

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΣΤΗ ΒΑΣΙΚΗ ΕΠΙΣΤΗΜΗ
ΠΑΘΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΟΜΑΤΟΣ**

**Ο ΟΓΚΟΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ
ΜΟΡΙΟΥ STAT3 ΣΤΟ ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ
ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΤΟΣ**

**ΙΩΑΝΝΗΣ ΓΚΟΥΒΕΡΗΣ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΟΣ-MSc**

Αθήνα 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγήτρια (επιβλέπουσα)	Αλεξάνδρα Σκλαβούνου
Αναπληρωτής Καθηγητής	Νικόλαος Νικητάκης
Επίκουρος Καθηγητής	Γεώργιος Ρασιδάκης

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγήτρια	Κιτράκη Ευθυμία
Καθηγητής	Πατσούρης Ευστράτιος
Καθηγήτρια	Σκλαβούνου Αλεξάνδρα
Αναπληρωτής Καθηγητής	Καβαντζάς Νικόλαος
Αναπληρωτής Καθηγητής	Λάζαρης Ανδρέας
Αναπληρωτής Καθηγητής	Νικητάκης Νικόλαος
Επίκουρος Καθηγητής	Ρασιδάκης Γεώργιος

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Οδοντιατρικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει ότι αποδέχεται τη γνώμη του συγγραφέα.

Οργανισμός Πανεπιστημίου Αθηνών, Άρθρο 202, παρ. 2, Ν. 5343

Το πρακτικό μέρος αυτής της μελέτης εκπονήθηκε στο Α΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Το περιεχόμενο της μελέτης βασίστηκε σε προηγούμενη ερευνητική πρόταση του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νικόλαου Νικητάκη, η οποία αναπτύχθηκε, συμπληρώθηκε και εξελίχθηκε προκειμένου να αποτελέσει το τελικό αντικείμενο της διατριβής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της διατριβής, Καθηγήτρια Στοματολογίας κα Αλεξάνδρα Σκλαβούνου, η οποία με παρότρυνε να ασχοληθώ με τη συγκεκριμένη μελέτη και με καθοδήγησε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νικόλαο Νικητάκη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γιώργο Ρασιδάκη που συμμετείχαν στην Τριμελή Επιτροπή, για τις εύστοχες παρατηρήσεις και συμβουλές.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη σύζυγό μου Νικολέττα και στους γονείς μου, που μου έδιναν δύναμη και με στήριζαν κάθε στιγμή.



Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ . Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Περιεχόμενα

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	11
Εισαγωγή.....	13
Οι πρωτεΐνες STAT.....	15
Δομή των πρωτεϊνών STAT.....	16
Η ενεργοποίηση της σηματοδοτικής ακολουθίας των JAK/STAT	17
Ρύθμιση της δραστηριότητας των STATs.....	18
Μεταφορά των STAT στον πυρήνα	18
STATs και γονιδιακή ρύθμιση	19
Αρνητικοί μηχανισμοί ρύθμισης της STAT σηματοδότησης	20
1. Protein Tyrosine Phosphatases (PTPs)	20
2. PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT, Πρωτεϊνικοί Αναστολείς των Ενεργοποιημένων STAT)	21
3. Η οικογένεια των SOCS (suppressor of cytokine signalling, Καταστολείς της Μετάδοσης Σημάτων των Κυτταροκινών) αναστολέων.	22
Η συμβολή των STAT στην ογκογένεση.....	23
Η πρωτεΐνη STAT σε συμπαγείς όγκους	25
Η πρωτεΐνη STAT σε μη λευχαιμικές αιμοποιητικές κακοήθειες.....	26
Η πρωτεΐνη STAT στη λευχαιμία.....	27
Συμπεράσματα για το ρόλο των STAT στην ογκογένεση.....	29
Οι πρωτεΐνες MAPK.....	30
Εισαγωγή.....	30
Ενεργοποίηση των MAPK	31
Οικογένειες MAPK – ERK, JNK και p38	32
ERK1/2.....	32
Ανώτερα μονοπάτια σηματοδότησης	33
Κατώτερα μονοπάτια σηματοδότησης.....	34
Ο ρόλος της ERK στην καρκινογένεση.	35

JNK	38
Ανώτερα μονοπάτια σηματοδότησης	38
Κατώτερα μονοπάτια σηματοδότησης.....	39
Ο ρόλος της JNK στην καρκινογένεση	40
P38	42
Ανώτερα μονοπάτια σηματοδότησης	42
Κατώτερα μονοπάτια σηματοδότησης.....	43
Ο ρόλος της p38 στην καρκινογένεση	44
Ο ρόλος των STAT και MAPK στον καρκίνο κεφαλής- τραχήλου.	46
Ο ρόλος των STAT στον καρκίνο κεφαλής- τραχήλου. Αλληλεπίδραση με άλλα μόρια. ...	46
EGFR και STAT στον καρκίνο κεφαλής- τραχήλου.....	46
Η οικογένεια Ras στον καρκίνο κεφαλής- τραχήλου.....	47
Η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών STAT στον καρκίνο κεφαλής-τραχήλου.	48
Κυτταροκίνες και Jaks	49
Η ενεργοποίηση των MAPK στον καρκίνο κεφαλής-τραχήλου.	51
Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης STAT και MAPK στον καρκίνο.	56
ERK- STAT	56
JNK-STAT	58
P38-STAT	60
Συμπεράσματα για το ρόλο των STAT και MAPK στον καρκίνο.	62
Στόχευση των STAT3 και MAPK για την πρόληψη και αντιμετώπιση του καρκίνου	64
Προσεγγίσεις σχετικές με την αναστολή των STATs.....	64
Έμμεσοι αναστολείς της STAT σηματοδότησης.	64
Άμεσοι αναστολείς των STAT	65
Μη πεπτιδικοί αναστολείς του SH2 τομέα των STATs.....	67
Αναστολείς των N τομέων των STAT.	68
Προσεγγίσεις απέναντι στην αναστολή των MAPKs.	70

Φάρμακα που στοχεύουν στο μονοπάτι Ras / Raf / MEK / ERK υπό κλινική δοκιμή	70
Συμπέρασμα.....	74
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	75
ΣΚΟΠΟΣ	77
Κυτταρικές σειρές και φαρμακευτικοί χειρισμοί	78
<i>In vitro</i> μετρήσεις του αριθμού των κυττάρων και της βιωσιμότητας	79
Απομόνωση ολικής πρωτεΐνης και ανάλυση κατά Western	79
Αποσιώπηση (gene silencing) και παροδική διαμόλυνση (transient transfection)	84
Μέθοδος ανοσοϊστοχημείας	85
Αξιολόγηση της Ανοσοϊστοχημικής χρώσης.....	86
Στατιστική ανάλυση.	88
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	89
α) Πειράματα σε κυτταροκαλλιέργειες.....	91
ERK1/2.....	91
Επίδραση του αναστολέα U0126 των Erk1/2, στην έκφραση και ενεργοποίηση της πρωτεΐνης STAT3 και του μορίου-στόχου Cyclin-D1.	91
Επιδράσεις του αναστολέα U0126 στην κυτταρική αύξηση και βιωσιμότητα	92
Επιδράσεις της siRNA σίγασης των Erk1 / 2 στην έκφραση και ενεργοποίηση της πρωτεΐνης STAT3 και του μορίου-στόχου Cyclin-D1.	94
Επίδραση της ειδικής σίγασης των Erk1/2 στην κυτταρική αύξηση και βιωσιμότητα.	95
Επίδραση της Erk1 / 2 επαγωγής στην έκφραση και ενεργοποίηση των STAT3 και Cyclin-D1.....	96
Επίδραση της Erk1/2 επαγωγής στην κυτταρική αύξηση και βιωσιμότητα.	96
JNK1/2.....	98
Επίδραση του αναστολέα SP600125 των JNK1/2, στην έκφραση και ενεργοποίηση της πρωτεΐνης STAT3 και του μορίου-στόχου Cyclin-D1.....	98
Επιδράσεις του αναστολέα SP600125 στην κυτταρική αύξηση και βιωσιμότητα.....	99

Επιδράσεις της siRNA σίγασης των JNK 1/2 στην έκφραση και ενεργοποίηση των STAT3 και Cyclin-D1.....	101
Επίδραση της ειδικής σίγασης των JNK1/2 στην κυτταρική αύξηση και βιωσιμότητα.....	101
P38	105
Επίδραση του αναστολέα SB203580 της P38, στην έκφραση και ενεργοποίηση της πρωτεΐνης STAT3 και του μορίου-στόχου Cyclin-D1.....	105
Επιδράσεις του αναστολέα SB203580 στην κυτταρική αύξηση και βιωσιμότητα...	106
Phospho-Stat3 (Tyrosine)	107
Phospho-Stat3 (Serine).....	109
Phospho-P38	110
Phospho c-jun.....	111
Phospho-ERK1/2.....	112
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	115
Ο ρόλος των πρωτεϊνών STAT3 και MAPK στον καρκίνο κεφαλής-τραχήλου.....	117
ERK1/2.....	117
JNK	120
p38	123
Ο ρόλος της STAT3 στον καρκίνο κεφαλής-τραχήλου. Η σημασία της φωσφορυλίωσης στη σερίνη και τυροσίνη.....	124
Αλληλεπίδραση της οδού STAT3 με τις MAPK.....	126
α) Αλληλεπίδραση ERK1/2 με STAT3.....	127
β) Αλληλεπίδραση JNK με STAT3	128
γ) Αλληλεπίδραση p38 με STAT3.....	129
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	131
Περίληψη / Summary.....	132
Βιβλιογραφία.....	141
Παράρτημα Ανοσοϊστοχημείας.....	173

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής- τραχήλου (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC), αντιπροσωπεύει έναν από τους έξι πιο κοινούς καρκίνους στον κόσμο, με περίπου περισσότερες από 500.000 νέες περιπτώσεις ετησίως (1) και 11,000 θανάτους κάθε έτος μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες(2). Παρά την πρόοδο στην κατανόηση, στην πρόληψη και στη θεραπεία άλλων τύπων καρκίνου, το πενταετές ποσοστό επιβίωσης μετά τη διάγνωση για HNSCC παραμένει χαμηλό, περίπου στο 50%, το οποίο είναι αρκετά χαμηλότερο από το αντίστοιχο ποσοστό για άλλους καρκίνους, όπως του παχέος εντέρου του τραχήλου της μήτρας και του μαστού(2). Η περιορισμένη επιβίωση των ασθενών με HNSCC οφείλεται πιθανώς στο ότι ένας μεγάλος αριθμός των ασθενών, προσέρχονται σε προχωρημένο στάδιο της νόσου, ενώ παράλληλα παρατηρείται έλλειψη των κατάλληλων δεικτών για την έγκαιρη ανίχνευση του, αλλά και αποτυχία στην ανταπόκριση στη χορηγούμενη χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία(3,4). Η φτωχή πρόγνωση μπορεί επίσης να αντανακλά στο γεγονός ότι ενώ έχουν σαφώς αναγνωριστεί πολλοί από τους παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την ανάπτυξη HNSCC, όπως το οινόπνευμα και η χρήση καπνού ή areca (betel) nut καθώς και η λοίμωξη με τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV)(3-5), υπάρχει ακόμα ελλιπής γνώση για τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην εξέλιξη αυτού του τύπου καρκίνου.

Πρόσφατες έρευνες έχουν αυξήσει εντυπωσιακά την κατανόηση των βασικών μηχανισμών που ελέγχουν τη φυσιολογική αύξηση των κυττάρων και έχουν ενισχύσει την ικανότητά να ερευνηθεί η φύση των βιολογικών διαδικασιών που οδηγούν στον καρκίνο. Είναι πια γνωστό ότι η πλειοψηφία των καρκινικών κυττάρων προέρχεται από την κλωνική ανάπτυξη και την παρεκκλίνουσα αύξηση ενός βλαστικού κυττάρου ή από λίγα ογκοκύτταρα που έχουν αποκτήσει την ικανότητα αυτόνομης αύξησης (6). Τα φυσιολογικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται μόνο όταν είναι απαραίτητο, ως αποτέλεσμα μιας λεπτής ισορροπίας μεταξύ παραγόντων προαγωγής ή αναστολής της αύξησης αλλά και βιοχημικών σημάτων που παρέχονται από γειτονικά κύτταρα και κυκλοφορούντα μόρια. Τα καρκινικά κύτταρα παρακάμπτουν αυτούς τους ελεγκτικούς μηχανισμούς και ακολουθούν ένα εσωτερικό πρόγραμμα για την αναπαραγωγή τους. Αυτά τα κύτταρα αυξάνονται συνήθως κατά τρόπο απεριόριστο, και με την πάροδο του χρόνου, μπορούν να

αγνοούν τα προγράμματα κυτταρικού θανάτου και με αυτόν τον τρόπο να γίνονται αθάνατα. Επιπρόσθετα ενισχύουν τον ανεφοδιασμό τους σε οξυγόνο και θρεπτικές ουσίες με το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων και αποκτούν τη δυνατότητα να μεταναστεύουν από την αρχική περιοχή τους, να εισβάλουν στους κοντινούς ιστούς, και να δημιουργούν μεταστάσεις σε απόμακρες ανατομικές περιοχές. Αυτές οι προοδευτικές αλλαγές στην κυτταρική συμπεριφορά, από τον ελαφρώς απορρυθμισμένο πολλαπλασιασμό στην πλήρη κακοήθεια, είναι το αποτέλεσμα της συσσώρευσης των γενετικών και επιγενετικών αλλαγών σε ένα μικρό αριθμό γονιδίων. Μεταξύ αυτών, δύο κατηγορίες γονιδίων, τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, παίζουν σημαντικό ρόλο στην προώθηση της καρκινικής αύξησης (7). Τα ενεργοποιημένα ογκογονίδια και η αδρανοποίηση λόγω μεταλλάξεων των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, προωθούν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων(7.8).

Μια πρόσφατη υπόθεση αναφέρει ότι διάφορα γεγονότα ενεργοποίησης και αδρανοποίησης προκύπτουν στα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια για την έναρξη και την εξέλιξη πολλών τύπων καρκίνων. Στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής- τραχήλου, αυτές οι γενετικές αλλαγές εμφανίζονται με μια διαδικασία πολλαπλών βημάτων (9). Κατά συνέπεια, εάν ήταν δυνατόν να επισημανθούν μοριακοί δείκτες που αντιπροσωπεύουν την πρόωμη εμφάνιση του καρκίνου, θα ήταν δυνατό να προσδιοριστούν οι ασθενείς υψηλού κινδύνου για HNSCC, δηλαδή εκείνοι των οποίων οι βλάβες εξελίσσονται μέσω μιας προκαρκινικής φάσης. Επιπλέον, η ύπαρξη των μοριακών δεικτών θα ήταν σημαντική για τον έλεγχο υποτροπής του καρκίνου, καθώς επίσης και για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των νέων σχημάτων χημειοθεραπείας ή ακτινοθεραπείας. Σαφώς, η δυνατότητα να αποκτηθεί γνώση για τα σύνθετα μοριακά γεγονότα που οδηγούν στην ανάπτυξη HNSCC, θα έχει σημαντικές επιπτώσεις στην έγκαιρη διάγνωση, στη θεραπεία, και στην πρόγνωση των ασθενών με HNSCC.

Πρόσφατα έχει υπάρξει μια έκρηξη στη γνώση σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο γίνεται η ροή πληροφοριών μέσω των μεσοκυττάρων σημάτων, η οποία ρυθμίζει τη διαφοροποίηση, την επιβίωση, το μεταβολισμό, την κινητικότητα και την κανονική και παρεκκλίνουσα αύξηση των κυττάρων. Ακολούθως θα γίνει αναφορά στην επίδραση της εκτροπής των πρωτεϊνών STAT και ειδικά της STAT3 στον καρκίνο

κεφαλής-τραχήλου καθώς και των μορίων που συνδέονται με τη σηματοδότηση των παραπάνω πρωτεϊνών.

Οι πρωτεΐνες STAT

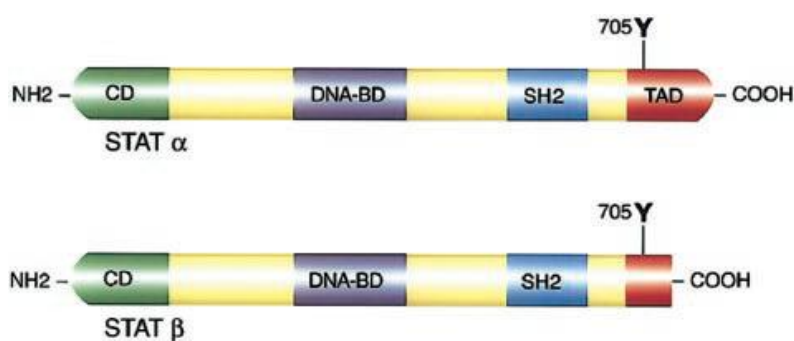
Οι πρωτεΐνες STAT (signal transducers and activators of transcription) έχουν αναγνωρισθεί τα τελευταία χρόνια και ονομάστηκαν έτσι λόγω του διπλού τους ρόλου ως μεταγωγείς σημάτων και ενεργοποιητές μεταγραφής. Αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που βρίσκονται στο κύτταρο σε λανθάνουσα μορφή και γίνονται ενεργοί ανταποκρινόμενοι σε ερεθίσματα από κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες και πεπτίδια (10). Οι υποδοχείς κυτταροκινών σχετίζονται με μέλη των Janus κινασών (JAK), που ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών της τυροσινικής κινάσης (11). Αντίθετα οι υποδοχείς αυξητικών παραγόντων (πχ EGFR) έχουν ενδογενή δράση τυροσινικής κινάσης. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων μέσω των αντιστοιχών μορίων προσδετών έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση μορίων τυροσίνης μέσα στον υποδοχέα, δημιουργώντας θέσεις πρόσδεσης για τα μέλη της οικογένειας STAT μέσω των SH2 περιοχών τους. Η διάρκεια και ο βαθμός γονιδιακής ενεργοποίησης ρυθμίζεται κάτω από αυστηρές συνθήκες από μια σειρά ανασταλτικών παραγόντων όπως οι πρωτεΐνες PIAS και SOCS(10).

Στα θηλαστικά έχουν ταυτοποιηθεί επτά μέλη της οικογένειας STAT: STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5 a και b και STAT-6, τα οποία όταν ενεργοποιούνται μεταβαίνουν στον πυρήνα και επάγουν τη γονιδιακή μεταγραφή δεσμευόμενα σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA στους υποκινητές των αντίστοιχων γονιδίων (12, 13). Παρά το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες STAT αρχικά χαρακτηρίστηκαν ως στόχοι των JAKs, είναι πλέον γνωστό πως συγκεκριμένα ερεθίσματα μπορούν να τις ενεργοποιήσουν ανεξάρτητα από τις κινάσες JAK (14). Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι οι νευροτροφίνες μπορούν να ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση στους νευρώνες μέσω του STAT-5 με μηχανισμό ανεξάρτητο της ενεργοποίησης της κινάσης JAK-2 (14).

Δομή των πρωτεϊνών STAT

Η διαμόρφωση των πρωτεϊνών STAT έγινε κατανοητή μέσω σύγκρισης αλληλουχιών και μελέτες μεταλλαξογένεσης. Σύμφωνα με αυτές η καρβοξυτελική περιοχή είναι μια περιοχή ενεργοποίησης (TAD: transactivation domain), η SH2 περιοχή προηγείται της TAD και το κατάλοιπο τυροσίνης που υφίσταται φωσφορυλίωση βρίσκεται μεταξύ των περιοχών SH2 και TAD (15-17). Επίσης, η περιοχή πρόσδεσης DNA βρίσκεται στο κέντρο του μορίου. Αυτά τα συμπεράσματα επιβεβαιώθηκαν και επεκτάθηκαν με κρυσταλλογραφικές μελέτες του 'πυρήνα' (core) του μορίου STAT, που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 130-710(18).

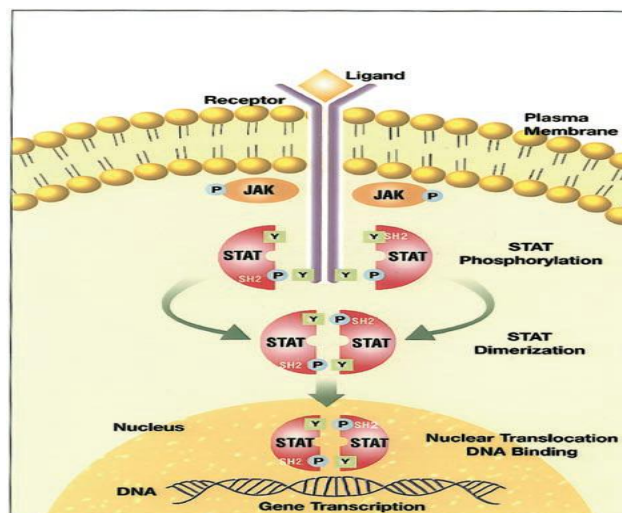
Ξεκινώντας από το κατάλοιπο 130, υπάρχει μια ελικοειδής περιοχή, η οποία είναι υπεύθυνη για πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (10). Η περιοχή πρόσδεσης DNA, που βρίσκεται μεταξύ των καταλοίπων 320 και 490, περιλαμβάνει β-πτυχωτά φύλλα. Επίσης, μεταξύ των καταλοίπων 490 και 580, υπάρχει μια περιοχή σύνδεσης (linker) η οποία παρουσιάζει υψηλό βαθμό συντήρησης, αλλά η λειτουργία της είναι άγνωστη (10). Όπως έχει δειχθεί, μεταλλαγές σε αυτή την περιοχή επηρεάζουν τη σταθερότητα πρόσδεσης στο DNA, η οποία οδηγεί σε γρήγορο ρυθμό αποδέσμευσης από το DNA και σε μη ικανότητα ενεργοποίησης γονιδίων μετά από επαγωγή με ιντερφερόνη γ (IFN-γ)(19). Μια κλασική SH2 περιοχή, η οποία εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων 580 και 680, ακολουθείται από ένα κατάλοιπο τυροσίνης (~700) που φωσφορυλιώνεται. Η SH2 περιοχή είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση υποδοχέα και το διμερισμό των STAT. Η καρβοξυτελική περιοχή TAD έχει μήκος 38-200 αμινοξέα σε ποικίλες πρωτεΐνες STAT και η δομή της είναι άγνωστη (10) (Εικ 1).



Εικόνα 1. Δομή των STAT. Benekli M. et al. *Blood*. 2003;101:2940-2954

Η ενεργοποίηση της σηματοδοτικής ακολουθίας των JAK/STAT

Οι πρωτεΐνες STAT συνδέονται σε φωσφορυλιωμένες τυροσίνες στην κυτταροπλασματική πλευρά του υποδοχέα gp130 και διμερίζονται μετά από φωσφορυλίωση σε τυροσινικά υπολείμματα από τις Jak κινάσες. Μετά από τον διμερισμό, οι STATs μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου και ενεργοποιούν γονίδια-στόχους (Εικ.2). Μέχρι στιγμής, έχουν αναγνωριστεί επτά STAT πρωτεΐνες (STAT1 έως 4, 5a, 5b και 6) στους ανθρώπους και στους επίμυες (20). Η σύνδεση της IL-6 με τον υποδοχέα gp130 επάγει την ενεργοποίηση των STAT1, 3 και 5. Οι STAT πρωτεΐνες δεν ανευρίσκονται σε μονοκύτταρους οργανισμούς και η εμφάνισή τους ίσως σχετίζεται με την εξέλιξη των πολυκύτταρων οργανισμών. Οι STATs είναι πρωτεΐνες με αρκετά διατηρημένη δομή. Αποτελούνται από 750-850 αμινοξέα (STAT1, 750 αμινοξέα και STAT3, 770 αμινοξέα) και το μόριο τους αποτελείται από αρκετές δομικές περιοχές με διαφορετική λειτουργία, όπως μία περιοχή πρόσδεσης στο DNA στο μέσο του μορίου και μία περιοχή ενεργοποίησης (transactivation) στο καρβόξυ-τελικό άκρο (21-23).



Εικόνα 2 Η ενεργοποίηση της STAT και η μεταφορά στον πυρήνα.

Ρύθμιση της δραστηριότητας των STATs

Με εξαίρεση τον STAT4, οι παράγοντες STAT εκφράζονται αυθόρμητα με αποτέλεσμα η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης τους (δηλ. η μεταγραφή των γονιδίων των STAT πρωτεϊνών) να μην παίζει ρόλο στη δραστηριότητά τους. Η δραστηριότητα των STAT ρυθμίζεται κυρίως με μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η φωσφορυλίωση σε αμινοξέα τυροσίνης και σερίνης. Η ενεργοποίηση των STAT απαιτεί την παροδική σύνδεση τους με τους υποδοχείς κυτταροκινών και τη φωσφορυλίωση τους από τις JAK κινάσες (24, 25). Χημικά μόρια που χρησιμοποιούν κοινούς με τους STAT υποδοχείς, λειτουργούν ως ενεργοποιητές των STAT (26). Για παράδειγμα όλες οι IL-6 κυτταροκίνες ενεργοποιούν κυρίως τον STAT3 και σε μικρότερο βαθμό τον STAT1 παράγοντα μέσω του κοινού υποδοχέα gp130 (27). Σε συνδυασμό με τη φωσφορυλίωση σε τυροσινικά αμινοξέα, έχουν αναφερθεί και άλλες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των STAT παραγόντων, όπως η μεθυλίωση και η φωσφορυλίωση σε υπολείμματα σερίνης.

Μεταφορά των STAT στον πυρήνα

Οι STATs ενεργοποιούνται στο κυτταρόπλασμα, αλλά εκτελούν τη λειτουργία τους στον πυρήνα. Εξαιτίας του μεγέθους τους, οι STATs πρέπει να μεταφερθούν ενεργά μέσω των πυρηνικών πόρων. Συνήθως, η μεταφορά των πρωτεϊνών στον πυρήνα καθορίζεται από μία αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization sequence, NLS). Μία προσεκτική εξέταση της αμινοξικής αλληλουχίας δεν φανερώνει τυπικές αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού (NLSs) σε όλους τους παράγοντες STAT. Έτσι, η μεταφορά των STATs στον πυρήνα πραγματοποιείται εκτός των τυπικών αλληλουχιών πυρηνικού εντοπισμού, μέσω πρωτεϊνών που συνδέονται με τους ενεργοποιημένους STATs και περιέχουν αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού. Ενεργοποιημένοι STAT5b και STAT3 συνδέονται με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), ο οποίος ως γνωστό περιέχει δύο αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού (28). Ωστόσο ένας τέτοιος μηχανισμός δεν έχει βρεθεί για καμία άλλη STAT πρωτεΐνη και ως εκ τούτου δεν μπορεί να γενικευθεί. Η συσσώρευση των

STAT στον πυρήνα, διεγείρεται από τον διμερισμό των STAT1 σε απάντηση στη φωσφορυλίωση σε τυροσινικά αμινοξέα. Ωστόσο η φωσφορυλίωση από μόνη της δεν είναι αναγκαία για τη μεταφορά των STAT στον πυρήνα, καθώς STAT πρωτεΐνες που είχαν διμεριστεί τεχνητά, δηλαδή χωρίς φωσφορυλίωση, εξακολουθούν να μεταφέρονται στον πυρήνα (29, 30). Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι σύμφωνα με τελευταίες έρευνες (31-33) υφίσταται μία διαρκής παλινδρόμηση των STAT πρωτεϊνών μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος ανεξάρτητη από εξωκυττάρια διέγερση και φωσφορυλίωση. Η εύρεση μη φωσφορυλιωμένων STAT πρωτεϊνών στον πυρήνα έρχεται σε συμφωνία με τον ήδη αναγνωρισμένο ρόλο τους ως μεταγραφικών συνενεργοποιητών (transcription co-factors) (34, 35).

STATs και γονιδιακή ρύθμιση

Μετά τον διμερισμό και τη μεταφορά τους στον πυρήνα, οι STATs προσδένονται σε ειδικές αλληλουχίες “ενισχυτές” και διεγείρουν τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων στόχων, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις ίσως και να καταστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων χρόνων αναγνωρίστηκαν πολλά γονίδια-στόχοι των IL-6 κυτοκινών και σε ορισμένες περιπτώσεις βρέθηκαν και περιοχές των υποκινητών σε αυτά τα γονίδια που συνδέονται με ενεργούς STAT παράγοντες.

Ανάμεσα στα γονίδια στόχους των IL-6 type κυτταροκινών, αυτά που ρυθμίζονται μέσω των STAT παραγόντων είναι : 1. γονίδια των πρωτεϊνών οξείας φάσης (κυρίως τύπου II) όπως το γονίδιο της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης(36), της α 1-αντιχυμοθρυψίνης (27), της πρωτεΐνης που συνδέεται με τη λιποπολυσακχαρίδη (LBP) (38) και του ιστικού αναστολέα της μεταλλοπρωτεϊνάσης (TIMP)-1(39), 2. γονίδια για μεταγραφικούς παράγοντες όπως Jun B (40), c-Fos (41), IRF-1 (interferon regulatory factor) (42) και C/EBP δ (CCAAT enhancer binding protein) (43) και 3. γονίδια για μία ποικιλία διαφορετικών μορίων όπως το αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο (VIP) (44), η πρωτεΐνη θερμικού σοκ hsp90 (45), καθώς και για τους αρνητικούς ρυθμιστές της Jak/Stat οδού, socs1/jab/ssi1(46-48) και socs3/jab2/cis3/ssi2(49). Είναι αρκετά ενδιαφέρον ότι τα γονίδια του υποδοχέα gp130 (50) και του STAT3 (51) είναι επίσης στόχοι της Jak/Stat οδού δημιουργώντας έτσι ένα μηχανισμό αυτορρύθμισης. Από τη μελέτη των υποκινητών των γονιδίων-στόχων

των IL-6-type κυτοκινών μπορούν να εξαχθούν δύο συμπεράσματα. Πρώτον, οι περιοχές πρόσδεσης των STATs βρίσκονται συχνά κοντά σε ανάλογες περιοχές άλλων μεταγραφικών παραγόντων, φανερώνοντας μία αλληλεπίδραση για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, όπως η συνεργασία του STAT3 με τον παράγοντα C/EBPβ/NF-IL-6 (38, 45) και τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) (52). Δεύτερον, οι θέσεις πρόσδεσης στο DNA των STATs είναι συχνά διαδοχικές, γεγονός που υποδηλώνει ότι ίσως τα διμερή των STATs δρουν ως πολυμερή με σύνδεση σε πολλαπλές θέσεις DNA. Τέτοιος πολυμερισμός έχει αναφερθεί για τον STAT1 στο αμινο-τελικό άκρο του μορίου του (53, 54).

Αρνητικοί μηχανισμοί ρύθμισης της STAT σηματοδότησης

Μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα gp130 επάγεται ραγδαία η φωσφορυλίωση της ERK- MAPK και του STAT3, η οποία όμως στη συνέχεια μειώνεται σταδιακά σε πολλά κύτταρα. Αυτό φανερώνει την ύπαρξη κυτταρικών μηχανισμών τερματισμού της μετάδοσης του σήματος, οι οποίοι έχουν ως στόχο την αποφυγή της υπερδιέγερσης των κυττάρων. Οι μηχανισμοί αυτοί, μετά την ταυτοποίηση των μορίων μέσω των οποίων πραγματοποιούνται, έχουν σε μεγάλο βαθμό διευκρινιστεί

1. Protein Tyrosine Phosphatases (PTPs)

Ένα καθοριστικό σημείο της μετάδοσης του σήματος της IL-6 είναι η φωσφορυλίωση στοιχείων της σηματοδοτικής οδού. Έτσι είναι φανερό ότι, εκτός των κινασών, και οι φωσφατάσες παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη σωστή μετάδοση των σημάτων. Την πρώτη ένδειξη για τη συμμετοχή των φωσφατάσων στη σηματοδότηση της IL-6 αποτέλεσε η ανακάλυψη ότι η φωσφατάση των πρωτεϊνικών τυροσινών SHP2 συνδέεται στην τυροσίνη Y759 των ενεργοποιημένων gp130 υποδοχέων (55, 56). Η Tyr759 του gp130 φαίνεται να έχει πολλαπλές λειτουργίες στη μετάδοση του σήματος. Αντικατάσταση της τυροσίνης από φαινυλαλανίνη ελαττώνει τη σύνδεση της SHP2 στον gp130 και τη φωσφορυλίωσή της (57) και οδηγεί στην ενίσχυση του σήματος της IL-6 (57-59), αφού η SHP2 έχει ανασταλτικό ρόλο σαν φωσφατάση

τυροσίνης στην οδό των Jak/Stat (60). Από την άλλη πλευρά όμως η επαγόμενη ενεργοποίηση της MAPK από την IL-6 αναστέλλεται από τη μετάλλαξη της Tyr759 του gp130, αφού η SHP2 φαίνεται πως δρα ως συνδέτης (adaptor) για την ενεργοποίηση της MAPK. Τα πειράματα *in vivo* συμπληρώνουν τις παρατηρήσεις *in vitro*, αφού μύες με έλλειψη της τυροσίνης Tyr759 του gp130 εμφανίζουν σπληνομεγαλία, λεμφαδενοπάθεια και ενίσχυση της αντίδρασης οξείας φάσης (61). Όλα τα σηματοδοτικά μόρια που περιέχουν φωσφορυλιωμένες τυροσίνες αποτελούν πιθανά υποστρώματα της SHP2 φωσφατάσης. Μέχρι στιγμής έχει παρατηρηθεί σύνδεση της SHP2 με τις Jak1, Jak2 και Tyk2 και φωσφορυλίωση της SHP2 από τις Jak1 και Jak2 *in vitro* (62). Επίσης, η ανίχνευση συμπλεγμάτων STAT3-SHP2 αποτελεί ένδειξη ότι η STAT3 είναι άμεσο υπόστρωμα της SHP2 (63). Για τη STAT1 έχει βρεθεί ότι η SHP2 δρα ως διπλή φωσφατάση διότι αποφωσφορυλιώνει όχι μόνο την Tyr701 (τυροσίνη), αλλά και τη Ser727 (σερίνη) (64). Εκτός από τη SHP2 και άλλες φωσφατάσες έχουν βρεθεί να επηρεάζουν τη μετάδοση των σημάτων της IL-6. Η κυτταροπλασματική φωσφατάση PTPeC, η οποία εκφράζεται σε κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος, αναστέλλει εκλεκτικά την από την IL-6 επαγόμενη ενεργοποίηση του υποδοχέα gp130, των Jak και των STATs (65). Πάντως, αν και η SHP2 επηρεάζει το ποσό της ενεργοποίησης της STAT3, η PTPeC επηρεάζει τη σηματοδοτική ακολουθία που οδηγεί στην ενεργοποίηση της STAT3 (66).

2. PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT, Πρωτεϊνικοί Αναστολείς των Ενεργοποιημένων STAT)

Η οικογένεια των PIAS περιέχει πέντε μέλη στα θηλαστικά: PIAS1, PIAS3, PIASxα, PIASxβ και PIASy. Έχει βρεθεί ότι η PIAS1 καταστέλλει εκλεκτικά τη δράση της STAT1 (μετά από διέγερση με IFN) και ότι η PIAS3 εμποδίζει εκλεκτικά τη STAT3-εξαρτώμενη γονιδιακή έκφραση (μετά από διέγερση με IL-6) (67). Τόσο η PIAS1, όσο και η PIAS3 συνδέονται στους αντίστοιχους STAT παράγοντες εμποδίζοντας την πρόσδεσή τους στο DNA. Η αλληλεπίδραση των PIAS πρωτεϊνών με τους παράγοντες STAT απαιτεί φωσφορυλίωση των STATs σε τυροσινικά αμινοξέα. Ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός δράσης των PIAS για την αρνητική ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας των STATs δεν έχει πλήρως εξακριβωθεί. Πρόσφατα βρέθηκε ότι και η PIASy, σε αντίθεση με την PIAS1, αναστέλλει τη δράση της

STAT1 (68), πιθανώς δρώντας ως αρνητικός μεταγραφικός συμπαράγοντας, χωρίς να επηρεάζει την πρόσδεση του STAT1 στο DNA.

3. Η οικογένεια των SOCS (suppressor of cytokine signalling, Καταστολείς της Μετάδοσης Σημάτων των Κυτταροκινών) αναστολέων.

Με την ανακάλυψη των SOCS, ένας νέος μηχανισμός αναστολής αναγνωρίστηκε. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάστηκαν επίσης CISs (cytokine-inducible SH2 proteins, επαγόμενες από κυτταροκίνες SH2 πρωτεΐνες) και SSIs (STAT-induced STAT inhibitors). Στις SOCSs περιλαμβάνονται οκτώ μέλη (CIS και SOCS1-7). Η έκφραση των SOCS επάγεται ραγδαίως από την IL-6 (CIS, SOCS1-3), αλλά και από τις υπόλοιπες IL-6 κυτταροκίνες (69, 70). Αφού οι SOCS επάγονται μέσω της Jak/Stat οδού και στη συνέχεια την αναστέλλουν, δρουν μέσω του κλασικού μηχανισμού της αρνητικής ανατροφοδότησης. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου δρα κάθε SOCS πρωτεΐνη, φαίνεται ότι διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών πρωτεϊνών. Η CIS, για παράδειγμα, ανταγωνίζεται τη STAT5 για την πρόσδεση στην κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα και ως εκ τούτου αναστέλλει τη δράση της STAT5 (71). Όσον αφορά στις SOCS1 και SOCS3, αυτές σχετίζονται λειτουργικά και αναστέλλουν κυρίως τη δράση των IL-6-type κυτοκινών και φαίνεται πως επιδρούν στις Jaks και αναστέλλουν τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα gp130, των STAT και των Jaks (48, 49). Από τη στιγμή που οι SOCS1 και SOCS3 δρουν στο επίπεδο των Jak επηρεάζουν διάφορους STAT παράγοντες ανάλογα με τον υποδοχέα. Η SOCS1 αναστέλλει τη μετάδοση του σήματος με τη σύνδεσή της στην ενεργό περιοχή της Jak (72). Σε αντίθεση με τη SOCS1, η SOCS3, παρόλο που μπορεί επίσης να συνδεθεί στις Jaks, συνδέεται συνήθως με συγκεκριμένες φωσφοτυροσίνες σε ενεργοποιημένους υποδοχείς, όπως ο gp130 (73). Έτσι η SOCS3 συνδέεται στη φωσφορυλιωμένη τυροσίνη Y759 του υποδοχέα gp130 (49), η οποία αποτελεί επίσης τη θέση σύνδεσης της SHP2. Ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου τελικά δρα η SOCS3 δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, καθώς έχει αναφερθεί ότι προσδένεται επίσης στο ενεργό κέντρο της Jak2 (74, 75). Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι η σύνδεση της SOCS3 στον υποδοχέα είναι προϋπόθεση για την ακόλουθη σύνδεση της SOCS3 στην Jak2.

Η συμβολή των STAT στην ογκογένεση

Κατά την πολύπλοκη διαδικασία της ογκογένεσης, τα κύτταρα χάνουν τη φυσιολογική τους ικανότητα να ανιχνεύουν και να επιδιορθώνουν τις βλάβες του DNA και να ρυθμίζουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης. Παράλληλα, τα κύτταρα αποκτούν ανώμαλα χαρακτηριστικά στη σηματοδότηση αυξητικών παραγόντων, στην αγγειογένεση και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Παρόλο που οι STATs δεν έχουν συσχετισθεί απευθείας με τη ρύθμιση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και την επιδιόρθωση του DNA, εντούτοις συμμετέχουν στην ογκογένεση μέσω της άμεσης σύνδεσής τους με τη σηματοδότηση αυξητικών παραγόντων, την αγγειογένεση και την απόπτωση. Επιπρόσθετα, η ανώμαλη σηματοδότηση των STAT μπορεί να ευνοήσει την ανάπτυξη όγκων με την τροποποίηση της ανοσολογικής απόκρισης, καθώς είναι γνωστή η σημασία των μορίων αυτών στην ανοσολογική απόκριση (76). Η απορύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών των STAT και ιδιαίτερα των STAT3 και STAT5 έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει στην κακοήγη κυτταρική εξαλλαγή (77, 78). Υποστηρίζεται ότι οι STAT πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση με δύο διακριτούς μηχανισμούς οι οποίοι περιλαμβάνουν την ιδιοσυστασιακή δράση του πλήρους μήκους (full-length) μορίου και της έκφρασης ενός μεταλλαγμένου μορίου στο c-τελικό άκρο.

Η ιδιοσυστασιακή ενεργοποίηση των STAT1, STAT3 και STAT5 έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με την κακοήγη εξαλλαγή που επάγεται από διάφορες ογκοπρωτεΐνες (78-82). Το πλήρους μήκους STAT3 ενεργοποιείται ιδιοσυστασιακά σε NIH3T3 κυτταρικές σειρές ινοβλαστών οι οποίες έχουν τροποποιηθεί με την ογκογόνο τυροσινική κινάση v-Src και τα επίπεδα της STAT3 δραστηριότητας συσχετίζονται απευθείας με την ογκογόνο τροποποίηση από την Src(79-82). Η μετατρεπτική ικανότητα της STAT3 περιορίστηκε με μεταλλαγμένα DN(Dominant Negative) STAT3, που συμπεριλάμβαναν γενετικώς ανασυνδυασμένα STAT3D, STAT3F και STAT3S καθώς και ισομορφές του STAT3β με αποκομμένο C-τελικό άκρο (79, 82). Παρομοίως, η JAK1 και Src έχει αποδειχθεί ότι συνεργάζονται στην ενεργοποίηση της STAT3 σε NIH3T3 κυτταρικές σειρές ινοβλαστών, προτείνοντας ένα μοντέλο στο οποίο η STAT3 στρατολογείται από τη Src μέσω της JAK1 πριν τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίησή της απευθείας από τη Src.

Η ιδιοσυστασιακή ενεργοποίηση των STAT μπορεί να ασκεί την τροποποιητική της δράση μέσω της επαγωγής ενός αντιαποπτωτικού μονοπατιού. Η αναστολή του μονοπατιού της STAT3 έχειδειχθεί ότι επάγει την απόπτωση σε κυτταρικές σειρές με καρκίνο του μαστού (83). Δύο μέλη της αντιαποπτωτικής οικογένειας των Bcl-2, οι Bcl-XL και Mcl-1, έχει αποδειχθεί ότι υπερρυθμίζονται σε κύτταρα πολλαπλού μυελώματος στα οποία η ιδιοσυστασιακή δράση της STAT3 επαγόταν από την IL-6 (84,85). Η ιδιοσυστασιακή δράση της STAT3 με την υπερύθμιση της σηματοδότησης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), παίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό μέσω ενός αντιαποπτωτικού μηχανισμού επαγόμενου από τη Bcl-x, στον καρκίνο κεφαλής τραχήλου (86, 87). Τα παραπάνω στοιχεία οδηγούν στην υπόθεση ότι η ιδιοσυστασιακή δράση των πρωτεϊνών STAT μπορεί να επάγει αντιαποπτωτικά μονοπάτια σε διάφορα νεοπλάσματα. Τα υποψήφια γονίδια στόχοι τα οποία ρυθμίζονται από τα STAT μονοπάτια, όπως τα c-myc, η cyclin D1 και η Bcl-x, εμφανίζονται να συμμετέχουν στην ογκογένεση με την επαγωγή της κυτταρικής αύξησης και επιβίωσης μέσω του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και της αποτροπής της απόπτωσης.

Ένα γενετικά μεταλλαγμένο STAT3 (STAT3-C) στο οποίο έχουν αντικατασταθεί 2 κυστεϊνικά κατάλοιπα στο c-τελικό άκρο του SH2 τομέα, φαίνεται να παρουσιάζει υψηλό ογκογενετικό δυναμικό σε απουσία της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης και δρα ως τροποποιητικός παράγοντας (29). Αυτό το μόριο είναι διαρκώς ενεργό και σχηματίζει αυτόματα ομοδιμερή, ανεξάρτητα από την τυροσινική φωσφορυλίωση, μετακινείται στον πυρήνα, συνδέεται με το DNA και επάγει τη μεταγραφή. Σε μοριακό επίπεδο, το παραπάνω μεταλλαγμένο μόριο ρυθμίζει θετικά την έκφραση της c-myc, cyclin D1 και Bcl-x. Η διαμόλυνση ινοβλαστών από ποντίκια με STAT3-C επάγει την παραγωγή μεταλλαγμένων αποικιών σε πήκτωμα soft agar και οδηγεί στην ανάπτυξη όγκων σε θυμεκτομηθέντα ποντίκια (nude mice). Τα παραπάνω στοιχεία υποδεικνύουν ότι η αλλαγή του c-τελικού άκρου των STAT3 επάγει την ιδιοσυστασιακή ενεργοποίηση. Η παρατήρηση αυτή παρέχει στοιχεία ότι η STAT3 ενεργοποίηση μπορεί να είναι από μόνη της ογκογόνος και όχι μόνο ως συνέπεια της τυροσινικής φωσφορυλίωσης (12).

Η πρωτεΐνη STAT σε συμπαγείς όγκους

Η ιδιοσυστασιακή ενεργοποίηση των STAT πρωτεϊνών έχει αναφερθεί σε μεγάλο αριθμό νεοπλασμάτων στον άνθρωπο αλλά και σε μελέτες κυτταρικών σειρών.

Ο ρόλος των μορίων STAT στον καρκίνο του μαστού έχει ερευνηθεί εκτεταμένα. Η ιδιοσυστασιακή ενεργοποίηση της STAT3 και/ή της STAT1 έχει γίνει αντιληπτή σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού (83, 88-90) και σε εξαχθέντα πυρηνικά στοιχεία καρκίνου του μαστού (74,82), αλλά όχι σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται από φυσιολογικό αδενικό επιθήλιο θηλαστικών (83, 89, 90) ή από υγιή ανθρώπινα κύτταρα μαστού (91). Η δραστηριότητα της STAT3 σχετίζεται με υψηλά επίπεδα έκφρασης των EGFR και Src και της σχετιζόμενης με τα παραπάνω δράσης της τυροσινικής κινάσης. Κατά τον ίδιο τρόπο στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής-τραχήλου παρατηρείται ιδιοσυστασιακή δραστηριότητα της STAT3 μέσω της ενεργοποίησης του EGFR, η οποία επάγεται από τον παράγοντα TGF- α (86, 87,92). Η αρνητική ρύθμιση της STAT3 με DN θεραπεία ή με ειδική σίγαση με πλασμίδια αποτρέπει το νεοπλασματικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μειώνει την έκφραση της Bcl-XL και επάγει την απόπτωση στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής-τραχήλου (86,87). Ιδιοσυστασιακή δραστηριότητα της STAT5 έχει αναφερθεί σε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής-τραχήλου και ιδιαίτερα της STAT5b. Επιπρόσθετα το σύμπλεγμα TGF- α / Erb-1/2 φαίνεται να ενεργοποιεί τη STAT3 σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (93).

