημειοπροφύλαξη και στην αντικαρκινική θεραπεία

Το μοντέλο που περιγράφηκε έχει σημαντικές κλινικές εφαρμογές και εξηγεί αρκετές παρατηρήσεις που έχουν γίνει για την καρκινογένεση του παχέος εντέρου.

Όσον αφορά στη χημειοπροφύλαξη, το μοντέλο αυτό εξηγεί την προφυλακτική δράση των ΜΣΑΦ και των θειαζολιδινεδιονών ενάντια στην καρκινογένεση. Συγκεκριμένα, τα ΜΣΑΦ και η ασπιρίνη αναστέλλουν τόσο την COX-2 όσο και την ενεργοποίηση του μονοπατιού του NF-κΒ, επεμβαίνοντας στη φωσφορυλίωση της IκB-α σε pIκB-α. Μεγάλες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει τη χημειοπροφυλακτική δράση των ΜΣΑΦ και ιδιαίτερα των εκλεκτικών COX-2 αναστολέων, με τίμημα, όμως, την αυξημένη επίπτωση σοβαρών καρδιαγγειακών ανεπιθύμητων ενεργειών που σχετίζονται με τη χορήγηση των τελευταίων.⁴⁶

Σύμφωνα με το προαναφερθέν μοντέλο, οι θειαζολιδινεδιόνες, γνωστά αντιδιαβητικά φάρμακα τα οποία είναι αγωνιστές του PPARγ, μπορούν να ελαττώσουν την έκφραση της COX-2. Πράγματι, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι αγωνιστές του PPARγ μπορεί να έχουν

χημειοπροφυλακτική δράση, όχι μόνο στον καρκίνο του παχέος εντέρου αλλά και σε άλλες κακοήθειες.^{47,48} Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, επειδή, αντίθετα με τους εκλεκτικούς COX-2 αναστολείς, οι αγωνιστές του PPARγ βελτιώνουν δείκτες που σχετίζονται με υψηλό κίνδυνο καρδιαγγειακών επεισοδίων και αθηροσκλήρυνσης.

Όσον αφορά στις σύγχρονες αντικαρκινικές θεραπείες, το παραπάνω μοντέλο εξηγεί, επίσης, το σημαντικό ρόλο φαρμάκων που επεμβαίνουν στη δράση του EGFR, ο οποίος –όπως αναφέρθηκε– υπερεκφράζεται στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου. Το cetuximab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ενάντια στον EGFR, το οποίο αναστέλλει τη δράση του τελευταίου. Το φάρμακο αυτό έχει ήδη εγκριθεί για τη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου.⁴⁹

Τέλος, το προτεινόμενο μοντέλο προβλέπει ένα σημαντικό ρόλο για φάρμακα, τα οποία επεμβαίνουν στην ενεργοποίηση του NF-κΒ και του AP-1. Τέτοιες θεραπείες θα μπορούσαν, είτε από μόνες τους είτε σε συνδυασμό με τα ήδη υπάρχοντα φάρμακα, να βελτιώσουν περισσότερο την επιβίωση ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου.

ABSTRACT

**Contribution of AP-1/PPAR γ /NF- κ B cross talk to COX-2 overexpression
in colon adenocarcinomas**

P.A. KONSTANTINOPOULOS,^{1*} G.P. VANDOROS,^{2,3*} M. GKERMPEI,² G. SOTIROPOULOU-BONIKOU,³
A.G. PAPAASSILIOU^{1,4}

¹Department of Biochemistry, School of Medicine, University of Patras, Patras, ²Department of Pathology, Eghion General Hospital, Eghion, ³Department of Anatomy and Histology-Embryology, School of Medicine, University of Patras, Patras, ⁴Department of Biological Chemistry, Medical School, University of Athens, Athens, Greece