Η ενεργοποίηση της STAT3 μέσω της κινάσης Src έχει αποδειχθεί ότι είναι βασική στον καρκίνο του προστάτη και των ωοθηκών (88). Η ενισχυμένη έκφραση του γονιδίου BRCA1 (breast cancer susceptible gene 1), που έχει συσχετισθεί με το καρκίνο του μαστού, σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη επάγει την ιδιοσυστασιακή φωσφορυλίωση της STAT3 στη σερίνη και τυροσίνη και την ενεργοποίηση της STAT3 σε ανώτερα μονοπάτια από τις JAK1 και JAK2 (94). Επιπρόσθετα η θεραπεία καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου με IL-6 επάγει την ενεργοποίηση της STAT1 και λιγότερο της STAT3 (95). Επιπλέον, τα B16 κύτταρα ποντικών με μελάνωμα παρουσιάζουν ιδιοσυστασιακή STAT3 δραστηριότητα που συνδυάζεται με την ενεργοποίηση μιας άγνωστης κυτοκίνης, ενώ το μεταλλαγμένο DN STAT3 β αποτρέπει την ενεργοποίηση της STAT3 και καταστέλλει την κυτταρική αύξηση (96). Η παρουσία του μεταλλαγμένου DN STAT3

β δεν έχει επίδραση σε φυσιολογικούς ινοβλάστες, υποδεικνύοντας ότι μόνο τα κακοήθη κύτταρα εξαρτώνται από τη δράση της STAT3 για την επιβίωσή τους (96).

Η πρωτεΐνη STAT σε μη λευχαιμικές αιμοποιητικές κακοήθειες

Η σηματοδότηση της IL-6 μέσω της μεταγραφικής δραστηριότητας της STAT3 αποτελεί την κύρια οδό που εμπλέκεται στην αύξηση και στη διαφοροποίηση των B κυττάρων στις κακοήθειες των πλασματοκυττάρων (97, 98). Η STAT3 είναι ιδιοσυστασιακά ενεργός στα μονοπύρηνια κύτταρα του μυελού ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα. Επίσης είναι ενεργός και στην κυτταρική σειρά U266, η οποία περιλαμβάνει ανεξάρτητα από την IL-6 κύτταρα μυελώματος, και εκφράζει σε υψηλά επίπεδα την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-XL (84). Η αναστολή της STAT3 σηματοδότησης με DN STAT3 ή με τον AG490, αναστολέα της JAK2 κινάσης, έχει δείξει ότι μπλοκάρει την έκφραση της Bcl-XL και κατά συνέπεια επάγει την απόπτωση (84). Επίσης η έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Mcl-1 υπερρυθμίζεται από την IL-6 σε ανθρώπινα κύτταρα μυελώματος μέσω του STAT3 μονοπατιού (85). Επιπρόσθετα η παρουσία της IFN-α αυξάνει την επιβίωση σε ανθρώπινα κύτταρα μυελώματος μέσω της υπερρύθμισης της Mcl-1 από τη STAT3 (85). Τέλος η ιδιοσυστατική δραστηριότητα της STAT3 σε πλασματοκυτώματα και υβριδώματα ποντικών σε απουσία εξωγενών αυξητικών παραγόντων έχει δειχθεί ότι σχετίζεται με την απόκτηση φαινοτύπου που δεν εξαρτάται από την IL-6 (99). Τα παραπάνω στοιχεία αποδεικνύουν τη σημασία της STAT3 στην ογκογένεση των πλασματοκυτταρικών μυελωμάτων.

Η ιδιοσυστατική δράση των STAT3 και STAT5 και όχι της STAT1 έχει μελετηθεί στην κυτταρική σειρά T λεμφωμάτων ποντικών, LSTRA, στην οποία εμφανίζεται υπερέκφραση της Lck πρωτεΐνης που ανήκει στην οικογένεια των τυροσινικών κινασών Src (100). Επίσης η δράση των STAT1 και STAT3 αναφέρεται ότι σχετίζεται με την παρουσία DNA του ιού Epstein-Barr σε κύτταρα λεμφώματος Burkitt (101). Η STAT3 και η STAT5 είναι ενεργοποιημένες και στα T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I-related adult T-cell) λεμφώματα (102). Τέλος

ενεργοποιημένη STAT3 ανιχνεύθηκε σε κυτταρικές σειρές με νόσο του Hodgkin (HD), ενώ ιδιοσυστατική φωσφορυλίωση STAT3 και STAT6 εντοπίστηκε και σε κύτταρα Reed-Sternberg σε ασθενείς με νόσο του Hodgkin (103).

Η πρωτεΐνη STAT στη λευχαιμία

Η ανώμαλη σηματοδότηση των πρωτεϊνών STAT φαίνεται ότι παίζει ρόλο και στη λευχαιμία. Η οξεία μυελογενής λευχαιμία (Acute Myelogenous Leukemia, AML) χαρακτηρίζεται από αναστολή της ωρίμανσης ενός νεοπλασματικού κλώνου μυελικών κυττάρων. Οι αυξητικοί παράγοντες και τα μονοπάτια σηματοδότησής τους είναι πιθανό να καθορίζουν τα επίπεδα αύξησης και διαφοροποίησης των λευχαιμικών βλαστών *in vivo* (104). Υποδοχείς αυξητικών παραγόντων οι οποίοι μεταφέρουν το σήμα τους μέσω των πρωτεϊνών STAT υπάρχουν σε AML βλάστες και οι περισσότεροι από αυτούς είναι γνωστό ότι έχουν σταθερή λειτουργία(104). Ενώ τα πολυδύναμα μη-λευχαιμικά αιμοποιητικά κύτταρα προχωρούν σε διαφοροποίηση, τα λευχαιμικά διατηρούν περισσότερο το αυξητικό δυναμικό τους παρά εκείνο της διαφοροποίησης ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες. Επομένως είναι πιθανό να υπάρχει κάποια αλλαγή στα σηματοδοτικά μονοπάτια γεγονός που οδηγεί στη λευχαιμική εμφάνιση (12). Η ιδιοσυστασιακή ενεργοποίηση των STAT έχει αποδειχθεί σε λευχαιμικές κυτταρικές σειρές και βλάστες στο 22% έως και 100% ασθενών σε διάφορες ομάδες με AML (101,105-110). Η ανώμαλη ενεργοποίηση των STAT μπορεί να σχετίζεται με τη λευχαιμική μετάλλαξη μέσω διάφορων ογκοπρωτεϊνών (111). Διάφορες φωσφοτυροσινικές κινάσες,, συμπεριλαμβανομένων των Bcr-Abl και TEL-JAK2 έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιούν το μονοπάτι των STAT στις λευχαιμίες, χωρίς την ανάγκη ενεργοποίησης υποδοχέων (112-4). Παρόλα αυτά η εμπλοκή αυτών των κινασών στις AML είναι σπάνια. Η ανώμαλη λειτουργία των μηχανισμών απόπτωσης μπορεί να είναι άλλη μια αιτία για τη γένεση της λευχαιμίας. Δεν υπάρχουν όμως ενδείξεις για συσχέτιση των αντιαποπτωτικών μορίων με τη δράση των STAT σε AML. Η απευθείας διασύνδεση των STAT και MAPK κινασών έχει επίσης προταθεί ως πιθανός γενεσιουργός μηχανισμός (108). Τέλος ο ρόλος των

πρωτεϊνών STAT στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (acute lymphoblastic leukemia, ALL) δεν έχει μελετηθεί εκτεταμένα και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Η χρόνια μυελογενής λευχαιμία (chronic myelogenous leukemia, CML) είναι μια κλωνική μυελοειδής νόσος που χαρακτηρίζεται από την παρουσία του χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια, η ακριβής γενετική ανωμαλία του οποίου είναι η μετατόπιση (t(9;22)(q34;q11). Αποτέλεσμα αυτής της μετατόπισης είναι ο σχηματισμός του γονιδίου-υβριδίου bcr/abl, η οποία εμφανίζεται στο 90% των ατόμων με χρόνια μυελογενή λευχαιμία (CML) και σε ποσοστό 35% των ατόμων που πάσχουν από οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ALL). Η χμιαϊκή πρωτεΐνη bcr/abl αποτελεί μια ιδιοσυστατικά ενεργοποιούμενη τυροσινική κινάση που προκαλεί αύξηση και εξαλλαγή στα αιμοποιητικά κύτταρα ανεξάρτητα από τη συμμετοχή αυξητικών παραγόντων (12). Το μονοπάτι των JAK/ STAT ενεργοποιείται ως αποτέλεσμα αυτής της χμιαϊκής ογκοπρωτεΐνης.

Με τα παραπάνω συμφωνούν πρόδρομες μελέτες, οι οποίες υποδεικνύουν ότι η ιδιοσυστατική δραστηριότητα των STAT5 και STAT6 σε διαμολυσμένα πρόδρομα B κύτταρα με τον ογκοϊό Abelson murine leukemia virus (A-MuLV, οφείλεται στην ενεργοποίηση του JAK/ STAT μονοπατιού, η οποία επάγεται από το Abl ογκογονίδιο (v-abl) (115-6). Η παρατήρηση ότι το ογκογονίδιο (v-abl) προκαλεί ιδιοσυστατική δραστηριότητα στις STAT οδήγησε σε περαιτέρω μελέτες σε θετικές για το χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας CML-κυτταρικές σειρές και σε δείγματα ασθενών (117-121). Η ιδιοσυστατική δράση της STAT5 αποδείχτηκε τόσο σε CML και ALL-κυτταρικές σειρές θετικές για την πρωτεΐνη bcr/abl, όσο και σε δείγματα από περιφερικό αίμα ασθενών με CML και σε αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές διαμολυσμένες in vitro με πρωτεΐνη bcr/abl (117). Ο βασικός ρόλος της ενεργοποίησης του STAT5 στην bcr/abl επαγόμενη κυτταρική αύξηση και εξαλλαγή επιβεβαιώθηκε με τη χρήση DN STAT5 ισομορφών οι οποίες οδηγούσαν σε αναστολή της εξαρτώμενης από τη bcr/abl φωσφορυλίωσης της STAT5 με επακόλουθη μείωση της μεταγραφής γονιδίων και της κυτταρικής αύξησης (119-120).

Η δράση των STAT μελετήθηκε και στη χρόνια λεμφοβλαστική λευχαιμία (chronic lymphoblastic leukemia, CLL) η οποία χαρακτηρίζεται από την αργή αύξηση ενός

κακοήθους κλώνου από διαφοροποιημένα ώριμα B λεμφοκύτταρα (122). Τα λευχαιμικά B λεμφοκύτταρα που ελήφθησαν από το περιφερικό αίμα 32 ασθενών με CLL εμφανίστηκαν να παρουσιάζουν ιδιοσυστατική φωσφορυλίωση των STAT1 και STAT3 στη σερίνη και όχι στην τυροσίνη, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων για τη φωσφορυλιωμένη Ser727 (123).

Συμπεράσματα για το ρόλο των STAT στην ογκογένεση.

Η κυτταρική εξαλλαγή με την ενεργοποίηση των STAT πραγματοποιείται μέσω της μεταγραφικής ρύθμισης συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων. Πολλά γονίδια-στόχοι των STAT είναι γνωστά και περιλαμβάνουν εκείνα που κωδικοποιούν τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-XL, Mcl-1 και Bcl-2, τις σχετιζόμενες με την κυτταρική αύξηση πρωτεΐνες Cyclin D1 και Myc και τον προαγγειογενετικό παράγοντα VEGF (29,78,84,124-126). Επιπρόσθετα η STAT3 συνεργάζεται με την πρωτεΐνη c-Jun που καταστέλλει την έκφραση του FAS, επηρεάζοντας την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα (127). Ενδεχομένως και άλλα γονίδια πρέπει να ρυθμίζονται εμμέσως από τις STAT, πολλά από τα οποία συμμετέχουν στην ογκογένεση και την εξέλιξη των νεοπλασμάτων.

Είναι σημαντικό να αναγνωρισθεί ότι τα STAT μόρια μπορεί να είναι συνεχώς ενεργοποιημένα με την επίδραση κάποιων παραγόντων, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι η κυτταρική εξαλλαγή θα είναι ο τελικός φαινότυπος, όπως συμβαίνει σε φλεγμαίνοντες συνδέσμους ή σε νευρώνες που βρίσκονται σε υποξεία. Οι μηχανισμοί της ογκογένεσης είναι εξαιρετικά πολύπλοκοι και η ιδιοσυστασιακή ενεργοποίηση των πρωτεϊνών STAT από μόνη της δεν οδηγεί στην κυτταρική εξαλλαγή, αλλά είναι σαφές ότι αποτελεί ένα σημαντικό μόριο που προάγει την ογκογένεση. Η διαρκώς συνεχιζόμενη έρευνα αποκαλύπτει ότι η αναστολή της STAT σηματοδότησης οδηγεί σε περιορισμό των καρκινικών κυττάρων, υποδεικνύει ότι αυτά τα μόρια συμμετέχουν στον καρκινικό φαινότυπο και πιθανότατα στο μέλλον να αποτελούν σημαντικούς θεραπευτικούς στόχους.

Οι πρωτεΐνες MAPK

Εισαγωγή

Οι ενεργοποιούμενες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες (Mitogen-activated protein kinases, MAPK) είναι εξειδικευμένες κινάσες σερίνης/ θρεονίνης, που ανταποκρίνονται σε εξωκυττάρια ερεθίσματα (μιτογόνα) και ρυθμίζουν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η έκφραση γονιδίων, η μίτωση, η διαφοροποίηση, η κυτταρική επιβίωση και η απόπτωση (128). Όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα παρουσιάζουν μεγάλο αριθμό MAPK μονοπατιών τα οποία ενεργοποιούνται από συγκεκριμένη ακολουθία σημάτων, επιτρέποντας στα κύτταρα να ανταποκρίνονται σε πολλαπλά και ποικίλα ερεθίσματα (129). Στα θηλαστικά, οι MAPK ενεργοποιούνται από μια μεγάλη ποικιλία ερεθισμάτων, που περιλαμβάνει ορμόνες (πχ ινσουλίνη), αυξητικούς παράγοντες (πχ PDGF, EGF, TGF), κυτταροκίνες φλεγμονής της οικογένειας των TNF, περιβαλλοντικό stress από ακτινοβολία και οσμωτικό ή ισχαιμικό shock. Τα παραπάνω ερεθίσματα μπορούν να δράσουν έναντι συγκεκριμένων υποδοχέων που σχετίζονται με τη MAPK σηματοδότηση, όπως οι υποδοχείς τυροσινικής κινάσης, οι υποδοχείς κυτταροκινών και κινασών σερίνης/θρεονίνης και οι υποδοχείς που έρχονται σε σύζευξη με τις G-πρωτεΐνες (G-protein-coupled receptors, ή GPCRs)(129). Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί έξι κατηγορίες MAPK στα θηλαστικά : οι εξωκυττάρια ρυθμιζόμενες κινάσες 1/2 (ERK 1/2 extracellular signal regulated kinases), οι p38 (p38 a/b/g/d), οι JNKs (c-jun NH2-terminal κινάσες, JNK1/2/3), οι ERK7/8, οι ERK3/4 και οι ERK5. Οι πιο καλά μελετημένες κατηγορίες MAPK είναι οι ERK1/2, οι JNKs και οι p38 κινάσες(129).

Οι ERK3 και ERK7 είναι συνεχώς ενεργείς MAPK. Οι ERK3/4 δε συμμετέχουν στον κλασικό μηχανισμό ενεργοποίησης Thr-Glu-Tyr (TEY), ενώ η δράση της ERK3 ρυθμίζεται μέσω πρωτεϊνικής ισορροπίας. Οι μηχανισμοί ενεργοποίησης της ERK4 είναι ακόμα ασαφείς. Η ERK5, αναφέρεται επίσης και ως μεγάλη MAPK (big MAPkinase-1, BMK1), ενεργοποιείται από τη MEK5 μετά από οξειδωτικό stress, υπερόσμωση και αυξητικούς παράγοντες (129,130).

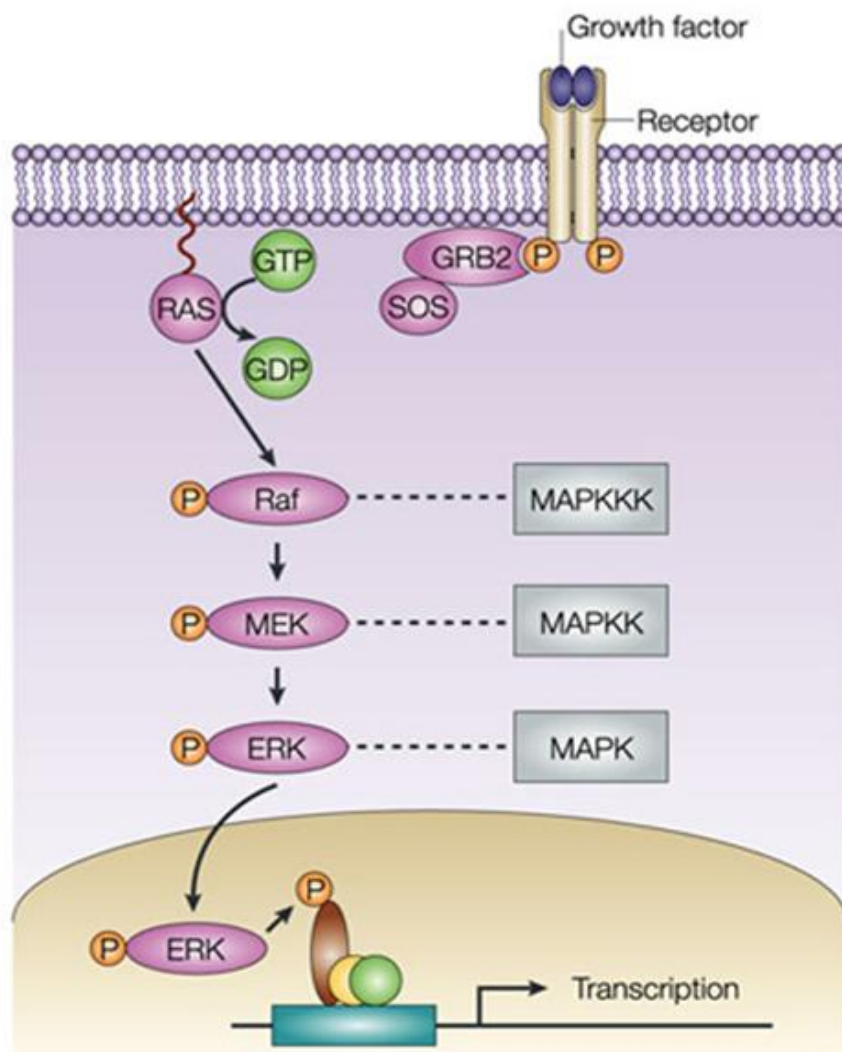
Ενεργοποίηση των MAPK

Παρόλο που κάθε MAPK είναι ξεχωριστή, υπάρχουν κοινά χαρακτηριστικά και γι' αυτό εντάχθηκαν στην ίδια κατηγορία. Ο κεντρικός μηχανισμός ενεργοποίησης των MAPK περιλαμβάνει την αλληλουχία τριών ενεργών κινασών. Μιας κινάσης της MAPK, μιας κινάσης της (MAPKK), και μιας κινάσης της MAPKK (MAPKKK). Η MAPKKK, ονομάζεται και MAP3K ή MEKK, είναι κινάση σερίνης/ θρεονίνης, η οποία ενεργοποιείται μέσω της φωσφορυλίωσης και/ή της αλληλεπίδρασης με μικρές πρωτεΐνες GTP της οικογένειας Ras/Rho ως απόκριση σε εξωκυττάριο ερέθισμα. Η ενεργοποίηση της MAP3K οδηγεί σε φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της MAPKK, η οποία είναι μια κινάση διπλής ειδικότητας και μπορεί να φωσφορυλιώσει τη MAPK στη θρεονίνη και τυροσίνη κατά το πρότυπο Thr-Xaa-Tyr. Με την ενεργοποίησή της, η MAPK φωσφορυλιώνει τα υποστρώματα-στόχους στα κατάλοιπα τυροσίνης / θρεονίνης των οποίων το αμινο-τελικό άκρο ακολουθείται από προλίνη. Τα παραπάνω υποστρώματα μπορεί να είναι μεταγραφικοί παράγοντες, κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, και άλλες κινάσες (MAPK ενεργοποιούμενες κινάσες ή MKs) (131). Οι MAPK ενεργοποιούμενες κινάσες ή MKs, συνεισφέρουν στην ειδικότητα, στην ποικιλομορφία και στην ένταση των κατώτερων MAPK μονοπατιών. Η οικογένεια των MKs περιλαμβάνει τις p90 ribosomal S6 κινάσες (RSK 1-4), τις ενεργοποιούμενες από μιτογόνα και stress κινάσες (stress activated kinases MSK1 and 2), τις MAPK-activated protein kinases -2 και -3 (MK2 and MK3 or MAPKAP-K2 and MAPKAP-K3) και τις MAPK-activated protein kinase 5 (MK-5 or MAPKAP-K5). Από τις παραπάνω, τα μέλη της οικογένειας των RSK φωσφορυλιώνονται και ενεργοποιούνται αποκλειστικά από τις ERK, ενώ καμία MK δεν έχει συσχετιστεί με τις JNK. Επίσης έχουν παρατηρηθεί δράσεις της MAPK που δεν αφορούν στην ιδιότητά της ως κινάση αλλά αφορούν στην απευθείας δράση πρωτεΐνης σε πρωτεΐνη. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν η επαγωγή της αποδόμησης της c-jun από τη JNK και η ενεργοποίηση της topoisomerase IIα από την ERK (132). Η σημασία αυτών των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων καθώς και η κατανόηση των παραγόντων επίδρασης μελετώνται ακόμα (133).

Οικογένειες MAPK – ERK, JNK και p38

ERK1/2

Οι εξωκυττάρια ρυθμιζόμενες κινάσες 1/2 (ERK 1/2 extracellular signal regulated kinases) είναι οι πρώτες MAPK που αναγνωρίστηκαν και μελετήθηκαν στα θηλαστικά. Η ενεργοποίηση των ERK γίνεται από ένα μεγάλο αριθμό εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων ερεθισμάτων. Ενεργοποιείται περισσότερο από αυξητικούς παράγοντες, εστέρες φορβόλης και λιγότερο από προσδέτες GPCRs, κυτταροκίνες, οσμωτικό stress και την αποδιοργάνωση των μικροσωληναρίων (134). Η απενεργοποίηση των ERK γίνεται κυρίως με αποφωσφορυλίωση από το ένα ή και τα δύο λειτουργικά κατάλοιπα Thr ή Tyr των ERK. Η διαδικασία αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη μεσολάβηση πρωτεϊνών φωσφατασών (PPs) Ser/Th, όπως η PP2A (135), πρωτεϊνών φωσφατασών Tyr, όπως η PTP-SL (136), ή από διπλής ειδικότητας φωσφατάσες, τις MKPs (137). Έχουν αναγνωριστεί δύο ισομερή των ERK, το ERK1 και το ERK2, τα οποία παρουσιάζουν κατά 83% ομοιότητα στα αμινοξέα τους και εκφράζονται σε όλους τους ιστούς σε διάφορα επίπεδα (129).



Εικόνα 3. Η ενεργοποίηση των ERK

Ανώτερα μονοπάτια σηματοδότησης

Η σηματοδοτική ακολουθία των ERK ξεκινάει με την ενεργοποίηση υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης, όπως τυροσινικών κινασών (RTKs) και GPCRs (138, 139). Το σήμα επάγεται από μικρές G πρωτεΐνες, όπως για παράδειγμα η Ras (140), οι οποίες μεταδίδουν το σήμα προσλαμβάνοντας MAP3K στην κυτταρική μεμβράνη, όπου μπορούν να ενεργοποιηθούν. Τέτοιες MAP3K είναι για παράδειγμα οι κινάσες Raf (A-Raf, B-Raf και Raf-1)(Εικ. 3). Ο ακριβής μηχανισμός ενεργοποίησης των Raf δεν είναι γνωστός. Πάντως απαιτείται η σύνδεση με τις πρωτεΐνες Ras καθώς και

πολλαπλές φωσφορυλιώσεις στην κυτταρική μεμβράνη. Άλλες MAP3K που συμμετέχουν κάτω από διάφορες συνθήκες στην ενεργοποίηση των ERK είναι οι c-Mos, TPL2 και MEKK1/2/3, οι οποίες δρουν κυρίως κατά τη μείωση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόκριση στο stress. Η ενεργοποιημένη Raf (ή οποιαδήποτε άλλη MAP3K) συνδέεται και φωσφορυλιώνει τις συσχετιζόμενες σε κατώτερα μονοπάτια κινάσες MEK1 και 2, οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν τις ERK1/2 ακολουθώντας το πρότυπο Thr-Glu-Tyr.

Κατώτερα μονοπάτια σηματοδότησης

Μετά την ενεργοποίηση ένα μέρος των ERK συγκεντρώνεται στον πυρήνα (141). Οι ενεργοποιημένες ERK έχει αποδειχθεί ότι φωσφορυλιώνουν ένα μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων σε όλα τα κυτταρικά διαμερίσματα, συμπεριλαμβανομένων και διάφορων κυτταροπλασματικών και μεμβρανικών πρωτεϊνών (PLA2, CD120a, Syk και calnexin), πυρηνικών υποστρωμάτων (SRC-1, Pax6, NFAT, Elk-1, MEF-2, c-fos, cjun, c-myc και STAT3) και κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών (νευρονίδια και paxillin)(142). Εναλλακτικά οι ERKs μπορούν να μεταβιβάσουν περαιτέρω το σήμα φωσφορυλιώνοντας και ενεργοποιώντας πρωτεϊνικές κινάσες στο επίπεδο των MKs. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί περισσότερα από 150 υποστρώματα των ERK και ο αριθμός τους αναμένεται να αυξηθεί. Το πιο καλά μελετημένο υπόστρωμα είναι το Elk-1 που είναι μέλος της οικογένειας του μεταγραφικού παράγοντα TCF (ternary complex factor). Η φωσφορυλίωση του Elk-1 εντείνει τη σύνδεσή του στο DNA, γεγονός που οδηγεί στην επιστράτευση των συνενεργοποιητών CBP και p300, οδηγώντας έτσι στην ενεργοποίηση γονιδίων. Η κινητοποίηση κυττάρων τα οποία δεν εκφράζουν c-fos, αυξάνει ταχύτητα την έκφραση της c-fos με ένα μηχανισμό που περιλαμβάνει το Elk-1. Το c-fos RNA και η πρωτεΐνη του σταθεροποιούνται από την ενεργή ERK και η ποσότητα της c-fos πρωτεΐνης ρυθμίζει την περαιτέρω έκφραση γονιδίων. Γι αυτό το λόγο, η σωστή ρύθμιση της c-fos παίζει ρόλο σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η αύξηση, η διαφοροποίηση και η ογκογόνος μετάλλαξη (143). Παρομοίως, η φωσφορυλίωση των c-myc και c-jun από την ERK είναι σημαντική για διάφορες κυτταρικές διεργασίες. Η c-myc είναι ρυθμιστής της κυτταρικής αύξησης, διαφοροποίησης και απόπτωσης και η βιολογική της δράση εξαρτάται από τα πολυπεπίδια που αποτελούν συνδέτες της, όπως η c-jun.

Στους κυτταροπλασματικούς στόχους των ERK περιλαμβάνεται η φωσφολιπάση A2, που ρυθμίζει την παραγωγή αραχιδονικού οξέως σε ενεργοποιημένα κύτταρα (144). Μεταξύ των MKs, τα μέλη της οικογένειας των RSK ενεργοποιούνται αποκλειστικά από τις ERK (145). Μετά την ενεργοποίησή τους μπορούν ανεξάρτητα να μετακομίσουν στον πυρήνα και να φωσφορυλιώσουν τα υποστρώματά τους (141). Παρόλα αυτά ενεργοποιημένες RSK έχουν βρεθεί και στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι διαθέτουν επίσης και κυτταροπλασματικά υποστρώματα. Οι RSKs και MSKs μοιράζονται πολλά υποστρώματα των RSK σε κατώτερα μονοπάτια, όπως μεταγραφικούς παράγοντες και συνενεργοποιητές (SRF, CBP, Elk-1 και CREB) οι οποίοι συμμετέχουν στην πρώιμη άμεση απόκριση (146, 147). Επίσης οι RSK φαίνεται ότι φωσφορυλιώνουν και πρώιμα γονιδιακά προϊόντα όπως τα c-fos και c-jun. Οι MKs μπορούν να ρυθμίζουν επίσης και τη δραστηριότητα κάποιων κινασών όπως για παράδειγμα η Myt1, χωρίς αυτές όμως να αποτελούν αυθεντικά μέλη της ακολουθίας των ERK (129).

Ο ρόλος της ERK στην καρκινογένεση.

Η καρκινογένεση μπορεί να θεωρηθεί ως ανώμαλη διεργασία που αφορά στα συστήματα σηματοδότησης. Τα μονοπάτια των ERK παρουσιάζουν απορρυθμισμό στο 1/3 των καρκίνων του ανθρώπου και πολλά μέλη αυτού του σηματοδοτικού μονοπατιού έχουν συσχετιστεί με την κυτταρική αύξηση, μεταξύ αυτών διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες, όπως οι c-myc, c-fos, SRF, CREB και AP-1, οι οποίοι ελέγχουν γονίδια πρώιμης απόκρισης (early response genes) αλλά και ο παράγοντας επιμήκυνσης και ενεργοποιητής του RNA pol I που επηρεάζει την πρωτεϊνσύνθεση. Επιπρόσθετα ο ρόλος του ras στον καρκίνο είναι γνωστός εδώ και πολλά χρόνια. Στο μονοπάτι του ERK κεντρικό ρόλο φαίνεται να παίζει το μοντέλο ras/raf. Παρεκκλίσεις παρουσιάζονται σε όλο το μονοπάτι, ξεκινώντας από την ανώμαλη υπερέκφραση υποδοχέων όπως οι EGFR και ErbB2, τη μετάλλαξη των Ras και Raf και την ενίσχυση πυρηνικών στόχων, κυρίως των myc και AP-1 (148). Ο ετεροδιμερισμός του raf1 με το B-raf φαίνεται να συμβάλλει στη δραστηριότητα του ERK και μελέτες στο μηχανισμό δράσης του ογκογονιδίου B-raf υποδεικνύουν την εμπλοκή του ERK στον καρκίνο (149). Οι MKs, RSKs, MNKs και MSKs, οι οποίες

μπορούν να μετακινούνται ανεξάρτητα στον πυρήνα και να φωσφορυλιώνουν διάφορους παράγοντες μεταγραφής που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, συμβάλλουν περαιτέρω στην επαγωγή πρώιμων γονιδίων και συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (150). Η σηματοδότηση της ERK παίζει ρόλο στη διατάραξη των αντιαυξητικών δράσεων συνδετών όπως ο TGF- β . Για παράδειγμα η ενεργοποιημένη N-Ras επάγει την κυτταροπλασματική μετακίνηση του p27 μέσω του μονοπατιού Ral-GEF, οδηγώντας στη διακοπή της μετακίνησης της Smad στον πυρήνα διαμέσου του TGF- β . Επιπρόσθετα υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι στον καρκίνο απορρυθμίζεται η έκφραση αναστολέων ανατροφοδότησης του μονοπατιού των ERK. Τα παραπάνω στοιχεία αφορούν στις φωσφατάσες των MAP κινασών (MKPs) και στα μέλη της οικογένειας των Sprouty(151, 152).

Εκτός από την κυτταρική αύξηση και άλλα μόρια δυνητικά στόχοι της ERK σε κατώτερα σηματοδοτικά μονοπάτια, παίζουν ρόλο στην αγγειογένεση και στη μετακίνηση των κυττάρων. Η σηματοδότηση των ERK προάγει ένα πιο κακοήθη φαινότυπο, διαταράσσοντας τα μονοπάτια σηματοδότησης της Rho SAHAI, και φωσφορυλιώνοντας ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην κυτταρική μετανάστευση, όπως η MLCK, η καλπαΐνη (calpain), η FAK και η παξιλίνη (paxillin), αλλά και ρυθμίζοντας την έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αποδόμηση της βασικής μεμβράνης (153).

Το σηματοδοτικό μονοπάτι της ERK1/2 αποτελεί κεντρικό ρυθμιστή της κυτταρικής αύξησης ελέγχοντας την κυτταρική διαίρεση και τον κυτταρικό κύκλο. Η υπερέκφραση ανενεργού ERK1 ή RNA της ERK που δε περιέχει νουκλεοτίδια προς μετάφραση (antisense-RNA), έχει αρνητικό αντίκτυπο στον πολλαπλασιασμό ινοβλαστών(154). Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η αναστολή της MEK1/2 μπλοκάρει τη σύνθεση της ολικής πρωτεΐνης που ανταποκρίνεται σε αυξητικούς παράγοντες και της πυριμιδίνης (155). Παρόλα αυτά έχει επισημανθεί ότι η συνεχής και όχι η περιοδική ενεργοποίηση του μονοπατιού της ERK, απαιτείται για την προώθηση της κυτταρικής αύξησης (156). Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί για να εξηγήσουν το ρόλο του μονοπατιού ERK1/2 στη λειτουργία του κυτταρικού κύκλου. Οι πιο σημαντικοί στόχοι είναι οι D-type κυκλίνες και ο c-myc. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού ERK1/2 επάγει τις D-type κυκλίνες υπερρυθμίζοντας και ενεργοποιώντας μεταγραφικούς παράγοντες που σχετίζονται με τη σύνθεσή τους,

όπως για παράδειγμα η οικογένεια των AP1 πρωτεϊνών, αλλά ελέγχοντας και μεταμεταγραφικούς παράγοντες (157, 158). Η ενεργοποιημένη MEK1 φαίνεται ότι διευκολύνει το σχηματισμό του συμπλόκου cyclinD1-Cdk4 σε ινοβλάστες. Η ενεργοποίηση της ERK σταθεροποιεί το c-myc μέσω φωσφορυλίωσης. Ο c-myc είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας Myc, ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική αύξηση, εξέλιξη και απόπτωση (159) και εκδηλώνει τη δράση του μέσω της υπερρύθμισης συγκεκριμένων γονιδίων, όπως της cyclin D (160), p21 (161) και cdc25A (162), ριβοσωμικών πρωτεϊνών και μεταφραστικών παραγόντων (163). Άλλοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την υπορύθμιση αντιαυξητικών γονιδίων, όπως τα Tob1, Ddit3 και Jun D.

Επιπρόσθετα έχει αναφερθεί ότι οι RSK2 φωσφορυλιώνουν τον p27kip1 υποδοχέα της εξαρτώμενης από την κυκλίνη κινάσης (CDK), προάγοντας τη G1 φάση. οι RSK2 φωσφορυλιώνουν και αναστέλλουν τη Myt1, μια κινάση αναστολέα για τη Cdc2 (M-phase CDK), προάγοντας τη G2 φάση (164). Οι RSK φαίνεται ότι συμμετέχουν και στο μετασχηματισμό της χρωματίνης με τη φωσφορυλίωση της ιστόνης H3, γεγονός που οδηγεί σε υψηλή μεταγραφική δραστηριότητα (165).

Το μονοπάτι της ERK σχετίζεται συχνά με την ογκογένεση. Το εύρος της δραστηριότητας της ERK επηρεάζει την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Υψηλή δραστηριότητα της ERK οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα του παχέως εντέρου, και επάγει την ανακοπή του κυτταρικού κύκλου μέσω της υπερρύθμισης των CDK αναστολέων p21 και p27 (166, 167). Η αντιαποπτωτική δράση του ERK μονοπατιού μπορεί να αποδοθεί στο γενικότερο αυξητικό χαρακτήρα των δράσεών του. Παρόλα αυτά, έχουν ανακαλυφθεί άμεσοι στόχοι της ERK που εμπλέκονται στην απόπτωση. Οι Erhardt et al. (168) έδειξαν ότι η ERK, δρώντας σε κατώτερα μονοπάτια της B-raf, αποτρέπει την ενεργοποίηση της κυτταροπλασματικής κασπάσης, που ακολουθείται από την απελευθέρωση κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια. Ένας δεύτερος πιθανός στόχος του ERK μονοπατιού είναι η προαποπτωτική πρωτεΐνη Bad, η οποία ανήκει στην οικογένεια των Bcl-2. Η Bad είναι γνωστό ότι επηρεάζει την ακεραιότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης και την απευθείας απελευθέρωση κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, συσχετιζόμενη με τις Bcl-2 και Bcl-x1 και αναστέλλοντας την αντιαποπτωτική τους δράση (169). Η φωσφορυλίωση της Bad από την ERK, αναστέλλει την επίδρασή της

στα μιτοχόνδρια, αποτρέποντας την απόπτωση (170). Πάντως, αξίζει να αναφερθεί ότι παρόλο που η δράση των ERK συσχετίζεται με την επιβίωση στα περισσότερα κύτταρα, πιστεύεται πως το μονοπάτι των ERK συμμετέχει και στην απόπτωση. Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι ERK επιδρούν στην απόπτωση δεν είναι ακόμα αντιληπτοί και πιθανόν αφορούν σε διάφορα μέρη του μονοπατιού αυτού(171).

JNK

Η JNK αναγνωρίστηκε αρχικά ως μια ενεργοποιούμενη από το stress πρωτεϊνική κινάση (SAPKs), στο ήπαρ ποντικών, στα οποία είχε χορηγηθεί κυκλοεξιμίδη (172). Στη συνέχεια μετονομάστηκε σε JNK για να δοθεί έμφαση στο ρόλο της, στη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα c-jun. Η JNK ενεργοποιείται ισχυρά ως απόκριση σε κυτταροκίνες, UV ακτινοβολίες, σε έλλειψη αυξητικών παραγόντων, σε παράγοντες που προκαλούν βλάβη στο DNA, και λιγότερο σε ερεθισμό από τις GPCRs (G-protein-coupled receptors), τον ορό και αυξητικούς παράγοντες (173, 174, 175).

Έχουν βρεθεί 3 ξεχωριστά γονίδια (JNK1, JNK2 και JNK3) που κωδικοποιούν τις JNK, στα θηλαστικά. Ενώ οι JNK1 και 2 εκφράζονται παντού, η JNK3 περιορίζεται στον εγκέφαλο, στην καρδιά και στους όρχεις (176).

Ανώτερα μονοπάτια σηματοδότησης

Οι ενεργοποιητές του μονοπατιού της JNK (MAP2Ks), είναι οι MKK4 και MKK7. Η ποικιλία των ενεργοποιητών των MKK4 και MKK7, επιτρέπει την ενεργοποίηση του μονοπατιού της JNK από μεγάλο αριθμό εξωτερικών ερεθισμάτων. Άλλοι ενεργοποιητές σε ανώτερα μονοπάτια περιλαμβάνουν διάφορες MAP3Ks, όπως για παράδειγμα τις MEKK1-4, τη MLK2 και -3, τις Trp1-2, DLK, TAO1 και 2, την TAK1 και ASK1/2 (177). Διάφορες MAP3Ks είναι ειδικές για διαφορετικά ερεθίσματα. Για παράδειγμα η TAK1 είναι σημαντική για την ενεργοποίηση της JNK ως απόκριση σε κυτταροκίνες φλεγμονής (IL-1, TNF- α , TGF- β και lymphotoxin- β) αλλά και για την

ενεργοποίηση από Toll υποδοχείς (TLR-3, -4 και -9) (178, 179). Η MEKK3 είναι σημαντική για την ενεργοποίηση σε απόκριση στον TLR-8 (180). Επιπλέον τα ισομερή της MAP3K, Trp1-2 και MLK-3, έχει αναφερθεί ότι παίρνουν μέρος στην TNF εξαρτώμενη ενεργοποίηση της JNK σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες(181, 182). Μεταξύ των πολλών ερεθισμάτων στα οποία αποκρίνεται η JNK, η έκθεση σε ένα μεγάλο αριθμό προφλεγμονών κυτταροκινών, όπως οι TNF- α και IL-1, είναι χαρακτηριστική για αυτές τις κινάσες (183). Επιπρόσθετα, το μονοπάτι της JNK, ενεργοποιείται κατά την ενδογενή ανοσολογική απόκριση ακολουθώντας την ενεργοποίηση διαφόρων μελών της οικογένειας υποδοχέων Toll (Toll-like receptor) (180, 184). Η ενεργοποίηση της JNK γίνεται και από μια σειρά παραγόντων, όπως το stress, η έλλειψη αυξητικών μορίων και η ακτινοβολία (185)(Εικ. 4). Κάτω από αυτές τις συνθήκες η ενεργοποίηση της JNK μπορεί να επηρεάζει σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η έκφραση των γονιδίων (186), ο κυτταρικός θάνατος (187) ή η κυτταρική αύξηση (188). Όπως και στην ERK1/2, η ενεργοποίηση της JNK απαιτεί τη φωσφορυλίωση σε ένα σταθερό πρότυπο Thr-Pro-Tyr.

Κατώτερα μονοπάτια σηματοδότησης

Οι JNK, όπως και οι ERK1/2, μπορούν να μετακινούνται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα μετά από ερεθισμό, αλλά όχι σε συγκεκριμένες αναλογίες όπως οι ERK1/2 (189). Ένας μεγάλος αριθμός πυρηνικών πρωτεϊνών, κυρίως μεταγραφικοί παράγοντες και πυρηνικοί ορμονικοί υποδοχείς, έχουν αναγνωρισθεί ως υποστρώματα των JNK. Όλα τα παραπάνω επηρεάζουν άμεσα την έκφραση γονιδίων. Το πιο σημαντικό και περισσότερο μελετημένο πυρηνικό υπόστρωμα της JNK είναι η c-jun, η οποία όταν φωσφορυλιώνεται στη Ser63 και 73 προκαλεί αύξηση της AP-1 μεταγραφικής δραστηριότητας. Άλλα υποστρώματα αποτελούν πρωτεΐνες της οικογένειας jun, όπως οι junD, junB, η οικογένεια ATF (π.χ., ATF-2), η fos οικογένεια, η Elk-1, το c-myc, το p53, η NFAT οικογένεια, οι STAT1 και 3, και οι πρωτεΐνες της οικογένειας Pax (190). Οι πρωτεΐνες υποδοχείς πυρηνικών ορμονών που ενεργοποιούνται από τις JNK, είναι ο υποδοχέας PARg1 (peroxisome proliferators-activated receptor g1), υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών, και οι υποδοχείς

ρετινοϊκού οξέος RXR και RARα. Η φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση πολλών μη πυρηνικών υποστρωμάτων της JNK, όπως πολλά σκαφοειδή και adaptor πρωτεΐνες (IRS-1, JIP1, JIP3 and 14-3-3), επιτρέπει τη ρύθμιση και άλλων σηματοδοτικών μηχανισμών στο κύτταρο.

Πολλές μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, όπως οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x1, Bad, Bim and Bax), οι οποίες παίζουν ρόλο στην απόπτωση, είναι στόχοι της JNK. Άλλα υποστρώματα των JNK είναι η κυτοσκελετική πρωτεΐνη Paxillin, η μικροσωληναριακή πρωτεΐνη 2 και 1B (MAP-2, 1B), και η Tau καθώς και η Akt κινάση. MKs ενεργοποιούμενες από JNK δεν έχουν βρεθεί ακόμα. Παρόλα αυτά, οι Zhang et al. (191) αναφέρουν ότι η p90RSK φωσφορυλιώνεται από τις JNK μετά από θεραπεία με UV.

Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό των JNK είναι ο ρόλος τους στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών (192). Η ελεγχόμενη αποικοδόμηση των πρωτεϊνών προσφέρει στα κύτταρα ένα μηχανισμό ελέγχου της λειτουργίας τους. Μελέτες με ανενεργό MEKK1 (ανώτερο ενεργοποιητή της JNK), καταδεικνύουν το ρόλο της JNK στις διαδικασίες της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών (193).

Ο ρόλος της JNK στην καρκινογένεση

Ο ρόλος του μονοπατιού της JNK στην ογκογένεση υποστηρίζεται από την ανεύρεση υψηλών επιπέδων της JNK σε διάφορες σειρές καρκινικών κυττάρων. Η δραστηριότητα της JNK και η φωσφορυλίωση της c-jun, έχει αναφερθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην επαγόμενη από το Ras ογκογένεση, ενώ παράλληλα το Ras και η c-jun συνεργάζονται στην κυτταρική μετάλλαξη (194, 195). Οι Nateri et al. (196) έδειξαν ότι η έλλειψη της c-jun ή μετάλλαξη της στις περιοχές φωσφορυλίωσής της από τη JNK, οδηγεί σε περιορισμό του αριθμού και του μεγέθους των όγκων και σε μεγαλύτερο προσδόκιμο επιβίωσης. Μια σημαντική λειτουργία της c-jun φαίνεται ότι είναι η μεταγραφική καταστολή του p53 (197, 198). Ένα άλλο παράδειγμα του ρόλου της c-jun στην ογκογένεση έχει αναφερθεί στο ήπαρ, όπου έχει αποδειχθεί ότι προάγει τη χημικά επαγόμενη καρκινογένεση του ήπατος (199).

Επιπρόσθετα, ο ρόλος της JNK στην απόπτωση είναι αρκετά κατανοητός. Παρόλα αυτά, ο μηχανισμός αυτός είναι αμφιλεγόμενος και φαίνεται ότι ενεργοποιείται μετά

από ερέθισμα και ότι παρουσιάζει ειδικότητα σε ορισμένους ιστούς (200). Ένας δυνητικός στόχος της προαποπτωτικής σηματοδότησης της JNK είναι το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53. Η σύνδεση του JNK έχει αναφερθεί ότι αποσταθεροποιεί το p53 προάγοντας την αποικοδόμηση που ελέγχεται από την ουμπικουιτίνη (201). Αντιθέτως, η ενεργοποίηση της JNK από το stress, φαίνεται ότι αναστέλλει την αποικοδόμηση του p53 που ελέγχεται από την ουμπικουιτίνη, σταθεροποιώντας το γονίδιο. Ένας άλλος δυνητικός στόχος της προαποπτωτικής σηματοδότησης της JNK είναι η c-myc που φωσφορυλιώνεται σε δύο σημεία (Ser62 και Thr71) από τη JNK. Μελέτες σε μεταλλαγμένους εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικών που δεν εξέφραζαν τη JNK, προσέφεραν ένα δυναμικό πρότυπο μελέτης για την απόπτωση που επάγεται από τη JNK. Σε αυτά τα μεταλλαγμένα πρότυπα παρατηρήθηκε ότι οι βιοχημικές ανωμαλίες στην επαγόμενη από το stress απόπτωση εντοπίζονταν στα μιτοχόνδρια, καθώς δεν παρουσιαζόταν αναστροφή της πόλωσης της μιτοχονδριακής μεμβράνης και απελευθέρωση κυτοχρώματος C. Επίσης, υποστρώματα της JNK αποτελούν προαποπτωτικοί και αντιαποπτωτικοί παράγοντες της οικογένειας Bcl-2. Οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-x1 έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν τη δράση τους μετά από φωσφορυλίωση από τη JNK (202, 203), παρόλο που υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει εμπλοκή των παραπάνω πρωτεϊνών ως *in vivo* υποστρώματα της JNK επαγόμενης απόπτωσης. Οι Bax έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν υποστρώματα της JNK *in vivo*, γεγονός που προσθέτει άλλο ένα στοιχείο στον προαποπτωτικό της ρόλο (204, 205). Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν την εμπλοκή της JNK στην αποικοδόμηση του αναστολέα της caspase-8 cFLIPL (206). Ένα άλλο πρόσφατα αναγνωρισμένο υπόστρωμα της JNK είναι το H2AX, το οποίο αποτελεί μέλος της histone 2. Το τελευταίο πιστεύεται ότι είναι σημαντικό για τον κατακερματισμό του DNA και συνεπώς πρέπει να παίζει ρόλο στην επαγόμενη από τη JNK απόπτωση (207). Επιπλέον, η Caspase 3 μπορεί να επιτείνει την ενεργοποίηση της JNK, καθώς είναι δυνατόν να διασπάσει και να ενεργοποιήσει τη MEKK1, η οποία αποτελεί ανώτερη κινάση της JNK (208).

Από την άλλη πλευρά, ενώ ο ρόλος της JNK στην απόπτωση είναι αρκετά κατανοητός έχει αποδειχθεί ότι παίζει ρόλο και στην επιβίωση. Αυτή η αντιφατική δράση μπορεί να αποδοθεί κατά ένα μέρος στη διάρκεια και στο εύρος της ενεργοποίησης του μονοπατιού, όπως επίσης και στην ενεργοποίηση ανώτερων

μονοπατιών που αφορούν στην επιβίωση. Έχει ακόμα δειχθεί ότι η παρατεταμένη ενεργοποίηση της JNK επηρεάζει την απόπτωση, ενώ η παροδική ενεργοποίησή της προωθεί περισσότερο την κυτταρική επιβίωση (209).

P38

Ομόλογα του p38 έχουν βρεθεί τόσο σε ανώτερα όσο και σε κατώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα. Ο ρόλος τους εντοπίζεται στην οσμωρύθμιση, σε ερεθίσματα εξωκυττάριου stress και σε διαδικασίες του κυτταρικού κύκλου (135). Όπως και η JNK, η p38, στα θηλαστικά, ενεργοποιείται από εξωκυττάρια ερεθίσματα stress, κυτταροκίνες φλεγμονής καθώς και από αυξητικούς παράγοντες και ινσουλίνη (210, 211). Σε *in vitro* μελέτες και πειράματα με παροδική διαμόλυνση, παρατηρήθηκε ότι οι MKP-1, MKP-4 και MKP-5 αποφωσφορυλιώνουν αποτελεσματικά τα p38a και p38b20. Αντίθετα τα p38γ και p38δ είναι ανθεκτικά σε όλα τα μέλη της οικογένειας MKP. Η PP2C, μια φωσφατάση Ser/Thr φαίνεται ότι υπορυθμίζει το μονοπάτι MAPK Hog1, όπως επίσης και οι MKK6 και MKK4.

Υπάρχουν τέσσερις ισομορφές του p38, οι α, β, γ και δ και η p38a είναι η πιο καλά μελετημένη.

Ανώτερα μονοπάτια σηματοδότησης

Η ομάδα των p38 κινάσων, ενεργοποιείται από διπλές κινάσες, τις MKK, οι οποίες αποκαλούνται MKK3 και MKK6. Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι διαφορετικές ανώτερες κινάσες ενεργοποιούν εκλεκτικά συγκεκριμένες ισομορφές p38. Η MKK6 ενεργοποιεί και τις 4 ισομορφές, ενώ η MKK3 δεν ενεργοποιεί επαρκώς την p38β (212). Οι MKK4 και MKK7 (ανώτερες κινάσες της JNK) ενεργοποιούν τα p38 (213), υποδεικνύοντας κάποια διασύνδεση μεταξύ των δύο μονοπατιών. Οι ανώτεροι ενεργοποιητές της ομάδας των p38 διαφοροποιούνται σε σχέση με εκείνους των JNK. Διάφορες MKKKs (MAP3Ks) έχουν αναφερθεί ότι ενεργοποιούν τις p38, όπως οι MTK1, MLK2/MST, MLK3, DLK, ASK1 και TAK1 (Εικ. 4)(214).

Κατώτερα μονοπάτια σηματοδότησης

Το p38 φαίνεται να είναι παρόν τόσο στον πυρήνα, όσο και στο κυτταρόπλασμα κυττάρων που βρίσκονται στη G0 φάση εφησύχανσης του κυτταρικού κύκλου. Υπάρχουν μελέτες που υποδεικνύουν ότι το p38 μετά την ενεργοποίηση μετακινείται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα (215), ενώ άλλες μελέτες αναφέρουν ότι ενεργοποιημένο p38 υπάρχει στο κυτταρόπλασμα διεγερμένων κυττάρων (216). Ο ρόλος του p38 στο ανοσοποιητικό σύστημα έχει μελετηθεί εκτεταμένα (217, 218). Το p38 συμμετέχει στην απόκριση μακροφάγων και ουδετερόφιλων σε διάφορες λειτουργίες, όπως η αναπνευστική έκρηξη, η χημειοταξία, η κοκκιώδης εξωκύτωση, η προσκόλληση των βακτηριδίων στα κύτταρα και η απόπτωση. Επίσης μεσολαβεί στη διαφοροποίηση των T-κυττάρων και στην απόπτωση ρυθμίζοντας την παραγωγή της IFN- γ (219, 220).

Η ενεργοποίηση του p38a έχει παρατηρηθεί σε διάφορα συστήματα. Αυξητικοί παράγοντες, όπως ο FGF (fibroblast growth factor), η ερυθροποιητίνη, η ιντερλευκίνη, ο NGF (Nerve growth factor), ο IGF (insulin-like growth factor) και PDGF, βρέθηκε ότι πυροδοτούν την p38a ενεργοποίηση σε διάφορα κύτταρα (221, 222). Η ενεργοποίηση του ανταποκρίνεται και σε ερεθίσματα από το TGF- β , GPCR συναγωνιστές (223), μουσκαρινικούς συναγωνιστές, νευροπεπτίδια (224), θερμικό shock και ισχαιμία (225). Γι αυτό το λόγο, το p38 είναι δύσκολο να ενταχθεί σε ένα συγκεκριμένο είδος απόκρισης, σε αντίθεση με τα ERK και JNK, τα οποία αναγνωρίζονται κατά ένα βαθμό ως κινάσες απόκρισης στο stress και στην κυτταρική αύξηση.

Παρόλο που οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στις λειτουργίες του p38 μελετώνται τα τελευταία χρόνια, έχει αποδειχθεί ότι το ενεργοποιημένο p38 φωσφορυλιώνει διάφορους κυτταρικούς στόχους. Ο στόχος μπορεί να είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, γεγονός που οδηγεί στην αλλαγή της έκφρασης των γονιδίων ή μπορεί να είναι μια MK (Midkine ή neurite growth-promoting factor 2 (NEGF2)). Άλλοι στόχοι, όπως η κυτταροπλασματική πρωτεΐνη phospholipase A2, η σχετιζόμενη με τα μικροσωληνάρια πρωτεΐνη Tau, η κερατίνη 8, η NHE-1 (Na⁺/H⁺ exchanger isoforms-1), έχουν αναφερθεί επίσης ως υποστρώματα του p38 (226, 227).

Πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες με μεγάλο εύρος δράσης φαίνεται ότι φωσφορυλιώνονται και ενεργοποιούνται από το p38. Τέτοιοι παράγοντες είναι ο ATF-1/2/6 (activating transcription factor 1, 2 and 6), ο Sap1 (SRF accessory protein), ο CHOP (CREB homologous protein or growth arrest DNA damage inducible gene, i.e., GADD (228), το p53, το Max, ο C/EBP β , ο MEF2C (myocyte enhance factor 2C), οι MEF2A, MITF1, DDIT3, Elk1, NFAT και η HBP-1 (high mobility group-box protein (229). Μεταξύ των MK, η MK2

αναγνωρίστηκε πρώτη ως υπόστρωμα του p38α. Τόσο η MK2, όσο και η MK3 ενεργοποιούνται από το p38 in vivo και εμπλέκονται μέσω της δράσης τους στη βιοσύνθεση κυτοκινών και στην κυτταρική μετανάστευση. Πρόσφατα, έχει αποδειχθεί ότι η MK2 φωσφορυλιώνει την tristetraprolin (TTP), την hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) (230) και την PABP1 (polyA-binding protein) (231). Αυτές οι πρωτεΐνες φαίνεται ότι αποσταθεροποιούν το mRNA, υποδεικνύοντας το ρόλο του p38 στη σταθερότητα του mRNA. Η MNK1 είναι άλλη μια κινάση υπόστρωμα του p38, της οποίας η λειτουργία εντοπίζεται στην έναρξη της μετάφρασης, λαμβάνοντας υπ' όψιν το γεγονός ότι η MNK1 και MNK2 φωσφορυλιώνουν την eIF4F. Τέλος οι MSK φαίνεται ότι ενεργοποιούνται από το μονοπάτι της p38.

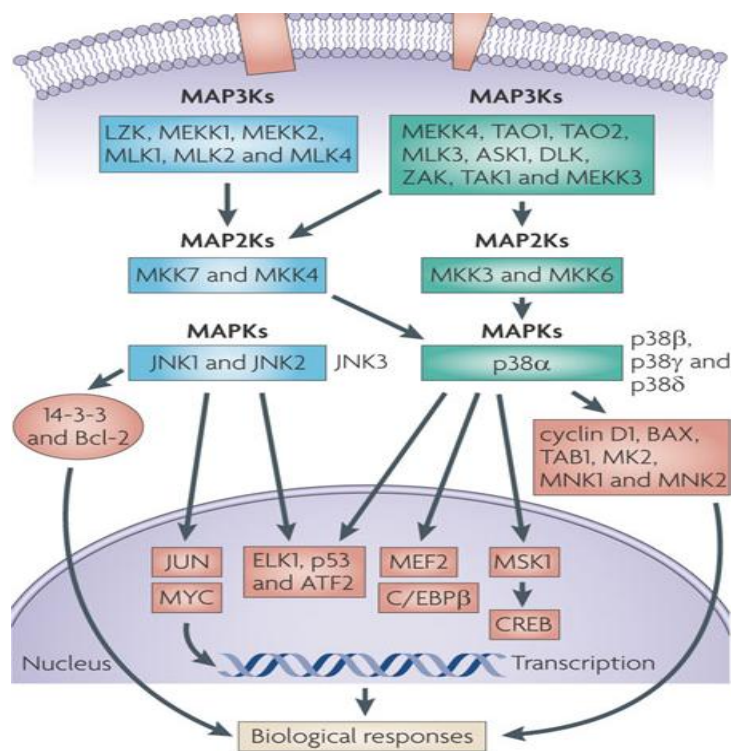
Ο ρόλος της p38 στην καρκινογένεση

Η εμπλοκή της p38 στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου έγινε αντιληπτή όταν παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση της p38 σε ζυμομύκητες οδηγεί σε σχετική μείωση της κυτταρικής αύξησης (232). Η αναστολή στη φάση G1 σε κύτταρα NIH3T3, με μικροέγχυση p38, αποτρέπεται με ανενεργή κινάση MKK3 υποδοκνύοντας την εμπλοκή της ενεργού p38α. Μια πιθανή σύνδεση της p38 με τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου έχει προταθεί μέσω της ρύθμισης υποστρωμάτων όπως τα HBP1 και p21(233). Πολλές δράσεις της p38 στον κυτταρικό κύκλο μεσολαβούνται από τις MSK, οι οποίες φωσφορυλιώνουν διάφορα υποστρώματα, όπως ο CREB, και επηρεάζουν την πρόιμη έκφραση των γονιδίων.

Η ενεργοποίηση της p38 παρατηρήθηκε σε κύτταρα που οδηγούνταν σε απόπτωση, επαγόμενη από διάφορους παράγοντες. Πολλοί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες απαιτούν τη δράση της p38 για την επαγωγή της απόπτωσης (234, 235). Η αναστολή της δράσης της p38 έχει αναφερθεί ότι ενισχύει την απόπτωση ως απόκριση σε παράγοντες που προκαλούν βλάβη στο DNA, όπως οι δοξορουμπικίνη και σισπλατίνη (236). Επίσης μελέτες οι οποίες δείχνουν την αναστολή της p38 από αναστολείς της κασπάσης, υποδεικνύουν το ρόλο των κατώτερων μονοπατιών της p38 στην ενεργοποίηση της κασπάσης (237). Παρόλα αυτά, η υπερέκφραση της MKK6 επάγει τη δράση της κασπάσης και αυξάνει τον κυτταρικό θάνατο, αποκαλύπτοντας κάποιο πιθανό ρόλο των ανώτερων μονοπατιών της p38 στην ενεργοποίηση της κασπάσης (238). Άλλοι μηχανισμοί που επάγουν την απόπτωση σε ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω της p38, υφίστανται μέσω της φωσφορυλίωσης και υπορύθμισης της Bcl-x1, και υπερρύθμισης του p53 (235). Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι η έλλειψη του MKK3 και MKK6 οδηγεί σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και πιθανόν σε ογκογόνο εξαλλαγή (235). Περαιτέρω μελέτες δηλώνουν ότι η p38 έχει ογκοκατασταλτική δράση, οι οποίες

φαίνεται ότι μεσολαβούνται μέσω της ενεργοποίησης του p53 και της απόπτωσης που εξαρτάται από το p53 (239).

Η p38 συμμετέχει και στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση. Η διαγραφή της p38a οδηγεί σε θάνατο των ποντικών της πειραματικής μελέτης, κατά την εμβρυογένεση (240). Η p38a και b εμπλέκονται στην κυτταρική διαφοροποίηση συγκεκριμένων τύπων κυττάρων. Η διαφοροποίηση των 3T3-L1 κυττάρων σε λιποκύτταρα και κυττάρων PC12 σε νευρώνες, απαιτεί τις p38a και b (241, 242). Η p38a σχετίζεται και με τη μυϊκή ανάπτυξη, καθώς είναι ένας σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας για πολλές μυϊκές πρωτεΐνες (243).



Εικόνα 4. Η ενεργοποίηση των JNK και p38 και πιθανά μόρια-στόχοι

Ο ρόλος των STAT και MAPK στον καρκίνο κεφαλής- τραχήλου.

Ο ρόλος των STAT στον καρκίνο κεφαλής- τραχήλου. Αλληλεπίδραση με άλλα μόρια.

EGFR και STAT στον καρκίνο κεφαλής- τραχήλου.

Η ανώμαλη σηματοδότηση υποδοχέων αυξητικών παραγόντων σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τις νεοπλασίες στον άνθρωπο (244). Πράγματι, σε πολλούς τύπους καρκίνου του ανθρώπου εκφράζονται υψηλά επίπεδα παραγόντων αύξησης και των αντίστοιχων υποδοχέων, και πολλά κακοήθη κύτταρα παρουσιάζουν υψηλή ενεργοποίηση υποδοχέων τυροσινικής κινάσης, λόγω της ενεργοποίησής τους από έναν αυτοκρινή ή παρακρινή μηχανισμό, ή με την ενεργοποίηση μεταλλάξεων στην ακολουθία κωδικοποίησής τους. Από τους παραπάνω υποδοχείς, πολύ καλά μελετημένος είναι ο υποδοχέας EGF (EGFR) (επίσης γνωστή ως τύπος I υποδοχέα τυροσινικής κινάσης tyrosine ErbB), ο οποίος είναι σημαντικός για πολυάριθμες φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες. Η παρεκκλίνουσα δραστηριότητα αυτής της οικογένειας υποδοχέων έχει συνδεθεί επίσης με την εξέλιξη και την αύξηση πολυάριθμων καρκινικών όγκων, συμπεριλαμβανομένου του 80-90% των HNSCCs (245). Πράγματι, η υπερέκφραση του EGFR μπορεί να αποτελεί έναν ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη σχετιζόμενο με το αυξημένο μέγεθος όγκων, τη μειωμένη ευαισθησία στην ακτινοβολία, και τον υψηλό κίνδυνο υποτροπής (246-248). Ο κυρίαρχος μηχανισμός που οδηγεί στην υπερέκφραση του EGFR είναι η ενίσχυση των γονιδίων EGFR, με καταγεγραμμένα περισσότερα από 12 αντίγραφα ανά κύτταρο σε HNSCC (249). Γενικά, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του EGFR οδηγούν στην ενεργοποίηση της δραστηριότητας ως κινάσες με αυτόματο διμερισμό. Η ιδιοσυστασιακή ενεργοποίηση του EGFR σε HNSCC προκαλείται επίσης από την αυτοκρινή σηματοδότηση του μέσω της συν-έκφρασης του EGFR και ενός από τους συνδέτες του, του TGF α , ο οποίος παρατηρείται συχνά σε HNSCC και σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση (250). Επίσης, η παρουσία του μεταλλαγμένου σμικρυσμένου EGFRvIII (truncated mutant), που προκαλεί την ιδιοσυστασιακή ενεργοποίησή του, έχει ανιχνευθεί σε ένα αριθμό περιπτώσεων HNSCC (251). Ιδιαίτερα ενδιαφέρον στις τρέχουσες προσπάθειες που στοχεύουν στον EGFR για τη θεραπεία HNSCC παρουσιάζει το γεγονός ότι ο EGFRvIII μπορεί να είναι ανθεκτικός στα αντισώματα

που μπλοκάρουν τον EGFR και τη cisplatin (251). Επιπρόσθετα έχει βρεθεί ότι ο υποδοχέας G protein-coupled receptor (GPCR) που επάγει την κατάτμηση των EGF-like αυξητικών παραγόντων οδηγεί σε ενεργοποίηση και σηματοδότηση του EGFR στα καρκινικά κύτταρα, υποδεικνύοντας ότι η επικοινωνία GPCR-EGFR μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη HNSCC αλλά και άλλων καρκίνων στον άνθρωπο (251-253).

Ο υποδοχέας EGFR, μόλις ενεργοποιηθεί, υποκινεί κατώτερα σηματοδοτικά μονοπάτια, των οποίων η συμβολή στην κανονική αλλά και παρεκκλίνουσα αύξηση των κυττάρων, αποτελεί αντικείμενο έντονης πειραματικής διερεύνησης κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών. Συγκεκριμένα, ο EGFR ενεργοποιεί τη Ras/Raf/mitogen ενεργοποιούμενη πρωτεϊνική κινάση (MAPK), την πρωτεΐνη STAT (signal transducers and activators of transcription), και την κινάση PI3K/AKT (phosphatidylinositol-3-kinase), στόχο του μονοπατιού της rapamycin (mTOR). Τα παραπάνω μόρια συμβάλλουν στην κακοήθη αύξηση και στο μεταστατικό δυναμικό των περιπτώσεων με HNSCC. Όσον αφορά στο STAT3, στον καρκίνο κεφαλής-τραχήλου, υπάρχουν αποδείξεις ότι η αυξημένη σηματοδότηση TGF- α /EGFR οδηγεί στην ιδιοσυστασιακή ενεργοποίησή του (245, 246). Ο EGFR έχει περιγραφεί ότι αλληλεπιδρά απευθείας με τις STAT1-3-5 σε επιθηλιακά κύτταρα. Τέλος, η στοχοποίηση της STAT3 υποδεικνύει τη σημασία του μορίου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω του μονοπατιού των TGF- α /EGFR, στον καρκίνο κεφαλής-τραχήλου (254).

Η οικογένεια Ras στον καρκίνο κεφαλής- τραχήλου

Τα μέλη της οικογένειας ras (H-ras, K-ras, N-ras) είναι από τα πιο συχνά μεταλλαγμένα ογκογονίδια στον καρκίνο του ανθρώπου(255). Υψηλή συχνότητα της ras μετάλλαξης έχει βρεθεί στον καρκίνο του στόματος, κυρίως σε ασιατικούς πληθυσμούς, όπου έχει συνδεθεί η μάσηση καρπών του φυτού areca (betel nut) (256). Εντούτοις, η μετάλλαξη της H-ras είναι λιγότερο συχνή (λιγότερο από 5%) σε περιπτώσεις HNSCC στο δυτικό ημισφαίριο, ενώ τα υπόλοιπα ras γονίδια σπάνια μεταλλάσσονται σε HNSCC (257, 258). Το παραπάνω καταδεικνύουν πώς οι διάφορες αιτίες και παράγοντες κινδύνου μπορούν να οδηγήσουν σε συγκεκριμένες γενετικές

αλλαγές, οι οποίες μπορούν να ασκήσουν αξιοπρόσεκτη επίδραση στην εξέλιξη ασθενειών και στην ανταπόκριση απέναντι στις διαθέσιμες και επιλεγμένες θεραπείες. Επίσης, φαίνεται ότι το δυναμικό των σηματοδοτικών μορίων που συμβάλλουν στην ανάπτυξη του HNSCC μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τους σχετικούς παράγοντες κινδύνου και τον πληθυσμό των ασθενών. Έτσι, ενώ στον καρκίνο του στόματος που σχετίζεται με τους καρπούς areca, το μονοπάτι Ras/RAF/MAPK μπορεί να ενεργοποιηθεί ιδιοσυστασιακά εξαιτίας λειτουργικής μετάλλαξης στα γονίδια *ras*, σε εκείνους τους καρκίνους που συνδέονται με την παρατεταμένη έκθεση στις καρκινογόνες ουσίες του καπνίσματος, το ίδιο μονοπάτι μπορεί να ενεργοποιηθεί από τη διαρκή αυτοκρινή ή παρακρινή υποκίνηση του EGFR και άλλων υποδοχέων αυξητικών παραγόντων. Η σημασία της αλληλεπίδρασης των μονοπατιών Ras/RAF/MAPK και JAK/STAT3 έχει αποδειχτεί σε κακοήθεις όγκους σε ηπατοκύτταρα, αλλά και στη λευχαιμία και είναι πολύ πιθανό να ισχύει και στις περιπτώσεις καρκίνου κεφαλής-τραχήλου (259, 260).

Η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών STAT στον καρκίνο κεφαλής-τραχήλου.

Η ιδιοσυστασιακή ενεργοποίηση της STAT3 έχει καταδειχθεί σε πολλούς καρκίνους, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του μαστού, της λευχαιμίας, του λεμφώματος, των πνευμόνων και του θυρεοειδή (261, 262). Στον καρκίνο κεφαλής-τραχήλου οι πρώτες μελέτες έδειξαν ότι τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν εντυπωσιακά αυξημένα τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων ενεργών μορφών του STAT3 (91). Επιπλέον, η αναστολή της δραστηριότητας του STAT3 οδηγεί στην παρεμπόδιση της αύξησης των καρκινικών κυττάρων (91, 263, 264), γεγονός που ενισχύει τη σημασία του STAT3 στην ογκογένεση. Στο HNSCC, τα υψηλά επίπεδα STAT3 φαίνεται ότι τροποποιούν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και προωθούν τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων του όγκου (265). Στην πραγματικότητα, η ενεργοποίηση του STAT3 μπορεί να αντιπροσωπεύσει ένα πρόδρομο γεγονός στην καρκινογένεση, δεδομένου ότι τόσο η περιοχή της βλάβης όσο και το παρακείμενο φυσιολογικό επιθήλιο των ασθενών με HNSCC παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης και φωσφορυλίωσης του STAT3 (263). Επίσης η παρουσία ενεργοποιημένου STAT3, συσχετίζεται με λεμφαδενική

μετάσταση και φτωχότερη πρόγνωση (91, 266). Αν και το STAT3 είναι το πιο προεξέχον STAT μόριο στα HNSCC, σε μερικές περιπτώσεις παρατηρείται ιδιοσυστατική ενεργοποίηση του STAT5, με τα STAT5A και STAT5B να είναι φωσφορυλιωμένα και σε υπερέκφραση (267, 268). Το STAT5A έχει συσχετιστεί με επαγωγή της cyclin D1, ενώ η αναστολή του STAT5B οδηγεί σε παύση της αύξησης των όγκων σε HNSCC (268).

Υπάρχουν πολλοί μηχανισμοί, οι οποίοι μπορούν να συμμετέχουν και να προάγουν την ενεργοποίηση των STATs στο HNSCC. Παραδείγματος χάριν, ενώ έχει μελετηθεί σαφώς η άμεση ενεργοποίηση του STAT3 από το EGFR σε κύτταρα HNSCC (91,7), το STAT3 μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί από ένα μηχανισμό ανεξάρτητο από το EGFR (269). Το παραπάνω περιλαμβάνει συχνά την αυτοκρινή ενεργοποίηση του υποδοχέα κυτταροκινών gp130 σε κύτταρα HNSCC, από κυτοκίνες που απελευθερώνονται από τα κύτταρα του όγκου, όπως η IL-6, η οποία ενεργοποιεί το STAT3 ανεξάρτητα από την κατάσταση ενεργοποίησης του EGFR (269).

Επιπλέον, η παρέμβαση σε αυτό το μονοπάτι ενεργοποίησης της STAT3 μπορεί να οδηγήσει στη μειωμένη αύξηση και τον αποπτωτικό θάνατο των κυττάρων σε HNSCC (269). Άλλες κυτοκίνες, όπως η ερυθροποιητίνη, μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν τις STAT σε HNSCC (270), υποδηλώνοντας ότι η αυτοκρινής ή παρακρινής ενεργοποίηση των STAT μπορεί τελικά να αντιπροσωπεύει ένα γενικό μηχανισμό με τον οποίο αυτοί οι παράγοντες μεταγραφής μπορούν να ενεργοποιηθούν στο περιβάλλον των κυττάρων με HNSCC. Επιπλέον, δύο μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών που καταστέλλουν τη σηματοδότηση των (suppressors of cytokine signaling) SOCS και αναστέλλουν τη δράση των STAT, οι socs-1 και socs-3, έχει αποδειχτεί πρόσφατα ότι υπορρυθμίζονται από την επαγόμενη σε ένα μεγάλο αριθμό των δειγμάτων ιστών και κυτταρικών σειρών από HNSCC(271, 272). Η παραπάνω πρωτεϊνική οικογένεια μπορεί να αντιπροσωπεύσει μια σειρά γονιδίων που αναστέλλουν τη μεταγωγή σημάτων σε HNSCC, η αδρανοποίηση των οποίων, μπορεί να συμβάλει στη διαδικασία της ανάπτυξης HNSCC.

Κυτταροκίνες και Jaks

Παρά την ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της ανώμαλης σηματοδότησης TGF-/EGFR και της ενεργοποίησης των πρωτεϊνών STAT στον καρκίνο κεφαλής-τραχήλου, η

ανάγκη της διαμεσολάβησης του EGFR για την ιδιοσυστασιακή ενεργοποίηση του Stat3 παραμένει ασαφής. Η δυνατότητα του ιδιοσυστασιακά ενεργού Stat3 να λειτουργεί ως σηματοδοτικός παράγοντας αύξησης των κυττάρων, ανεξάρτητα από τη σηματοδότηση του EGFR, υποστηρίζει την παρουσία άλλων μονοπατιών που συμβάλλουν στην ογκογόνο σηματοδότηση του Stat3 στον καρκίνο κεφαλής-τραχήλου (273). Τα κύτταρα του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος κεφαλής-τραχήλου εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα προ-φλεγμονώδεις και προ-αγγειογενετικές κυτοκίνες, όπως οι IL-1, IL-6, IL-8, ο παράγοντας GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), και ο VEGF τόσο σε in vivo όσο και σε in vitro μελέτες. Το παραπάνω γεγονός μπορεί επίσης να διαδραματίζει έναν πιθανό ρόλο στην αυτοκρινή και παρακρινή σηματοδότηση οδηγώντας στην ογκογόνο ενεργοποίηση του STAT (274, 275). Επιπρόσθετα, ο στοχευμένος αποκλεισμός του υποδοχέα gp130 ή η αναστολή των JAK κινασών μπλοκάρει την ιδιοσυστασιακή ενεργοποίηση του Stat3 και εμποδίζει την αύξηση των κυττάρων στον καρκίνο κεφαλής-τραχήλου (269). Εντούτοις, ο ρόλος των JAK κινασών στην ογκογόνο σηματοδότηση του STAT παραμένει αμφισβητούμενος, δεδομένου ότι οι JAK κινάσες αποδείχθηκε ότι δεν απαιτούνται για την ενεργοποίηση των STAT και την αύξηση των κυττάρων στον καρκίνο κεφαλής-τραχήλου (268). Τέτοιες αποκλίσεις μπορούν να είναι αποτέλεσμα των διαφορών στα επίπεδα αναστολής των JAK κινασών.

Η ενεργοποίηση των MAPK στον καρκίνο κεφαλής-τραχήλου.

Η ανώμαλη σηματοδότηση των MAPK επηρεάζει τις περισσότερες κυτταρικές λειτουργίες και διαδραματίζει ένα βασικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου (276). Διάφορες ομάδες έχουν αναλύσει την ενεργοποίηση των MAPK στο HNSCC τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* πειράματα. Λαμβάνοντας υπόψη τον κύριο ρόλο τους στην κυτταρική διαφοροποίηση και στη διαδικασία της απόπτωσης, οι JNK/SAPK και p38 MAPK θεωρούνται ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες(277). Στην πραγματικότητα, έχει αναφερθεί μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της ενεργοποίησης της p38 και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HNSCC σε *in vitro* μελέτες (278). Εντούτοις, διαφορετικά αποτελέσματα αναφέρονται από τους Juntilla et al (279), καθώς αναφέρεται ότι η ενεργοποίηση της p38 είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό των κυτταρικών σειρών HNSCC, δεδομένου ότι η χημική αναστολή της οδήγησε σε εμφανή μείωση στον αριθμό των κυττάρων. Επιπλέον, η μεταφορά dominant-negative p38 απέτρεψε την αύξηση των όγκων *in vivo*, μετά από τον εμβολιασμό κυττάρων ακανθοκυτταρικού καρκινώματος σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια (279). Επίσης η παραπάνω μελέτη, κατέδειξε τη δυνατότητα της p38 να αποφοσφωριλιώνει τη MEK1/2, και να εμποδίζει συνεπώς την ενεργοποίηση της ERK1/2, οδηγώντας τα κύτταρα στην απόπτωση. Η παραπάνω αρνητική ρύθμιση του μονοπατιού της ERK1/2 από την p38, έχει περιγραφεί μόνο σε φυσιολογικά κύτταρα, αλλά όχι σε κύτταρα HNSCC, υποδηλώνοντας ότι η απουσία της p38 ενεργοποίησης μπορεί να βοηθάει τα νεοπλασματικά κύτταρα ώστε να αποφύγουν την απόπτωση. Σε αντίθεση με τα ανωτέρω στοιχεία, στην κυτταρική σειρά Hep3, η οποία προέρχεται από μεταστατικό καρκίνωμα της γλώσσας, η αύξηση της αναλογίας ERK/p38 ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την αύξηση του όγκου(280). Επίσης έχει αναφερθεί ότι η p38 επηρεάζει την επαγόμενη από τον EGF, παραγωγή και απελευθέρωση του VEGF σε κυτταρικές σειρές HNSCC (281). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η ενεργοποίηση της p38 είναι απαραίτητη για το θάνατο των καρκινικών κυττάρων σε χημειοθεραπείες (282). Παρόμοια με την p38, η JNK έχει αναφερθεί ότι μεσολαβεί στην κυτταροτοξική δράση αντινεοπλασματικών παραγόντων(283) αλλά και στην επαγόμενη από την ακτινοθεραπεία απόπτωση σε κυτταρικές σειρές HNSCC (284). Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τον ογκοκατασταλτικό ρόλο των παραπάνω μορίων, έχει παρατηρηθεί μείωση της έκφρασής τους σε κύτταρα HNSCC (285). Εντούτοις, άλλες μελέτες

επισημάναν το ρόλο της ενεργοποιημένης JNK στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HNSCC και στην αύξηση των όγκων *in vivo*. Για παράδειγμα οι Gross et al(286), παρατήρησαν αύξηση στα επίπεδα του φωσφορυλιωμένου JNK σε κύτταρα HNSCC σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς που ελήφθησαν από υγιείς εθελοντές. Επιπλέον, η αναστολή της JNK οδήγησε στη στάση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M και απέτρεψε την απελευθέρωση VEGF (286).

Αντίθετα, επειδή η ERK συμμετέχει στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, έχει προταθεί ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού της ERK μπορεί να οδηγήσει στην προαγωγή της αύξησης καρκίνου. Επομένως, η ενεργοποίηση της ERK έχει μελετηθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου στον άνθρωπο, και η ιδιοσυστασιακή ενεργοποίησή της έχει τεκμηριωθεί σε αρκετές κακοήθειες, όπως για παράδειγμα στο μυέλωμα, στο ήπαρ, καθώς και στο στομάχι και στον προστάτη(287-289). Μερικές μελέτες αξιολόγησαν επίσης το μονοπάτι της ERK στο HNSCC. Οι Mishima et al(290) παρατήρησαν με ανοσοιστοχημική ανάλυση μια αύξηση στο ποσοστό των κυττάρων που ήταν θετικά στην ERK1/2 σε δείγμα 39 ασθενών με OSCC, σε σύγκριση με δείγμα πέντε ασθενών που περιελάμβανε φυσιολογικό βλεννογόνο. Επιπλέον, η έκφραση της ERK1/2 συσχετίστηκε έντονα με το δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67 σε φτωχά διαφοροποιημένα κύτταρα, προτείνοντας κατά συνέπεια έναν ρόλο της ERK1/2 στον καρκινικό πολλαπλασιασμό (290). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται από τους Albanell et al(291), οι οποίοι μελέτησαν την ανοσοιστοχημική έκφραση της ERK1/2 σε ένα αριθμό δειγμάτων HNSCC, ο οποίος περιελάμβανε καρκινώματα της γλώσσας, των χειλέων και του φάρυγγα. Επιπρόσθετα, καταδείχθηκε μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της ERK και του EGFR και βρέθηκε έντονη αύξηση στα επίπεδα της ενεργοποιημένης ERK1/2 σε όγκους με προχωρημένη λεμφαδενική μετάσταση.

Μια ανοσοιστοχημική μελέτη της έκφρασης της ενεργοποιημένης ERK1/2 πραγματοποιήθηκε από τους WANG et al(292) σε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της γλώσσας, έναντι φυσιολογικών ιστών γλώσσας που ελήφθησαν από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση για άλλους λόγους. Σε αυτήν τη μελέτη, παρατηρήθηκε υπερέκφραση της φωσφορυλιωμένης ERK1/2 στα δείγματα με καρκίνο, η οποία συσχετίστηκε με την ιστολογική κατάταξη των βλαβών. Επιπλέον, η υπερέκφραση αυτή συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση της cyclin D1,

υποδεικνύοντας την άμεση διασύνδεση μεταξύ της υπερέκφρασης της ERK1/2 και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η έκφραση και η κυτταρική εντόπιση των φωσφορυλιωμένων μορφών των ERK1/2 και p38 αναλύθηκε επίσης σε μια μελέτη από τους Ritcher et al (293). Σε αυτήν τη μελέτη, η ανοσοϊστοχημική ανάλυση αποκάλυψε την παρουσία φωσφορυλιωμένης και μεταφερόμενης στον πυρήνα ERK1/2 τόσο σε φυσιολογικό όσο και σε παθολογικό βλεννογόνο. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα για τη φωσφορυλιωμένη p38, καθώς ανιχνεύτηκε τόσο σε φυσιολογικό όσο και σε παθολογικό βλεννογόνο, εντοπισμένη όμως μόνο στα κύτταρα της βασικής και παραβασικής μεμβράνης. Παρόλα αυτά αναφέρθηκε μια γενική μείωση στα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης ERK1/2 στα δείγματα των όγκων σε σύγκριση με το φυσιολογικό βλεννογόνο. Επιπρόσθετα παρατηρήθηκε μια τάση για μικρή αύξηση στο ποσοστό των θετικών κυττάρων για την πυρηνική pERK1/2 σε σχέση με την ιστολογική διαβάθμιση.

Αντίθετα, η πυρηνική εντόπιση της φωσφορυλιωμένης p38 μπορούσε να ανιχνευθεί μόνο σε λίγα κύτταρα και ανεξάρτητα από την ιστολογική διαβάθμιση (293). Οι Serewko et al(294) που ανέλυσαν τη γονιδιακή έκφραση σε κυτταρικές σειρές ακανθοκυτταρικού καρκινώματος στόματος, ανακάλυψαν μειωμένη έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν ενεργοποιητές των MAPK, όπως των MAPKK2 και MAPKK3, και πρότειναν ότι μια τέτοια μείωση αποτελεί μηχανισμό αντίδρασης στην αυξανόμενη έκφραση του EGFR. Σε μερική διαφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματα έρχεται μια άλλη μελέτη με γενομικό συγκριτικό υβριδισμό σε 26 δείγματα HNSCC, η οποία διαπιστώνει χρωμοσωμική δραστηριότητα με την κωδικοποίηση γονιδίων για τη MAPK2 (295).

Μερικοί συγγραφείς έχουν υπογραμμίσει το ρόλο των MAPK και ειδικά του μονοπατιού των ERKs στη ρύθμιση της απελευθέρωσης του VEGF, παράγοντας αύξησης ο οποίος είναι γνωστό ότι προάγει και την κυτταρική αύξηση και μετάσταση σε HNSCC. Η συμμετοχή των ERK1/2 στην επαγόμενη από τα AP-1 και pF-kB έκφραση του VEGF, έχει καταδειχθεί στις κυτταρικές σειρές ακανθοκυτταρικού καρκινώματος στόματος 9 και 11 (296). Η συμβολή του μονοπατιού της ERK στη νέο-αγγειογένεση έχει επιβεβαιωθεί σε μια μελέτη των Zeng et al (297). Στην πραγματικότητα, κατέδειξαν συγκαλλιεργώντας ενδοθηλιακά κύτταρα και κύτταρα ακανθοκυτταρικού καρκινώματος στόματος ότι τα

ακανθοκυτταρικά κύτταρα είναι σε θέση να επάγουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα ώστε να παράγουν μικροαγγειακούς σχηματισμούς μέσω της αλληλεπίδρασης μεταξύ της ERK και του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch (297). Η δια μέσω της ERK επαγόμενη απελευθέρωση του VEGF, έχει επίσης παρατηρηθεί τόσο σε κυτταρικές σειρές HNSCC όσο και σε *in vivo* πειράματα μετά από ακτινοβολία (298).

Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των ανωτέρω μελετών που προτείνουν έναν ισχυρό ρόλο της ενεργοποίησης της ERK στην πρόοδο του HNSCC, άλλοι ερευνητές αναφέρουν μείωση στην ενεργοποίηση της ERK1/2 σε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του στόματος. Οι Tosi et al(299) πραγματοποίησαν μια ανάλυση σε 47 δείγματα από βιοψίες HNSCC, τα οποία αφορούσαν σε περιοχές της στοματικής κοιλότητας, του φάρυγγα και του λάρυγγα, εξετάζοντας την κατάσταση ενεργοποίησης διάφορων πρωτεϊνικών κινασών, όπως των MAPK, AKT και PKC. Σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες, κυρίως βασισμένες σε ποιοτική ή ημιποσοτική ανάλυση, αυτή η ποσοτική αξιολόγηση της ενεργοποίησης των ERK1/2 επισήμανε μια σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων του όγκου και ελέγχου. Στην πραγματικότητα οι ERK1/2 ήταν σε χαμηλότερα επίπεδα φωσφορυλιωμένες στα καρκινικά δείγματα. Μια παρόμοια μείωση στα επίπεδα των ενεργοποιημένων μορφών βρέθηκε επίσης για την AKT. Επιπλέον, τα χαμηλότερα επίπεδα της ενεργοποιημένης ERK1/2 βρέθηκαν σε όγκους ανεξάρτητα από τη λεμφαδενική συμμετοχή, προτείνοντας κατά συνέπεια ότι τα χαμηλότερα επίπεδα της ενεργοποιημένης ERK1/2 είναι συνδεδεμένα με την ογκογένεση παρά με τη μετάσταση (299).

Συγκρίσιμα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και σε μια άλλη μελέτη, η οποία εξέτασε δείγματα από βιοψίες ακανθοκυτταρικού καρκινώματος του λάρυγγα (300). Η western blot ανάλυση της έκφρασης των ERK1/2 υπέδειξε σημαντική μείωση στα επίπεδα των ενεργοποιημένων ERK1/2 στα καρκινικά δείγματα συγκρινόμενα με τα δείγματα ελέγχου, τα οποία ελήφθησαν από κλινικά υγιή ιστό των ίδιων ασθενών. Αν και βρέθηκαν ελάχιστες διαφορές στα επίπεδα των ενεργοποιημένων μορφών των JNK και p38 MAPK, η ανοσοιστοχημική ανάλυση για τις φωσφορυλιωμένες μορφές των MAPKs έδειξε ότι όλες οι ενεργοποιημένες MAPKs εκφράζονται τόσο στους όγκους όσο και στους φυσιολογικούς ιστούς, ενώ καμία διαφορά δε βρέθηκε στην κυτταρική εντόπιση μεταξύ των όγκων και των φυσιολογικών ιστών.

Τα παραπάνω αποτελέσματα έχουν επιβεβαιωθεί και από μια άλλη μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε σε δείγματα OSCC (301). Σε αυτήν την περίπτωση, η western blot ανάλυση δεν αποκάλυψε καμία σημαντική αλλαγή στην ενεργοποίηση των JNK και p38 MAPK, ενώ παρατήρησε μια σημαντική μείωση στα επίπεδα φωσφορυλίωσης των ERK1/2 στα καρκινικά δείγματα σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς.

Μερικές μελέτες έχουν αναλύσει το ρόλο των MAPK στην εξέλιξη των HNSCC, δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στη διηθητική τους ικανότητα. Οι Mukhopadhyay et al(302) αξιολόγησαν την επίπτωση των p38 και ERK1/2 στην ενεργοποίηση των μεταλοπρωτεϊνών (MMPs), οι οποίες αποτελούν ένζυμα που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση της βασικής μεμβράνης. Ανώμαλη έκφραση των MMPs και ειδικά των MMP2 και MMP9, βρίσκεται συχνά στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του στόματος σε ανθρώπους, όπου παρατηρείται ενισχυμένη έκφραση τους στις περιοχές με αυξημένη διήθηση(303, 304). Ένας αντίστροφος συσχετισμός έχει καταδειχθεί μεταξύ της ενεργοποίησης της p38 MAPK και της έκφρασης της MMP9 σε κυτταρικές σειρές OSCC, ενώ η ενεργοποίηση των ERK1/2 συσχετίζεται θετικά με τη δραστηριότητα της MMP9(301). Η συμμετοχή του μονοπατιού των ERKs στη θετική ρύθμιση της έκφρασης της MMP2 έχει καταδειχθεί επίσης στην κυτταρική καρκινική σειρά scc-4(305). Ο ρόλος της p38 στη θετική ρύθμιση της έκφρασης διαφόρων MMP συμπεριλαμβανομένων των MMP9 και MMP13 καταδείχθηκε σε διάφορες κυτταρικές σειρές από καρκίνο του λάρυγγα, της γλώσσας και των ούλων(279).

Ο ρόλος της αλληλεπίδρασης STAT και MAPK στον καρκίνο.

ERK- STAT

Ο ρόλος της φωσφορυλίωσης της σερίνης στη δράση των Stat1 και Stat3 αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Zhang και συν (306), οι οποίοι κατέδειξαν τη σημασία αυτής της φωσφορυλίωσης στη σύνδεση με το DNA. Οι Wen και συν (307) παρατήρησαν συναινετικές αλληλουχίες (αλληλουχίες νουκλεϊνικού οξέος που όταν συγκρίνονται μεταξύ τους εμφανίζουν τις ίδιες βάσεις -consensus sequences) στη φωσφορυλίωση των MAPK και στη ser-727 στο καρβοξυτελικό άκρο της STAT3. Η μετάλλαξη αυτού του τμήματος περιορίζει τη μεταγραφική δραστηριότητα της STAT3. Η φωσφορυλίωση της συναινετικής αλληλουχίας των MAPK στις STATs (στη Ser-727 σε STAT1 και STAT3) έχει αποδειχτεί μέσα από μελέτες με προκλητή μετάλλαξη σε αυτό το τμήμα, οι οποίες υποδεικνύουν ότι το τελευταίο απαιτείται για τη μέγιστη μεταγραφική δράση αλλά όχι απαραίτητα για τη σύνδεση με το DNA. Επίσης αναφέρθηκε συνκατακρήμνιση Stat1 με ERK2 σε κύτταρα με επαγόμενη IFN-β και μείωση της επαγόμενης από IFN-β γονιδιακής μεταγραφής σε πειράματα με μεταλλαγμένο (ανενεργό) ERK2 (308). Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι η συγκεκριμένη MAPK ενεργεί ως ένα θετικό σήμα στη ρύθμιση της δραστηριότητας των STAT. Οι Chung et al (309) αναφέρουν ότι η φωσφορυλίωση της σερίνης της Stat3 επιτυγχάνεται με τη μεσολάβηση ενός μονοπατιού που εξαρτάται από την ERK ως απάντηση στον EGF παράγοντα, ενώ ρυθμίζει αρνητικά τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης. Τα παραπάνω συμφωνούν με τα αποτελέσματά των Jain et al (310), οι οποίοι προσθέτουν ότι η αρνητική επίδραση στη φωσφορυλίωση της τυροσίνης έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της σύνδεσης του STAT3 στο DNA και μειώνει τη μεταγραφική δραστηριότητα. Παρόλα αυτά, βρέθηκε ότι η Stat3 φωσφορυλίωση στη σερίνη σε κύτταρα που επάγονται από την IL-6 είναι ανεξάρτητη από την ERK. (309). Σε μια άλλη έρευνα, οι Zhu et al. (311) υποδεικνύουν ότι οι MAPK ενεργοποιούνται ασθενώς σε απάντηση στην IFN-γ και δεν είναι υπεύθυνες για τη Stat1 φωσφορυλίωση στη σερίνη, που δηλώνουν ότι η φωσφορυλίωση της σερίνης των STATs είναι ένα περίπλοκο ζήτημα. Η πρωτεΐνη STAT φαίνεται να φωσφορυλιώνεται από διάφορες κινάσες μέσω αντίστοιχων συνδετικών μορίων.