*P.A. Konstantinopoulos and G.P. Vandoros contributed equally to this work

Archives of Hellenic Medicine 2007, 24(2):155-169

OBJECTIVE The exact role of activator protein-1 (AP-1), nuclear factor- κ B (NF- κ B) and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in the development of colon cancer remains to be elucidated. *Cox-2* promoter contains transcriptional regulatory elements for various transcription factors including AP-1 and NF- κ B. This study evaluated the expression of c-FOS, phosphorylated-active c-JUN (pc-JUN), phosphorylated I κ B- α , a signaling intermediate of the NF- κ B pathway (pI κ B- α), CBP (a known AP-1, NF- κ B and PPAR γ transcriptional coactivator), epidermal growth factor receptor (EGFR), p53, PPAR γ and COX-2 in normal colonic epithelial cells and colon adenocarcinoma cells. **METHOD** Immunohistochemical methodology was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded sections from 60 patients with colon adenocarcinoma. A “molecular profile” was created for each patient for both normal colonic epithelial cells and colon adenocarcinoma cells. Relationships between transcription factors and downstream molecular targets were evaluated by Spearman’s rho correlation coefficient and all results were further validated by nonparametric Kruskal-Wallis test. **RESULTS** pI κ B- α was overexpressed in 81.7% of the adenocarcinomas as compared to adjacent normal colon and correlated positively with COX-2 (Spearman’s rho=0.513, P<0.001). PPAR γ was down-regulated in 77.3% of the adenocarcinomas and correlated inversely with COX-2 (Spearman’s rho=-0.412, P=0.001) and pI κ B- α (Spearman’s rho=-0.444, P<0.001). CBP was induced in 50% of the cases and its expression correlated positively with COX-2 (Spearman’s rho=0.461, P<0.001). Induction of EGFR and pc-JUN was detected in 41.7% and 43.3% of the cases, respectively, and their expression correlated positively with COX-2 (Spearman’s rho=0.444, P<0.001 and Spearman’s rho=0.431, P<0.001, respectively). Moreover, p53 expression correlated positively with COX-2 (Spearman’s rho=0.435, P=0.004). **CONCLUSIONS** The results of this study indicate that activation of the EGFR-MAPK-AP-1 and NF- κ B pathways and down-regulation of PPAR γ expression are important events in colon carcinogenesis. The correlations between AP-1, NF- κ B, PPAR γ and COX-2 lead to the proposal of a dynamic molecular model to explain COX-2 induction in colon adenocarcinomas. The clinical implications of this model in chemoprophylaxis and treatment of colorectal cancer are discussed.

Key words: Colon cancer, Cross talk, Cyclooxygenase-2, Molecular-targeted anticancer therapies, Transcription factors

Βιβλιογραφία

1. SHAULIAN E, KARIN M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 2001, 20:2390-2400
2. KARIN M, LIU Z, ZANDI E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997, 2:240-246
3. KYRIAKIS JM, AVRUCH J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001, 81:807-869
4. KARIN M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1995, 270:16483-16486
5. WHITMARSH AJ, DAVIS RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 1996, 74:589-607
6. PAPAASSILIOU AG, TREIER M, BOHMANN D. Intramolecular signal transduction in c-Jun. *EMBO J* 1995, 14:2014-2019
7. ARIAS J, ALBERTS AS, BRINDLE P, CLARET FX, SMEAL T, KARIN M ET AL. Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* 1994, 370:226-229

8. KARAMOUZIS MV, PAPADAS T, VARAKIS I, SOTIROPOULOU-BONIKOU G, PAPAVALSILIOU AG. Induction of the CBP transcriptional co-activator early during laryngeal carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002, 128:135–140
9. SHAULIAN E, KARIN M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 2002, 4:131–136
10. EFERL R, WAGNER EF. AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2003, 3:859–868
11. VAN DAM H, CASTELLAZZI M. Distinct roles of Jun, Fos and Jun: ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* 2001, 20:2453–2464
12. HIRANO F, TANADA H, MAKINO Y, OKAMOTO K, HIRAMOTO M, HANDA H ET AL. Induction of the transcription factor AP-1 in cultured human colon adenocarcinoma cells following exposure to bile acids. *Carcinogenesis* 1996, 17:427–433
13. GLINGHAMMAR B, HOLMBERG K, RAFTER J. Effects of colonic luminal components on AP-1-dependent gene transcription in cultured human colon carcinoma cells. *Carcinogenesis* 1999, 20:969–976
14. CHEN A, DAVIS BH, BISSONNETTE M, SCAGLIONE-SEWELL B, BRASITUS TA. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) stimulates activator protein-1-dependent Caco-2 cell differentiation. *J Biol Chem* 1999, 274:35505–35513
15. SUBBARAMAIAH K, DANNENBERG AJ. Cyclooxygenase 2: A molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends Pharmacol Sci* 2003, 24:96–102
16. DUBOIS RN, ABRAMSON SB, CROFFORD L, GUPTA RA, SIMON LS, VAN DE PUTTE LB ET AL. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998, 12:1063–1073
17. KOSAKA T, MIYATA A, IHARA H, HARA S, SUGIMOTO T, TAKEDA O ET AL. Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur J Biochem* 1994, 221:889–897
18. GUO YS, HELLMICH MR, WEN XD, TOWNSEND CM. Activator protein-1 transcription factor mediates bombesin-stimulated cyclooxygenase-2 expression in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2001, 276:22941–22947
19. SUBBARAMAIAH K, NORTON L, GERALD W, DANNENBERG AJ. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: Evidence for involvement of AP-1 and PEA3. *J Biol Chem* 2002, 277:18649–18657
20. SUBBARAMAIAH K, COLE PA, DANNENBERG AJ. Retinoids and carnosol suppress cyclooxygenase-2 transcription by CREB-binding protein/p300-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Res* 2002, 62:2522–2530
21. BAEUERLE PA, BALTIMORE D. NF-kappa B: Ten years after. *Cell* 1996, 87:13–20
22. KOJIMA M, MORISAKI T, IZUHARA K, UCHIYAMA A, MATSUNARI Y, KATANO M ET AL. Lipopolysaccharide increases cyclo-oxygenase-2 expression in a colon carcinoma cell line through nuclear factor-kappa B activation. *Oncogene* 2000, 19:1225–1231
23. LIU W, REINMUTH N, STOELTZING O, PARIKH AA, TELLEZ C, WILLIAMS S ET AL. Cyclooxygenase-2 is up-regulated by interleukin-1 beta in human colorectal cancer cells via multiple signaling pathways. *Cancer Res* 2003, 63:3632–3636
24. RAYET B, GELINAS C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 1999, 18:6938–6947
25. SARRAF P, MUELLER E, JONES D, KING FJ, DEANGELO DJ, PARTRIDGE JB ET AL. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat Med* 1998, 4:1046–1052
26. SUBBARAMAIAH K, LIN DT, HART JC, DANNENBERG AJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem* 2001, 276:12440–12448
27. YANG WL, FRUCHT H. Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 2001, 22:1379–1383
28. SU CG, WEN X, BAILEY ST, JIANG W, RANGWALA SM, KEILBAUGH SA ET AL. A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest* 1999, 104:383–389
29. BLANQUART C, BARBIER O, FRUCHART JC, STAELS B, GLINEUR C. Peroxisome proliferator-activated receptors: Regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003, 85:267–273
30. LAW RE, MEEHAN WP, XI XP, GRAF K, WUTHRICH DA, COATS W ET AL. Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia. *J Clin Invest* 1996, 98:1897–1905
31. CHUNG SW, KANG BY, KIM SH, PAK YK, CHO D, TRINCHIERI G ET AL. Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* 2000, 275:32681–32687
32. SUBBARAMAIAH K, ALTORKI N, CHUNG WJ, MESTRE JR, SAMPAT A, DANNENBERG AJ. Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *J Biol Chem* 1999, 274:10911–10915
33. LEUNG WK, TO KF, NG YP, LEE TL, LAU JY, CHAN FK ET AL. Association between cyclo-oxygenase-2 overexpression and missense p53 mutations in gastric cancer. *Br J Cancer* 2001, 84:335–339
34. RISTIMAKI A, SIVULA A, LUNDIN J, LUNDIN M, SALMINEN T, HAGLUND C ET AL. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 2002, 62:632–635
35. SOSLOW RA, DANNENBERG AJ, RUSH D, WOERNER BM, KHAN KN, MASFERRER J ET AL. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 2000, 89:2637–2645
36. MAJIMA M, AMANO H, HAYASHI I. Prostanoid receptor signaling relevant to tumor growth and angiogenesis. *Trends Pharmacol Sci* 2003, 24:524–529
37. SHENG H, SHAO J, MORROW JD, BEAUCHAMP RD, DUBOIS RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998, 58:362–366
38. YIN MJ, YAMAMOTO Y, GAYNOR RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* 1998, 396:77–80
39. LUO JL, MAEDA S, HSU LC, YAGITA H, KARIN M. Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell* 2004, 6:297–305