Η φωσφορυλίωση της ERK2 από την MEK1 κινάση της, αυξάνει τη σύνδεσή της όχι μόνο με το κανονικό (wild type) Stat3 αλλά και με το μεταλλαγμένο στη Ser-727

STAT3 που δεν μπορεί να συσχετιστεί με την ERK2 απουσία της MEK1 σε μη επαγόμενα κύτταρα. Αυτό δείχνει ένα υψηλό βαθμό σύνδεσης της Stat3 με την ενεργοποιημένη ERK2 που μπορεί να υπερκεράσει την απαίτηση της φωσφορυλίωσης στη σερίνη.

Φαίνεται ότι υπάρχουν δυο τρόποι σύνδεσης στη σερίνη: η μη φωσφορυλιωμένη ERK2 δεσμεύει τη Stat3 με χαμηλή συνάφεια σε μη επαγόμενα κύτταρα στο κυτταρόπλασμα, ενώ η φωσφορυλιωμένη ERK2 δεσμεύει τη Stat3 με υψηλή συνάφεια πιθανώς στον πυρήνα, γεγονός που επηρεάζει αρνητικά τη δραστηριότητα της Stat3 με τη μείωση της φωσφορυλίωσης στην τυροσίνη μέσω ενός μέχρι τώρα άγνωστου μηχανισμού. Επίσης, αντίθετα με τις c-Src και Jak2 κινάσες, η έκφραση της v-Src κινάσης δε φαίνεται να επηρεάζει τη διασύνδεση Stat3/ERK2 σε μετασχηματισμένα (ενεργά) v-Src κύτταρα. Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι το γεγονός ότι η ισχυρή φωσφορυλίωση της ERK2 από τη v-Src οδηγεί σε αύξηση της διασύνδεσης (310).

Οι Krasilnikov και συν (312) σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές μελανώματος μελέτησαν την επίδραση των ERK και PI3K στη μεταγραφική δραστηριότητα της STAT και αναφέρουν ότι η ERK αναστέλλει τη STAT μέσω της υπορύθμισης της JAK, γεγονός που θέτει ερωτήματα για το μηχανισμό παρεμπόδισης της JAK από την ERK. Οι συγγραφείς προτείνουν ότι είναι πιθανόν η ERK να ρυθμίζει έμμεσα το βαθμό δραστηριότητας της JAK, αν και δεν μπορεί να αποκλεισθεί η επίδραση σε κάποια άλλη κινάση που μπορεί να φωσφορυλιώνει τη STAT3 στην τυροσίνη. Σχετικοί ανασταλτικοί παράγοντες όπως οι SOCS (313), καθώς και η φωσφατάση CD45 (314), είναι μεταξύ των πιθανών παραγόντων που μπορούν να επηρεάζουν τη δράση της JAK μέσω της MAPK φωσφορυλίωσης. Περαιτέρω μελέτες θα καθορίσουν τον ακριβή στόχο της δραστηριότητας των ERK ο οποίος παρεμποδίζει τη JAK και έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της δραστηριότητας της STAT3. Επίσης οι Krasilnikov et al αναφέρουν ότι η παρεμπόδιση της δράσης της STAT συμπίπτει με αυξανόμενη έκφραση του Fas υποδοχέα, ο οποίος στην αντίθετη περίπτωση είναι κατασταλαμένος λόγω της συνεργασίας μεταξύ STAT3 και c-Jun (312).

Τα συμπεράσματα των παραπάνω ερευνητών έρχονται σε συμφωνία με μελέτες που διενεργήθηκαν και σε άλλους τύπους καρκινικών κυττάρων και υποδεικνύουν σαφώς το ρόλο του μονοπατιού Ras-Raf-MEK-ERK στην αντοχή των όγκων στην απόπτωση, εν μέρει μέσω της ενεργοποίησης του παράγοντα αύξησης των ηπατοκυττάρων ή της PI3K σηματοδότησης (315-317). Ο ρόλος των PI3K και του B-raf στην καταστολή της STAT σηματοδότησης αποτελεί μέρος ενός σύνθετου δικτύου διαδοχικών σημάτων που μετασχηματίζουν και προσφέρουν αντίσταση στα κύτταρα του μελανώματος. Η ανοχή αυτή μπορεί να υπερνικηθεί μέσω της παρεμπόδισης των PI3K και MAPK μονοπατιών, με συνέπεια την ευαισθητοποίηση των παραπάνω όγκων στην απόπτωση.

JNK-STAT

Η ενεργοποίηση της JNK οδηγεί στη φωσφορυλίωση στη Ser/Thr σε διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες και άλλα κυτταρικά υποστρώματα τα οποία εμπλέκονται στην κυτταρική επιβίωση, στη σηματοδότηση υποδοχέων ινσουλίνης και στη σταθεροποίηση του mRNA (318-322).

Οι Shirakawa et al (323) σε μια μελέτη αναφέρουν ότι η JNK φωσφορυλιώνει τη Ser-707 και με αυτόν τον τρόπο, καταστέλλει τη μέσω IL-4-επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση της STAT6. Όταν στα κύτταρα της μελέτης χορηγήθηκαν αναστολείς των p38 και JNK η φωσφορυλίωση της ser-707 της STAT6 ήταν περιορισμένη. Εντούτοις, η ser-707 της STAT6 φωσφορυλιωνόταν *in vitro* μόνο από τη JNK, και όχι από την p38 και η αναστολή της p38 δεν είχε κανένα ανιχνεύσιμο αποτέλεσμα στη φωσφορυλίωση της ser-707. Η παραπάνω φωσφορυλίωση μειώνει την ικανότητα σύνδεσης στο DNA της STAT6 που επάγεται από την IL-4, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη μεταγραφή των σηματοδοτούμενων από τη STAT6 γονιδίων. Η αδρανοποίηση των STAT6 από τη JNK μέσω της φωσφορυλίωσης στη Ser-707 μπορεί να είναι ένας μηχανισμός που ελέγχει την ισορροπία μεταξύ της IL-1β και IL-4 σήμανσης. Αν και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες επιβεβαίωσης, η ικανότητα της JNK να φωσφορυλιώνει τη Ser-707 της STAT6 θα μπορούσε να παίζει ρόλο στην ανοσολογική απόκριση.

Η JNK μεσολαβεί στην εξαρτώμενη από το στρες φωσφορυλίωση της σερίνης του Stat3. Η θέση της φωσφορυλίωσης της Stat3 από τη JNK1 ταυτοποιήθηκε σε *in vitro* μελέτες ότι είναι η Ser-727. Οι Lim και Cao (324) σε μια μελέτη τους χρησιμοποίησαν αναστολείς των μονοπατιών της ERK και p38 και υποστηρίζουν περαιτέρω την ειδικότητα της Stat3 φωσφορυλίωσης στη σερίνη από τη JNK. Τα αποτελέσματά τους αποδεικνύουν ότι η JNK είναι η κινάση που φωσφορυλιώνει τη Stat3 ως απάντηση στο στρες. Δεδομένου ότι παρατηρείται φωσφορυλίωση της Stat3 στη Ser-727 κατά τη θεραπεία των κυττάρων με χλωριούχο νάτριο, οκαδαϊκό οξύ και λιποπολυσακχαρίτη, (παράγοντες που διεγείρουν τη δραστηριότητα της p38), οι ερευνητές εξέτασαν αν η p38 κινάση θα μπορούσε να φωσφορυλιώνει τη Stat3. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι δεν ήταν σε θέση να ανιχνεύσουν φωσφορυλίωση στη Ser-727 της Stat3 πρωτεΐνης από την p38, η οποία ενεργοποιήθηκε είτε από ερεθίσματα στρες είτε με την ανώτερη της MKK3 κινάση. Ωστόσο, η δυνατότητα της p38 να φωσφορυλιώνει τη Stat3 *in vivo* δεν μπορεί να αποκλειστεί, και πρέπει να γίνουν και άλλες μελέτες προκειμένου να καθοριστεί αν η JNK είναι η μόνη από την οικογένεια κινασών που εμπλέκονται στη Stat3 φωσφορυλίωση της σερίνης μετά από εφαρμογή παραγόντων στρες. Επιπρόσθετα οι Lim και Cao (324) εξέτασαν πώς η JNK επηρεάζει την πρόσδεση του Stat3 στο DNA και τη μεταγραφική της δραστηριότητα όταν η STAT3 διεγείροταν από τον EGF ή τη Src. Παρατήρησαν λοιπόν ότι η JNK1, όταν ενεργοποιείται από την ανώτερη κινάση της MKK7, ή από την υπεριώδη ακτινοβολία, αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης και περιορίζει την πρόσδεση στο DNA και τη μεταγραφική δραστηριότητα του Stat3. Η καταστολή φαίνεται να είναι ειδική για το Stat3 καθώς η Stat1-DNA δραστηριότητα δεν αναστέλλεται (324).

Οι Miyazaki et al (325) μελέτησαν τη σχέση λεπτίνης, JNK, STAT3 και Akt σε περιπτώσεις καρκίνου του προστάτη που δεν εξαρτάται από ανδρογόνα. Οι ερευνητές αναφέρουν ότι η προσθήκη λεπτίνης διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω της JNK. Όπως και η JNK, οι STAT3 και Akt πρωτεΐνες εμπλέκονται στην παραπάνω μορφή καρκίνου του προστάτη. Η λεπτίνη ενεργοποιεί τις JNK, STAT3 και Akt με ένα διφασικό τρόπο ακολουθώντας παρόμοια χρονική πορεία. Η φαρμακολογική αναστολή της JNK καταστέλλει τη διεγερόμενη από τη λεπτίνη δραστηριότητα δέσμευσης στο DNA, καθώς επίσης και τη φωσφορυλίωση της Ser-

727, της STAT3. Δεδομένου ότι η JNK αυξάνει τη δραστηριότητα της STAT3 μέσω της φωσφορυλίωσης της Ser-727, μεσολαβεί στην ενεργοποίηση της STAT3 μέσω της διέγερσης από τη λεπτίνη και της φωσφορυλίωσης της Ser-727. Επιπλέον, η αναστολή της JNK εξασθενίζει τη διεγερόμενη από τη λεπτίνη φωσφορυλίωση της Ser-473 της Akt, που είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της. Έτσι, η JNK εμπλέκεται στη διαδικασία ενεργοποίησης της Akt από τη λεπτίνη. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η JNK διαμεσολαβεί στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που διεγείρονται από τη λεπτίνη, στο συγκεκριμένο τύπο καρκίνου, μέσω της επίδρασης σε STAT3 και Akt (325).

P38-STAT

Σε προγεννητικά κύτταρα του ερυθρού μυελού, υπάρχει η παραδοχή ότι η αναστολή της σηματοδότησης της IL-6 από την IL-1 ρυθμίζεται από την p38 ομάδα των MAPKs (326, 327). Οι Graeve et al (327) κατέδειξαν ότι η IL-1 ενεργοποιεί την έκφραση των SOCS3 πρωτεϊνών με μηχανισμό που εξαρτάται από την p38 και ότι η αναστολή της p38 μπλοκάρει την έκφραση των SOCS3 και αντιστρέφει την αναστολή της IL-6 σηματοδότησης. Άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι όταν οι SOCS3 υπερεκφράζονται συνδέονται με τον υποδοχέα gp130 και αναστέλλουν την IL-6 σηματοδότηση (328, 329). Τα παραπάνω ευρήματα έχουν οδηγήσει στην πρόταση ότι η IL-1 αναστολή της IL-6 εξαρτάται από τις SOCS3 πρωτεΐνες. Αντίθετα οι Ahmed και συν (326), υποδεικνύουν ότι η IL-1 αναστέλλει τη σηματοδότηση της IL-6 μέσω ενός p38-εξαρτώμενου μηχανισμού ακόμα και όταν οι SOCS3 δεν εκφράζονται και όταν η γονιδιακή τους έκφραση μπλοκάρεται από τη χρήση της ακτινομυκίνης D(326). Αυτό έχει οδηγήσει στην πρόταση ενός εναλλακτικού μηχανισμού μέσω του οποίου η p38 αναστέλλει την IL-6 σηματοδότηση ανεξάρτητα από την έκφραση νέων γονιδίων. Πρόσθετα στοιχεία για την ταχεία και άμεση ανασταλτική δράση του μονοπατιού της Jak-STAT σηματοδότησης παρέχονται από μία μελέτη που αποδεικνύει ότι η μέσω της IL-1 αναστολή της σηματοδότησης της ιντερφερόνης (IFN)-α στα ηπατοκύτταρα δεν εξαρτάται από τη de novo γονιδιακή έκφραση (330). Τα προηγούμενα αποτελέσματά δεν αποκλείουν την πιθανότητα η IL-1 να αναστέλλει την IL-6 σηματοδότηση έμμεσα, μέσω της επαγωγής της p38 και της

επακόλουθης αύξησης της σταθερότητας ή της μετάφρασης των mRNAs που εκφράζονται ιδιοσυστασιακά (331).

Επίσης οι Ahmed και συν (326) αναφέρουν ότι το κύριο εύρημα της μελέτης τους είναι η αναστολή της μέσω- IL-6 Jak-STAT σηματοδότησης, η οποία μπορεί να συμβεί ανεξάρτητα της σύνθεσης ανασταλτικών πρωτεϊνών, όπως οι SOCS (331). Αυτός ο ανασταλτικός μηχανισμός εξαρτάται από την p38 (326) και μπορεί να ενεργοποιηθεί από φυσιολογικούς συνδέτες όπως η IL-1 αλλά ακόμα και από αναστολείς της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Μια τέτοια άμεση ανασταλτική οδός λογικά θα ενεργεί μέσω της επίδρασης σε πρωτεΐνες που ήδη εκφράζονται στο κύτταρο και είναι σε θέση να ανταποκριθούν στην IL-6 σηματοδότηση. Μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την IL-1 και που μπορούν να τροποποιήσουν πρωτεΐνες είναι εκείνα της ουμπικουιλίνωσης (απενεργοποίηση πρωτεϊνών), της πρωτεολυτικής αποδόμησης (330), της ενεργοποίησης της κασπάσης 1 (332), καθώς και η παραγωγή των PGs(προσταγλαδινών) και η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών. Πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε φωσφολιπάση A2, COX, πρωτεοσώματα, και αναστολείς της κασπάσης δεν αντιστρέφουν την αναστολή και για αυτό ευνοείται η πιθανότητα η αναστολή της IL-6-σηματοδότησης να εξαρτάται από την φωσφορυλίωση κάποιου μορίου σηματοδότησης της IL-6, από την p38. Πρόσφατα στοιχεία υποδεικνύουν ότι ένα τέτοιο μόριο μπορεί να είναι ο ίδιος ο υποδοχέας της IL-6 και ειδικά η υπομονάδα του gp130 (331).

Η p38 ενεργοποιείται από πολλά ερεθίσματα stress, φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, και από τον TGF- β παράγοντα. Μεταξύ των παραπάνω, πολλά ερεθίσματα stress, η IL-1, ο TNF παράγοντας και ο TGF- β έχουν αποδειχτεί ότι αναστέλλουν ταχέως τη Jak-STAT σηματοδότηση (326, 333), και είναι πιθανό ότι η p38 παίζει ένα ρόλο στη μεσολάβηση της αναστολής από πολλά ερεθίσματα εκτός από την IL-1 και τον αναστολέα κυκλοοξυμίδα CHX. Στα πλαίσια της φυσικής και επίκτητης ανοσίας, η p38 ενεργοποιείται από υποδοχείς που αναγνωρίζουν ξένα αντιγόνα, όπως οι αντιγονικοί υποδοχείς των T και B κυττάρων, υποδοχείς Fc και συμπληρώματος και οι Toll-like υποδοχείς. Έτσι η p38 μπορεί να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της Jak-STAT σηματοδότησης μέσω κυτταροκινών και μέσω μιας μεγάλης ποικιλίας ερεθισμάτων που ρυθμίζουν την ανοσιακή ενεργοποίηση των κυττάρων και τη διαφοροποίηση. Η p38 μπορεί να επηρεάσει τη σηματοδότηση των κυτταροκινών

αρνητικά ή θετικά με αρκετούς διαφορετικούς μηχανισμούς. Στην αρνητική πλευρά, η σηματοδότηση της IL-6 καταστέλλεται με ένα άμεσο μηχανισμό με την επαγωγή της έκφρασης της SOCS3 και πιθανόν άλλων πρωτεϊνών SOCS. Από τη άλλη πλευρά, η p38 μπορεί να αυξάνει την έκφραση των υποδοχέων κυτοκινών και μπορεί να ενισχύσει τη μεταγραφική απόκριση σε κυτταροκίνες όπως η IFN- γ ή η IL-12 με τη φωσφορυλίωση της σερίνης των STATs, η οποία αυξάνει τη μεταγραφική τους δυνατότητα (334). Έτσι, η p38 φαίνεται να επηρεάζει τη σηματοδότηση των Jak-STAT μέσω κυτταροκινών με ένα πολύπλοκο και ισορροπημένο τρόπο, παρόμοιο με εκείνο της θετικής και αρνητικής ρύθμισης της δραστηριότητας του παράγοντα NF- κ B (335).

Οι Pesu και συν (336) εργάστηκαν σε κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος καθώς και Β-λεμφώματος και διαπιστώνουν ότι ο μηχανισμός της άμεσης ενεργοποίησης της STAT6 από την IL-4 δεν επηρεάστηκε από τη δραστηριότητα της p38 MAPK. Επιπλέον μετά την εφαρμογή ανάλυσης φωσφοπεπτιδικού οξέος και φωσφοπεπτιδικής χαρτογράφησης αναφέρουν ότι η STAT6 δεν αποτελεί άμεσο υπόστρωμα για την p38 MAPK. Αντίθετα, η p38 βρέθηκε ότι ρυθμίζει άμεσα τη δραστηριότητα του τομέα ενεργούς δραστηριότητας της STAT6. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι, εκτός από τις αποδεδειγμένες προφλεγμονώδεις δράσεις της, η p38 MAPK παρέχει ένα συνδιεγερτικό σήμα για την επαγωγή γονιδίων μέσω της IL-4 με την άμεση διέγερση της μεταγραφικής ενεργοποίησης της STAT6 (336).

Συμπεράσματα για το ρόλο των STAT και MAPK στον καρκίνο.

Είναι γεγονός πως υπάρχουν επαρκή στοιχεία που ενισχύουν τον κομβικό ρόλο των πρωτεϊνών STAT στην καρκινογένεση. Αν και η ιδιοσυστασιακή ενεργοποίηση των πρωτεϊνών STAT προφανώς δεν αποτελεί το μοναδικό παράγοντα για την καρκινική εξαλλαγή και εξέλιξη, ο καίριος ρόλος τους έχει σαφώς καταδειχθεί σε αρκετές περιπτώσεις καρκίνου. Οι μηχανισμοί οι οποίοι είναι αρμόδιοι για την παρεκκλίνουσα ενεργοποίηση του STAT στον καρκίνο παραμένουν ασαφείς και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση.

Από την άλλη πλευρά η ενεργοποίηση των MAPKs στον καρκίνο στον άνθρωπο έχει αναλυθεί σε μεγάλο βαθμό. Ενώ για τις JNK/SAPK και p38 MAPK, διάφορες μελέτες έχουν καταδείξει ένα γενικό ογκοκατασταλτικό ρόλο, οι ERKs, οι οποίες αποτελούν κατώτερο μονοπάτι πολλών αυξητικών παραγόντων, είναι γενικά συνδεδεμένες με τον πολλαπλασιασμό και την επέκταση του καρκίνου.

Η διαδικασία της σηματοδότησης δεν αποτελεί ένα μονοσήμαντο και μονοδιάστατο μηχανισμό. Η πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων και ο μεγάλος αριθμός των μορίων που συμμετέχουν επιβάλλουν την περαιτέρω εμβάθυνση. Η κατανόηση της αλληλεπίδρασης των μορίων STAT με άλλες κρίσιμες κυτταρικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην κυτταρική αύξηση και επιβίωση, όπως οι MAPKs, θα προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες για το μηχανισμό της ογκογένεσης.

Επιπρόσθετα, η μελέτη της συσχέτισης μεταγραφικών συνενεργοποιητών και αναστολέων με τα μόρια STAT στη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων στόχων, θα αποδειχθεί πολύτιμη για την κατανόηση της μοριακής βάσης του καρκίνου.

Στόχευση των STAT3 και MAPK για την πρόληψη και αντιμετώπιση του καρκίνου

Προσεγγίσεις σχετικές με την αναστολή των STATs.

Μικρά μόρια αναστολείς, με επιλεκτικότητα στην ισομορφή τους για συγκεκριμένες STAT, θα μπορούσαν να αποτελέσουν πολύτιμα εργαλεία για να αποσαφηνισθεί η πολύπλοκη βιολογική δραστηριότητα των μελών της οικογένειας STAT σε γενετικά τροποποιημένα πειραματικά συστήματα. Οι αναστολείς της STAT σηματοδότησης μπορούν να ταξινομηθούν σε παράγοντες οι οποίοι δρουν μέσω μιας άμεσης ή έμμεσης λειτουργίας (337). Μικρά μόρια που δρουν ως έμμεσοι αναστολείς της STAT, αναφέρονται επίσης και ως αναστολείς της STAT σηματοδότησης, δεν αλληλεπιδρούν με τη STAT, αλλά επηρεάζουν τη δράση ενός μορίου που με τη σειρά του έχει κάποια ρυθμιστική λειτουργία για τη STAT. Αντίθετα οι άμεσοι αναστολείς της STAT αλληλεπιδρούν φυσικά με αυτές και παρεμβαίνουν στην ικανότητά τους να ρυθμίζουν τη μεταγραφή (Εικ. 5).

Έμμεσοι αναστολείς της STAT σηματοδότησης.

Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει αναστολείς των ενζυμικών δραστηριοτήτων σε εκείνες τις κινάσες τυροσίνης που ενεργοποιούν τις STATs στο συντηρημένο κατάλοιπο τυροσίνης, μεταξύ του SH2 τομέα και του τομέα διενεργοποίησης. Η αλκυλιωμένη όξιμη ινδिरουμπίνη (indirubin oxime) E804 αποδείχθηκε ότι αναστέλλει τη STAT3 σηματοδότηση σε κύτταρα καρκίνου του μαστού με ανασταλτική δραστητικότητα σε ανώτερες κινάσες και ειδικότερα στη c-Src (338). Η Ροσκοβινίνη (Roscovitine), ένας αναστολέας των εξαρτώμενων από την κυκλίνη κινασών, εμφανίζεται να αναστέλλει τη STAT5 φωσφορυλίωση (339). Η ενδεδειγμένη ανασκόπηση ερευνών που αφορούν στη χημική δραστηριότητα διαφόρων μορίων απέναντι στη STAT6 καθώς και η επακόλουθη πρόοδος στις τεχνικές της βιοχημείας οδήγησε στη σύνθεση μιας σειράς υποκατάστατων της αμινοπυριμιδίνης-5-καρβοξαμιδίων, ως αναστολείς της σηματοδότησης της STAT6. Η πιο πετυχημένη ένωση που ονομάστηκε AS1517499 αναστέλλει την IL-4 εξαρτώμενη μεταγραφή, η οποία μεσολαβείται από τη STAT6, και αναστέλλει επιλεκτικά την επαγόμενη από την IL-4, Th2-διαφοροποίηση σε T κύτταρα σπλήνας ποντικών σε χαμηλή

γραμμομοριακή συγκέντρωση (340). Με βάση τα δημοσιευμένα στοιχεία, δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι η παραπάνω ένωση δρα άμεσα στη STAT6. Ωστόσο, δεδομένα που υποδεικνύουν μια άμεση αλληλεπίδραση δεν επιβεβαιώθηκαν.

Τα προηγούμενα παραδείγματα δείχνουν ότι οι έμμεσοι αναστολείς μπορούν να αναστέλλουν αποτελεσματικά την ενεργοποίηση των STAT και να εξασκούν ισχυρά βιολογικά αποτελέσματα (341). Ωστόσο, η στόχευση ενός ρυθμιστικού μορίου σε ανώτερο μονοπάτι είναι γενικά μη ικανοποιητική μέθοδος για τη διερεύνηση της ακριβούς λειτουργίας ενός μορίου, καθώς η αλληλεπίδραση μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών είναι πολύ συχνή. Έτσι συνήθως, οι έμμεσοι αναστολείς της STAT σηματοδότησης δεν αποτελούν κατάλληλα εργαλεία για τη μοριακή έρευνα που αφορά στην αποσαφήνιση των βιολογικών διαδικασιών μιας δεδομένης πρωτεΐνης STAT (342).

Άμεσοι αναστολείς των STAT

Οι άμεσοι αναστολείς με επιλεκτικότητα για μια ισομορφή των STAT μπορούν γενικά να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες ανάλογα με τους μηχανισμούς δράσης: αναστολείς της λειτουργίας του STAT στη δεσμευτική περιοχή με το DNA, αναστολείς του τομέα SH2, και αναστολείς του αμινο-τελικού τομέα της STAT (342).

Παρέμβαση στον τομέα σύνδεσης με το DNA.

Μέχρι σήμερα, αυτή η προσέγγιση έχει εφαρμοστεί μόνο στην αναστολή της STAT3. Παράδειγμα αυτής της προσέγγισης είναι το φυσικό προϊόν γαλιελακτόνη (galiellalactone), το οποίο αρχικά αναφέρθηκε ως ασθενής αναστολέας της σύνθεσης της α -αμυλάσης, πρωτεασών και φωσφατασών σε κύτταρα σπόρων σιταριού (343). Επίσης βρέθηκε ότι αναστέλλει την IL-6 διαμεσολαβούμενη STAT3 σηματοδότηση (344). Η ακριβής δομή του φυσικού προϊόντος καθορίστηκε πρόσφατα με τον προσδιορισμό της χημικής σύνθεσης του (345,346). Καθώς η γαλιελακτόνη ανέστειλε τη σύνδεση της ενεργοποιημένης STAT3 στο DNA χωρίς να επηρεάζει τη STAT3 φωσφορυλίωση στην τυροσίνη, η ένωση θεωρήθηκε πως συνδέεται με τον τομέα δέσμευσης του DNA του διμερούς STAT3, ενδεχομένως με ομοιοπολική

τροποποίηση ενός υπολείμματος κυστεΐνης στην STAT3 DNA δεσμευτική περιοχή (347).

Αναστολείς που παρεμβαίνουν στην SH2 περιοχή.

Δεδομένου ότι ο τομέας SH2 απαιτείται τόσο για τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης όσο και το διμερισμό της STAT, μια αποτελεσματική προσέγγιση η οποία θα επέτρεπε τη στόχευση συγκεκριμένων STAT είναι η αναστολή της λειτουργίας του SH2 τομέα τους (348). Με αυτόν τον τρόπο θα αναστέλλεται η ενεργοποίηση της STAT, αλλά επίσης θα εμποδίζεται ο διμερισμός οποιουδήποτε μορίου STAT το οποίο διαφεύγει την αναστολή της φωσφορυλίωσης.

Πεπτιδικοί αναστολείς του SH2 τομέα των STATs.

Η φυσιολογία της αναστολής ενεργοποίησης των μελών της οικογένειας των STAT με ένα συνδέτη για τις SH2 περιοχές τους καταδείχθηκε για τις STAT3 (348-352) και STAT6 (353). Ένα πεπτίδιο σύντηξης διαπερατό για το κύτταρο, που περιλαμβάνει την αλληλουχία GASSGEEGpYKPFQDLC και προέρχεται από τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης (IL) -4, φαίνεται ότι αναστέλλει την εξαρτώμενη από την IL-4 φωσφορυλίωση της STAT6 και τη STAT6 εξαρτώμενη μεταγραφή (353). Τα δεδομένα που προέκυψαν από την εφαρμογή ενός πεπτιδίου σύντηξης διαπερατού για το κύτταρο που περιελάμβανε την προερχόμενη από τη STAT6 αλληλουχία GRGpYVSTT, η οποία ήταν γνωστό ότι μπορεί να συνδεθεί με το SH2 τομέα της STAT6 σε μοντέλα χοιριδίων, πρότεινε την αναστολή του SH2 τομέα της STAT6 ως θεραπευτική προσέγγιση για την αλλεργική ρινίτιδα και το άσθμα (354).

Η συντριπτική πλειοψηφία των μελετών με στόχο μια SH2 περιοχή των STAT έχουν διεξαχθεί με τη STAT3. Ένα πεπτίδιο σύντηξης μεταξύ του εξαπεπτιδίου PpYLKTK (το μοτίβο που μεσολαβεί στο διμερισμό της STAT3) και μιας αλληλουχίας μετατόπισης της μεμβράνης, αποδείχτηκε ότι αναστέλλουν τη φωσφορυλίωση της STAT3 στην τυροσίνη, την εξαρτώμενη από τη STAT3 γονιδιακή μεταγραφή, και τον ογκογόνο μετασχηματισμό (349). Το πρότυπο του τριπεπτιδίου A/PpYL αποδείχτηκε ότι είναι επαρκές για την αναστολή του διμερισμού της STAT3 in vitro, και αποτέλεσε σημείο αναφοράς για το σχεδιασμό μορίων που προσομοιάζουν στα πεπτίδια με μειωμένο πεπτιδικό χαρακτήρα. Αρχικά,

αυτό οδήγησε στη δημιουργία του μιμητικού πεπτιδίου ISS-610, το οποίο αποδείχτηκε ότι αναστέλλει την DNA πρόσδεση του ενεργοποιημένου STAT3 κατά επτά-οκτώ φορές σε σχέση με τη STAT1, και κατέδειξε την εμφάνιση αλλαγών στους καλλιεργούμενους ιστούς που εξαρτώνται από τη STAT3 (355).

Μη πεπτιδική αναστολή του SH2 τομέα των STATs.

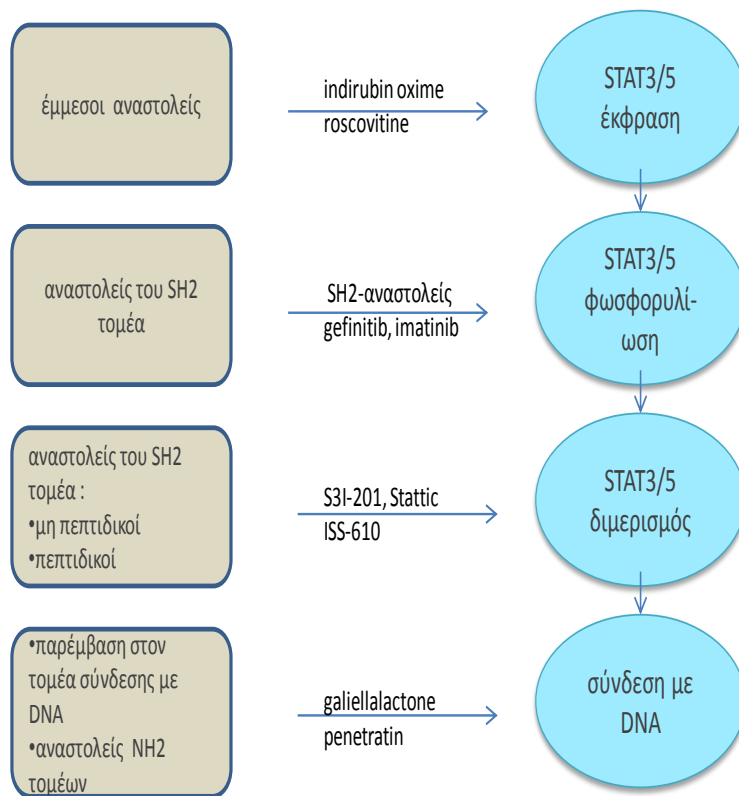
Η εμπειριστατωμένη μελέτη της κρυσταλλικής δομής της DNA σύνδεσης της φωσφορυλιωμένης στην τυροσίνη STAT3, επέτρεψε τη διεξαγωγή δύο ανεξάρτητων μελετών οι οποίες εφάρμοσαν την εικονική διαλογή και εισαγωγή χημικών προτύπων από βάσεις δεδομένων, για την ταυτοποίηση των μη πεπτιδικών αναστολέων του SH2 τομέα των STATs (356,357). Στη συνέχεια, μόρια τα οποία θα μπορούσαν να συνδέονται στον τομέα SH2 της STAT3 δοκιμάστηκαν σε πραγματικές βιοχημικές μελέτες. Η πρώτη ένωση που ανακαλύφθηκε μέσω αυτής της οδού ήταν η STA-21, η οποία φαίνεται να αναστέλλει τη σύνδεση στο DNA φωσφορυλιωμένων STAT3 και εμφανίζει κυτταρικές μεταβολές εξαρτώμενες από τη STAT3 (356). Πρόσφατα έχει αναφερθεί το νούμερο 16 παράγωγο του STA-21 με παρόμοια δραστηριότητα, το οποίο είναι περισσότερο δεκτικό στη δομική τροποποίηση (358). Επιπλέον, η ένωση S3I-201 σχεδιάστηκε με βάση τον SH2 τομέα της STAT3 και φάνηκε να αναστέλλει το διμερισμό της STAT3. Η ένωση ανέστειλε την εξαρτώμενη από τη STAT3 έκφραση γονιδίων, προκάλεσε απόπτωση σε κύτταρα με ιδιοσυστασιακά ενεργοποιημένο STAT3, και ανέστειλε την ανάπτυξη του όγκου σε μοντέλα χοιριδίων με ξένο μόσχευμα.

Η δυνατότητα του εντοπισμού μικρών μορίων αναστολέων του SH2 τομέα της STAT3 μέσω βιοχημικής διαλογής (screening) αποδείχθηκε με την ταυτοποίηση και το χαρακτηρισμό του μορίου-αναστολέα στάτικ (Stattic) (359). Η ένωση αυτή ανακαλύφθηκε σε μια *in vitro* μελέτη βασισμένη στην πόλωση φθορισμού, η οποία αναλύει την επίδραση των υπό δοκιμή ενώσεων στη λειτουργία του SH2 τομέα της STAT3 (360). Το μόριο Stattic βρέθηκε ότι αναστέλλει τη λειτουργία του τομέα SH2, τόσο στη μη φωσφορυλιωμένη όσο και στη φωσφορυλιωμένη STAT3, και ότι εμφανίζει μια προτίμηση στη STAT3 σε σχέση με άλλα μέλη της οικογένειας STAT, όπως η STAT1 και STAT5b, σε *in vitro* μελέτες. Επιπλέον, το Stattic αναφέρεται ότι

αναστέλλει τη μετακίνηση στον πυρήνα της STAT3 με σχετική ειδικότητα έναντι της STAT1 σε μια κυτταρική σειρά ηπατικού καρκινώματος, και επιλεκτικά αυξάνει το ποσοστό της απόπτωσης σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού που παρουσιάζουν ιδιοσυστασιακή STAT3 δραστηριότητα (360).

Αναστολείς των N τομέων των STAT.

Παρόλο που εδώ και αρκετά χρόνια είναι γνωστό ότι η σύνδεση των διμερών σχηματισμών των φωσφορυλιωμένων STAT στις παρακείμενες θέσεις του DNA μέσω του αμινο-τελικού (N) τομέα τους, μπορεί να αυξήσει το μεταγραφικό δυναμικό τους, το πεδίο που αφορά στην έρευνα της στόχευσης της N περιοχής σε ένα μέλος της οικογένειας των STAT, έχει διερευνηθεί ανεπαρκώς και πολύ πρόσφατα (342). Οι N τομείς των STAT αποτελούνται από οκτώ έλικες και είναι καλά διατηρημένες ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας των STAT (361). Ένα πεπτίδιο που περιλαμβάνει την έλικα 2 του N τομέα της STAT4 βρέθηκε ότι προκαλεί σημαντικές δομικές αλλαγές σε όλο το μήκος του N τομέα (362). Με βάση την αλληλουχία ενός πεπτιδίου προερχόμενου από τη STAT4 που χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα NMR (Nuclear magnetic resonance), δημιουργήθηκε μια μικρή ομάδα αντίστοιχων πεπτιδίων παραγώγων του STAT3 που περιλαμβάνουν την έλικα δύο από το N τομέα της STAT3 καθώς και αλληλουχίες πεπτιδίων που παρέχουν κυτταρική διαπερατότητα. Μεταξύ άλλων, ένα πεπτίδιο που περιέχει το πρότυπο LDTRYLEQLHKLY συγχωνευμένο με το πεπτίδιο πενετρατίνη (penetratin) φαίνεται να συνδέεται με τη STAT3 με καλή επιλεκτικότητα έναντι της STAT1 σε κύτταρα, και να επάγουν τον αποπτωτικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων με ένα STAT3-εξαρτώμενο τρόπο. Αυτά τα δεδομένα παρέχουν αποδείξεις πως η στοχοποίηση της N περιοχής των STAT αποτελεί πιθανό μηχανισμό παρέμβασης στη δραστηριότητα των STAT (342).



Εικόνα 5. Προσεγγίσεις στην αναστολή των STAT

Προσεγγίσεις απέναντι στην αναστολή των MAPKs.

Η B-Raf είναι μια κινάση σχετική με τη σερίνη / θρεονίνη και αποτελεί πρωταρχικό στόχο της ομάδας των ογκογόνων πρωτεϊνών Ras (363). Η αναγνώριση των μεταλλάξεων του γονιδίου της B-Raf σε διάφορους τύπους καρκίνου του ανθρώπου οδήγησε στην πραγματοποίηση πολυάριθμων ερευνών (364). Περισσότερο από το 80% των B-Raf μεταλλάξεων αφορούν σε ολόκληρη αντικατάσταση αμινοξέων του γλουταμινικού οξέος από τη βαλίνη στο κωδικόνιο 600 (παλαιότερα θεωρείτο στο 599) στον τομέα της κινάσης. Οι B-Raf μεταλλάξεις έχουν ταυτοποιηθεί σε μεγάλη ποικιλία καρκίνων του ανθρώπου, όπως στο μελανώμα, στις ωοθήκες, σε καρκινώματα του παχέως εντέρου, και σε καρκινώματα του θυρεοειδούς (364-368). Οι πληροφορίες λαμβάνονται από τη βάση δεδομένων που ονομάζεται: "Ο κατάλογος των σωματικών μεταλλάξεων στον Καρκίνο "(COSMIC) (369). Η B-Raf μεταλλαγμένη πρωτεΐνη, αναφέρεται ως B-RafV600E και έχει αυξημένη δραστηριότητα κινάσης σε σύγκριση με την άγριου-τύπου πρωτεΐνη B-Raf (364). Η B-RafV600E ενεργοποιεί το κατώτερο μονοπάτι σηματοδότησης της MEK / ERK ανεξάρτητα από τη δράση της Ras-GTP και η έκφρασή της είναι απαραίτητη για τη διατήρηση των ογκογόνων χαρακτηριστικών της B-RafV600E σε κυτταρικές σειρές καρκίνων του ανθρώπου (370-372). Η BRAFV600E γίνεται ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση της Ras-GTP, αλλά πλέον δεν καταστέλλεται από την SPRY2 (αρνητικός ρυθμιστής υποδοχέων τυροσινικής κινάσης). Η SPRY2 έχει παλαιότερα αναγνωριστεί ως ένας αναστολέας της MAPK σηματοδότησης σε σειρές επιθηλιακών κυττάρων και ινοβλαστών (373). Στην συνέχεια βρέθηκε ότι η SPRY2 δεσμεύεται μόνο στην άγριου τύπου B-Raf με σκοπό να κινήσει την αναστολή της MEK / ERK σηματοδότησης, αλλά η SPRY2 δεν δεσμεύεται στη B-RafV600E (374). Έτσι, η συγκεκριμένη στοχοθέτηση της μεταλλαγμένης BRAFV600E πρωτεΐνης χωρίς την αναστολή του άγριου-τύπου B-Raf είναι ένας από τους στόχους των αντινεοπλασματικών στρατηγικών με σκοπό να βελτιωθεί η αντικαρκινική δραστηριότητα των κυττάρων, αλλά και να ελαχιστοποιηθεί η τοξικότητα.

Φάρμακα που στοχεύουν στο μονοπάτι Ras / Raf / MEK / ERK υπό κλινική δοκιμή

Πολλά αντικαρκινικά φάρμακα που στοχεύουν τη Raf ή το κατώτερο μόριο MEK, έχουν αναπτυχθεί και βρίσκονται σε διάφορες φάσεις κλινικών δοκιμών,

συμπεριλαμβανομένων των PLX4032 (συγκεκριμένος στόχος της B-Raf), RAF265 (στοχεύει τόσο τη Raf όσο και τον υποδοχέα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα 2 [VEGFR] -2), sorafenib tosylate (στόχοι πολλαπλές κινάσες), XL281 (στοχεύει Raf κινάσες), και AZD6244 (συγκεκριμένα στοχεύει τη MEK) (375).

Βελτίωση της ειδικότητας και αποτελεσματικότητας με παράγωγα των αρχικών κύριων φαρμακευτικών ενώσεων.

Φαρμακευτικά σκευάσματα και υποψήφια φαρμακευτικά σχήματα έχουν παρουσιαστεί σε πολλές έρευνες τα τελευταία χρόνια και αποτελούν χημικές ενώσεις που στοχεύουν τη Raf, τη MEK, ή πολλαπλές κινάσες τυροσίνης (376-387). Πολλές από αυτές τις ενώσεις προέρχονται από αρωματικές ετεροκυκλικές ενώσεις, όπως η ημιδαζόλη, η κιναζολίνη, το φαιναιθυλαμίδιο, το μαλοναμίδιο και οι βενζο-αζόλες. Χρησιμοποιώντας αυτές τις ενώσεις ως αρχικές βάσεις για τροποποίηση και εξέλιξη, έχουν εντοπιστεί πιο ισχυροί και αποτελεσματικοί αναστολείς. Για παράδειγμα, για να βελτιωθεί η βιοδιαθεσιμότητα και η δραστηριότητα της CI-1040 (388), αναπτύχθηκε ένα παράγωγο, η PD0325901 (389). Η PD0325901 προήλθε από την αντικατάσταση της κυκλοπρόπυλ-μέθοξυ ομάδας με μία ομάδα (R) -2,3-διυδροξυπροποξυ και αντικαθιστώντας τον 2-χλωρο υποκαταστάτη με μια ομάδα 2-φθορο στο δεύτερο αρωματικό δακτύλιο της CI-1040. Τέτοιες μικρές δομικές αλλαγές οδηγούν σε 100-πλάσια δραστηριότητα γεγονός που αντανάκλαται από την ικανότητα της PD0325901 να αναστέλλει τόσο την καθαρή MEK, όσο και την κυτταρική ενεργοποίηση των MAPK, σε χαμηλές νανογραμμομοριακές συγκεντρώσεις (390). Ομοίως, ένα παράγωγο της ημιδαζόλης ταυτοποιήθηκε από την τράπεζα ενώσεων της εταιρίας SmithKline Beecham ως μικρομοριακός αναστολέας της B-Raf (391, 392). Η ημιδαζόλη αποτελεί οργανική ένωση με τον τύπο C₃H₄N₂. Η δομική τροποποίηση της ημιδαζόλης είχε ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό του SB-590.885, το οποίο είναι ένα νέο παράγωγο τριαρυλοημιδαζόλης με ένα 2,3-διυδρο-1-οξίμη υποκατάστατο. Ο SB-590885 είναι ένας ισχυρός και εξαιρετικά εκλεκτικός αναστολέας της B-Raf κινάσης σε νανογραμμομοριακές συγκεντρώσεις (393).

Το μονοπάτι RAF-MEK-ERK αποτελεί βασικό κόμβο που επηρεάζει την ενεργοποίηση της Raf.

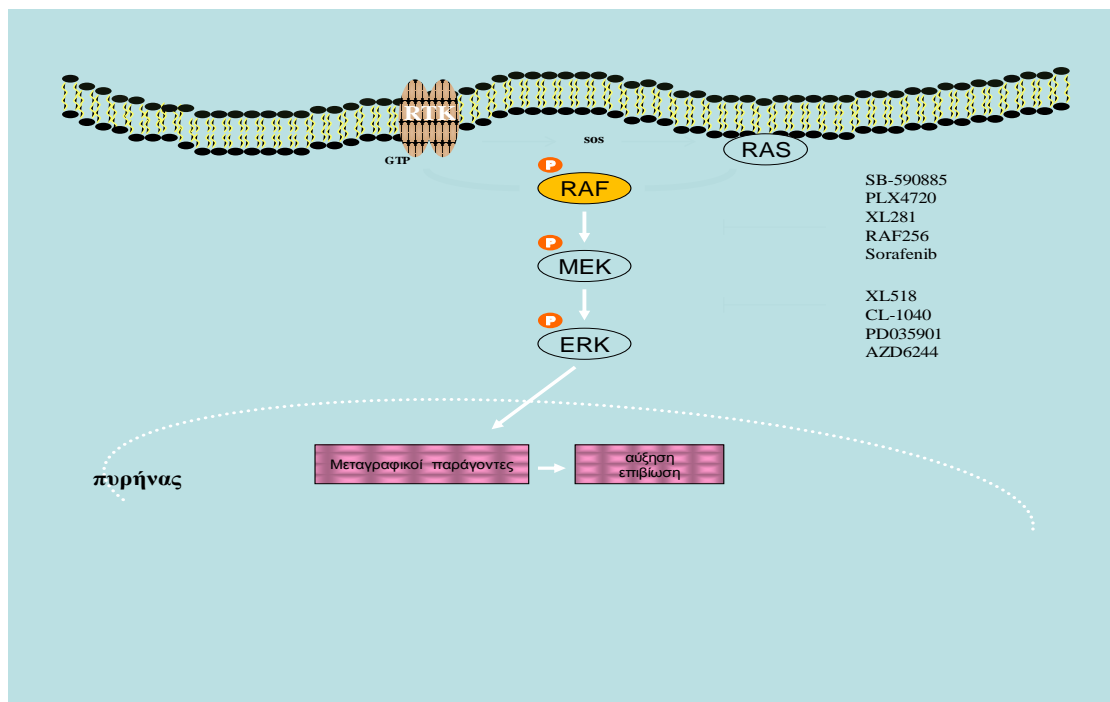
Σε γενικές γραμμές, οι αναστολείς της MEK φαίνεται να είναι καλά ανεκτοί με μόνες συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες το εξάνθημα, το οίδημα, και την παροδική θολή όραση. Έχει αποδειχθεί ότι οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα του αίματος για κάθε ένωση, για την αναστολή της αύξησης καρκινικών ιστών αντιστοιχούν με εκείνες που επαρκούν για την αναστολή της MEK σε in-vitro πειράματα. Παρά την ύπαρξη προκλινικών δεδομένων το ποσοστό της αντικειμενικής ανταπόκρισης σε αυτές τις μελέτες ήταν μέτριο και θα μπορούσε να αποδοθεί σε διάφορους παράγοντες, μεταξύ των οποίων i) στην άγνωστη συγκέντρωση για την κυτταροτοξικότητα του όγκου, ii) στην ύπαρξη εναλλακτικών οδών που αντισταθμίζουν τις επιπτώσεις των αναστολέων της MEK iii) σε μεταβολές των πολλαπλών μονοπατιών σηματοδότησης στον καρκίνο και iv) στο γεγονός ότι η παρεμπόδιση μίας μόνο οδού μπορεί να μην είναι επαρκής για να προωθήσει την απόπτωση ή τη διακοπή της ανάπτυξης των κυττάρων. Με δεδομένο τα άριστα επίπεδα ασφάλειας των φαρμάκων αυτών, είναι πιθανό ότι συνδυασμοί των παραπάνω κυτταροτοξικών παραγόντων με άλλες στοχευμένες θεραπείες θα δοκιμαστούν στο μέλλον, όπως αποδεικνύεται και από προκλινικά δεδομένα που υποστηρίζουν τη δυναμική της εφαρμογής συνδυασμών των αναστολέων της MEK (394).

Οι στοχευμένες θεραπείες είναι πιθανό να ωφελούν μόνο ένα συγκεκριμένο αριθμό ασθενών. Η αναστολή ενός μόνο μορίου-σήματος (π.χ. RAS), δεν είναι σε θέση να μπλοκάρει τα κατώτερα μονοπάτια των RAS-RAF, τα οποία μπορεί να ρυθμίζονται και από άλλα μόρια. Ορισμένα κυτταρικά μονοπάτια μπορεί να ενεργοποιούνται τόσο από RAS-εξαρτώμενους όσο και RAS-ανεξάρτητους μηχανισμούς. Διάφορες προκλινικές μελέτες, αύξησαν τη γνώση για την πολυπλοκότητα του Ras-MAPK μονοπατιού, και τη συσχέτιση του με άλλα ογκογόνα μονοπάτια και παρείχαν τη δυνατότητα να σχεδιαστούν καλύτερες θεραπευτικές στρατηγικές. Συνδυάζοντας διαφορετικούς αναστολείς της οδού RAS- MAPK (π.χ. RAS-,RAF-, MEK, PI3K αναστολείς), με την εφαρμογή των διαφόρων αναστολέων της RAS-σηματοδότησης να γίνεται διαδοχικά ή παρεμβαίνοντας στα ανώτερα υποστηρικτικά σήματα της (π.χ. RTKs), είναι δυνατόν να προκύψουν συνδυασμοί φαρμάκων, τα οποία θα

μπορούσαν να έχουν ένα σημαντικά υψηλότερο δυναμικό για τη θανάτωση καρκινικών κυττάρων μειώνοντας τις παρενέργειες επί των φυσιολογικών κυττάρων (394).

Επίσης οι αναστολείς της Raf- κινάσης, παραμένουν ένας ελκυστικός θεραπευτικός στόχος, και δικαιολογημένα είναι σε εξέλιξη επιπλέον προκλινικές και κλινικές μελέτες, προκειμένου να αξιολογήσουν την κλινική τους δράση και να επωφεληθούν από αυτές τις ενώσεις. Ακόμα είναι αναγκαία η πραγματοποίηση περισσότερων ερευνών για να γίνει κατανοητή η φύση του βιολογικού μηχανισμού αυτών των αναστολέων. Οι προσπάθειες για τον εντοπισμό προγνωστικών μοριακών δεικτών ή η ανάπτυξη έγκυρων αλγορίθμων για την εξαγωγή γονιδιακών υπογραφών χρειάζονται για την πρωτοποριακή εξατομικευμένη θεραπεία. Η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων του EGFR που φαίνεται να ανταποκρίνονται στους αναστολείς του EGFR είναι ένα καλό παράδειγμα. Η BRAF V600E και οι μεταλλάξεις της RAS μπορεί να αντιπροσωπεύουν ακριβείς δείκτες για την πρόβλεψη της κλινικής απόκρισης στους αναστολείς των RAF και MEK. Ως εκ τούτου, η ανάλυση των BRAF και RAS μεταλλάξεων θα είναι χρήσιμη σε μελλοντικές θεραπευτικές δοκιμές με νέες κατηγορίες αναστολέων. Ιδιαίτερα χρησιμοποιώντας BRAF αναστολείς, οι οποίοι έχουν αποδειχθεί ότι ενισχύουν τη φωσφορυλίωση της ERK και την ανάπτυξη του όγκου σε καρκινικά κύτταρα BRAF άγριου τύπου (394). Οι συνεχιζόμενες θεραπείες δεύτερη γραμμής με αναστολείς της BRAF μπορεί να οδηγήσουν σε αντίσταση των καρκινικών κυττάρων. Συνεπώς, θα πρέπει να αναπτυχθούν σωστές συνδυαστικές θεραπείες για να ξεπεραστεί η αποκτηθείσα προσαρμοστική αντίσταση σε αυτούς τους παράγοντες. Ένα μοντέλο αντίστασης στους αναστολείς της BRAF που αναπτύχθηκε μετά από χρόνια θεραπεία κυττάρων μελανώματος με τύπο BRAF V600E, με τον αναστολέα BRAF SB-590885 έχει πρόσφατα περιγραφεί (375). Η αντίσταση αποδόθηκε στην ικανότητα εναλλαγής μεταξύ των τριών ισομορφών RAF, υπογραμμίζοντας την ικανότητα των κυττάρων του μελανώματος να προσαρμοστούν στις φαρμακολογικές προκλήσεις. Έχει προταθεί ότι αυτή η αντίσταση βασίζεται στην ενεργοποίηση των άλλων οδών, ιδίως της IGF-1R/PI3K σηματοδότησης. Μόνο η συνδυασμένη θεραπεία με IGF-1R/PI3K και MEK αναστολείς προκάλεσε το θάνατο των κυττάρων που είναι ανθεκτικά στο BRAF αναστολέα. Αυξημένη επίπεδα IGF-1R και pAKT, σε περίπτωση υποτροπής

καρκινικών κυττάρων ήταν συμβατά με IGF-1 R /PI3K-εξαρτώμενη επιβίωση στην ανάπτυξη αντοχής στους BRAF αναστολείς (395)(Εικ.6).



Εικόνα 6. Προσεγγίσεις στην αναστολή του μονοπατιού RAF-MEK-ERK

Συμπέρασμα

Ο μελλοντικός σχεδιασμός πιθανών συνδυαστικών θεραπειών και η παρακολούθηση των αποτελεσμάτων τους αναμφίβολα θα διευκολυνθεί από την ανάλυση του γονιδιακού προφίλ της κάθε περίπτωσης. Δεδομένου ότι οι κλινικές δοκιμές αυτών των αναστολέων παρουσιάζουν συνεχή πρόοδο, μεγαλύτερη έμφαση θα πρέπει να δοθεί στη βιολογική πολυπλοκότητα και στην αλληλεπίδραση των σημάτων μεταξύ των καρκινικών κυττάρων. Οι συνδυαστικές θεραπευτικές προσεγγίσεις είναι η καλύτερη στρατηγική για την αντιμετώπιση της αντίστασης των καρκινικών κυττάρων και της ανάπτυξης αντοχής.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Η διερεύνηση και κατανόηση του ρόλου της σηματοδοτικής οδού STAT3 στον καρκίνο του στόματος, δεδομένης της αποδεδειγμένης ογκογόνου δράσης του σε ποικίλες άλλες μορφές καρκίνου, μπορεί να προσφέρει τη δυνατότητα αναγνώρισης συγκεκριμένων στόχων διαγνωστικής, προγνωστικής και θεραπευτικής αξίας. Η διαλεύκανση των μηχανισμών αρνητικής ρύθμισης και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της ογκογόνου σηματοδότησης του STAT3 και άλλων μονοπατιών σηματοδότησης, όπως των ρυθμιζόμενων από τις MAPK (ERK, JNK, p38) είναι πολύ σημαντική για την αναγνώριση συγκεκριμένων στόχων που θα χρησιμοποιηθούν για την αναχαίτιση της ανώμαλης σηματοδότησης του STAT3 στον καρκίνο.

Η παρούσα ερευνητική πρόταση στοχεύει να διερευνήσει

- α) την έκφραση και κατάσταση ενεργοποίησης MAPK και STAT3 σε κυτταρικές σειρές ΑΚΣ,
- β) την επίδραση της επιλεκτικής αναστολής των MAPK στην STAT3 σηματοδότηση σε κυτταρικές σειρές ΑΚΣ,
- γ) την επίδραση της ενεργοποίησης των μονοπατιών MAPK στη σηματοδότηση του STAT3 σε κυτταρικές σειρές ΑΚΣ,
- δ) τα επίπεδα έκφρασης των MAPK και STAT3 σε ιστούς ΑΚΣ (Ανοσοϊστοχημική μελέτη σε 60 δείγματα ασθενών με ΑΚΣ).

Η παρούσα λοιπόν ερευνητική πρόταση στοχεύει να διερευνήσει την υπόθεση ότι το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του στόματος (ΑΚΣ), παρουσιάζει συνεχή ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού STAT3 η οποία συμβάλλει στην απορρύθμιση των μηχανισμών ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης. Επίσης, θα ερευνηθεί η πιθανότητα τροποποίησης, ελέγχου και αρνητικής ρύθμισης της οδού μέσω ενεργοποίησης συγκεκριμένων MAPK και άλλων αρνητικών σηματοδοτικών ρυθμιστών. Οι προτεινόμενες πειραματικές εργασίες θα αποκαλύψουν νέα μοριακά δεδομένα για τον καρκίνο του στόματος σε σχέση με την αλληλεπίδραση μεταξύ των STAT και συσχετιζόμενων σηματοδοτικών μονοπατιών, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη αποτελεσματικότερων αντινεοπλασματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κυτταρικές σειρές και φαρμακευτικοί χειρισμοί

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο (2) κυτταρικές σειρές ακανθοκυτταρικού καρκινώματος της στοματικής κοιλότητας (ΑΚΣ) του ανθρώπου. Συγκεκριμένα αγοράστηκαν οι σειρές 9 και 25 από την American Type Culture Collection (ATCC, τύποι 9 και 25) (Manassas, VA, USA) που αφορούν σε ΑΚΣ γλώσσας.

Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε μέσο Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F12 (DMEM F12) το οποίο περιείχε 1.2 g/L διττανθρακικό νάτριο, 0.5 mM νατριούχο πυροσταφιλικό οξύ, 2.5 mM L-glutamine 1%, 10% εμβρυικό ορό βοδιού (FBS), 400 ng/ml υδροκορτιζόνης και 1% στρεπτομυκίνης-πενικιλίνης (ATCC , Manassas, VA, USA). Όλες οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε επωαστήρα στους 37°C σε περιβάλλον υγρασίας που περιείχε 5% CO₂.

Οι δυο κυτταρικές σειρές της μελέτης επώασθηκαν με τον ειδικό αναστολέα της JNK κινάσης, SP60025 (Cell Signaling, US), τον αναστολέα της ERK1/2 κινάσης U0126 (Calbiochem, San Diego, CA), και τον αναστολέα της p38 κινάσης SB203580 (Calbiochem, San Diego, CA). Επίσης χρησιμοποιήθηκε ο ERK1/2 επαγωγέας MEK1/2 (Prospect, Israel) και ο JNK επαγωγέας MKK7 (Sigma-Aldrich Co.US). Επίσης πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση και ειδική σίγαση με SiRNA (silencing by siRNA transfection) για τις JNK (Qiagen, Valencia, CA) και ERK1/2 (Qiagen, Valencia, CA) κινάση. Οι αναστολεις, οι επαγωγείς και τα SiRNA χορηγήθηκαν σύμφωνα με τις αναφερόμενες συγκεντρώσεις και στα αναφερόμενα διαστήματα (time points) και ακολούθως έγινε καταγραφή του αριθμού των ζωντανών κυττάρων και μετρήθηκε το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων (βιωσιμότητα).

***In vitro* μετρήσεις του αριθμού των κυττάρων και της βιωσιμότητας**

Η βιωσιμότητα και ο απόλυτος αριθμός των κυττάρων υπό δοκιμασία μετρήθηκε με την μέθοδο αρνητικής χρώσης trypan blue και μικροσκοπική παρατήρηση σε ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης (Olympus) με την βοήθεια κοινού αιματοκυτταρομέτρου εις τετραπλούν. Συνοπτικά η βιωσιμότητα υπολογίστηκε επί τοις % ως:

$$v=1,..3$$

$$[\sum(\zeta\omega\nu\tau\alpha\nu\acute{\alpha}\ \kappa\acute{\upsilon}\tau\tau\alpha\alpha/\zeta\omega\nu\tau\alpha\nu\acute{\alpha}\ \kappa\acute{\upsilon}\tau\tau\alpha\alpha+ \nu\epsilon\kappa\rho\acute{\alpha}\ \kappa\acute{\upsilon}\tau\tau\alpha\alpha)/3]X100,$$

όπου ως ζωντανά κύτταρα αναγνωρίστηκαν τα μη χρωματισμένα, και ως νεκρά τα χρωματισμένα με την χρωστική trypan blue.

Απομόνωση ολικής πρωτεΐνης και ανάλυση κατά Western (ανοσοαποτύπωση)

Κύτταρα από τις κυτταρικές σειρές συλλέχθηκαν κατά την λογαριθμική φάση ανάπτυξης της καλλιέργειας, όπως και 24, ή 48 ώρες μετά την έναρξη των φαρμακευτικών χειρισμών, όπως περιγράφονται αναλυτικά στα αποτελέσματα, και αφού αρχικά πλύθηκαν σε κρύο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffer saline), ακολούθως η αντίστοιχη ολική πρωτεΐνη απομονώθηκε με ομογενοποίηση στους 4°C σε ειδικό διάλυμα που περιείχε 25 mM HEPES, pH 7.7, 400 mM NaCl, 0.5% Triton X100, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF. Επίσης το διάλυμα περιείχε τους αναστολείς πρωτεασών leupeptin 10 μg/ml, pepstatin 2 μg/ml, antipain 50 μg/ml, aprotinin 2 μg/ml και benzamidin 2μg/ml, και τους αναστολείς φωσφατασών 2 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, και 20 mM β-glycerophosphate. Μετά την λύση των κυττάρων ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 14000 στρ. ανά λεπτό (rpm) σε ψυχόμενη φυγόκεντρο και ελήφθη το υπερκείμενο το οποίο περιείχε τις πρωτεΐνες. Η ποσοτικοποίηση της ολικής πρωτεΐνης έγινε με την μέθοδο Bradford και η χρήση πρότυπης καμπύλης συγκέντρωσης BSA με τη βοήθεια φωτόμετρου τύπου μQuant (BIO-TEK Instruments Inc.)

Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος αυτή είναι μία γρήγορη και ευαίσθητη ποσοτική τεχνική προσδιορισμού της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών (μέχρι 1 μg πρωτεΐνης) σε βιολογικά δείγματα. Στηρίζεται στην ιδιότητα των πρωτεϊνών να αντιδρούν με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 σε όξινα υδατικά διαλύματα. Η χρωστική προσδένεται κυρίως στα αμινοξέα αργινίνη, λυσίνη και στα υδρόφοβα κατάλοιπα αμινοξέων λαμβάνοντας τη μη πρωτονιωμένη μπλε μορφή της, με μέγιστο απορρόφησης στα 595 nm. Η αύξηση της απορρόφησης είναι ανάλογη της ποσότητας της δεσμευμένης/ανιοντικής χρωστικής συνεπώς και της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο δείγμα. Ο προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford είναι λιγότερο ευαίσθητος στην επίδραση διαφόρων χημικών προσμίξεων στο δείγμα με εξαίρεση τις υψηλές συγκεντρώσεις απορρυπαντικών.

Συγκεκριμένα, 2 μl από κάθε δείγμα πρωτεΐνης προστέθηκαν μαζί με 200 μl αντιδραστήριου (Bradford 1X, Bio-Rad), δηλαδή συνολική αραίωση 1/100, σε μία πλάκα 96 οπών. Ακολούθησε καλή ανάμειξη και τα διαλύματα μετρήθηκαν σε φωτόμετρο ρυθμισμένο στα 595 nm και στο κατάλληλα ρυθμισμένο πρόγραμμα. Η συγκέντρωση πρωτεΐνης κάθε δείγματος προέκυψε βάσει πρότυπης καμπύλης σύμφωνα με την οποία ρυθμίστηκε το φωτόμετρο.

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε γέλη πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μέγεθός τους. Στηρίζεται στο γεγονός ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι ηλεκτρικά φορτισμένες και συνεπώς όταν βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο κινούνται με ταχύτητα που εξαρτάται από την σχέση του ηλεκτρικού φορτίου προς τη μάζα τους.

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε γέλη πολυακρυλαμίδης. Ανάλογα με το ποσοστό της πολυακρυλαμίδης, μεταβάλλεται και το μέγεθος των πόρων της γέλης. Επειδή οι πρωτεΐνες μπορεί να είναι θετικά ή αρνητικά φορτισμένες, κινούνται προς τον αρνητικό ή θετικό πόλο αντίστοιχα. Προκειμένου να απλοποιηθεί η ηλεκτροφόρησή τους και για να είναι η κίνηση των

πρωτεϊνών ανάλογη με το μοριακό τους βάρος, χρησιμοποιείται το ανιονικό τασιενεργό (απορρυπαντικό) SDS (Sodium Dodecyl Sulfate- Riedel-de Haen). Το SDS σε ουδέτερες τιμές pH είναι αρνητικά φορτισμένο. Ένα μόριο SDS δεσμεύεται σε καθένα από τα αμινοξέα της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα όλες οι πρωτεΐνες να αποκτούν αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο ανεξαρτήτως του αρχικού τους φορτίου. Η δέσμευση του SDS στα αμινοξέα προκαλεί καταστροφή της φυσικής δομής των πρωτεϊνών, οι οποίες αποκτούν τη μορφή ελάσματος. Επειδή πολλές πρωτεΐνες περιέχουν και δισουλφιδικούς δεσμούς, χρησιμοποιείται μαζί με το SDS και μερκαπτοαιθανόλη (Merck), η οποία σε υψηλές θερμοκρασίες (100° C) διασπά τους δεσμούς αυτούς.

Ποσότητα που αντιστοιχούσε σε 50 µg ολικής πρωτεΐνης αναλύθηκε σε γέλη πολυακρυλαμιδίου 6%, 8%, 10%, 12% ή 15% και στην συνέχεια μεταφέρθηκε σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης τύπου PVDF με χρησιμοποίηση της ημί-στεγνης (semi-dry) μεθόδου μεταφοράς πρωτεϊνών (συσκευή εταιρείας BIORAD).

Μέθοδος μεταφοράς πρωτεϊνών (transfer)

Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε η τεχνική Semi-Dry, κατά την οποία μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η γέλη διαχωρισμού στην οποία είχαν αναλυθεί οι πρωτεΐνες, αφού πλύθηκε σε Transfer Buffer για 20 λεπτά τοποθετήθηκε στην συσκευή Semi-Dry Bio-Rad μαζί με την νιτροκυτταρίνη, η οποία προηγουμένως είχε υποστεί επεξεργασία αφυδάτωσης σε μεθανόλη - Scharlau (1-2'), σταδιακής ενυδάτωσης (2x2' ddH₂O) και εξισορρόπησης σε Transfer Buffer 1X [100 ml Transfer Buffer 10X (144 gr Glycine – Biomol, 30 gr Tris-OH – Sigma, 1000 ml ddH₂O), 200 ml methanol - Scharlau , 700 ml ddH₂O] (10'). Στη συσκευή τοποθετήθηκαν επίσης χαρτιά Whatman κομμένα στις διαστάσεις της γέλης και της νιτροκυτταρίνης, τα οποία είχαν προηγουμένως εμποτιστεί με Transfer Buffer προκειμένου να διατηρούν υγρό το περιβάλλον της ηλεκτρομεταφοράς. Τα παραπάνω τοποθετήθηκαν στην συσκευή με την εξής σειρά: χαρτιά Whatman, νιτροκυτταρίνη, γέλη διαχωρισμού, χαρτιά Whatman και ρυθμίστηκε η παροχή ρεύματος στα 45 mA (για μία μεμβράνη) ή 90 mA (για δύο

μεμβράνες) για 140 λεπτά προκειμένου να μεταφερθούν όλες οι πρωτεΐνες από την πηκτή στην νιτροκυτταρίνη.

Μετά το τέλος της ηλεκτρομεταφοράς και αφού ξεπλύθηκε η νιτροκυτταρίνη σε PBS-Tween 20 0.1% (Sigma) για 15 λεπτά, η μεμβράνη επώαστηκε για 20 λεπτά με διάλυμα Blocking buffer (5% άπαχο γάλα - Regilait σε σκόνη διαλυμένο σε PBS-T 0.1%) σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να μπλοκαριστούν οι θέσεις που δεν καλύφθηκαν με τις πρωτεΐνες. Ακολούθησε 24ωρη επώαση της μεμβράνης στους 4° C με ταυτόχρονη ανάδευση με το πρωτογενές αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που μελετάται σε κατάλληλη αραιώση. Το πρωτογενές αντίσωμα αραιώνεται σε διάλυμα 5% (κ.β.) άπαχου γάλακτος σε σκόνη (Regilait) σε PBS-T 0.1%. Μετά το τέλος της επώασης, ακολούθησαν πλύσεις της μεμβράνης με PBS-T (2 x 15 λεπτά) και επώαση της με το δευτερογενές αντίσωμα (anti-mouse ή anti-rabbit, Sigma) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μία ώρα, με ταυτόχρονη ανάδευση. Το δευτερογενές αντίσωμα έχει παρασκευαστεί έναντι του πρωτογενούς, στο οποίο και δεσμεύεται, ενώ είναι συνδεδεμένο με μόριο ραφανιδικής υπεροξειδάσης (horseradish peroxidase, HRP). Χρησιμοποιείται σε αραιώση 1/1000 σε διάλυμα 5% (κ.β.) σκόνη άπαχου γάλακτος σε διάλυμα PBS-T 0.1%. Ακολουθούν τρία δεκάλεπτα πλυσίματα με PBS-T για να απομακρυνθεί η περίσσεια των αντισωμάτων που δεν δεσμεύτηκαν

Μέθοδος ανίχνευσης πρωτεϊνών με χημειοφωταύγεια (chemiluminescence)

Στο τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται η ανίχνευση χημειοφωταύγειας με την οποία διαπιστώνεται η παρουσία της προς μελέτη πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, προστίθεται στην νιτροκυτταρίνη απουσία φωτός 2 ml ECL Western blot Substrate (Pierce), το οποίο παρασκευάζεται εκείνη τη στιγμή από ίσα μέρη των διαλυμάτων Detection Reagents 1 και 2 και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου απουσία φωτός για 5 λεπτά. Μετά το τέλος της επώασης, η νιτροκυτταρίνη τοποθετείται σε κασέτα αυτοραδιογραφίας, πάνω από την οποία τοποθετείται X-ray film (HyBlot CL™) σε σκοτεινό θάλαμο και ακολουθούν στιγμιαίες μέχρι και 15λεπτες εκθέσεις. Κατόπιν το φιλμ εμφανίζεται σε επεξεργαστή Kodak X-OMAT.

Το ECL είναι ένα ενισχυμένο, υψηλής ευαισθησίας υπόστρωμα χημειοφωταύγειας,

βασιζόμενο στη luminol, το οποίο χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της HRP σε ανοσοστυπώματα. Η λουμινόλη είναι ένα χημικό, το οποίο εμφανίζει χημειοφωταύγεια εκπέμποντας ένα μπλε φως παρουσία οξειδωτικού παράγοντα. Το ρόλο του οξειδωτικού παράγοντα στην παραπάνω πειραματική διάταξη παίζει το οξυγόνο που παράγεται κατά την αντίδραση της υπεροξειδάσης (συνδεδεμένη στο δευτερογενές αντίσωμα) με το υπόστρωμά της H_2O_2 (συστατικό του ECL). Επομένως, όταν το δευτερογενές αντίσωμα, που είναι δεσμευμένο στη μεμβράνη, αντιδράσει με το ECL θα παραχθεί φως το οποίο θα αποτυπωθεί στο φιλμ και θα δηλώνει την παρουσία του συμπλέγματος δευτερογενές-πρωτογενές αντίσωμα και επομένως του αντιγόνου (προς μελέτη πρωτεΐνη). Η παραπάνω πειραματική διάταξη, αν και πολύπλοκη, παρουσιάζει υψηλή εξειδίκευση.

Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: total STAT3, phospho-STAT3 (Tyr705), phospho-STAT3 (Ser727) (Santa Cruz, CA), total p44/42(Erk1/2) (Cell Signaling, Beverly, MA), phospho-Erk1/2 MAPK, (Upstate, Charlottesville, VA), total p38, total JNK1/2 (Cell Signaling, Beverly, MA), phospho-JNK1/2, phospho-p38, Ser63phospho-c-Jun, cyclin D1 (Cell Signaling, Beverly, MA). Η β -ακτίνη που ανιχνεύτηκε με μονοκλωνικό αντίσωμα (Sigma, St Louis, MO) χρησίμευσε για τον έλεγχο της ποσότητας και ακεραιότητας της ολικής πρωτεΐνης.

Ποσοτικοποίηση αποτελεσμάτων Western (ανοσοαποτύπωσης) με σύστημα ανάλυσης εικόνας.

Προκειμένου να εξάγουμε ποσοτικά συμπεράσματα από τα ανοσοστυπώματα, έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών με τη χρήση συστήματος ανάλυσης εικόνας. Η διαδικασία της ποσοτικοποίησης περιλαμβάνει τη φωτογράφιση των ανοσοστυπωμάτων με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή, την επεξεργασία των φωτογραφιών και την πραγματοποίηση των ποσοτικοποιήσεων.

Στη συνέχεια, οι φωτογραφίες μεταφέρθηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή και αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Scion Image (Scion Corporation). Το λογισμικό είχε ρυθμιστεί κατάλληλα, έτσι ώστε για κάθε ζώνη αναφοράς, καταγράφονταν αυτόματα σε ένα λογιστικό φύλλο η επιφάνεια της ζώνης και η μέση έντασή της. Το γινόμενο των δύο αυτών παραμέτρων είναι ανάλογο της ποσότητας της πρωτεΐνης που

αντιστοιχεί σε κάθε ζώνη του ηλεκτροφορήματος και χρησιμοποιήθηκε για τις ποσοτικές αναλύσεις και συγκρίσεις που έγιναν στην παρούσα εργασία.

Τα επίπεδα των υπό μελέτη πρωτεϊνών και της ακτίνης ποσοτικοποιήθηκαν με το σύστημα ανάλυσης εικόνας και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα της % μεταβολής στα επίπεδα των πρωτεϊνών ως προς τα επίπεδα της ακτίνης, σε σχέση με τα κύτταρα του control (μάρτυρας). Όπου παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το μάρτυρα τοποθετήθηκαν αστερίσκοι ($P < 0.05$).

Αποσιώπηση (gene silencing) και παροδική διαμόλυνση (transient transfection)

Η αποσιώπηση (silencing) της έκφρασης των JNK και ERK1/2 σε κυτταρικές σειρές ΑΚΣ έγινε με την τεχνική της παροδικής διαμόλυνσης (transient transfection) με τη βοήθεια του ειδικού μηχανήματος διαμόλυνσης (electroporator) Amaxa Nucleofector II (Lonza, Cologne, Germany). Περίπου 2×10^6 κύτταρα σε κάθε δείγμα, αναδιαλύθηκαν σε 100μl του ειδικού διαλύματος (Kit “V” or “T” solution) και διαμολύνθηκαν με 1μM και 2,5μM τελικής συγκέντρωσης siRNA χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα A-030, σύμφωνα με το προτεινόμενο πρωτόκολλο της εταιρείας. Μετά από 48 ώρες, τα κύτταρα συλλέχθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν και εν συνεχεία έγινε απομόνωση πρωτεϊνών από τα κυτταρικά ιζήματα όπως περιγράφηκε σε προηγούμενη παράγραφο. Οι ειδικές παρεμβατικές αλληλουχίες RNA (small interference RNA ή siRNA) που χορηγήθηκαν με την παροδική διαμόλυνση στοχεύουν τα γονιδιακά προϊόντα των JNK1/2 και ERK1/2, ήταν προ-σχεδιασμένες από την εταιρία Ambion Inc (Austin, TX) και περιελάμβαναν τις εξής αλληλουχίες :

JNK1/2: 5_-GGAAGCUGGAGAGAAUCGcTt-3_ (νοηματική) και 5_-
CGAUUCUCUCCAGCUUCcTt-3_ (μη νοηματική); *JNK1*: 5_-

GGACUACGUUGAAAACAGtt-3_(νοηματική) και 5_-
CUGUUUCAACGUAAGUCcTt-3_ (μη νοηματική); *JNK2*: 5_-
GCUCUGCGUCACCCAUAACAtt-3_ (νοηματική) και 5_-
UGUAUGGGUGACGCAGAGCtt-3_(μη νοηματική).

ERK1/2: ERK1: 5'-CGCUACACGC AGUUGCAGUACA-3' (νοηματική) and 5'-AAGCGCAGCAGG AUCUGGA-3' (μη νοηματική); ERK2: 5'-UGUUCCCAAUUGCUG ACUCCAA-3' (νοηματική) and 5'-UCGGGUCGUAAUACUGC UCCAGAUUA-3' (μη νοηματική).

Τα επίπεδα έκφρασης των cJun, JNK1/2 και ERK1/2 εκτιμήθηκαν με στύπωμα κατα Western για να επιβεβαιωθεί ο βαθμός αποσιώπησης μετά απο την διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών.

Μέθοδος ανοσοϊστοχημείας

Στόχος της ανοσοϊστοχημείας είναι ο κυτταρικός εντοπισμός και ταυτοποίηση αντιγόνων-πρωτεϊνικών μορίων σε βιολογικά υλικά. Η ανίχνευση επιτυγχάνεται με χρήση κατάλληλων αντισωμάτων σημασμένων με ένζυμα. Η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας βασίζεται στην επιλεκτική σύνδεση των πρωτογενών αντισωμάτων με τους υπό ανίχνευση αντιγονικούς επιτόπους. Η εφαρμογή της καθίσταται δυνατή βάσει των χημικών ιδιοτήτων ενζυμικών συμπλεγμάτων ή ενζύμων τα οποία συνδέονται με τα συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος και στη συνέχεια αντιδρούν με χρωμογόνες ενώσεις οι οποίες μετατρέπονται σε έγχρωμα τελικά προϊόντα με αποτέλεσμα την οπτικοποίηση των ανοσοσυμπλόκων.

Χρησιμοποιήθηκαν ιστοί ακανθοκυτταρικού καρκινώματος του στόματος, που προέρχονται από το αρχείο του Εργαστηρίου Στοματολογίας της Οδοντιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών (60 περιπτώσεις) που ταξινομήθηκαν σε 3 ομάδες των 20 περιπτώσεων με βάση το βαθμό διαφοροποίησης (υψηλής, μέτριας, χαμηλής). Διερευνήθηκε η έκφραση των εξής 5 πρωτεϊνών : phospho-STAT3 (Tyr705)(1:100), phospho-STAT3 (Ser727) (1:100), phospho-cJun (1:100), phospho-ERK1/2(1:100), phospho-p38(1:100).

Αρχικά λήφθησαν τομές παραφίνης πάχους 5 μm οι οποίες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες καλυμμένες με poly-Llysine, αποπαραφινώθηκαν, ενυδατώθηκαν και εμβαπτίστηκαν για 10 λεπτά σε διάλυμα TBS/ Tween 20 pH 7.4 (Sigma). Για την αποκάλυψη των αντιγονικών θέσεων των υπό μελέτη πρωτεϊνών, οι τομές εμβαπτίστηκαν σε 10mM κιτρικό νάτριο (pH 6.0) και θερμάνθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων σε ισχύ 600W για 3 κύκλους των 5 λεπτών έκαστος (μέθοδος της

θέρμανσης υπό πίεση) ή σε ειδικό διάλυμα αποκάλυψης αντιγόνων (target retrieval solution, DAKO) και θέρμανση σε χύτρα ατμού (steamer) για 30 λεπτά. Ακολούθως, οι τομές επώαστηκαν σε διάλυμα 0.3% υπεροξειδίου του υδρογόνου για να παρεμποδιστεί η δράση της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Μετά από πλύσεις σε διάλυμα TBS/ Tween 20 pH 7.4 (Sigma) οι τομές επώαστηκαν με τα αντίστοιχα πρωτογενή αντισώματα σε θερμοκρασία 4°C για μία νύχτα. Ακολούθως, προστέθηκε δευτερογενές αντίσωμα συνδεδεμένο με ένα μόριο βιοτίνης σε διάλυση 1:200 για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (RT) ή το μείγμα δευτερογενών αντισωμάτων (anti-mouse, anti-rabbit, anti-goat) που αποτελεί μέρος της μεθόδου LSAB+ (DAKO,Denmark) για 20 λεπτά. Μετά από πλύσεις των πλακιδίων με TBS/ Tween 20 pH 7.4 (Sigma) ακολούθησε επώασή τους με το σύμπλεγμα στρεπταβιδίνης - υπεροξειδάσης (DAKO, Denmark) για 20 λεπτά. Ως χρωμογόνο χρησιμοποιήθηκε 3,3'-διαμινοβενζιδίνη τετραϋδροχλωρίδιο (DAB) και αιματοξυλίνη για τη χρώση των πυρήνων.

Αξιολόγηση της Ανοσοϊστοχημικής χρώσης

Η αξιολόγηση των περιπτώσεων έγινε από 3 ανεξάρτητους ερευνητές, με μέτρηση τουλάχιστον 1000 νεοπλασματικών κυττάρων και μικροσκόπηση τουλάχιστον 10 αντιπροσωπευτικών πεδίων του ΑΚΣ στο οπτικό μικροσκόπιο, χρησιμοποιώντας φακούς μεγέθυνσης 20x και 40x. Κάθε τομή εκτιμήθηκε ως προς την ένταση του καφέ χρώματος (DAB/υπεροξειδάση) και το ποσοστό (%) των κυττάρων της βλάβης που είναι θετικά στην ανοσοχρώση. Μόνο οι περιπτώσεις με παρουσία πυρηνικής χρώσης χαρακτηρίστηκαν θετικές για όλα τα αντισώματα που αξιολογήθηκαν. Για τον καθορισμό του ποσοστού των θετικών νεοπλασματικών κυττάρων των 5 πρωτεϊνών μελέτης, τουλάχιστον 500 κύτταρα μετρήθηκαν σε κάθε περιστατικό. Για τη λήψη φωτογραφιών χρησιμοποιήκε το μικροσκόπιο BX51 Olympus, DP12 Olympus ψηφιακή κάμερα και φακοί universal semi-apochromat UPlan FL lens (40x/0.75 NA) (Olympus, Melville, US).

Η βαθμολόγηση έγινε ως εξής:

Κατανομή (ποσοστό χρώσης): Εκτιμήθηκε το ποσοστό των κυττάρων της βλάβης που ήταν θετικά για τη χρώση. 0, 1, 2, 3 είναι η βαθμολόγηση που έγινε ανάλογα με το ποσοστό βάσει του παρακάτω πίνακα.

Ποσοστό χρώσης	
Ποσοστό	Βαθμολογία
< 10%	0
10-20%	1
20-50%	2
> 50%	3

Ένταση: Αξιολογήθηκε ως αρνητική, ασθενής, μέτρια, και ισχυρή και βαθμολογήθηκε βάσει του παρακάτω πίνακα.

Ένταση χρώσης	
χαρακτηρισμός	Βαθμολογία
Αρνητική	0
Ασθενής	1
Μέτρια	2
Ισχυρή	3

Συνδυάζοντας τις δύο αυτές παραμέτρους, ένταση και ποσοστό χρώσης, προκύπτει το τελικό άθροισμα (0 - 6) (total score).

Στατιστική ανάλυση.

α) Βιωσιμότητας και Αριθμού ζωντανών κυττάρων

Πραγματοποιήθηκαν 5 επαναληπτικές μετρήσεις σε κάθε περίπτωση, ανά μονάδα χρόνου και εφαρμοζόμενης συγκέντρωσης φαρμάκου. Οι πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των μεταβολών του ποσοστού βιωσιμότητας και του αριθμού των ζωντανών κυττάρων ανά εφαρμοζόμενη συγκέντρωση φαρμάκου (αναστολέα, επαγωγέα, siRNA) εκτιμήθηκαν με τη χρήση μη παραμετρικών στατιστικών δοκιμασιών (Δοκιμασία t-student για μικρά δείγματα). Όλα τα στατιστικά στοιχεία έχουν εκφραστεί ως μέσες τιμές \pm SD. Οι στατιστικές διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές όταν ο δείκτης πιθανότητας p ήταν <0.05 .

β) Ανοσοϊστοχημικών αποτελεσμάτων

Οι μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη στατιστική ανάλυση ήταν οι εξής:

- Βαθμός διαφοροποίησης
- Ένταση χρώσης (intensity score)
- Ποσοστό θετικής χρώσης (percentage score)
- Άθροισμα σκορ ποσοστού και έντασης χρώσης (total score)

Οι πιθανές συσχετίσεις στην ένταση και στο ποσοστό έκφρασης των 5 πρωτεϊνών μελέτης μεταξύ των τριών ομάδων διαφοροποίησης (υψηλής, μέτριας, χαμηλής) εκτιμήθηκαν με τη χρήση μη παραμετρικών στατιστικών δοκιμασιών (Δοκιμασία Fisher –Two Tailed Fisher's exact test). Οι στατιστικές διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές όταν ο δείκτης πιθανότητας p ήταν <0.05 . Όλη η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του στατιστικού λογισμικού SPSS (Abacus Concepts, Berkeley, CA).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

α) Πειράματα σε κυτταροκαλλιέργειες

ERK1/2

Επίδραση του αναστολέα U0126 των Erk1/2, στην έκφραση και ενεργοποίηση της πρωτεΐνης STAT3 και του μορίου-στόχου Cyclin-D1.

Αρχικά εξετάστηκε η έκφραση και η κατάσταση ενεργοποίησης των Erk1 / 2 σε κύτταρα OSCC. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Western-Blot, ανιχνεύθηκαν τόσο ολικά όσο και φωσφορυλιωμένα (ενεργοποιημένα) επίπεδα πρωτεΐνης Erk1/2 (p42/44) σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν (SCC9 και SCC25). Επίσης παρατηρήθηκαν ολικά και φωσφορυλιωμένα, στην τυροσίνη και σερίνη, επίπεδα πρωτεΐνης STAT3 και διαπιστώθηκε έκφραση της cyclin-D1 σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές (Εικ. 7).

Στη συνέχεια αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα της ERK1/2 αναστολής. Η εφαρμογή του αναστολέα U0126 στη σειρά SCC25 για 24 ώρες, οδήγησε σε αναστολή της φωσφορυλίωσης των ERK1 / 2, η οποία ήταν εντονότερη στην υψηλότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (50μM). Επίσης παρατηρήθηκε μικρή μείωση στα ολικά επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών Erk1/2 μετά την εφαρμογή του U0126 και στις δυο συγκεντρώσεις για την κυτταρική σειρά SCC25. Από την άλλη πλευρά, η δράση του U0126 προκάλεσε λιγότερο αξιοσημείωτες επιπτώσεις στην κυτταρική σειρά SCC9, καθώς παρατηρήθηκε μείωση στην έκφραση και φωσφορυλίωση των Erk1/2 μόνο στην υψηλότερη συγκέντρωση (50 μM). Επιπρόσθετα εξετάστηκε η επίδραση της αναστολής των ERK1/2 στα επίπεδα έκφρασης και ενεργοποίησης της πρωτεΐνης STAT3. Μετά την εφαρμογή του αναστολέα στη σειρά SCC25 για 24 ώρες, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της STAT3 φωσφορυλίωσης στη σερίνη και στις 2 συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Αντίθετα, τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης στην τυροσίνη STAT3 δεν επηρεάστηκαν σημαντικά. Από την άλλη πλευρά , η εισαγωγή του U0126 στην κυτταρική σειρά SCC9 οδήγησε στη μείωση της STAT3 φωσφορυλίωσης στη σερίνη, μόνο όμως στην υψηλότερη συγκέντρωση (50 μM), η οποία συνοδεύτηκε από μέτρια αύξηση της STAT3 φωσφορυλίωσης στην τυροσίνη.

Τα ολικά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης STAT3 δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από την εφαρμογή του U0126 και στις δύο κυτταρικές σειρές (Εικ.7).

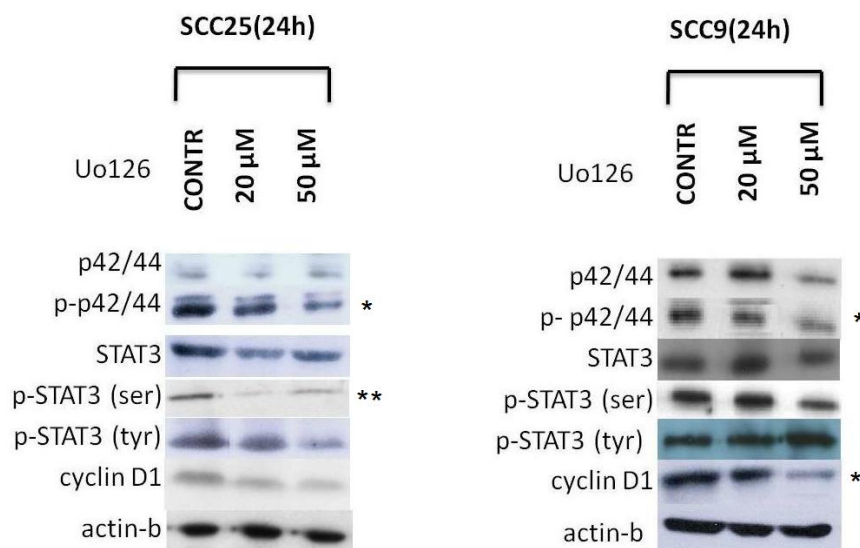
Επιπλέον, η Western blot ανάλυση έδειξε ότι η αναστολή των ERK1/2 φαίνεται να συνδέεται με μειωμένα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1 κατά ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές. Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης της ακτίνης παρέμειναν σταθερά καθ' όλη τη θεραπεία, υποδεικνύοντας ότι οι παρατηρούμενες επιδράσεις στις προαναφερθείσες πρωτεΐνες δεν προκλήθηκαν από τυχαία μη ειδική μείωση στην έκφραση της εκάστοτε πρωτεΐνης (Εικ.7).

Συνοπτικά, η αναστολή των Erk1/2 μετά την εφαρμογή του U0126 ήταν πιο ισχυρή στην κυτταρική σειρά SCC25 και συνδέθηκε με αξιοσημείωτη μείωση στα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη STAT3 αλλά και της κυκλίνης D1, χωρίς να επηρεάζει τη φωσφορυλίωση στην τυροσίνη.

Επίσης, στην SCC9 σειρά, η δράση του U0126 οδήγησε σε μείωση της Erk1 / 2 φωσφορυλίωσης, αν και σε μικρότερο βαθμό συγκριτικά με την SCC25. Επιπλέον, διαπιστώθηκε μείωση στα επίπεδα της STAT3 φωσφορυλίωσης στη σερίνη και της κυκλίνης D1, αλλά και αύξηση της φωσφορυλίωσης στην τυροσίνη, στην υψηλότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε.

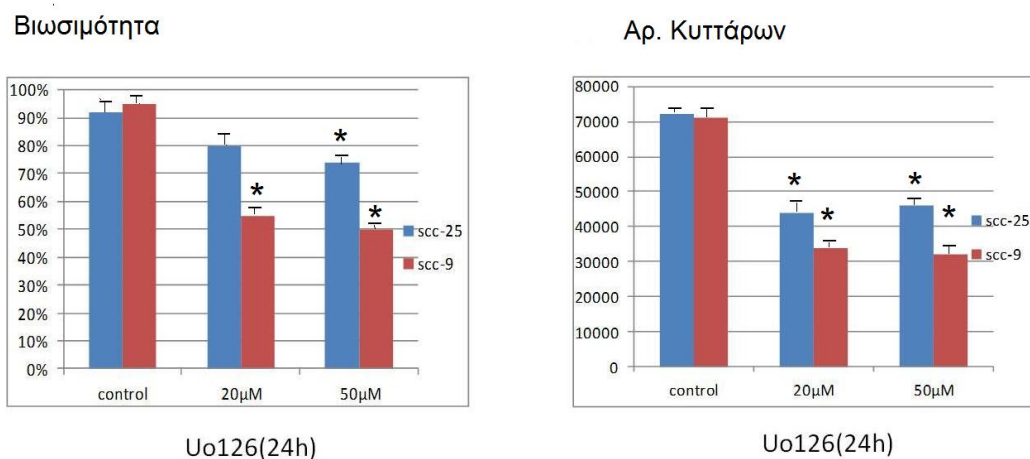
Επιδράσεις του αναστολέα U0126 στην κυτταρική αύξηση και βιωσιμότητα

Η χορήγηση του αναστολέα U0126 για 24 ώρες είχε ως αποτέλεσμα μια στατιστικώς σημαντική ($P < 0,05$) δόσο-εξαρτώμενη μείωση στην κυτταρική αύξηση (απόλυτος αριθμός των κυττάρων) και στην κυτταρική βιωσιμότητα (αριθμός των βιώσιμων κυττάρων) σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν. Η μείωση φαίνεται να είναι πιο εμφανής στην SCC9 κυτταρική σειρά (Σχ. 1).



Εικόνα 7. Επίδραση του αναστολέα U0126 των Erk1/2, στην έκφραση και ενεργοποίηση των STAT3 και Cyclin-D1.

*: $p < 0.05$ σε σύγκριση με control στην υψηλή συγκέντρωση / **: $p < 0.05$ σε σύγκριση με control και στις 2 συγκεντρώσεις



Σχήμα 1. Επιδράσεις του αναστολέα U0126 στον αριθμό των κυττάρων (cell number) και στη βιωσιμότητα (viability)

*: $p < 0,05$ σε σύγκριση με control

Επιδράσεις της siRNA σίγασης των Erk1 / 2 στην έκφραση και ενεργοποίηση της πρωτεΐνης STAT3 και του μορίου-στόχου Cyclin-D1.

Για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα από τη φαρμακολογική αναστολή των Erk1/2, πραγματοποιήθηκε ειδική αναστολή των ERK1/2 με siRNA στόχευση και στις δύο κυτταρικές σειρές.