40. DIN FV, DUNLOP MG, STARK LA. Evidence for colorectal cancer cell specificity of aspirin effects on NF kappa B signaling and apoptosis. *Br J Cancer* 2004, 91:381–388
41. LU T, BURDELYA LG, SWIATKOWSKI SM, BOIKO AD, HOWE PH, STARK GR ET AL. Secreted transforming growth factor beta2 activates NF-kappaB, blocks apoptosis, and is essential for the survival of some tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:7112–7117
42. GIRNUN GD, SMITH WM, DRORI S, SARRAF P, MUELLER E, ENG C ET AL. APC-dependent suppression of colon carcinogenesis by PPARgamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:13771–13776
43. SARRAF P, MUELLER E, SMITH WM, WRIGHT HM, KUM JB, AALTONEN LA ET AL. Loss-of-function mutations in PPAR gamma associated with human colon cancer. *Mol Cell* 1999, 3:799–804
44. SMITH WM, ZHOU XP, KUROSE K, GAO X, LATIF F, KROLL T ET AL. Opposite association of two PPARG variants with cancer: Overrepresentation of H449H in endometrial carcinoma cases and underrepresentation of P12A in renal cell carcinoma cases. *Hum Genet* 2001, 109:146–151
45. ZHOU XP, SMITH WM, GIMM O, MUELLER E, GAO X, SARRAF P ET AL. Over-representation of PPARgamma sequence variants in sporadic cases of glioblastoma multiforme: Preliminary evidence for common low penetrance modifiers for brain tumour risk in the general population. *J Med Genet* 2000, 37:410–414
46. KONSTANTINOPOULOS PA, LEHMANN DF. The cardiovascular toxicity of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors: Comparisons, contrasts, and aspirin confounding. *J Clin Pharmacol* 2005, 45:742–750
47. YANG WL, FRUCHT H. Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 2001, 22:1379–1383
48. SABICHI AL, SUBBARAYAN V, LLANSA N, MENTER DG. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma suppresses cyclooxygenase-2 expression in human prostate cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004, 13:1704–1709
49. CUNNINGHAM D, HUMBLET Y, SIENA S, KHAYAT D, BLEIBERG H, SANTORO A ET AL. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004, 351:337–345

Corresponding author:

A.G. Papavassiliou, Department of Biological Chemistry, Medical School, University of Athens, 75 M. Asias street, GR-115 27 Goudi, Athens, Greece
e-mail: gpapavas@pat.forthnet.gr & papavas@med.uoa.gr