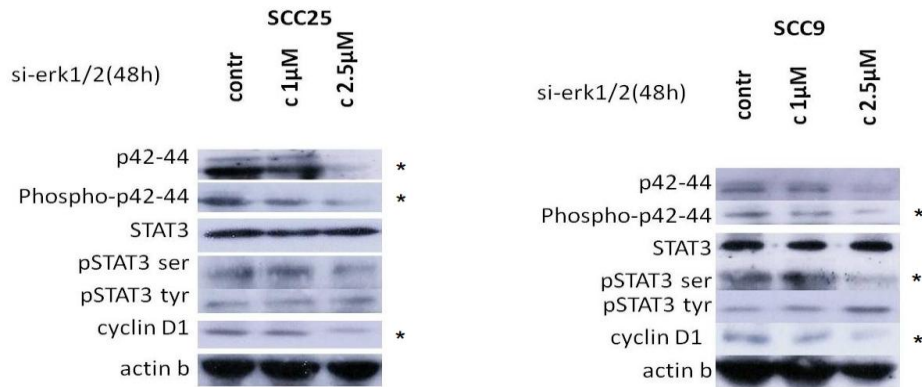
Σαράντα οκτώ ώρες μετά τη διαμόλυνση, η Western blot ανάλυση αποκάλυψε ότι η εφαρμογή siRNA κατά των Erk1/2 είχε σιγήσει αποτελεσματικά τις Erk1 / 2 προκαλώντας δόσοεξαρτώμενη μείωση στα ολικά και φωσφορυλιωμένα επίπεδα έκφρασης των p42/44 (Erk1/2) πρωτεϊνών σε σύγκριση με τα διαμολυσμένα κύτταρα ελέγχου, σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές (Εικ.8). Η μείωση της έκφρασης στα επίπεδα της ολικής και φωσφορυλιωμένης μορφής των Erk1/2 συσχετίζεται με μείωση της STAT3 φωσφορυλίωσης στη σερίνη σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές, μετά από 48 ώρες εφαρμογής ειδικού siRNA κατά των Erk1/2 σε συγκέντρωση 2.5 μΜ. Όσον αφορά στη φωσφορυλίωση της τυροσίνης στην κυτταρική σειρά SCC9, ανιχνεύθηκε αύξηση στα επίπεδα της πρωτεΐνης pSTAT3-tyr, ιδιαίτερα στην υψηλότερη συγκέντρωση. Αντίθετα, η θεραπεία με siRNA κατά των Erk1/2 δεν φαίνεται να προκαλεί οποιαδήποτε αξιοσημείωτη μεταβολή στα επίπεδα της pSTAT3-tyr στην SCC25 σειρά. Τα επίπεδα της ολικής STAT3 πρωτεΐνης δεν επηρεάστηκαν σε καμία κυτταρική σειρά (Εικ.8).

Επιπλέον, η Western-blot κατέδειξε ότι η αποσιώπηση των ERK1/2 σχετίζεται σημαντικά με μειωμένα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1 κατά ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο και στις δύο κυτταρικές σειρές. Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης της ακτίνης παρέμειναν σταθερά (Εικ.8).

Επομένως, η ειδική σίγαση των ERK1/2 οδήγησε στη μείωση της STAT3 φωσφορυλίωσης στη σερίνη και της έκφρασης της κυκλίνης D1 σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές καθώς και σε αύξηση της STAT3 φωσφορυλίωσης στην τυροσίνη ιδιαίτερα στην SCC9 κυτταρική σειρά.

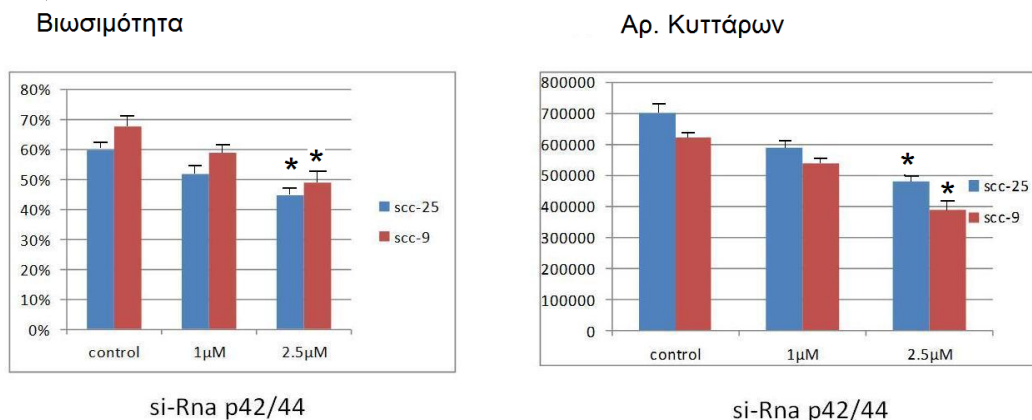
Επίδραση της ειδικής σίγασης των Erk1/2 στην κυτταρική αύξηση και βιωσιμότητα.

Παρόμοια με τις επιπτώσεις της χημικής αναστολής με U0126, 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση με siRNA κατά των Erk1/2, παρατηρήθηκε δόσοεξαρτώμενη μείωση της ανάπτυξης των κυττάρων και της κυτταρικής βιωσιμότητας σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές (P < 0,05 στη μεγαλύτερη συγκέντρωση) (Σχ. 2).



Εικόνα 8. Επιδράσεις της siRNA σίγασης των Erk1 / 2 στην έκφραση και ενεργοποίηση των STAT3 και Cyclin-D1.

*: p<0.05 σε σύγκριση με control στην υψηλή συγκέντρωση



Σχήμα 2. Επίδραση της ειδικής σίγασης των Erk1/2 στον αριθμό των κυττάρων (cell number) και στη βιωσιμότητα (viability)

*: p<0,05 σε σύγκριση με control

Επίδραση της Erk1 / 2 επαγωγής στην έκφραση και ενεργοποίηση των STAT3 και Cyclin-D1.

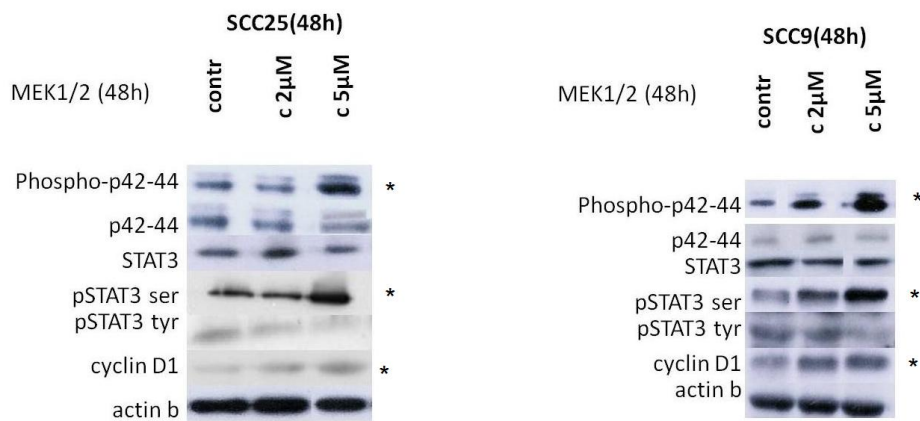
Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η σημασία των ERK1/2 κινασών στην έκφραση του STAT3 και της κυκλίνης D1, πραγματοποιήθηκε φαρμακολογική επαγωγή των Erk1/2 με χρήση ενεργού MEK1/2 (ανώτερος ενεργοποιητής των ERK1/2). Η εφαρμογή του ειδικού MEK1 / 2 επαγωγέα, οδήγησε στην αποτελεσματική αύξηση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης Erk1/2 κατά ένα δοσο-εξαρτώμενο τρόπο και στις δύο κυτταρικές σειρές χωρίς να επηρεάσει, όπως αναμενόταν, τα ολικά επίπεδα των πρωτεϊνών Erk1/2 (Εικ. 9). Επιπρόσθετα η χορήγηση για 48 ώρες του Erk1 / 2 επαγωγέα, οδήγησε σε σημαντική επαγωγή της STAT3 Ser 727 φωσφορυλίωσης, ειδικά στη συγκέντρωση των 5μm/mL. Αντίθετα, τα επίπεδα της p- Tyr- STAT3 φάνηκε να μειώνονται μετά την εφαρμογή του επαγωγέα. Τα ολικά επίπεδα της STAT3 πρωτεΐνης δεν επηρεάστηκαν από την Erk1 / 2 επαγωγή σε καμία από τις δυο κυτταρικές σειρές (Εικ. 9).

Επίσης, η χρήση του ενεργού MEK1/2 προκάλεσε αύξηση των επιπέδων έκφρασης της κυκλίνης D1 και στις δύο κυτταρικές σειρές, ιδίως στην υψηλότερη συγκέντρωση. Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης της ακτίνης παρέμειναν σταθερά καθ' όλη την πειραματική διαδικασία (Εικ. 9).

Συνοπτικά, η επαγωγή των Erk1 / 2 προκάλεσε αύξηση των επιπέδων έκφρασης της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη STAT3 και της κυκλίνης D1 σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές και μείωση της φωσφορυλιωμένης στην τυροσίνη STAT3.

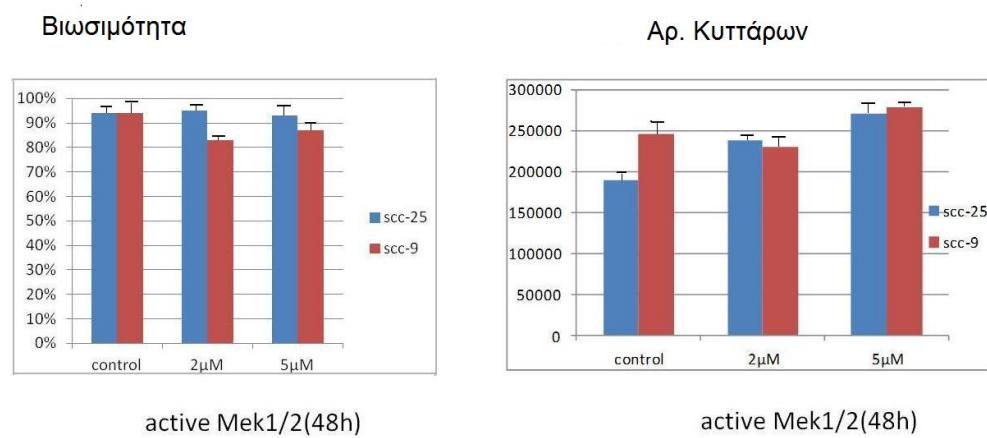
Επίδραση της Erk1/2 επαγωγής στην κυτταρική αύξηση και βιωσιμότητα.

Η χορήγηση ενεργού MEK1/2 στις δυο κυτταρικές σειρές OSCC για 48 ώρες, είχε ως αποτέλεσμα σημαντική δοσοεξαρτώμενη αύξηση στην ανάπτυξη των κυττάρων στην υψηλότερη συγκέντρωση, η οποία ήταν περισσότερο εμφανής στην SCC9 κυτταρική σειρά. Αντιθέτως, η χορήγηση ενεργού MEK1/2 για 48 ώρες, δε φαίνεται να επάγει αξιοσημείωτες αλλαγές στην κυτταρική βιωσιμότητα και για τις δυο κυτταρικές σειρές (Σχ. 3).



Εικόνα 9. Επίδραση της Erk1 / 2 επαγωγής στην έκφραση και ενεργοποίηση των STAT3 και Cyclin-D1.

*: $p < 0.05$ σε σύγκριση με control στην υψηλή συγκέντρωση



Σχήμα 3. Επίδραση της Erk1 / 2 επαγωγής στον αριθμό των κυττάρων (cell number) και στη βιωσιμότητα (viability)

JNK1/2

Επίδραση του αναστολέα SP600125 των JNK1/2, στην έκφραση και ενεργοποίηση της πρωτεΐνης STAT3 και του μορίου-στόχου Cyclin-D1.

Αρχικά εξετάστηκε η έκφραση και η κατάσταση ενεργοποίησης των JNK1/2 σε κύτταρα ΑΚΣ. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Western Blot, ανιχνεύθηκαν τόσο ολικά όσο και φωσφορυλιωμένα (ενεργοποιημένα) επίπεδα πρωτεϊνών JNK1/2 και του άμεσου στόχου της p-cJun, σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν (SCC9 και SCC25). Επίσης, παρατηρήθηκαν ολικά και φωσφορυλιωμένα, στην τυροσίνη και σερίνη, επίπεδα πρωτεΐνης STAT3 και διαπιστώθηκε έκφραση της cyclin-D1 σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές (Εικ. 10). Στη συνέχεια αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα της JNK1/2 αναστολής. Η εφαρμογή του αναστολέα SP600125 στη σειρά SCC25 για 24 ώρες, οδήγησε σε αναστολή της φωσφορυλίωσης της c-Jun, και στις δύο συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Τα ολικά επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών JNK1/2 μετά την εφαρμογή του SP600125 παρέμειναν σταθερά και στις δύο συγκεντρώσεις για την κυτταρική σειρά SCC25. Η εφαρμογή του SP600125 στην κυτταρική σειρά SCC9 προκάλεσε παρόμοια μείωση στη φωσφορυλίωση της c-Jun, με ένα δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (Εικ.10).

Επιπρόσθετα εξετάστηκε η επίδραση της αναστολής των JNK1/2 στα επίπεδα έκφρασης και ενεργοποίησης της πρωτεΐνης STAT3. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την εφαρμογή του αναστολέα στις δύο κυτταρικές σειρές SCC9 και SCC25, παρατηρήθηκε μείωση της STAT3 φωσφορυλίωσης στη σερίνη και στις 2 συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Αντίθετα, τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης στην τυροσίνη STAT3 παρουσίασαν αύξηση, ιδιαίτερα στην υψηλότερη συγκέντρωση (40μM).

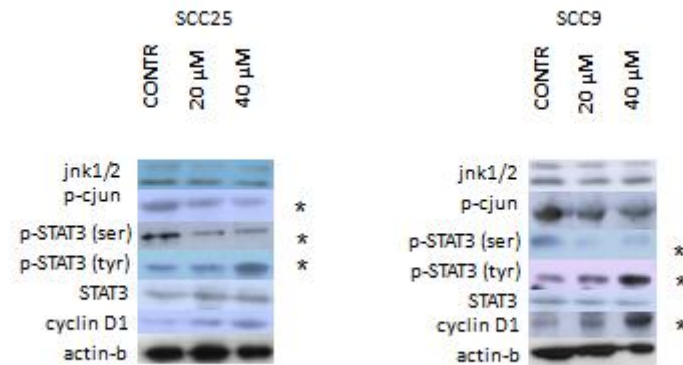
Τα ολικά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης STAT3 δεν επηρεάστηκαν από την εφαρμογή του SP600125 σε καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές (Εικ. 10).

Επιπλέον, η Western blot ανάλυση έδειξε ότι η αναστολή των JNK1/2 φαίνεται να συνδέεται με αυξημένα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1 κατά ένα δοσο-εξαρτώμενο τρόπο σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές. Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης της ακτίνης παρέμειναν σταθερά καθ 'όλη τη θεραπεία, υποδεικνύοντας ότι οι παρατηρούμενες επιδράσεις στις προαναφερθείσες πρωτεΐνες δεν

προκλήθηκαν από τυχαία μη ειδική μεταβολή της έκφρασης της εκάστοτε πρωτεΐνης. Συνοπτικά, η αναστολή της ενεργοποίησης των JNK1/2 μετά την εφαρμογή του SP600125 ήταν εμφανής και στις δύο κυτταρικές σειρές και συνδέθηκε με αύξηση στα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης στην τυροσίνη STAT3 αλλά και της κυκλίνης D1, ταυτόχρονα με μείωση στη φωσφορυλίωση της σερίνης.

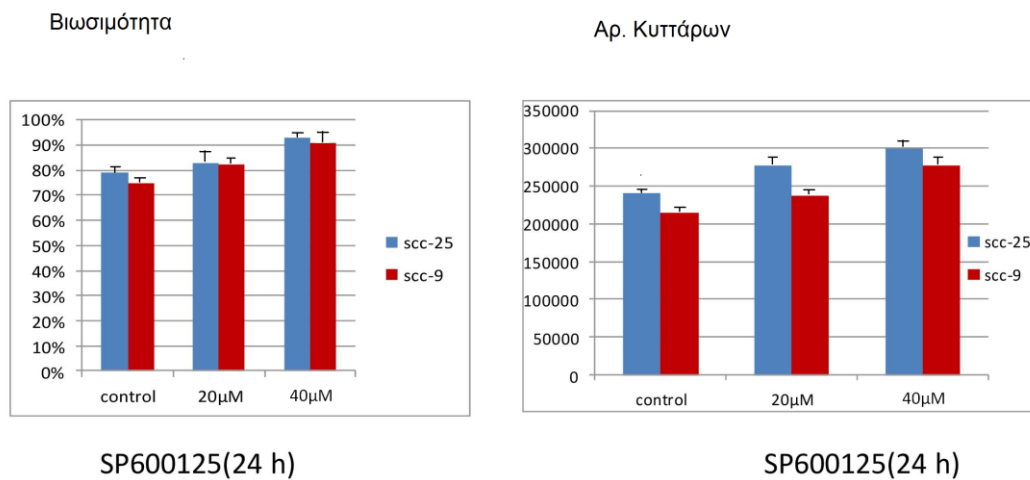
Επιδράσεις του αναστολέα SP600125 στην κυτταρική αύξηση και βιωσιμότητα.

Η χορήγηση του αναστολέα SP600125 στις δυο κυτταρικές σειρές OSCC για 24 ώρες, είχε ως αποτέλεσμα τη δόσο-εξαρτώμενη, αλλά όχι στατιστικά σημαντική, αύξηση του απόλυτου αριθμού των κυττάρων και της κυτταρικής βιωσιμότητας (αριθμός των βιώσιμων κυττάρων) σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν. Η αύξηση φαίνεται να είναι πιο εμφανής στην SCC25 κυτταρική σειρά (Σχ. 4).



Εικόνα 10. Επίδραση του αναστολέα SP600125 των JNK1/2, στην έκφραση και ενεργοποίηση των STAT3 και Cyclin-D1.

*: $p < 0.05$ σε σύγκριση με control στην υψηλή συγκέντρωση



Σχήμα 4. Επιδράσεις του αναστολέα SP600125 στον αριθμό των κυττάρων (cell number) και στη βιωσιμότητα (viability)

Επιδράσεις της siRNA σίγασης των JNK 1/2 στην έκφραση και ενεργοποίηση των STAT3 και Cyclin-D1.

Για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα από την φαρμακολογική αναστολή των JNK1/2, πραγματοποιήθηκε ειδική αναστολή των JNK1/2 με siRNA στόχευση και στις δύο κυτταρικές σειρές.

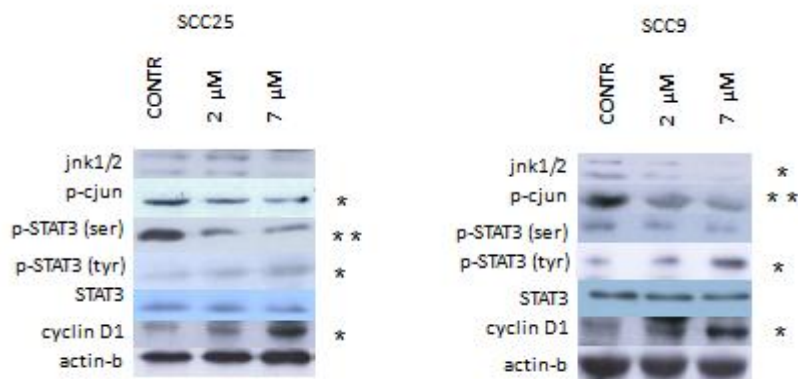
Σαράντα οκτώ ώρες μετά τη διαμόλυνση, η Western blot ανάλυση αποκάλυψε ότι η εφαρμογή siRNA κατά των JNK1/2 είχε σιγήσει αποτελεσματικά την έκφραση των ολικών JNK1/2 προκαλώντας δόσοεξαρτώμενη μείωση στην ολική JNK1/2 και στα φωσφορυλιωμένα επίπεδα έκφρασης της c-Jun πρωτεΐνης σε σύγκριση με τα διαμολυσμένα κύτταρα ελέγχου, σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές (Εικ.11). Η μείωση της έκφρασης στα επίπεδα των ολικών JNK1/2 και της φωσφορυλιωμένης c-Jun συσχετίζεται με δόσοεξαρτώμενη μείωση της STAT3 φωσφορυλίωσης στη σερίνη σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές, μετά από 48 ώρες εφαρμογής ειδικού siRNA κατά των JNK1/2. Όσον αφορά στη φωσφορυλίωση της STAT3 στην τυροσίνη, ανιχνεύθηκε αύξηση στα επίπεδα της p-tyr STAT3, ιδιαίτερα στην υψηλότερη συγκέντρωση, η οποία ήταν πιο εμφανής στην κυτταρική σειρά SCC9. Τα επίπεδα της ολικής STAT3 πρωτεΐνης δεν εμφάνισαν σημαντικές μεταβολές (Εικ.11).

Επιπλέον, η Western-blot κατέδειξε ότι η αποσιώπηση των JNK1/2 σχετίζεται σημαντικά με αυξημένα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1 κατά ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο και στις δύο κυτταρικές σειρές. Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης της ακτίνης παρέμειναν σταθερά (Εικ.11)

Επομένως, η ειδική σίγαση των JNK1/2 οδήγησε στην αύξηση της STAT3 φωσφορυλίωσης στην τυροσίνη και της έκφρασης της κυκλίνης D1 καθώς και σε μείωση της STAT3 φωσφορυλίωσης στην σερίνη σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές

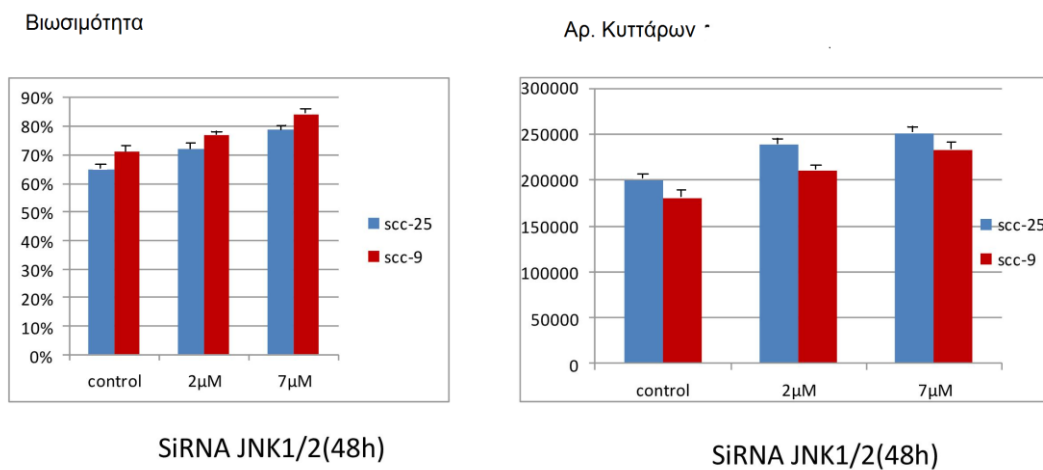
Επίδραση της ειδικής σίγασης των JNK1/2 στην κυτταρική αύξηση και βιωσιμότητα.

Παρόμοια με τις επιπτώσεις της χημικής αναστολής με SP600125, 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση με siRNA κατά των JNK1/2, παρατηρήθηκε δόσοεξαρτώμενη, αλλά μη στατιστικά σημαντική, αύξηση της ανάπτυξης των κυττάρων και της κυτταρικής βιωσιμότητας σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές (Σχ. 5).



Εικόνα 11. Επιδράσεις της siRNA σίγασης των JNK 1/2 στην έκφραση και ενεργοποίηση των STAT3 και Cyclin-D1.

*: $p < 0.05$ σε σύγκριση με control στην υψηλή συγκέντρωση / **: $p < 0.05$ σε σύγκριση με control και στις 2 συγκεντρώσεις



Σχήμα 5. Επίδραση της ειδικής σίγασης των JNK1/2 στον αριθμό των κυττάρων (cell number) και στη βιωσιμότητα (viability)

Επίδραση της JNK 1 / 2 επαγωγής στην έκφραση και ενεργοποίηση της πρωτεΐνης STAT3 και του μορίου-στόχου Cyclin-D1.

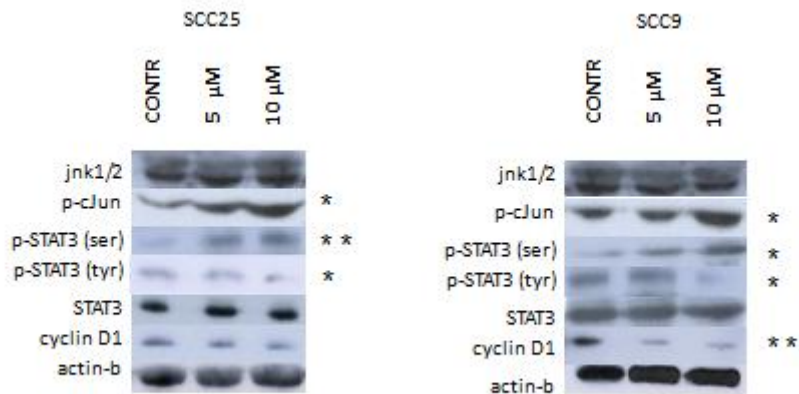
Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η σημασία των JNK1/2 κινασών στην έκφραση του STAT3 και της κυκλίνης D1, πραγματοποιήθηκε φαρμακολογική επαγωγή των JNK 1/2 με χρήση ενεργού MKK7 (ανώτερος ενεργοποιητής των JNK1/2). Η εφαρμογή του ειδικού MKK7 επαγωγέα, οδήγησε στην αποτελεσματική αύξηση των επιπέδων της phospho-cJun (p-cJun) κατά ένα δοσο-εξαρτώμενο τρόπο και στις δύο κυτταρικές σειρές χωρίς να επηρεάσει, όπως αναμενόταν, τα ολικά επίπεδα των πρωτεϊνών JNK 1/2 (Εικ.12). Επιπρόσθετα, η θεραπεία για 24 ώρες και των δύο κυτταρικών σειρών με τον JNK 1 / 2 επαγωγέα, οδήγησε σε επαγωγή της STAT3 Ser 727 φωσφορυλίωσης, ειδικά στην υψηλότερη συγκέντρωση. Αντίθετα, τα επίπεδα της p- Tyr- STAT3 φάνηκε να μειώνονται μετά την εφαρμογή του επαγωγέα. Τα ολικά επίπεδα της STAT3 πρωτεΐνης δεν εμφάνισαν αξιοσημείωτες μεταβολές κατόπιν της JNK 1 / 2 επαγωγής σε καμία από τις δυο κυτταρικές σειρές (Εικ.12).

Επίσης η χρήση του ενεργού MKK7 προκάλεσε μείωση των επιπέδων έκφρασης της κυκλίνης D1 και στις δύο κυτταρικές σειρές, ιδίως στην υψηλότερη συγκέντρωση. Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης της ακτίνης παρέμειναν σταθερά καθ' όλη την πειραματική διαδικασία (Εικ.12).

Συνοπτικά, η επαγωγή των JNK 1 / 2 προκάλεσε αύξηση των επιπέδων έκφρασης της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη STAT3 και μείωση της έκφρασης της κυκλίνης D1 και της φωσφορυλιωμένης στην τυροσίνη STAT3, σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές.

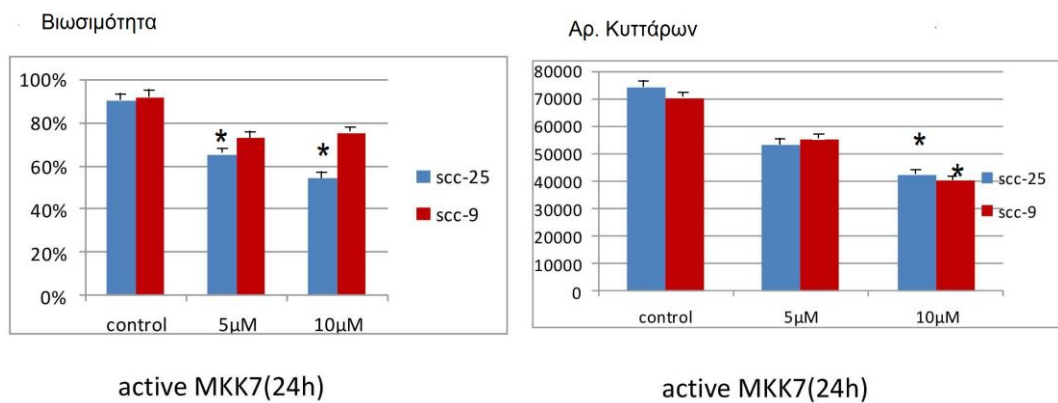
Επίδραση της JNK 1/2 επαγωγής στην κυτταρική αύξηση και βιωσιμότητα.

Η χορήγηση ενεργού MKK7 για 24 ώρες, είχε ως αποτέλεσμα σημαντική δοσοεξαρτώμενη μείωση στην ανάπτυξη των κυττάρων στην υψηλότερη συγκέντρωση και για τις δυο κυτταρικές σειρές($P < 0,05$ όπου φαίνεται στο σχήμα 6). Τέλος, η χορήγηση ενεργού MKK7 για 24 ώρες, προκαλεί μείωση στην κυτταρική βιωσιμότητα ιδιαίτερα στην SCC25 κυτταρική σειρά (Σχ.6).



Εικόνα 12. Επίδραση της JNK 1 / 2 επαγωγής στην έκφραση και ενεργοποίηση των STAT3 και Cyclin-D1.

*: $p < 0.05$ σε σύγκριση με control στην υψηλή συγκέντρωση / **: $p < 0.05$ σε σύγκριση με control και στις 2 συγκεντρώσεις



Σχήμα 6. Επίδραση της JNK 1/2 επαγωγής στον αριθμό των κυττάρων (cell number) και στη βιωσιμότητα (viability)

*: $p < 0.05$ σε σύγκριση με control

P38

Επίδραση του αναστολέα SB203580 της P38, στην έκφραση και ενεργοποίηση της πρωτεΐνης STAT3 και του μορίου-στόχου Cyclin-D1.

Αρχικά εξετάστηκε η έκφραση και η κατάσταση ενεργοποίησης της p38 σε κύτταρα ΑΚΣ. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Western-Blot, ανιχνεύθηκαν τόσο ολικά όσο και φωσφορυλιωμένα (ενεργοποιημένα) επίπεδα πρωτεΐνης p38 σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν (SCC9 και SCC25). Επίσης παρατηρήθηκαν ολικά και φωσφορυλιωμένα, στην τυροσίνη και σερίνη, επίπεδα πρωτεΐνης STAT3 και διαπιστώθηκε έκφραση της cyclin-D1 σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές (Εικ.13).

Στη συνέχεια αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα της p38 αναστολής. Η εφαρμογή του αναστολέα SB203580 στις κυτταρικές σειρές SCC25 και SCC9 για 24 ώρες, οδήγησε σε αναστολή της φωσφορυλίωσης της p38, ιδιαίτερα στην υψηλότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (20μM). Τα ολικά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p38 μετά την εφαρμογή του SB203580 παρέμειναν σχετικά σταθερά και στις δυο συγκεντρώσεις για την κυτταρική σειρά SCC25.

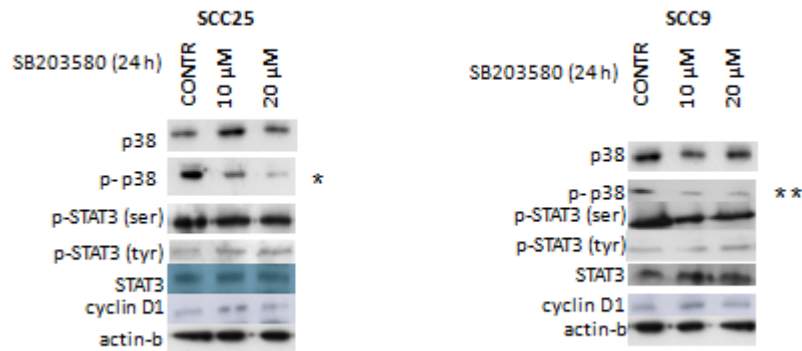
Επιπρόσθετα εξετάστηκε η επίδραση της αναστολής της p38 στα επίπεδα έκφρασης και ενεργοποίησης της πρωτεΐνης STAT3. Εικοσιτέσσερις ώρες μετά την εφαρμογή του αναστολέα στις σειρές SCC25 και SCC9, δεν παρατηρήθηκε κάποια ιδιαίτερη μεταβολή στα ολικά επίπεδα της STAT3 ή στα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων στη σερίνη ή στην τυροσίνη STAT3 και για τις 2 συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Τα ολικά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης STAT3 δεν επηρεάστηκαν από την εφαρμογή του SB203580 και στις δύο κυτταρικές σειρές, (Εικ. 13).

Επιπλέον, η Western blot ανάλυση έδειξε ότι η αναστολή της p38 δε φαίνεται να συνδέεται με μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1 σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές. Επίσης, τα επίπεδα έκφρασης της ακτίνης παρέμειναν σταθερά καθ 'όλη τη θεραπεία, υποδεικνύοντας ότι οι παρατηρούμενες επιδράσεις στις προαναφερθείσες πρωτεΐνες δεν προκλήθηκαν από τυχαία μη ειδική μεταβολή της έκφρασης της εκάστοτε πρωτεΐνης (Εικ. 13).

Συνοπτικά, η αναστολή της p38 μετά την εφαρμογή του SB203580 ήταν εμφανής και στις δύο κυτταρικές σειρές, αλλά δεν προκάλεσε αξιόλογες μεταβολές στα επίπεδα της φωσφορυλίωσης της STAT3(σερίνη /τυροσίνη) ή στην έκφραση της κυκλίνης D1.

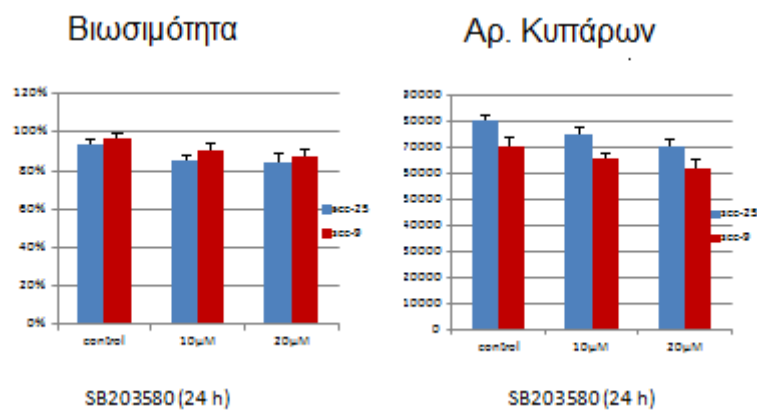
Επιδράσεις του αναστολέα SB203580 στην κυτταρική αύξηση και βιωσιμότητα.

Η χορήγηση του αναστολέα SB203580 για 24 ώρες δε φαίνεται να έχει κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή στον απόλυτο αριθμό των κυττάρων και στην κυτταρική βιωσιμότητα (αριθμός των βιώσιμων κυττάρων) σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν (Σχ.7).



Εικόνα 13. Επίδραση του αναστολέα SB203580 της P38, στην έκφραση και ενεργοποίηση των STAT3 και Cyclin-D1.

*: $p < 0.05$ σε σύγκριση με control στην υψηλή συγκέντρωση / **: $p < 0.05$ σε σύγκριση με control και στις 2 συγκεντρώσεις



Σχήμα 7. Επιδράσεις του αναστολέα SB203580 στον αριθμό των κυττάρων (cell number) και στη βιωσιμότητα (viability)

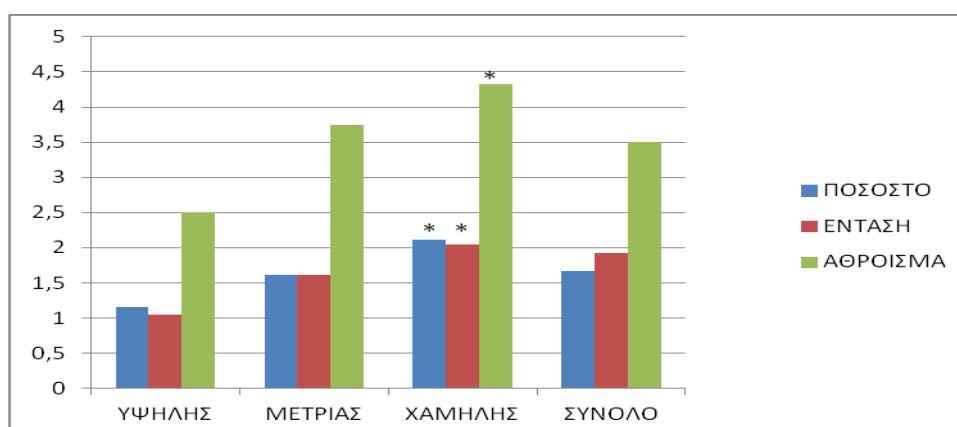
β) Αποτελέσματα Ανοσοϊστοχημείας

Phospho-Stat3 (Tyrosine)

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της p-STAT3(tyr) μελετήθηκε σε 60 περιπτώσεις ακανθοκυτταρικού καρκινώματος στόματος (ΑΚΣ) ποικίλου βαθμού διαφοροποίησης. Στις θετικές περιπτώσεις παρατηρήθηκε πυρηνική εντόπιση της χρώσης. Η ανοσοϊστοχημική χρώση ήταν θετική για το 73,6% (14/19) των περιπτώσεων ΑΚΣ υψηλής διαφοροποίησης, καθώς και για το 94,4% (17/18) και 88,8% (16/18) των περιπτώσεων μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης αντίστοιχα. Τα χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης νεοπλάσματα παρουσίασαν τους υψηλότερους μέσους όρους και στις τρεις υπό μελέτη μεταβλητές: ποσοστό θετικής χρώσης (percentage score), ένταση χρώσης (intensity score), άθροισμα ποσοστού και έντασης χρώσης (combined score), σε αντίθεση με τα καλής διαφοροποίησης περιστατικά, τα οποία εμφάνισαν τις αντίστοιχες χαμηλότερες τιμές (πίνακας 1/ σχήμα 8).

p-STAT3 (tyr)	% ΘΕΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΩΝ	ΠΟΣΟΣΤΟ (Percentage score)	ΕΝΤΑΣΗ (Intensity score)	ΑΘΡΟΙΣΜΑ (total score)
ΚΑΛΗΣ	14/19 (73,6%)	1,16	1,05	2,50
ΜΕΤΡΙΑΣ	17/18 (94,4%)	1,61	1,61	3,75
ΧΑΜΗΛΗΣ	16/18 (88,8%)	2,11	2,05	4,33
ΣΥΝΟΛΟ	47/55(87,5%)	1,67	1,92	3,50

Πίνακας 1. Συνοπτικά αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης p-STAT3(tyr).



Σχήμα 8. Γραφική αναπαράσταση μέσω όρων ποσοστού, έντασης και συνολικού (combined) score ανοσοϊστοχημικής έκφρασης p-STAT3(tyr).

*: $p < 0,05$ σε σύγκριση με καλής διαφοροποίησης

Συνολικό σκορ ποσοστού και έντασης χρώσης (combined score)

Μεταξύ των 18 περιπτώσεων ΑΚΣ χαμηλής διαφοροποίησης τα 11 (61.1%) έλαβαν υψηλό συνολικό σκορ (5 ή 6). Αντίθετα μόνο 3/19 (15,7%) καλής διαφοροποίησης νεοπλάσματα εμφάνισαν ισχυρή έκφραση (συνολικό σκορ 5 ή 6) για την πρωτεΐνη p-STAT3(tyr), με την πλειοψηφία των νεοπλασμάτων αυτών να εμφανίζουν χαμηλό συνολικό σκορ (0 ή 2).

Η στατιστική ανάλυση κατέδειξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης p-STAT3(tyr) και του βαθμού διαφοροποίησης των όγκων. Συγκεκριμένα, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της p-STAT3(tyr) σχετίζονταν με νεοπλάσματα χαμηλής διαφοροποίησης. Στατιστικές συγκρίσεις μεταξύ των επιμέρους κατηγοριών των νεοπλασμάτων αποκάλυψαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) μεταξύ των νεοπλασμάτων καλής και χαμηλής διαφοροποίησης, όσον αφορά στο συνολικό σκορ της πρωτεΐνης p-STAT3(tyr)

Ένταση χρώσης

Μεταξύ των 18 περιπτώσεων ΑΚΣ χαμηλής διαφοροποίησης τα 8 (44,4%) εμφάνισαν ισχυρή ένταση (σκορ 3) χρώσης. Αντίθετα μόνο 1/19 (5,2%) καλής διαφοροποίησης νεοπλάσματα εμφάνισαν ισχυρή ένταση για την πρωτεΐνη p-STAT3(tyr), ενώ 9/19 (47,3%) εμφάνισαν ασθενή ένταση (σκορ 1) χρώσης για την p-STAT3(tyr).

Στατιστικά σημαντική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της έντασης της χρώσης της πρωτεΐνης p-STAT3(tyr) και του βαθμού διαφοροποίησης των όγκων, προς την κατεύθυνση υψηλότερων επιπέδων έντασης χρώσης της p-STAT3(tyr) σε νεοπλάσματα υψηλής κακοήθειας. Επιμέρους στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) διαπιστώθηκε μεταξύ των νεοπλασμάτων καλής και χαμηλής διαφοροποίησης, όσον αφορά στην ένταση της χρώσης της πρωτεΐνης p-STAT3(tyr).

Ποσοστό θετικών κυττάρων

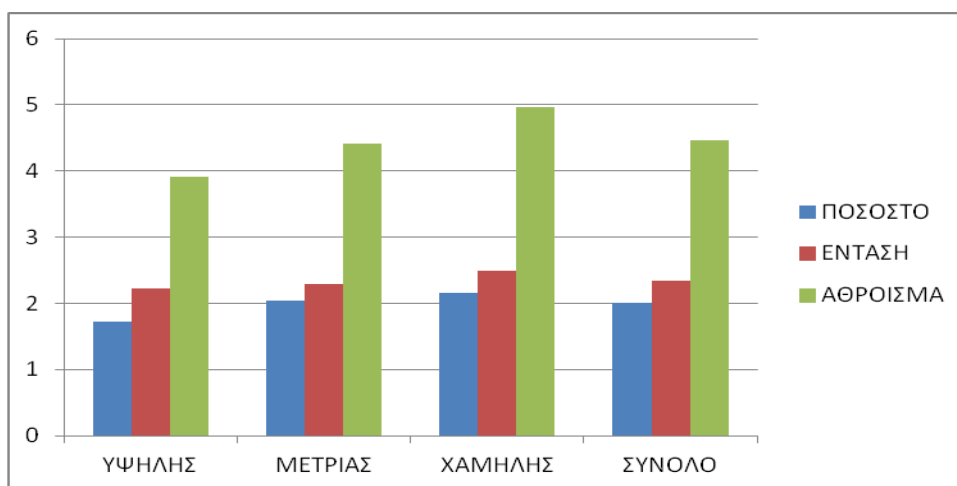
Αναφορικά με το ποσοστό των θετικών στη χρώση κυττάρων, μεταξύ των 18 περιπτώσεων ΑΚΣ χαμηλής διαφοροποίησης τα 9 (50%) παρουσίασαν υψηλό ποσοστό (σκορ 3) χρώσης. Αντίθετα, μόνο 3/19 (15,7%) καλής διαφοροποίησης νεοπλάσματα εμφάνισαν υψηλό ποσοστό θετικών καρκινικών κυττάρων στην p-STAT3(tyr). Η στατιστική ανάλυση κατέδειξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού των θετικών καρκινικών κυττάρων στην p-STAT3(tyr) και του βαθμού διαφοροποίησης των όγκων. Συγκεκριμένα, τα υψηλά ποσοστά θετικών καρκινικών κυττάρων στην p-STAT3(tyr) σχετίζονταν με νεοπλάσματα χαμηλής διαφοροποίησης. Στατιστικές συγκρίσεις μεταξύ των επιμέρους κατηγοριών των νεοπλασμάτων αποκάλυψαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των νεοπλασμάτων καλής και χαμηλής διαφοροποίησης, όσον αφορά στο ποσοστό των θετικών κυττάρων στην πρωτεΐνη p-STAT3(tyr).

Phospho-Stat3 (Serine)

Η ανοσοϊστοχημική χρώση ήταν θετική για το 94,4% (17/18) των περιπτώσεων καλής διαφοροποίησης, καθώς και για το 95% (19/20) και 100% (18/18) των περιπτώσεων μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης αντίστοιχα. Αν και τα χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης νεοπλάσματα παρουσίασαν τους υψηλότερους μέσους όρους και στις τρεις υπό μελέτη μεταβλητές (ποσοστό, ένταση, έκφραση-combined score) σε σύγκριση με τα καλής διαφοροποίησης περιστατικά (πίνακας 2/ σχήμα 9), δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

p-STAT3(ser)	%ΘΕΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΩΝ	ΠΟΣΟΣΤΟ (Percentage score)	ΕΝΤΑΣΗ (Intensity score)	ΑΘΡΟΙΣΜΑ (TOTAL score)
ΚΑΛΗΣ	17/18 (94,4%)	1,72	2,22	3,91
ΜΕΤΡΙΑΣ	19/20 (95,0%)	2,05	2,3	4,42
ΧΑΜΗΛΗΣ	18/18 (100%)	2,16	2,50	4,97
ΣΥΝΟΛΟ	55/57 (96%)	2	2,35	4,47

Πίνακας 2. Συνοπτικά αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης p-STAT3(ser).



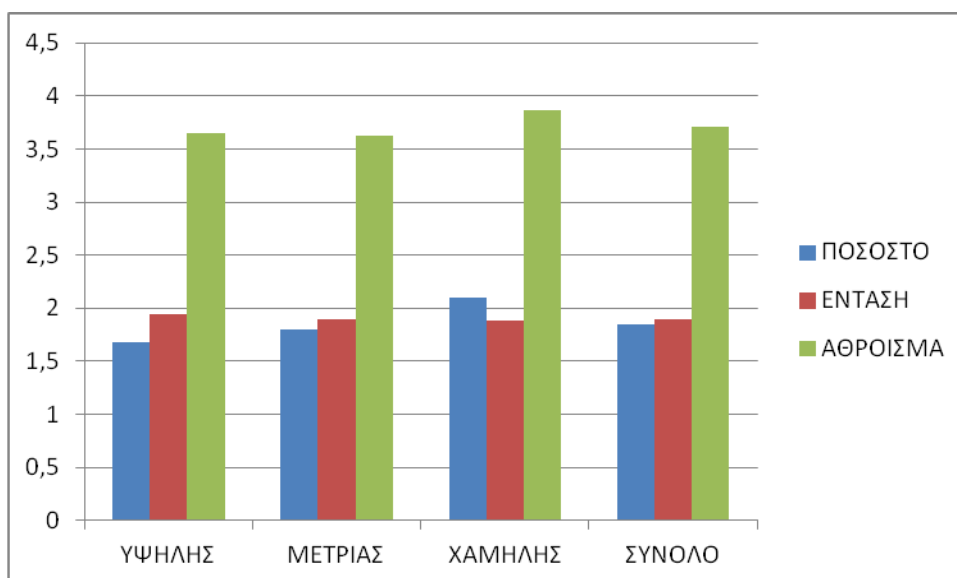
Σχήμα 9. Γραφική αναπαράσταση μέσω όρων ποσοστού, έντασης και συνολικού (combined) σκορ ανοσοϊστοχημικής έκφρασης p-STAT3(ser).

Phospho-P38

Η ανοσοϊστοχημική χρώση ήταν θετική για το 84,2% (16/19) των περιπτώσεων καλής διαφοροποίησης, καθώς και για το 80% (16/20) και 85% (17/20) των περιπτώσεων μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης αντίστοιχα. Οι μέσοι όροι των τριών μεταβλητών δεν παρουσίασαν σημαντικές αποκλίσεις σε σχέση με το βαθμό διαφοροποίησης των περιπτώσεων (πίνακας 3/ σχήμα 10) και η στατιστική ανάλυση δεν κατέδειξε σημαντικές διαφορές.

p-p38	% ΘΕΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΩΝ	ΠΟΣΟΣΤΟ (Percentage score)	ΕΝΤΑΣΗ (Intensity score)	ΑΘΡΟΙΣΜΑ (total score)
ΚΑΛΗΣ	16/19 (84,2%)	1,68	1,94	3,65
ΜΕΤΡΙΑΣ	16/20 (80%)	1,80	1,90	3,63
ΧΑΜΗΛΗΣ	17/18 (94,4)	2,10	1,88	3,86
ΣΥΝΟΛΟ	49/57 (85,9%)	1,85	1,89	3,71

Πίνακας 3. Συνοπτικά αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης p-p38).



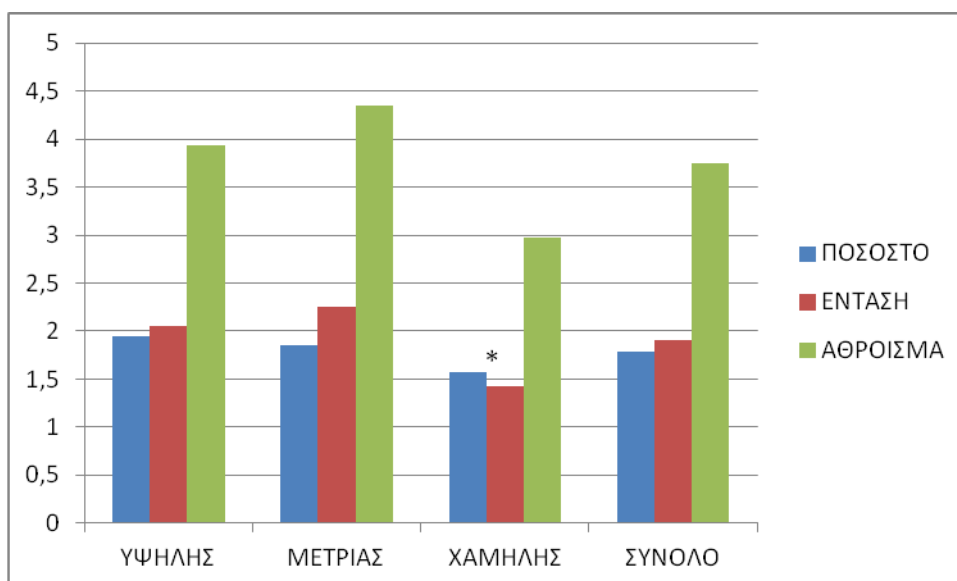
Σχήμα 10. Γραφική αναπαράσταση μέσω όρων ποσοστού, έντασης και συνολικού (combined) σκορ ανοσοϊστοχημικής έκφρασης p-38.

Phospho c-jun

Η ανοσοϊστοχημική χρώση ήταν θετική για το 88,8% (16/18) των περιπτώσεων καλής διαφοροποίησης, καθώς και για το 90% (18/20) και 78,9% (15/19) των περιπτώσεων μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης αντίστοιχα. Οι μέσοι όροι των τριών μεταβλητών δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές αποκλίσεις σε σχέση με το βαθμό διαφοροποίησης των νεοπλασμάτων (πίνακας 4/ σχήμα 11). Παρόλα αυτά, συγκρίσεις μεταξύ των επιμέρους κατηγοριών των νεοπλασμάτων αποκάλυψαν μειωμένες τιμές για το ποσοστό, την ένταση και το συνολικό σκορ για την πρωτεΐνη p-cJun στα νεοπλάσματα χαμηλής διαφοροποίησης. Μάλιστα η τιμή της έντασης της χρώσης ήταν χαμηλότερη σε στατιστικά σημαντικό βαθμό σε σύγκριση με τα νεοπλάσματα μέτριας διαφοροποίησης.

p-cJun	% ΘΕΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΩΝ	ΠΟΣΟΣΤΟ (Percentage score)	ΕΝΤΑΣΗ (Intensity score)	ΑΘΡΟΙΣΜΑ (total score)
ΚΑΛΗΣ	16/18 (88,8%)	1,94	2,05	3,94
ΜΕΤΡΙΑΣ	18/20 (90%)	1,85	2,25	4,35
ΧΑΜΗΛΗΣ	15/19 (78,9%)	1,57	1,42	2,97
ΣΥΝΟΛΟ	49/57 (85,9%)	1,78	1,90	3,75

Πίνακας 4. Συνοπτικά αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης p-cJun.



Σχήμα 11. Γραφική αναπαράσταση μέσω όρων ποσοστού, έντασης και συνολικού (combined) σκορ ανοσοϊστοχημικής έκφρασης p-*Jun*.

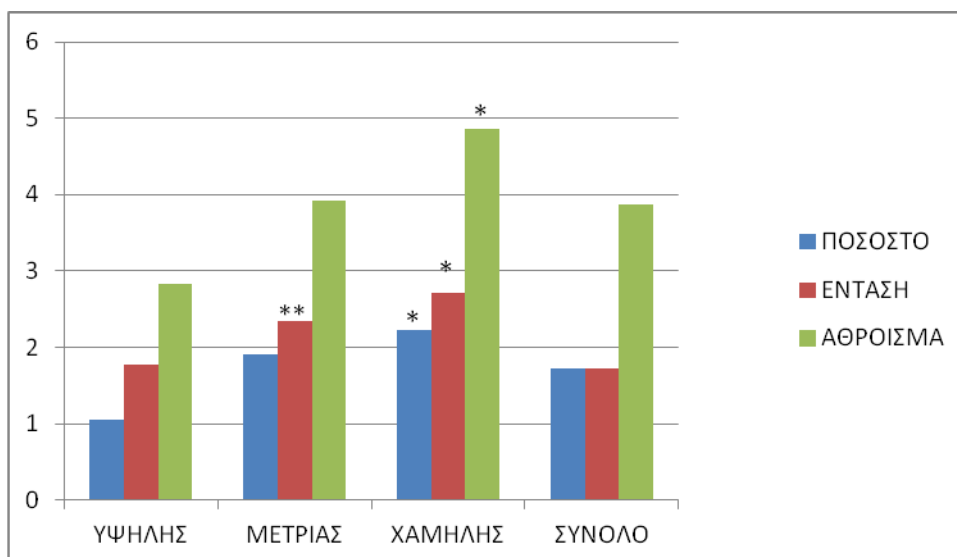
*: $p < 0,05$ σε σύγκριση με μέτριας διαφοροποίησης

Phospho-ERK1/2

Η ανοσοϊστοχημική χρώση ήταν θετική για το 77,7% (14/18) των περιπτώσεων ΑΚΣ υψηλής διαφοροποίησης, καθώς και για το 100% (20/20) και 94,4% (17/18) των περιπτώσεων μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης αντίστοιχα. Τα χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης νεοπλάσματα παρουσίασαν τους υψηλότερους μέσους όρους και στις τρεις υπό μελέτη μεταβλητές, σε αντίθεση με τις περιπτώσεις καλής διαφοροποίησης, τα οποία εμφάνισαν τις αντίστοιχες χαμηλότερες τιμές (πίνακας 5/σχήμα 12).

p-Erk 1/2	% ΘΕΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΩΝ	ΠΟΣΟΣΤΟ (Percentage score)	ΕΝΤΑΣΗ (Intensity score)	ΑΘΡΟΙΣΜΑ (total score)
ΚΑΛΗΣ	14/18 (77,7%)	1,05	1,77	2,83
ΜΕΤΡΙΑΣ	20/20 (100%)	1,90	2,35	3,93
ΧΑΜΗΛΗΣ	17/18 (94,4%)	2,22	2,72	4,86
ΣΥΝΟΛΟ	51/56 (91%)	1,73	1,73	3,87

Πίνακας 5. Συνοπτικά αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης p-STAT3(tyr).



Σχήμα 12. Γραφική αναπαράσταση μέσω όρων ποσοστού, έντασης και συνολικού (combined) σκορ ανοσοϊστοχημικής έκφρασης p-ERK1/2

*: $p < 0,05$ σε σύγκριση με καλής διαφοροποίησης

Συνολικό σκορ ποσοστού και έντασης χρώσης (combined score)

Μεταξύ των 18 περιπτώσεων ΑΚΣ χαμηλής διαφοροποίησης, τα 14 (82,2%) έλαβαν υψηλό συνολικό σκορ (5 ή 6). Αντίθετα μόνο 4/18 (22,2%) καλής διαφοροποίησης νεοπλάσματα εμφάνισαν ισχυρή έκφραση (συνολικό σκορ 5 ή 6) για την πρωτεΐνη p-ERK1/2, με την πλειοψηφία των νεοπλασμάτων αυτών να εμφανίζουν χαμηλό συνολικό σκορ (0 ή 2).

Η στατιστική ανάλυση κατέδειξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης p-ERK1/2 και του βαθμού διαφοροποίησης των όγκων. Συγκεκριμένα, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της p-ERK1/2 σχετίζονταν με νεοπλάσματα χαμηλής διαφοροποίησης. Στατιστικές συγκρίσεις μεταξύ των επιμέρους κατηγοριών των νεοπλασμάτων αποκάλυψαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των νεοπλασμάτων καλής και χαμηλής διαφοροποίησης, όσον αφορά στο συνολικό σκορ της πρωτεΐνης p-ERK1/2.

Ένταση χρώσης

Μεταξύ των 18 περιπτώσεων ΑΚΣ χαμηλής διαφοροποίησης τα 15 (83,3%) εμφάνισαν ισχυρή ένταση (σκορ 3) χρώσης. Αντίθετα μόνο 8/18 (44,4%) καλής διαφοροποίησης νεοπλάσματα εμφάνισαν ισχυρή ένταση για την πρωτεΐνη p-ERK1/2, ενώ 4/18 (22,2%) εμφάνισαν ασθενή ένταση (σκορ 1) χρώσης.

Στατιστικά σημαντική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της έντασης της χρώσης της πρωτεΐνης p-ERK1/2 και του βαθμού διαφοροποίησης των όγκων, προς την κατεύθυνση υψηλότερων επιπέδων έντασης χρώσης της p-ERK1/2 σε νεοπλάσματα υψηλής κακοήθειας. Επιμέρους στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) διαπιστώθηκε μεταξύ των νεοπλασμάτων καλής και χαμηλής διαφοροποίησης, όσον αφορά στην ένταση της χρώσης της πρωτεΐνης p-ERK1/2.

Ποσοστό θετικών κυττάρων

Όσον αφορά στο ποσοστό των θετικών στη χρώση κυττάρων, μεταξύ των 18 περιπτώσεων ΑΚΣ χαμηλής διαφοροποίησης τα 8 (44,4%) παρουσίασαν υψηλό ποσοστό (σκορ 3) χρώσης. Αντίθετα, μόνο 1/18 (5,5%) καλής διαφοροποίησης νεοπλάσματα εμφάνισαν υψηλό ποσοστό θετικών καρκινικών κυττάρων στην p-ERK1/2. Η στατιστική ανάλυση κατέδειξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού των θετικών καρκινικών κυττάρων στην p-ERK1/2 και του βαθμού διαφοροποίησης των όγκων. Συγκεκριμένα, τα υψηλά ποσοστά θετικών καρκινικών κυττάρων στην p-ERK1/2 σχετίζονταν με νεοπλάσματα χαμηλής διαφοροποίησης. Στατιστικές συγκρίσεις μεταξύ των επιμέρους κατηγοριών των νεοπλασμάτων αποκάλυψαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των νεοπλασμάτων καλής και χαμηλής διαφοροποίησης, όσον αφορά στο ποσοστό των θετικών κυττάρων στην πρωτεΐνη p-ERK1/2.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ρόλος των πρωτεϊνών STAT3 και MAPK στον καρκίνο κεφαλής-τραχήλου.

Μολονότι ο ρόλος της STAT3 είναι πολύ σημαντικός για τον καρκίνο, ο μηχανισμός της ανώμαλης λειτουργίας της στον καρκίνο κεφαλής-τραχήλου δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός (396). Η ιδιοσυστασιακή ενεργοποίηση της STAT3 συνοδεύεται από αυξήσεις στη STAT3 φωσφορυλίωση στην τυροσίνη και ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση (273, 397) ενώ ο ρόλος της φωσφορυλίωσης της STAT3 στη σερίνη παραμένει αμφιλεγόμενος. Οι STAT πρωτεΐνες αποτελούν κατώτερους σηματοδοτικούς στόχους για τις MAPK (ERK1/2, JNK και p38), ενώ οι τελευταίες έχουν εμπλακεί στη ρύθμιση των πρωτεϊνών STAT μέσω διασταυρούμενης σηματοδότησης (334).

Λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία της STAT3 και MAPK σηματοδότησης σε διάφορους τύπους καρκίνου, η παρούσα μελέτη εξέτασε την πιθανότητα αλληλεπίδρασης και επικοινωνίας μεταξύ αυτών των σημαντικών βιολογικών μορίων στον καρκίνο του στόματος. Η βασική ιδέα ήταν να διερευνηθεί κατά πόσο οι αλλαγές στην έκφραση και στην κατάσταση ενεργοποίησης των ERK1/2, JNK1 / 2 και p38 MAPK επηρεάζουν τη φωσφορυλίωση της STAT3 στις τυροσίνη ή / και σερίνη αλλά και στα συνολικά επίπεδα της STAT3, σε κυτταρικές σειρές ΑΚΣ. Επίσης, μελετήθηκε η έκφραση και ενεργοποίηση των προαναφερόμενων μορίων σε ιστούς ΑΚΣ.

ERK1/2

Η ERK αποτελεί μέλος ενός ογκογόνου μονοπατιού που ενεργοποιείται από ανώτερα σηματοδοτικά μόρια, όπως τις ογκοπρωτεΐνες Ras και Raf (398, 399). Μετά την ενεργοποίησή τους, οι Erk1 / 2 φωσφορυλιώνουν υποκείμενους κυτταροπλασματικούς στόχους ή πυρηνικά υποστρώματα (399, 400). Η σημασία της οδού των MEK / ERK στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων έχει καταδειχθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως του ήπατος, του προστάτη και του κακοήθους μελανώματος σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες (401-403). Για παράδειγμα, η αποσιώπηση με siRNA της κινάσης της σερίνης / θρεονίνης Mirk/Dyrk1B, σε καρκίνο των ωθηκών ή σε μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) οδήγησε σε αυξημένη ενεργοποίηση της οδού c-Raf-MEK-ERK, με συνακόλουθο

υψηλό ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων (404). Επίσης η επαγωγή των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως οι Bcl2 και Bclx1 και η αναστολή προαποπτωτικών παραγόντων, όπως ο BAD, έχει συσχετισθεί με το ογκογόνο δυναμικό της ERK (405).

Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής μελέτης στην παρούσα εργασία κατέδειξαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση και των τριών παραμέτρων της έκφρασης της p-ERK1/2 (ποσοστό θετικής χρώσης, ένταση χρώσης, άθροισμα ποσοστού και έντασης χρώσης) με το βαθμό διαφοροποίησης των όγκων. Δεδομένου ότι τα χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης νεοπλάσματα παρουσίασαν τους υψηλότερους μέσους όρους και στις τρεις υπό μελέτη μεταβλητές, η έκφραση της p-ERK1/2 μπορεί να θεωρηθεί ότι συμβάλλει στο ογκογόνο δυναμικό των ΑΚΣ.

Η παραπάνω υπόθεση ενισχύεται και από τα αποτελέσματα της επαγωγής αλλά και της αναστολής των ERK1/2 σε κυτταρικές σειρές ΑΚΣ, που πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο βιολογικός ρόλος του μορίου. Συγκεκριμένα αξιολογήθηκαν οι ενδεχόμενες επιπτώσεις της μεταβολής της λειτουργίας της ERK στην ανάπτυξη και στη βιωσιμότητα των κυττάρων ΑΚΣ. Ειδικότερα, τόσο η χημική αναστολή (U0126) όσο και η επιλεκτική αναστολή (siRNA) των ERK1 / 2 προκάλεσε μια δόσο-εξαρτώμενη μείωση του απόλυτου αριθμού των κυττάρων καθώς και μείωση των επιπέδων έκφρασης της κυκλίνης D1 στις μελετώμενες κυτταρικές σειρές ΑΚΣ. Από την άλλη πλευρά η φαρμακολογική επαγωγή των ERK1 / 2 προκάλεσε αντίστροφα με τα προαναφερθέντα αποτελέσματα προτείνοντας ένα μιτογόνο ρόλο για τις ERK1/2. Είναι ενδιαφέρον ότι η αύξηση του απόλυτου αριθμού των κυττάρων συνοδευόταν από σχετική αύξηση στα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1.

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας βρίσκονται αρκετές μελέτες που έχουν καταδείξει το ογκογόνο δυναμικό των ERK1/2 στο ΑΚΣ. Για παράδειγμα οι Mishima et al. πραγματοποίησαν ανοσοϊστοχημική μελέτη σε 39 περιπτώσεις OSCC και ανέφεραν ότι η υπερέκφραση των ERK1/2 στο ΑΚΣ συσχετίζεται με το βαθμό διαφοροποίησης των βλαβών, παρατηρώντας υψηλότερη έκφραση στα χαμηλής διαφοροποίησης περιστατικά (406). Παρόμοια αποτελέσματα κατέγραψαν και οι Wang et al. σε 30 περιστατικά ΑΚΣ γλώσσας, προσθέτοντας ότι η

αυξημένη έκφραση των ERK1/2 συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα και της cyclin D1 (407). Σε μια άλλη ανοσοϊστοχημική έρευνα 101 HNSCC περιστατικών, οι Albanell et al. (291) περιέγραψαν ότι τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των ERK1/2 καταγράφηκαν στις περιπτώσεις ΑΚΣ με απομακρυσμένες λεμφαδενικές μεταστάσεις και σχετίζονταν θετικά με την έκφραση του Ki-67, ενώ οι Psyrri et al. (408) σε μια μελέτη μικροσυστοιχιών HNSCC διαπίστωσαν ότι η ενεργοποίηση της οδού των RAS/MAPK/ERK σχετιζόταν με αντίσταση στη χημειοθεραπεία με cetuximab. Επιπρόσθετα, έρευνες σε κυτταρικές σειρές ενισχύουν τα προαναφερθέντα ευρήματα και υποστηρίζουν τον ογκογόνο ρόλο της ERK στον καρκίνο του στόματος. Προηγούμενες μελέτες έχουν καταδείξει την αρνητική ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της έκφρασης της κυκλίνης D1 μετά την αναστολή των Erk1 / 2 μέσω της εφαρμογής του αναστολέα U0126 σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, σε ηπατικό καρκίνωμα, σε ινοβλάστες και σε λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων (401, 404, 409, 410).

Επίσης, χρησιμοποιώντας παρόμοιες με την παρούσα έρευνα τεχνικές siRNA, οι Bessard et al. (401) υπογράμμισαν τον κρίσιμο ρόλο του μονοπατιού MEK / ERK στην ανάπτυξη ηπατικών καρκινικών κυττάρων in vitro και in vivo, αποδεικνύοντας ότι η μέσω RNAi εξουδετέρωση της ERK2 αναστέλλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Ομοίως, οι Si et al. (411) απέδειξαν ότι η μείωση της έκφρασης των ERK1 / 2 μετά την εφαρμογή siRNA ανέστειλε την ανάπτυξη και την επέκταση καρκινικών κυττάρων οστεοσαρκώματος και παράλληλα διαπίστωσαν ότι η εξουδετέρωση των ERK1 / 2 έκανε τα καρκινικά κύτταρα πιο ευαίσθητα στην θεραπεία με σισπλατίνη. Επιπλέον, οι Dumesic et al. (412) ανέφεραν ότι η συνδυαστική siRNA εξουδετέρωση των Erk1 / 2 προκάλεσε επιδερμική υποπλασία και μείωση της αναπαραγωγής των κυττάρων χωρίς να διαταράζει τους μηχανισμούς διαφοροποίησης των κυττάρων της ανθρώπινης επιδερμίδας, υποδηλώνοντας τον ενεργό ρόλο των μορίων στον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων. Τέλος, οι Dunvuri et al. (413) διαπίστωσαν ότι η γονιδιακή απενεργοποίηση των Erk1 / 2 με siRNA ανέστειλε την πολλαπλασιαστική δράση των πρωτεϊνών TMEM16A, που επάγεται μέσω των Erk1 / 2, σε HNSCC. Σε συμφωνία με την παρούσα εργασία, μελέτες επαγωγής των ERK1/2 πρότειναν ότι η ενεργοποίηση της οδού των c-Raf-MEK-Erk1 / 2 οδηγεί σε επακόλουθη αύξηση των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου (κυκλίνη D1, p27kip1), γεγονός που

συνοδεύεται από αύξηση στο ρυθμό ανάπτυξης και μετάβασης των κυττάρων από τη G0/G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, σε κύτταρα καρκίνου των ωοθηκών και μη-μικροκυτταρικού καρκινώματος του πνεύμονα (404). Ομοίως, οι Wang et al. κατέδειξαν ότι η υπερ-έκφραση των ενεργοποιημένων ERK1 / 2 και της κυκλίνης D1 σχετίζονται με τον καρκίνο της γλώσσας και ότι η ενεργοποίηση των ERK1/2 προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της γλώσσας (407). Τέλος, οι Judd et al. (414) αναφέρουν ότι η ενεργοποίηση της MEK1 επάγει την έκφραση του CD44 (διαμεμβρανικός υποδοχέας- πρωτεογλυκάνη) και αυξάνει την επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων σε HNSCC, ενώ οι Katada et al. (415) και Zuo et al. (416) πρότειναν ότι η ERK1 / 2 ενεργοποίηση συσχετίζεται με αυξημένη μετανάστευση και διήθηση των κυττάρων σε HNSCC.

Συνοπτικά, η αυξημένη έκφραση των ERK1/2 σχετίζεται θετικά με τα νεοπλάσματα χαμηλής διαφοροποίησης και αναδεικνύει τον ογκογόνο ρόλο του μορίου μέσω της επαγωγής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, που συνοδεύεται από αντίστοιχη αύξηση της έκφρασης της cyclin D1.

JNK

Ο ρόλος της JNK στην ανάπτυξη του καρκίνου είναι ακόμη υπό έρευνα. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης της JNK ως απάντηση σε διάφορα εξωκυττάρια ερεθίσματα, έχει αναφερθεί σε αρκετές μελέτες ως ένα κρίσιμο γεγονός που οδηγεί σε αποπτωτικό ή μη αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (417-420). Άλλοι ερευνητές όμως προτείνουν ότι η JNK συμμετέχει στην εξαλλαγή και στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (421). Πιο πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι JNK1/2 μπορεί να προκαλούν αύξηση ή και καταστολή στο σχηματισμό ή στο μέγεθος ενός όγκου σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου, τονίζοντας τη σημασία της κατανόησης του διπλού ρόλου των JNK1/2 και της μοριακής δράσης τους σε διαφορετικούς καρκινικούς τύπους (422). Για παράδειγμα, οι Seki et al. (423) τόνισαν το σημαντικό ρόλο της JNK σηματοδότησης στην έναρξη και την εξέλιξη του καρκίνου του ήπατος και οι Leventaki et al. (424) ανέφεραν ότι η ενεργοποίηση της JNK επάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων στο Hodgkin λέμφωμα. Από την άλλη πλευρά, οι Jia et al. (425) παρατήρησαν ότι η

ενεργοποίηση της JNK συμβάλλει στη φαρμακοεπαγόμενη (μέσω dihydroartemisinin) αυτοφαγία, σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα και οι Shi et al. (426) απέδειξαν ότι η JNK ενισχύει τον ογκοκατασταλτικό ρόλο του p53 και προάγει την απόπτωση σε αρκετές σειρές καρκινικών κυττάρων συμπεριλαμβανομένων του παχέος εντέρου, του μαστού και του οστεοσαρκώματος. Στην παρούσα μελέτη, η ανοσοϊστοχημική χρώση για την p-cjun ήταν θετική για το 86% των περιστατικών ΑΚΣ με σημαντικές όμως διακυμάνσεις μεταξύ των κατηγοριών της έκφρασης. Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων διαπίστωσε σημαντική διαφορά μόνο στην ένταση της χρώσης της p-cjun μεταξύ των περιπτώσεων ΑΚΣ μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης. Συγκεκριμένα στα περιστατικά χαμηλής διαφοροποίησης η ένταση της χρώσης p-cjun ήταν ασθενέστερη σε σχέση με τα μέτριας διαφοροποίησης.

Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα τόσο της φαρμακευτικής, όσο και της ειδικής με siRNA αναστολής της JNK στην παρούσα εργασία, φαίνεται να υποστηρίζουν τον ογκο-κατασταλτικό ρόλο της JNK στον καρκίνο του στόματος, καθώς διαπιστώθηκε ότι η αναστολή των JNK1 / 2 αυξάνει κατά ένα δοσο-εξαρτώμενο τρόπο τον απόλυτο αριθμό των ζωντανών κυττάρων και την κυτταρική βιωσιμότητα παράλληλα με αντίστοιχη αύξηση των επιπέδων της cyclinD1. Κατά αντίστροφο τρόπο, η φαρμακολογική επαγωγή της JNK οδήγησε σε πτώση του απόλυτου αριθμού των κυττάρων που συνοδεύτηκε από σχετική μείωση στην έκφραση της κυκλίνης D1.

Σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα, οι Gross et al. (427) ανέφεραν την αυξημένη έκφραση της JNK σε ιστούς HNSCC σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς ενώ οι Boivin et al. (428) έδειξαν ότι η JNK διαμεσολαβεί την επαγόμενη από την ακτινοθεραπεία απόπτωση σε κυτταρικές σειρές HNSCC. Αρκετές μελέτες επισημαίνουν τον ογκοκατασταλτικό ρόλο των ενεργοποιημένων JNK μέσω μηχανισμών απόπτωσης και αναστολής της δράσης των καρκινικών κυττάρων HNSCC. Για παράδειγμα, οι Chen et al. (429) ανέφεραν ότι η αποπτωτική δράση της σισπλατίνης και της cordycepin λειτουργεί συνεργιστικά με την ενεργοποίηση του μονοπατιού της JNK / κασπάσης -7/PARP σε κυτταρικές σειρές OSCC, ενώ οι Yunoki et al. (430) παρατήρησαν ότι η σίγαση της BAG3 (συνοδός της πρωτεΐνης Hsp70) οδήγησε σε ενεργοποίηση των μονοπατιών της JNK / κασπάσης -3, ενισχύοντας την ευαισθησία των κυττάρων OSCC στη θεραπεία υπερθερμίας.

Επίσης, προηγούμενες μελέτες εξέτασαν την επίδραση διαφόρων φαρμακολογικών παραγόντων ή αντικαρκινικών φαρμάκων, όπως η N-(4-υδροξυφαινυλ) ρετιναμίδη (4HPR), η πεψίνη με βόεια λακτοφερρίνη, το 5-αμινολεβουλινικό οξύ, η MLN4924, 6-(N,N-Διμεθυλαμινο)-2-(ναφθαλινο-1-υλ)-4-κινολινόνη (DPQZ), η fomitostide-K, η μεβαστατίνη, ο AZD8055 (αναστολέας mTOR), στους βιολογικούς μηχανισμούς της απόπτωσης σε κυτταρικές σειρές HNSCC (410, 431-437). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, οι παραπάνω ερευνητές πρότειναν έναν ογκοκατασταλτικό ρόλο για τη JNK, υποδεικνύοντας ότι η θεραπεία κυττάρων HNSCC με τον αναστολέα της JNK (SP600125), περιόρισε την επαγόμενη από τους φαρμακευτικούς παράγοντες απόπτωση (410, 431-437). Επιπρόσθετα, οι Li et al. 2012 παρατήρησαν ότι η φαρμακολογική αναστολή της JNK με τον SP600125, ανέστειλε σημαντικά την επαγόμενη από τη βορτεζομίμη (bortezomib) αυτοφαγική δραστηριότητα καθώς και το σχηματισμό φαγοσωματίων σε HNSCC (438). Χρησιμοποιώντας παρόμοιες με την παρούσα μελέτη τεχνικές siRNA, οι Kim et al. έδειξαν ότι η καταστολή των JNK1/2 με siRNA μείωνε την επαγόμενη από το φαρμακευτικό παράγοντα 4HPR απόπτωση, ενώ η υπερέκφραση του άγριου τύπου JNK1 είχε το αντίθετο αποτέλεσμα (432). Επίσης, οι Li et al. περιέγραψαν ότι η αναστολή της JNK με τεχνική παρεμβαλλόμενου RNA (RNAi) περιόριζε τον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από το φάρμακο AZD8055 σε HNSCC (437).

Όσον αφορά στην επαγωγή της JNK, οι Schramek et al. (439) διαπίστωσαν ότι η MKK7 (ενεργοποιητής της JNK) λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό μόριο στον καρκίνο του πνεύμονα και του μαστού σε πειραματόζωα, ενώ οι Tang et al. (440) ανέφεραν ότι το φάρμακο alpinetin μειώνει τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων κυττάρων ηπατώματος μέσω της ενεργοποίησης της MKK7. Επίσης, οι Dai et al. κατέδειξαν την ύπαρξη μηχανισμού απόπτωσης εξαρτώμενου από τις MKK7/JNK1 σε ανθρώπινα κύτταρα οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας (441). Τέλος, οι Noutomi et al. (442) τόνισαν ότι η ενεργοποίηση της JNK εμπλέκεται στο μοριακό μηχανισμό του επαγόμενου μέσω του TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) κυτταρικού θανάτου σε HNSCC και οι Guo et al. (443) διαπίστωσαν ότι η θεραπεία καρκινικών κυττάρων του μαστού με oncrasin-72 προκαλεί την ενεργοποίηση της JNK και καταστέλλει την έκφραση της κυκλίνης D1.

Συνοπτικά, οι JNK1/2 εμφανίζουν ογκοκατασταλτική δράση στην παρούσα μελέτη, προκαλώντας μείωση τόσο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού όσο και της έκφρασης της κυκλίνης D1.

p38

Πολλές μελέτες στη βιβλιογραφία υποδεικνύουν την εμπλοκή της p38 κινάσης σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως του προστάτη (444, 445, 446), του μαστού (447) και του καρκίνου της ουροδόχου κύστης (448, 449). Ο ρόλος της p38 φαίνεται να εξαρτάται από το είδος του καρκίνου και τον τύπο των κυττάρων που μελετώνται. Πράγματι, η ενεργοποίηση της p38 έχει συσχετισθεί με την αποδιαφοροποίηση και εξαλλαγή των κυττάρων σε περιπτώσεις γαστρικού αδενοκαρκινώματος και καρκίνου του παγκρέατος και με την ενίσχυση της ικανότητας των καρκινικών κυττάρων να εισβάλλουν και να μεταναστεύουν στους περιβάλλοντες ιστούς (450, 451). Αντίθετα, άλλες μελέτες υποστηρίζουν τον ογκοκατασταλτικό ρόλο της p38 και αναφέρουν ότι η ενεργοποίηση της p38 θεωρείται υπεύθυνη για τη φαρμακολογικώς-επαγόμενη απόπτωση (embelin αναστολέας) σε καρκίνο του πνεύμονα (452), για την ενεργοποίηση του p53 και της p53-επαγόμενης απόπτωσης και για τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου (453-456). Επιπρόσθετα, η αναστολή της p38 MAPK έχει συσχετισθεί με την αντίσταση στην ανοίκιση (apoptosis-απόπτωση οφειλόμενη σε απώλεια κυτταρικής πρόσφυσης) (457).

Στην παρούσα εργασία διαπιστώθηκε η έκφραση της p38 στον καρκίνο του στόματος. Η θετική ανοσοϊστοχημική χρώση για την ενεργοποιημένη-φωσφορυλιωμένη μορφή του μορίου (p-p38) παρατηρήθηκε στο 87,7% των περιστατικών ΑΚΣ. Παρόλα αυτά δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων της συνολικής έκφρασης, της έντασης και του ποσοστού των θετικών καρκινικών κυττάρων στην p-p38 με το βαθμό διαφοροποίησης των όγκων.

Επίσης, η αναστολή της δραστηριότητας της p38 οδήγησε σε μία ελαφρά, μη στατιστικά σημαντική μείωση στη βιωσιμότητα και στον απόλυτο αριθμό των ζωντανών κυττάρων σε αμφοτέρες τις κυτταρικές σειρές. Από τα παραπάνω εικάζεται ότι η p38 δε διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού

πολλαπλασιασμού στο ΑΚΣ. Αντίστοιχα, οι Leelahavanichkul et al. (458) αναφέρουν την αυξημένη παρουσία p-p38, που κυμάνθηκε στο 79%, σε μεγάλο αριθμό HNSCC που μελέτησαν, ενώ προηγούμενες μελέτες δείχνουν ότι η φαρμακολογική αναστολή της p38 δεν επηρέασε τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες της αυτοφαγίας και του σχηματισμού των φαγοσωματίων σε HNSCC (438). Επίσης παρόμοια αναστολή δεν επηρέασε τον επαγόμενο από τη φαρμακευτική ουσία DPQZ (6 - N, N-διμεθυλαμινο-2 - ναφθαλινο-1-υλ -4-κινολινόνη) κυτταρικό θάνατο σε αδενοκυστικό καρκίνωμα σιαλογόνων αδένων (436) και την επαγόμενη από τη μεβαστατίνη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και απόπτωσης σε HNSCC (459). Τέλος, σε μια ερευνητική μελέτη για τις MAPK, οι Shen et al. (460) αναφέρουν ότι οι ERK και JNK, αλλά όχι η p38, είναι υπεύθυνες για τη μείωση της κυκλίνης D1 σε ανθρώπινους εμβρυϊκούς ινοβλάστες πνεύμονα.

Συνοπτικά, στην παρούσα μελέτη η δράση της p38 δε φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ΑΚΣ.

Ο ρόλος της STAT3 στον καρκίνο κεφαλής-τραχήλου. Η σημασία της φωσφορυλίωσης στη σερίνη και τυροσίνη.

Σημαντικός αριθμός ερευνών αναφέρει ότι η ιδιοσυστασιακή ενεργοποίηση της πρωτεΐνης STAT3 συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στη διαφοροποίηση και στην απόπτωση των κυττάρων σε ΑΚΣ (273, 397). Η ανώμαλη ενεργοποίηση της STAT3, η οποία και συσχετίζεται με αύξηση της φωσφορυλίωσης του μορίου στην τυροσίνη, θεωρείται ισχυρός προαγωγός για την έναρξη και εξέλιξη του ΑΚΣ. Γι αυτό το λόγο η αναστολή της ενεργοποίησης της STAT3 έχει προταθεί ως ένας πιθανός θεραπευτικός στόχος για τη θεραπεία του HNSCC (461, 462, 397).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων σε κυτταροκαλλιέργειες κατέδειξαν την ισχυρή έκφραση της φωσφορυλιωμένης STAT3 τόσο στη σερίνη όσο και στην τυροσίνη. Η αναστολή ή η επαγωγή των MAPK οδήγησε σε αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης της φωσφορυλιωμένης STAT3 στη σερίνη ή/και στην τυροσίνη, αλλά η κατεύθυνση των

μεταβολών και οι συσχετίσεις με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων θα περιγραφούν στο κεφάλαιο της αλληλεπίδρασης των MAPK με τη STAT3.

Επιπρόσθετα, στην παρούσα εργασία, η ανάλυση των ανοσοϊστοχημικών αποτελεσμάτων ανέδειξε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση της συνολικής έκφρασης, της έντασης της χρώσης και του ποσοστού των θετικών καρκινικών κυττάρων στην p-STAT3(tyr) με το βαθμό κακοήθειας (grade) των όγκων υποστηρίζοντας τον ογκογόνο ρόλο της p-STAT3(tyr) στον καρκίνο του στόματος. Παρόμοιες ανοσοϊστοχημικές μελέτες, έχουν συσχετίσει τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της p-STAT3(tyr) με το χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης (463, 464), την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (463, 465) και τη φτωχότερη πρόγνωση σε περιπτώσεις HNSCC (463-465). Επίσης, οι Masuda et al. διαπίστωσαν ότι η αυξημένη έκφραση της p-STAT3(tyr) συνοδεύεται από αντίστοιχα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1 (465). Το ογκογόνο δυναμικό της p-STAT3(tyr) περιγράφηκε και σε δύο άλλες ανοσοϊστοχημικές μελέτες HNSCC (466, 467), όπου αναφέρθηκε ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της p-STAT3(tyr) συσχετιζόνταν με μεγαλύτερη αντίσταση στη θεραπεία με cetuximab και cisplatin.

Αν και το ογκογόνο δυναμικό της πρωτεΐνης STAT3 φαίνεται ότι εξαρτάται κυρίως από την κατάσταση της φωσφορυλίωσης στην Tyr705, ο ρόλος της φωσφορυλίωσης στη σερίνη είναι αμφιλεγόμενος (468). Στην παρούσα έρευνα, η ανοσοϊστοχημική χρώση για την p-STAT3(ser) ήταν θετική για το 96.5% των περιστατικών με σημαντικές όμως διακυμάνσεις μεταξύ των κατηγοριών της έκφρασης. Παρόλα αυτά, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της STAT3 στη ser727 με το βαθμό διαφοροποίησης των όγκων. Η ισχυρή παρουσία της όμως σε όλα σχεδόν τα νεοπλάσματα υποδηλώνει τη σημασία της στη λειτουργία των καρκινικών κυττάρων.

Προηγούμενες έρευνες έχουν περιγράψει τις αρνητικές επιπτώσεις της φωσφορυλίωσης στη ser727 σε σχέση με τη δραστηριότητα της STAT3, προτείνοντας ότι η φωσφορυλίωση της σερίνης 727 ρυθμίζει αρνητικά τη STAT3 φωσφορυλίωση στην τυροσίνη, η οποία απαιτείται για το σχηματισμό διμερούς και την επακόλουθη πυρηνική μετατόπιση και έναρξη της μεταγραφικής δραστηριότητας (67). Η αρνητική σχέση μεταξύ της STAT3 φωσφορυλίωσης στη σερίνη και στην

τυροσίνη έχει επίσης προταθεί από τους Venkatasubbarao et al. (469) και Wakahara et al.(470), οι οποίοι ανέφεραν ότι η φωσφορυλίωση στη Ser727 καθορίζει τη διάρκεια της δραστηριότητας της STAT3 με ενίσχυση της αποφωσφορυλίωσης της Tyr705 σε μεγάλο βαθμό μέσω της TC45 φωσφατάσης, σε παγκρεατικά και ηπατικά καρκινικά κύτταρα αντίστοιχα.

Ωστόσο, άλλοι ερευνητές πρότειναν ένα διαφορετικό ρόλο για την p-STAT3(ser) και ανέφεραν ότι η φωσφορυλίωση της STAT3 στη σερίνη συνδέεται με αύξηση της μετατόπισης του μορίου στον πυρήνα και χρησιμεύει για τη μεγιστοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας (471, 472). Οι Hazan-Halevy et al. πρότειναν ότι η ιδιοσυστασιακή φωσφορυλίωση της STAT3 στη σερίνη 727 είναι σημαντική διεργασία για την εξέλιξη της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (CLL) και μπορεί να αποτελέσει ένα ισχυρό θεραπευτικό στόχο (473).

Κατά συνέπεια η αξιοσημείωτη παρουσία της p-STAT3(ser) στη δεδομένη ανοσοϊστοχημική μελέτη μπορεί να μη συνοδεύεται από στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις, αλλά ενδεχομένως υποδηλώνει ένα ξεχωριστό ρόλο στην λειτουργία των καρκινικών κυττάρων HNSCC, που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Πάντως ο ρόλος της STAT3 στην καρκινογένεση φαίνεται ότι ποικίλει και η συμπεριφορά του μορίου παρουσιάζει διακυμάνσεις ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου και το είδος των κυττάρων που μελετώνται.

Αλληλεπίδραση της οδού STAT3 με τις MAPK.

Προηγούμενες μελέτες υποστηρίζουν τη σύνδεση μεταξύ της ενεργοποίησης συγκεκριμένων μελών της οικογένειας MAPK και αρνητικής ρύθμισης της STAT3 σηματοδότησης σε διάφορους τύπους κυττάρων (67, 310, 474). Αξιολογώντας τη σημασία της λειτουργίας των μορίων STAT3 και MAPK στο ΑΚΣ, εξετάστηκε η πιθανότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο σηματοδοτικών οδών, καθώς και τα επακόλουθα αποτελέσματά της.

α) Αλληλεπίδραση ERK1/2 με STAT3.

Στην παρούσα μελέτη, η χημική αναστολή (μέσω U0126) ή η επιλεκτική σίγαση (μέσω siRNA) των ERK1 / 2 MAPK μείωσε τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της STAT3 στη σερίνη προκαλώντας παράλληλη αύξηση της STAT3 φωσφορυλίωσης στην τυροσίνη (Y705). Αντίθετα, η επαγωγή της ERK σε κύτταρα AKΣ οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της STAT3 στη σερίνη και μείωση των επιπέδων φωσφορυλίωσης στην τυροσίνη. Εντούτοις αν και η φαρμακευτική επαγωγή της ERK1/2 μεταβάλλει μερικώς την ισορροπία της STAT3 φωσφορυλίωσης, οδηγώντας σε μείωση της p-STAT3(tyr) και αύξηση της p-STAT3(ser), εξακολουθεί να προκαλεί αύξηση του αριθμού των κυττάρων. Είναι συνεπώς πιθανό ότι η συνολική επίδραση (net effect) της αύξησης των επιπέδων της ERK, η οποία προφανώς επηρεάζει ποικιλία σηματοδοτικών μονοπατιών πέραν των STAT, εξακολουθεί να είναι ογκογόνος.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής μελέτης αξιοσημείωτο είναι το γεγονός της ταυτόχρονης εμφάνισης υψηλών επιπέδων της πρωτεΐνης p-STAT3(tyr) και p-ERK1/2 στα νεοπλάσματα χαμηλής διαφοροποίησης. Η υπερέκφραση της p-ERK1/2 δεν φαίνεται ικανή από μόνη της να περιορίζει την ενεργοποίηση της STAT3 μέσω της φωσφορυλίωσης στην τυροσίνη. Εντούτοις, θα πρέπει να συνεκτιμηθεί το γεγονός ότι η ανοσοϊστοχημική μελέτη αποτελεί στατική απεικόνιση της κυτταρικής έκφρασης, σε αντίθεση με τη φαρμακευτική παρέμβαση σε κυτταρικές καλλιέργειες όπου η πολυπλοκότητα της επικοινωνίας μεταξύ των χημικών μορίων και της αλληλεπίδρασης των σηματοδοτικών μονοπατιών, μπορεί να οδηγήσει σε ενδιαφέροντα αποτελέσματα που χρήζουν διεξοδικής και συνδυαστικής ερμηνείας.

Ομοίως με τα παραπάνω αποτελέσματα, προηγούμενες μελέτες έχουν προτείνει την ύπαρξη σηματοδοτικής επικοινωνίας μεταξύ της ERK και της STAT3, υποδεικνύοντας ότι η ERK επάγει τη φωσφορυλίωση στη Ser 727 (67, 310, 475) και ρυθμίζει αρνητικά τη σηματοδότηση της STAT3 από την IL-6 (476). Η ενεργοποίηση της ERK έχει συνδεθεί με αρνητική ρύθμιση της STAT3 που εκδηλώνεται με μείωση στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της τυροσίνης σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα (469), αλλά και με αύξηση της φωσφορυλίωσης στη σερίνη, η οποία εμφανίζεται να ρυθμίζει αρνητικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστης (474).

Κατά ένα αντίστροφο τρόπο, η χημική αναστολή της ERK μέσω του U0126 ανέστειλε τη φωσφορυλίωση της STAT3 στη Ser727 σε κύτταρα καρκίνου του μαστού (477) και περιορίσε τη φωσφορυλίωση της STAT3 στη σερίνη 727 που επάγεται από την ερυθροποιητίνη, χωρίς να επηρεάσει τη φωσφορυλίωση στην τυροσίνη σε ερυθροκύτταρα (478)

Παρόλα αυτά, έχουν καταγράψει και διαφορετικά δεδομένα, όπως των Sumimoto et al. (479), οι οποίοι ανέφεραν ότι η θεραπεία με U0126 ανέστειλε τη φωσφορυλίωση της ERK, αλλά δεν επηρέασε τη STAT3 φωσφορυλίωση στη Ser727 και Tyr705 σε ανθρώπινα κύτταρα μελανώματος και των Nelson et al. (480), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι ο συνδυασμός νιφουροξαζίδης και U0126 αναστέλλει τη STAT3 φωσφορυλίωση στην τυροσίνη σε κύτταρα πολλαπλού μυελώματος.

Το εύρος και η ποικιλία των αποτελεσμάτων οδηγεί στην υπόθεση ότι η σημασία, η βαρύτητα και το επίπεδο της επικοινωνίας μεταξύ των ERK1 / 2 και STAT3 διαφέρει ανάλογα με την προέλευση των καρκινικών κυττάρων και το είδος του καρκίνου που μελετώνται σε κάθε περίπτωση. Ειδικότερα, στην περίπτωση του ΑΚΣ, προκύπτει ότι η ERK επιδρά περισσότερο στη φωσφορυλίωση της STAT3 στη σερίνη και λιγότερο στην τυροσίνη.

β) Αλληλεπίδραση JNK με STAT3

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής μελέτης, η χρώση για την p-cjun ήταν θετική σχεδόν σε όλα τα περιστατικά ανεξάρτητα με το βαθμό διαφοροποίησης, με σημαντικές όμως διακυμάνσεις μεταξύ των κατηγοριών της έκφρασης. Συγκεκριμένα, μειωμένη ένταση της χρώσης p-cjun παρατηρήθηκε στα περιστατικά χαμηλής διαφοροποίησης, τα οποία εμφάνιζαν υψηλή ένταση χρώσης για την p-STAT3(tyr), υποδηλώνοντας την πιθανή ύπαρξη ενός μηχανισμού αλληλεπίδρασης με αρνητική συσχέτιση μεταξύ των δύο μορίων. Πιο σαφής ένδειξη για την παρουσία ενός τέτοιου μηχανισμού προσφέρεται από τα αποτελέσματα της

αναστολής, αλλά και της επαγωγής των JNK1/2. Η χημική αναστολή (μέσω SP600125) ή η ειδική σίγαση (μέσω siRNA) των JNK1 / 2 MAPK οδήγησαν σε μείωση στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της STAT3 στη σερίνη στα κύτταρα AKΣ, η οποία συνοδευόταν από μια μέτρια αύξηση της φωσφορυλιωμένης στην τυροσίνη STAT3. Αντίστροφα, η επαγωγή της JNK οδήγησε σε αύξηση της φωσφορυλίωσης στη σερίνη και μείωση της STAT3 φωσφορυλίωσης στην τυροσίνη.

Η ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ JNK και STAT, η οποία επηρεάζει τη δυναμική κατάσταση της STAT φωσφορυλίωσης, έχει καταγραφεί σε αρκετές μελέτες. Παρόμοια με τα παραπάνω αποτελέσματα περιγράφονται σε δύο μελέτες, οι οποίες ανέφεραν ότι η αναστολή της JNK μέσω του SP600125 ή η ειδική σίγαση της JNK μείωσαν τη φωσφορυλίωση της STAT3 στη serine727 σε ανθρώπινα βρογχιολικά επιθηλιακά κύτταρα (417, 481). Επίσης, οι Lim et al. (324), έχουν διαπιστώσει ότι η STAT3 ρυθμίζεται αρνητικά από τη JNK μέσω φωσφορυλίωσης στη σερίνη σε κύτταρα νεφρού πιθήκου(COS-1 cell line). Οι Shirakawa et al. υποδεικνύουν ότι η JNK φωσφορυλιώνει τη Ser-707 του STAT6 και οδηγεί στην απενεργοποίηση και την αναστολή της μεταγραφής των ανταποκρινόμενων στο STAT6 γονιδίων σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα HeLa και HEK293 (323). Επιπρόσθετα οι Guo et al. διαπίστωσαν ότι η αναστολή της JNK οδηγεί σε μειωμένη φωσφορυλίωση της STAT3 στη ser727 σε κύτταρα καρκίνου του μαστού και παρατήρησαν ότι η αντικαρκινική δραστηριότητα της oncrasin-72 συνοδεύτηκε από την ενεργοποίηση της JNK και την αναστολή της φωσφορυλίωσης των JAK2/STAT3 (443). Συνοπτικά, η JNK εμφανίζεται στο AKΣ να ρυθμίζει αρνητικά τη λειτουργία της STAT3, μειώνοντας τη φωσφορυλίωση του μορίου στην τυροσίνη και αυξάνοντας τη φωσφορυλίωση στη σερίνη.

γ) Αλληλεπίδραση p38 με STAT3.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας διαπιστώνουν την έκφραση της p38 στον καρκίνο του στόματος, χωρίς όμως να παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των τριών παραμέτρων της έκφρασης και του βαθμού

διαφοροποίησης των όγκων. Παρόλο που η έκφραση της χρώσης της p-STAT3(tyr) εμφανίζει σημαντικά αυξημένες τιμές στις περιπτώσεις υψηλού βαθμού κακοήθειας, η έκφραση της p-p38 δεν παρουσιάζει ανάλογα σχετιζόμενες μεταβολές. Επίσης, η χορήγηση του φαρμακολογικού αναστολέα της p38 (SB203580) στα κύτταρα OSCC, περιόρισε τη φωσφορυλίωση της p38 αλλά δεν οδήγησε σε σημαντική αλλαγή στα επίπεδα της STAT3 φωσφορυλίωσης στην tyr705 ή στη ser727. Επομένως δεν υποστηρίζεται η παρουσία πιθανού μηχανισμού αλληλεπίδρασης μεταξύ των p38 και STAT3.

Η πιθανότητα της αλληλεπίδρασης μεταξύ p38 και STAT3 έχει περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας οι Platanias et al. ανέφεραν ότι η p38 παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην τύπου IFN-I -εξαρτώμενη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας, χωρίς να επηρεάζει την ενεργοποίηση του μονοπατιού των STAT (482). Από την άλλη πλευρά, οι Riebe et al. (483) περιέγραψαν ότι η μείωση των επιπέδων έκφρασης της p38 MAPK μέσω ειδικού siRNA, περιορίζει σημαντικά τη STAT3 φωσφορυλίωση στην τυροσίνη 705 χωρίς να επιδρά στη φωσφορυλίωση της σερίνης 727 σε κυτταρικές σειρές HNSCC.

Επιπρόσθετα, έχει προταθεί ότι η p38 ενισχύει τη φωσφορυλίωση των STAT στη σερίνη ως απόκριση στην επίδραση κυτταροκινών και στρες (484), ενώ η ενεργοποίηση της p38 αναστέλλει την IL-6-JAK-STAT3 σηματοδότηση σε φλεγμονώδη κύτταρα (485). Αντίθετα, οι Zauberman et al. (486), αναφέρουν ότι η p38 εμπλέκεται στην επαγόμενη από την IL-6 μεταγραφική δραστηριότητα του STAT3 και οι Yaman et al. (487), διαπιστώνουν ότι το μονοπάτι του παράγοντα EGFR είναι σε στενή σχέση και επικοινωνία με τα μονοπάτια των STAT-3 και p38 MAPK, στον καρκίνο του μαστού.

Επομένως, η p38 δε φαίνεται να αλληλεπιδρά με τη σηματοδοτική οδό της STAT3 στο ΑΚΣ. Είναι πιθανόν ότι η ρύθμιση και η λειτουργία της p38 MAPK ποικίλει και εξαρτάται τόσο από το είδος του ερεθίσματος, όσο και από τον τύπο του κυττάρου (488, 489, 213).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας, τα δεδομένα της παρούσας εργασίας εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

- Οι ERK1 / 2 φαίνεται να διαθέτουν ογκογόνο δυναμικό στο ΑΚΣ ασκώντας θετική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.
- Η ογκογόνος ιδιοσυστασιακή σηματοδότηση της STAT3 φαίνεται να ρυθμίζεται αρνητικά από τις ERK1 / 2 σε κύτταρα ΑΚΣ. Η αλληλεπίδραση ERK1/2-STAT3 αφορά κυρίως στην επαγόμενη από την ERK φωσφορυλίωση της STAT3 στη Ser727, ενώ η φωσφορυλίωση στην Tyr 705 δεν παρουσιάζει σημαντικές μεταβολές.
- Το ογκοκατασταλτικό δυναμικό των JNK1 / 2 σε ΑΚΣ υποστηρίζεται από την ανασταλτική επίδραση που ασκούν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην κυτταρική βιωσιμότητα.
- Η ογκογόνος ιδιοσυστασιακή STAT3 σηματοδότηση φαίνεται ότι ρυθμίζεται αρνητικά από τη JNK στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές ΑΚΣ. Η αλληλεπίδραση JNK-STAT3 εκδηλώνεται μέσω της μείωσης της STAT3 φωσφορυλίωσης στην Tyr 705 και της αύξησης της φωσφορυλίωσης στη Ser727.
- Η p38 MAPK εμφανίζεται να μην επηρεάζει σημαντικά τη σηματοδότηση της STAT3 και τον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα των κυττάρων ΑΚΣ.
- Οι ERK1/2, p38 και p-cJun εκφράζονται έντονα στο ΑΚΣ γεγονός που υποδηλώνει τη σημασία τους σε αυτόν τον τύπο καρκίνου.
- Ο ρόλος των JNK, p38 και ERK1/2 στη λειτουργία της STAT3 ποικίλει ανάλογα με τον τύπο των μελετώμενων καρκινικών κυττάρων, υποδεικνύοντας την ανάγκη για τον ακριβή προσδιορισμό του ρόλου της ενεργοποίησης των MAPK σε σχέση με τη STAT3 σηματοδότηση σε κάθε τύπο κυττάρου ξεχωριστά.
- Η κατανόηση της πολυπλοκότητας του μονοπατιού των MAPK και της αλληλεπίδρασης μεταξύ άλλων σημαντικών μορίων όπως της πρωτεΐνης STAT3 θα αποτελέσουν χρήσιμους στόχους για την εφαρμογή νέων φαρμακολογικών θεραπειών στην πρόληψη του καρκίνου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ογκογενετικός ρόλος του σηματοδοτικού μορίου STAT3 στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του στόματος.

Γκούβερης Ιωάννης

Ο καρκίνος του στόματος είναι η έκτη πιο κοινή μορφή καρκίνου στον κόσμο και η επίπτωση των νέων περιπτώσεων δείχνει μια συνεχή αύξηση στις αναπτυσσόμενες χώρες. Πολλές γενετικές και επιγενετικές αλλοιώσεις διέπουν την προοδευτική απόκτηση ενός κακοήθους φαινοτύπου στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής-τραχήλου (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma-HNSCC). Η διαρκής διερεύνηση της ανώμαλης σηματοδότησης μορίων που συμπεριλαμβάνουν τα EGFR, Ras, NF-κB, Wnt/β-catenin, TGF-β και PI3K-AKT-mTOR μονοπάτια, έχει αυξήσει την κατανόηση των βασικών μηχανισμών ελέγχου την εξέλιξη του HNSCC. Τα πρωτεϊνικά μόρια STAT (signal transducers and activators of transcription - διαβιβαστές σημάτων και ενεργοποιητές της μεταγραφής) αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που βρίσκονται στο κύτταρο σε λανθάνουσα μορφή και γίνονται ενεργοί ανταποκρινόμενοι σε ερεθίσματα από κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες και πεπτίδια. Η φωσφορυλίωση των STAT μορίων στην τυροσίνη αποτελεί το πρώτο ουσιαστικό βήμα για την ενεργοποίησή τους και συσχετίζεται άμεσα με την ικανότητα των STAT να συνδέονται με το DNA και να επάγουν μεταγραφική δραστηριότητα. Σε αντίθεση, η φωσφορυλίωση του STAT στη σερίνη, η οποία επίσης προκύπτει ως απάντηση σε ενεργοποίηση από αυξητικούς παράγοντες ή κυτταροκίνες, έχει συσχετιστεί με αρνητική ρύθμιση της STAT δράσης. Η STAT σηματοδότηση έχει εμπλακεί και στην ογκογένεση. Ειδικότερα, η ιδιοσυστασιακή ενεργοποίηση του STAT3, η οποία συσχετίζεται κυρίως με ανώμαλη σηματοδότηση μέσω των TGF-α/EGFR, έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται με την εξέλιξη και επέκταση του καρκίνου κεφαλής-τραχήλου.

Οι ενεργοποιούμενες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες (Mitogen-activated protein kinases, MAPK) είναι εξειδικευμένες κινάσες σερίνης/ θρεονίνης, που ανταποκρίνονται σε εξωκυττάρια ερεθίσματα (μιτογόνα) και ρυθμίζουν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η έκφραση γονιδίων, η μίτωση, η διαφοροποίηση, η κυτταρική επιβίωση και η απόπτωση. Οι MAP κινάσες (MAPK) φωσφορυλιώνουν μόρια σερίνης και θρεονίνης σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες στόχους. Διαιρούνται σε τρεις υποομάδες, που περιλαμβάνουν τις ERKs (extracellular signal regulated kinases, τις p38 MAPKs, και τις JNKs (c-jun NH2-terminal κινάσες). Προηγούμενες μελέτες υποστηρίζουν τη σύνδεση μεταξύ της ενεργοποίησης συγκεκριμένων μελών της οικογενείας MAPK και αρνητικής ρύθμιση των STAT3, η οποία εκδηλώνεται με την αρνητική ρύθμιση της STAT3 φωσφορυλίωση στην τυροσίνη και την επαγωγή της φωσφορυλίωσης στη σερίνη, σε διάφορους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και καρκινικών κυττάρων.

ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας έρευνας είναι να αξιολογήσει κατά πόσον η ογκογόνος ιδιοσυστασιακή σηματοδότηση της STAT3 σε κύτταρα ακανθοκυτταρικού καρκινώματος του στόματος (Oral Squamous Cell Carcinoma-OSCC), μπορεί να τροποποιηθεί με τη ρύθμιση συγκεκριμένων MAPK. Επίσης καταγράφηκαν η έκφραση και η κατάσταση ενεργοποίησης των STAT3 και MAPK σε κυτταρικές σειρές HNSCC και μελετήθηκαν οι επιδράσεις της επιλεκτικής αναστολής ή ενεργοποίησης των MAPKs στη STAT3 σηματοδότηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, σε μια προσπάθεια να φωτιστούν σημαντικές μοριακές πτυχές του καρκίνου του στόματος με πιθανά θεραπευτικά οφέλη.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Κυτταρικές σειρές: Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο (2) κυτταρικές σειρές ακανθοκυτταρικού καρκινώματος της στοματικής κοιλότητας (ΑΚΣ) του ανθρώπου. Συγκεκριμένα αγοράστηκαν οι σειρές 9 και 25 από την American Type Culture Collection (ATCC, τύποι 9 και 25) (Manassas, VA, USA).

Φαρμακευτική αναστολή των MAPK: Στα κύτταρα χορηγήθηκε είτε μόνο το μέσο(DMSO) είτε ο ειδικός για κάθε MAPK αναστολέας (JNK1/2- SP600125, p38-SB203580, Erk1/2-U0126) (Calbiochem, San Diego, CA, USA) σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις για 24 ώρες.

Φαρμακευτική επαγωγή των MAPK: Στα κύτταρα χορηγήθηκε είτε μόνο το μέσο (DMSO) είτε ο ειδικός για κάθε MAPK επαγωγέας (active Mek1/2-Erk1/2, active MKK7-JNK1/2) (ProSpec, Israel σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις για 48 ώρες.

Διαμόλυνση με siRNA: Η αποσιώπηση (silencing) της έκφρασης των JNK1/2 και ERK1/2 βασίστηκε σε αναγνωρισμένες ακολουθίες αναφοράς της τράπεζας γονιδίων NCBI (GenBank:Erk1: NM_002746 and Erk2: NM_002745) και εφαρμόστηκε η τεχνική της παροδικής διαμόλυνσης με λιποφεκταμίνη 2000(Invitrogen), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του ειδικού μηχανήματος διαμόλυνσης (electroporator) Amaxa Nucleofector II (Amaxa Biosystems-Lonza, Cologne, Germany).

Ανάλυση κατά Western: Κατά την πειραματική διαδικασία με Western blot χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντισώματα: total STAT3, phospho-STAT3 (Tyr705), phospho-STAT3 (Ser727), total p44/42(Erk1/2) total p38, total JNK1/2, phospho-p38, phospho-c-Jun, cyclin D1 (Cell Signaling, Beverly, MA,USA), phospho-Erk1/2 (Upstate, Charlottesville, VA, USA), cyclin D1 (Cell Signaling) and β-actin (Sigma Chemical).

Κυτταρική αύξηση και βιωσιμότητα: Η βιωσιμότητα και ο απόλυτος αριθμός των κυττάρων υπό δοκιμασία μετρήθηκε με την μέθοδο αρνητικής χρώσης trypan blue και μικροσκοπική παρατήρηση σε ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης, με την βοήθεια κοινού αιματοκυτταρομέτρου εις τετραπλούν.

Ανοσοϊστοχημική ανάλυση: Χρησιμοποιήθηκαν ιστοί ακανθοκυτταρικού καρκινώματος του στόματος, που προέρχονται από το αρχείο του Εργαστηρίου

Στοματολογίας της Οδοντιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών (60 περιπτώσεις) που ταξινομήθηκαν σε 3 ομάδες των 20 περιπτώσεων με βάση το βαθμό διαφοροποίησης (υψηλής, μέτριας, χαμηλής). Διερευνήθηκε η έκφραση των εξής 5 πρωτεϊνών : phospho-STAT3 (Tyr705)(1:100), phospho-STAT3 (Ser727) (1:100), phospho-cJun (1:100), phospho-ERK1/2(1:100), phospho-p38(1:100). **Στατιστική ανάλυση:** Οι πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των μεταβολών του ποσοστού βιωσιμότητας και του αριθμού των ζωντανών κυττάρων ανά εφαρμοζόμενη συγκέντρωση φαρμάκου (αναστολέα, επαγωγή, siRNA) εκτιμήθηκαν με τη δοκιμασία του Fisher. Οι πιθανές συσχετίσεις των ανοσοϊστοχημικών μεταβλητών μεταξύ των τριών ομάδων διαφοροποίησης εκτιμήθηκαν με τη χρήση της δοκιμασίας t-test. Οι στατιστικές διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές όταν ο δείκτης πιθανότητας p ήταν <0.05.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τη μελέτη προέκυψαν τα ακόλουθα ευρήματα:

Erk1/2 αναστολή: Η χημική αναστολή των Erk1/2 μετά την εφαρμογή του U0126 ήταν πιο ισχυρή στην κυτταρική σειρά SCC25 και συνδέθηκε με αξιοσημείωτη μείωση στα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη STAT3 αλλά και της κυκλίνης D1, χωρίς να επηρεάζει τη φωσφορυλίωση στην τυροσίνη.

Η ειδική σίγαση των ERK1/2 οδήγησε στη μείωση της STAT3 φωσφορυλίωσης στη σερίνη και της έκφρασης της κυκλίνης D1 σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές καθώς και σε αύξηση της STAT3 φωσφορυλίωσης στην τυροσίνη ιδιαίτερα στην SCC9 κυτταρική σειρά. Τόσο η χημική αναστολή (U0126) όσο και η ειδική σίγαση των ERK1/2, οδήγησαν σε δόσοεξαρτώμενη μείωση της ανάπτυξης των κυττάρων και της κυτταρικής βιωσιμότητας σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές.

Erk1/2 επαγωγή: η επαγωγή των Erk1 / 2 προκάλεσε αύξηση των επιπέδων έκφρασης της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη STAT3 και της κυκλίνης D1 σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές και μείωση της φωσφορυλιωμένης στην τυροσίνη STAT3. Επίσης, είχε ως αποτέλεσμα σημαντική δόσοεξαρτώμενη αύξηση στην ανάπτυξη των κυττάρων στην υψηλότερη συγκέντρωση, η οποία ήταν περισσότερο εμφανής στην SCC9 κυτταρική σειρά. Αντιθέτως, η επαγωγή δε φαίνεται να προκαλεί αξιοσημείωτες αλλαγές στην κυτταρική βιωσιμότητα και για τις δυο κυτταρικές σειρές.

JNK1/2 αναστολή: Η χημική αναστολή της ενεργοποίησης των JNK1/2 μετά την εφαρμογή του SP600125 ήταν εμφανής και στις δύο κυτταρικές σειρές και συνδέθηκε με αύξηση στα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης στην τυροσίνη STAT3 αλλά και της κυκλίνης D1, ταυτόχρονα με μείωση στη φωσφορυλίωση της σερίνης. Η ειδική σίγαση των JNK1/2 οδήγησε στην αύξηση της STAT3 φωσφορυλίωσης στην τυροσίνη και της έκφρασης της κυκλίνης D1 καθώς και σε μείωση της STAT3 φωσφορυλίωσης στην σερίνη σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές. Παρόμοια με τις επιπτώσεις της χημικής αναστολής με SP600125, η διαμόλυνση με

siRNA κατά των JNK1/2, οδήγησε σε δόσοεξαρτώμενη αύξηση της ανάπτυξης των κυττάρων και της κυτταρικής βιωσιμότητας σε αμφοτέρες τις κυτταρικές σειρές.

JNK1/2 επαγωγή: Η επαγωγή των JNK 1 / 2 προκάλεσε αύξηση των επιπέδων έκφρασης της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη STAT3 και μείωση της έκφρασης της κυκλίνης D1 και της φωσφορυλιωμένης στην τυροσίνη STAT3, σε αμφοτέρες τις κυτταρικές σειρές.

Η χορήγηση ενεργού MKK7, είχε ως αποτέλεσμα σημαντική δόσοεξαρτώμενη μείωση στην ανάπτυξη των κυττάρων στην υψηλότερη συγκέντρωση και για τις δυο κυτταρικές σειρές. Τέλος, η χορήγηση ενεργού MKK7 για 24 ώρες, προκαλεί μείωση στην κυτταρική βιωσιμότητα ιδιαίτερα στην SCC25 κυτταρική σειρά.

P38 αναστολή: Η χημική αναστολή της p38 μετά την εφαρμογή του SB203580 ήταν εμφανής και στις δύο κυτταρικές σειρές, αλλά δεν προκάλεσε αξιόλογες μεταβολές στα επίπεδα της φωσφορυλίωσης της STAT3(σερίνη /τυροσίνη) ή στην έκφραση της κυκλίνης D1. Επιπρόσθετα, δε φαίνεται να έχει κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή στον απόλυτο αριθμό των κυττάρων και στην κυτταρική βιωσιμότητα σε αμφοτέρες τις κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν.

Ανοσοϊστοχημεία

p-STAT3(ser): Παρόλο που τα χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης νεοπλάσματα παρουσίασαν τους υψηλότερους μέσους όρους και στις τρεις υπό μελέτη μεταβλητές, σε σύγκριση με τα καλής διαφοροποίησης περιστατικά, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

p-STAT3(tyr): Η στατιστική ανάλυση κατέδειξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των τριών μεταβλητών της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης p-ERK1/2 και του βαθμού διαφοροποίησης των όγκων ($p < 0,05$), με τις υψηλότερες τιμές να εμφανίζονται στα νεοπλάσματα χαμηλής διαφοροποίησης. Στατιστικές συγκρίσεις μεταξύ των επιμέρους κατηγοριών των νεοπλασμάτων αποκάλυψαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των νεοπλασμάτων καλής και χαμηλής διαφοροποίησης και για τις τρεις μεταβλητές έκφρασης της πρωτεΐνης p-STAT3(tyr).

p-p38: Οι μέσοι όροι των τριών μεταβλητών δεν παρουσίασαν σημαντικές αποκλίσεις σε σχέση με το βαθμό διαφοροποίησης των περιπτώσεων και η στατιστική ανάλυση δεν κατέδειξε σημαντικές διαφορές.

p-Erk1/2: Η στατιστική ανάλυση κατέδειξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των τριών μεταβλητών της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης p-ERK1/2 και του βαθμού διαφοροποίησης των όγκων ($p < 0,05$), με τις υψηλότερες τιμές να εμφανίζονται στα νεοπλάσματα χαμηλής διαφοροποίησης. Στατιστικές συγκρίσεις μεταξύ των επιμέρους κατηγοριών των νεοπλασμάτων αποκάλυψαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των νεοπλασμάτων καλής και χαμηλής διαφοροποίησης και για τις τρεις μεταβλητές έκφρασης της πρωτεΐνης p-STAT3(tyr).

p-cJun: Οι συγκρίσεις μεταξύ των επιμέρους κατηγοριών των νεοπλασμάτων αποκάλυψαν μειωμένες τιμές και στις τρεις παραμέτρους για την πρωτεΐνη p-cJun στα νεοπλάσματα χαμηλής διαφοροποίησης. Μάλιστα η τιμή της έντασης της χρώσης

ήταν χαμηλότερη σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p < 0,05$) σε σύγκριση με τα νεοπλάσματα μέτριας διαφοροποίησης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας, τα δεδομένα της παρούσας εργασίας εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

- Οι ERK1 / 2 φαίνεται να διαθέτουν ογκογόνο δυναμικό στο ΑΚΣ ασκώντας θετική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.
- Η ογκογόνος ιδιοσυστασιακή σηματοδότηση της STAT3 φαίνεται να ρυθμίζεται αρνητικά από τις ERK1 / 2 σε κύτταρα ΑΚΣ. Η αλληλεπίδραση ERK1/2-STAT3 αφορά κυρίως στην επαγόμενη από την ERK φωσφορυλίωση της STAT3 στη Ser727, ενώ η φωσφορυλίωση στην Tyr 705 δεν παρουσιάζει σημαντικές μεταβολές.
- Το ογκοκατασταλτικό δυναμικό των JNK1 / 2 σε ΑΚΣ υποστηρίζεται από την ανασταλτική επίδραση που ασκούν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην κυτταρική βιωσιμότητα.
- Η ογκογόνος ιδιοσυστασιακή STAT3 σηματοδότηση φαίνεται ότι ρυθμίζεται αρνητικά από τη JNK στα συγκεκριμένα κύτταρα ΑΚΣ. Η αλληλεπίδραση JNK-STAT3 εκδηλώνεται μέσω της μείωσης της STAT3 φωσφορυλίωσης στην Tyr 705 και της αύξησης της φωσφορυλίωσης στη Ser727.
- Η p38 MAPK εμφανίζεται να μην επηρεάζει σημαντικά τη σηματοδότηση της STAT3 και τον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα των κυττάρων ΑΚΣ.
- Οι ERK1/2, p38 και p-cJun εκφράζονται έντονα στο ΑΚΣ γεγονός που υποδηλώνει τη σημασία τους σε αυτόν τον τύπο καρκίνου.
- Ο ρόλος των JNK, p38 και ERK1/2 στη λειτουργία της STAT3 ποικίλει ανάλογα με τον τύπο των μελετώμενων καρκινικών κυττάρων, υποδεικνύοντας την ανάγκη για τον ακριβή προσδιορισμό του ρόλου της ενεργοποίησης των MAPK σε σχέση με τη STAT3 σηματοδότηση σε κάθε τύπο κυττάρου ξεχωριστά.
- Η κατανόηση της πολυπλοκότητας του μονοπατιού των MAPK και της αλληλεπίδρασης μεταξύ άλλων σημαντικών μορίων όπως της πρωτεΐνης STAT3 θα αποτελέσουν χρήσιμους στόχους για την εφαρμογή νέων φαρμακολογικών θεραπειών στην πρόληψη του καρκίνου.

Λέξεις κλειδιά: STAT3, MAPK, σηματοδότηση, αλληλεπίδραση

SUMMARY

The oncogenic role of STAT3 signaling molecule in oral squamous cell carcinoma.

Gkouveris Ioannis

Oral cancer is the sixth most common cancer worldwide and the incidence of new cases indicates a continuing rise in developing countries. Several genetic and epigenetic alterations underlie the progressive acquisition of a malignant phenotype in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). The molecular dissection of aberrant signaling networks, including EGFR, Ras, NF- κ B, Wnt/ β -catenin, TGF- β , and PI3K-AKT-mTOR signaling pathways, has increased our understanding on the basic mechanisms controlling HNSCC progression.

Signal transducer and activator of transcription (STAT) proteins constitute a family of transcription factors, which exist in the cell as latent cytoplasmic transcription factors and become activated in response to stimulation by cytokines and growth factors, translocate to the nucleus, where they interact with the promoters of target genes. Phosphorylation of STAT molecules on a tyrosine residue is the first critical event for their activation and has been convincingly shown to correlate with STAT DNA binding and transcriptional activity. In contrast, STAT serine phosphorylation, which may also occur in response to growth factor and cytokine stimulation, has been associated mainly with negative regulation of STAT activity. STAT signaling has been found to be involved in oncogenesis. There is compelling evidence that STAT3 constitutive activation, mainly associated with aberrant TGF- α /EGFR signaling, is linked to HNSCC development and growth.

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways are evolutionarily conserved kinase modules that link extracellular signals to the machinery that controls fundamental cellular processes such as growth, proliferation, differentiation, migration and apoptosis. MAPKs phosphorylate serine and threonine residues of specific target proteins. They are classified into three major subfamilies, including extracellular signal-regulated kinases (ERKs), p38 MAPKs, and c-Jun NH₂-terminal kinases (JNKs)

Previous studies supported an association between activation of specific members of the MAPK family and negative regulation of STAT3, manifested by downregulation of STAT3 tyrosine phosphorylation and induction of STAT3 serine phosphorylation, in various cell types including cancer cells.

PURPOSE

The aim of the present investigation was to evaluate whether oncogenic constitutive STAT3 signaling in oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells can be modulated by regulation of specific MAPKs. The expression and activation status of STAT3 and MAPKs in HNSCC cell lines were recorded and the effects of selective MAPKs inhibition or activation on STAT3 signaling and cellular proliferation were monitored, in an attempt to elucidate important molecular aspects of oral cancer with potential therapeutic implications.

MATERIAL AND METHODS

Cell lines and cell culture. Experiments were performed using established cell lines of human HNSCC (SCC9 and SCC25) obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA).

Selective inhibition of MAPKs. Cells were treated either with the vehicle alone (DMSO) or with the selective MAPK inhibitor (JNK1/2- SP600125, p38-SB203580, Erk1/2-U0126) (Calbiochem, San Diego, CA, USA) at specific concentrations for 24 h.

Selective induction of MAPKs. Cells were treated either with the vehicle alone (DMSO) or with the selective MAPK (active Mek1/2-Erk1/2, active MKK7-JNK1/2) inducers (ProSpec, Israel) at specific concentrations for 48 h.

siRNA transfection: JNK1, JNK2 and Erk1, Erk2 siRNAs were based on NCBI Reference Sequences (GenBank: Erk1: NM_002746 and Erk2: NM_002745). All siRNA and scrambled control siRNA (siControl) were purchased from Qiagen. All siRNA transfections were performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. After OSCC cells were grown, they were transiently transfected with 50 µg of the empty vector or siRNA using Nucleofector II reagents (Amaxa Biosystems-Lonza, Cologne, Germany).

Western blot experiments. Western blotting was performed using antibodies against: total STAT3, phospho-STAT3 (Tyr705), phospho-STAT3 (Ser727), total p44/42(Erk1/2) total p38, total JNK1/2, phospho-p38, phospho-c-Jun, cyclin D1 (Cell Signaling, Beverly, MA, USA), phospho-Erk1/2 (Upstate, Charlottesville, VA, USA), cyclin D1 (Cell Signaling) and β-actin (Sigma Chemical).

Cell proliferation and viability. Cells were counted with a hemocytometer under inverted microscope. Cell viability after treatment was determined by the trypan blue dye exclusion test 24 h after each treatment. All assays were performed in quadruplicate and results are reported as the mean ± SD.

Immunohistochemistry. The material consisted of 60 specimens diagnosed as oral SCC, selected from the Department of Oral Pathology and Medicine, Faculty of Dentistry, University of Athens. The specimens were divided in 3 groups of 20 cases according to their differentiation level (high, medium, poor). Staining was performed for the following antibodies: phospho-STAT3 (Tyr705)(1:100), phospho-STAT3 (Ser727) (1:100), phospho-cJun (1:100), phospho-ERK1/2(1:100), phospho-p38(1:100).

Statistical Analysis. The relationship between cell viability/cell number and concentrations of chemical reagents was assessed with the t-test. The association between immunohistochemical variables (intensity/ percentage of positive cells, combined score) and differentiation levels was analyzed by Fisher's test. Differences were considered to be statistically significant when: $p < 0.05$.

RESULTS

The results of this study are summarized as follows:

Erk1/2 inhibition: Erk1/2 inhibition by U0126 treatment was more potent in oral SCC25 cells and was associated with a decrease in p-ser STAT3 and cyclin D1 levels without affecting p-tyr STAT3 levels.

Moreover, specific silencing of Erk1/2 resulted in a decrease in p-ser STAT3 and cyclin D1 levels in both cell lines and an increase in p-tyr-STAT3, particularly in oral SCC9 cells. Both chemical inhibition with U0126 and silencing Erk1/2 resulted in a dose-dependent reduction in cell growth and cell viability in both cell lines.

Erk1/2 induction: Erk1/2 induction caused upregulation of p-ser STAT3 and cyclin D1 levels in both cell lines, decrease in p-tyr-STAT3 and resulted in a significant dose-dependent increase in cell growth, which was more prominent in the oral SCC25 cell line. On the contrary, treatment of cells with active MEK1/2 did not appear to induce notable changes in cell viability in either cell line.

JNK1/2 inhibition: JNK1/2 inhibition by SP600125 treatment was detected in both cell lines and was associated with increases in p-tyr Stat3 and cyclin D1 levels as well as decreases in p-serr Stat3 levels at the highest concentration used.

Specific silencing of JNK1/2 resulted in decreases in p-ser Stat3 and cyclin D1 levels in both cell lines and increases in p-tyr-Stat3 particularly in oral SCC9 cells. Similar to chemical inhibition with SP600125 silencing of JNK1/2 resulted in a dose-dependent rise in cell growth and cell viability in both cell lines.

JNK1/2 induction: JNK1/2 induction caused upregulation of p-ser Stat3 levels in both cell lines and decreases in p-tyr Stat3 and cyclin D1. Moreover, active MKK7 treatment at the highest concentration resulted in significant dose-dependent decrease in cell growth and cell viability, which was more prominent in oral SCC25 cell line.

P38 inhibition: p38 inhibition by SB203580 treatment was not associated with any significant change in phosphorylated levels of STAT3 (ser/tyr) and cyclin D1 in both cell lines. Furthermore treatment with SB203580 for 24h resulted in no statistically significant changes in cell growth and cell viability in both cell lines tested.

Immunohistochemistry

p-STAT3(ser): Eventhough poorly differentiated neoplasms showed the lowest mean average score, no statistically significant correlation was found between the three histopathological parameters (intensity/percentage of positive cells, combined score) and differentiation level for p-STAT3(ser).

p-STAT3(tyr): Statistically significant correlation ($p < 0.05$) was found between all three histopathological parameters and differentiation level of neoplasms with poorly differentiated cases showing the highest mean average scores. Furthermore statistically significant difference ($p < 0.05$) was found between poorly and well differentiated neoplasms for all tested parameters.

p-p38: No statistically significant correlation was found between the three

histopathological parameters (intensity/percentage of positive cells, combined score) and differentiation level for p-p38.

p-Erk1/2: There is statistically significant correlation ($p < 0.05$) between all three histopathological parameters and differentiation level of neoplasms with poorly differentiated cases showing the highest mean average scores. Moreover statistically significant difference ($p < 0.05$) was found between poorly and well differentiated neoplasms for all the tested parameters.

p-cJun: Poorly differentiated neoplasms showed the lowest mean average score for all three histopathological parameters, but the only statistically significant correlation ($p < 0.05$) concerned intensity score between poorly and medium differentiated neoplasms.

CONCLUSIONS

- Our data are supportive of the oncogenic potential of Erk1/2 in OSCC, which appears to contribute to cell proliferation.
- The oncogenic STAT3 constitutive signaling in OSCC cells appears to be negatively regulated by Erk1/2. The Erk1/2-STAT3 crosstalk appears to involve mainly ERK-induced upregulation of STAT3(Ser727) phosphorylation while Tyr705 phosphorylation does not exhibit major changes.
- JNK1/2 oncosuppressor potential in OSCC is supported by the reduction of cell proliferation and cell viability.
- The oncogenic Stat3 constitutive signaling in OSCC cells is negatively regulated by JNK. The JNK-STAT3 crosstalk seems to respond mostly through the downregulation of Stat3 phosphorylation on Ser727 residue and upregulation of Tyr 705.
- P38 does not appear to play a significant role in STAT3 signaling, cell proliferation and cell viability.
- ERK1/2, p38 and p-cJun are strongly expressed in OSCC indicating their significance in this type of cancer.
- It is possible that the role of Erk1/2, JNK and p38 in STAT3 modulation varies according to the type and status of the cells studied, indicating the need to identify the role of MAPK activation in relation to STAT3 signaling in specific cell types.
- Understanding MAPK pathway complexity and cross-talk between other major molecules such as STAT3 will be helpful to pharmacologic therapies for cancer prevention.

Keywords: STAT3, MAPK, signaling, crosstalk

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics 2002 *CA Cancer J Clin* 2005;55(2):74–108.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58(2):71–96.
3. Mao L, Hong WK, Papadimitrakopoulou VA. Focus on head and neck cancer. *Cancer Cell* 2004;5(4):311–6.
4. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 2001;345(26):1890–900.
5. Bagan JV, Scully C. Recent advances in Oral Oncology 2007: epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and prognostication. *Oral Oncol* 2008;44(2):103–8.
6. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;23:675–99.
7. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57–70.
8. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008;358(11):1148–59.
9. Partridge M, Emilion G, Pateromichelakis S, Phillips E, Langdon J. Field cancerisation of the oral cavity: comparison of the spectrum of molecular alterations in cases presenting with both dysplastic and malignant lesions. *Oral Oncol* 1997;33(5):332–7.
10. Bromberg J, Darnell JE Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 2000;19:2468-73.
11. Rane SG, Reddy EP. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* 2000;19:5662-79.
12. Benekli M, Baer MR, Baumann H, Wetzler M. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood* 2003; 101:2940-2954.
13. Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clinical Cancer* 2002; 8: 945-954. 99
14. Klein M, Hempstead BL, Teng KK. Activation of STAT5-dependent transcription by the neurotrophin receptor Trk. *J Neurobiol* 2005; 63: 159 – 171.
15. Kim H, Baumann H. The carboxyl-terminal region of STAT3 controls gene induction by the mouse haptoglobin promoter. *J Biol Chem* 1997;72:14571-14579.
16. Moriggl R, Berchtold S, Friedrich K, Standke GJ, Kammer W, Heim M, et al.. Comparison of the transactivation domains of Stat5 and Stat6 in lymphoid cells and mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol* 1997;17:3663-3678.
17. Leonard WJ, O'Shea JJ Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 1998;16:293-322.
18. Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science* 1997;277:1630-1635.
19. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ and Schreiber RD. 1998; *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, 95, 7556 - 7561.
20. Pellegrini S, Dusanter-Fourt I. The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur J Biochem* 1997; 15;248(3):615-33.
21. Vinkemeier U, Moarefi I, Darnell JE, Jr., Kuriyan J. Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science* 1998; 279: 1048-1052.

22. Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE, Jr., Kuriyan J. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 1998; 93: 827-839.
23. Becker S, Groner B, Muller C W. Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. *Nature* 1998; 394:145-151.
24. Fu XY, Zhang JJ. Transcription factor p91 interacts with the epidermal growth factor receptor and mediates activation of the c-fos gene promoter. *Cell* 1993; 74: 1135-1145.
25. Greenlund AC, Farrar MA, Viviano BL, Schreiber RD. Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J* 1994; 13: 1591-1600.
26. Briscoe J, Guschin D, Muller M. Signal transduction. Just another signalling pathway. *Curr Biol* 1994; 4: 1033-1035.
27. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998; 334(Pt 2): 297-314.
28. Wang Y, Robledo O, Kinzie E, et al. Receptor subunit-specific action of oncostatin M in hepatic cells and its modulation by leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem* 2000; 275: 25273-25285
29. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, et al. Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999; 98: 295-303.
30. Milocco LH, Haslam JA, Rosen J, Seidel HM. Design of conditionally active STATs: insights into STAT activation and gene regulatory function. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2913-2920.
31. Meyer T, Begitt A, Lodige I, van Rossum M, Vinkemeier U. Constitutive and IFN-gamma-induced nuclear import of STAT1 proceed through independent pathways. *EMBO J* 2002; 21:344-354.
32. Meyer T, Gavenis K, Vinkemeier U. Cell type-specific and tyrosine phosphorylation-independent nuclear presence of STAT1 and STAT3. *Exp Cell Res* 2002; 272: 45-55.
33. Zeng R, Aoki Y, Yoshida M, Arai K, Watanabe S. Stat5B shuttles between cytoplasm and nucleus in a cytokine-dependent and -independent manner. *J Immunol* 2002; 168: 4567-4575.
34. Kumar A, Commane M, Flickinger TW, Horvath CM, Stark GR. Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science* 1997; 278:1630-1632.
35. Chatterjee-Kishore M, Wright KL, Ting JP, Stark GR. How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *EMBO J* 2000; 19: 4111-4122.
36. Zhang D, Sun M, Samols D, Kushner I. STAT3 participates in transcriptional activation of the C-reactive protein gene by interleukin-6. *J Biol Chem* 1996; 271: 9503-9509.
37. Kordula T, Rydel RE, Brigham EF, Horn F, Heinrich PC, Travis J. Oncostatin M and the interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor complex regulate alpha1-antichymotrypsin expression in human cortical astrocytes. *J Biol Chem* 1998; 273:4112-4118.
38. Schumann RR, Kirschning CJ, Unbehauen A, et al. The lipopolysaccharide-binding protein is a secretory class 1 acute-phase protein whose gene is

- transcriptionally activated by APRF/STAT3 and other cytokine-inducible nuclear proteins. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 3490-3503.
39. Bugno M, Graeve L, Gatsios P, et al. Identification of the interleukin-6/oncostatin M response element in the rat tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) promoter. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 5041-5047.
 40. Coffey P, Lutticken C, van Puijenbroek A, Klop-de Jonge M, Horn F, Kruijer W. Transcriptional regulation of the junB promoter: analysis of STAT-mediated signal transduction. *Oncogene* 1995; 10: 985-994.
 41. Hill C S, Treisman R. Differential activation of c-fos promoter elements by serum, lysophosphatidic acid, G proteins and polypeptide growth factors. *EMBO J* 1995; 14: 5037-5047.
 42. Harroch S, Revel M, Chebath J. Induction by interleukin-6 of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) gene expression through the palindromic interferon response element pIRE and cell type-dependent control of IRF-1 binding to DNA. *EMBO J* 1994; 13: 1942-1949.
 43. Yamada T, Tobita K, Osada S, Nishihara T, Imagawa M. CCAAT/enhancer-binding protein delta gene expression is mediated by APRF/STAT3. *J Biochem (Tokyo)* 1997; 121: 731-738.
 44. Symes A, Gearan T, Eby J, Fink JS. Integration of Jak-Stat and AP-1 signaling pathways at the vasoactive intestinal peptide cytokine response element regulates ciliary neurotrophic factor-dependent transcription. *J Biol Chem* 1997; 272: 9648-9654.
 45. Stephanou A, Isenberg DA, Akira S, Kishimoto T, Latchman DS. The nuclear factor interleukin-6 (NF-IL6) and signal transducer and activator of transcription-3 (STAT-3) signalling pathways co-operate to mediate the activation of the hsp90beta gene by interleukin-6 but have opposite effects on its inducibility by heat shock. *Biochem J* 1998; 330(Pt 1): 189-195.
 46. Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 1997; 387: 921-924.
 47. Naka T, Narazaki M, Hirata M, et al. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 1997; 387: 924-929.
 48. Starr R, Willson TA, Viney EM, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997; 387: 917-921.
 49. Schmitz J, Weissenbach M, Haan S, Heinrich PC, Schaper F. SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem* 2000; 275: 12848-12856.
 50. O'Brien CA, Manolagas SC. Isolation and characterization of the human gp130 promoter. Regulation by STATs. *J Biol Chem* 1997; 272: 15003-15010.
 51. Ichiba M, Nakajima K, Yamanaka Y, Kiuchi N, Hirano T. Autoregulation of the Stat3 gene through cooperation with a cAMP-responsive element-binding protein. *J Biol Chem* 1998; 273: 6132-6138.
 52. Zhang Z, Jones S, Hagood JS, Fuentes NL, Fuller GM. STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling. *J Biol Chem* 1997; 272: 30607-30610.
 53. Xu X, Sun YL, Hoey T. Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science* 1996; 273: 794-797.
 54. Vinkemeier U, Cohen SL, Moarefi I, Chait BT, Kuriyan J, Darnell JE, Jr. DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1:

- interaction between NH₂-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *EMBO J* 1996; 15: 5616-5626.
55. Stahl N, Farruggella TJ, Boulton TG, et al. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 1995;267:1349-1353.
 56. Boulton TG, Stahl N, Yancopoulos GD. Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin 6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors. *J Biol Chem* 1994;269:11648-11655.
 57. Schaper F, Gendo C, Eck M, et al. Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression. *Biochem J* 1998;335:557-565.
 58. Symes A, Stahl N, Reeves SA, et al. The protein tyrosine phosphatase SHP-2 negatively regulates ciliary neurotrophic factor induction of gene expression. *Curr Biol* 1997;7:697-700.
 59. Kim H, Hawley TS, Hawley RG, Baumann H. Protein tyrosine phosphatase 2 (SHP-2) moderates signaling by gp130 but is not required for the induction of acute-phase plasma protein genes in hepatic cells. *Mol Cell Biol* 1998;18:1525-1533.
 60. Lehmann U, Schmitz J, Weissenbach M, et al. SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. *J Biol Chem* 2003;278:661-671.
 61. Ohtani T, Ishihara K, Atsumi T, et al. Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for S. *Immunity* 2000;12:5-105.
 62. Yin T, Shen R, Feng GS, Yang YC. Molecular characterization of specific interactions between SHP-2 phosphatase and JAK tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1997;272:1032-1037.
 63. Gunaje JJ, Bhat GJ. Involvement of tyrosine phosphatase PTP1D in the inhibition of interleukin-6-induced Stat3 signaling by alpha-thrombin. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:252-257.
 64. Wu TR, Hong YK, Wang XD, et al. SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei. *J Biol Chem* 2002;277:47572-47580.
 65. Tanuma N, Nakamura K, Shima H, Kikuchi K. Protein-tyrosine phosphatase PTPepsilon C inhibits Jak-STAT signaling and differentiation induced by interleukin-6 and leukemia inhibitory factor in M1 leukemia cells. *J Biol Chem* 2000;275:28216-28221.
 66. Tanuma N, Shima H, Nakamura K, Kikuchi K. Protein tyrosine phosphatase epsilonC selectively inhibits interleukin-6- and interleukin-10-induced JAK-STAT signaling. *Blood* 2001;98:3030-3034.
 67. Chung CD, Liao J, Liu B, et al. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 1997;278:1803-1805.
 68. Melen K, Kinnunen L, Julkunen I. Arginine/lysine-rich structural element is involved in interferon-induced nuclear import of STATs. *J Biol Chem* 2001;276:16447-16455.
 69. Blanchard F, Wang Y, Kinzie E, Duplomb L, Godard A, Baumann H. Oncostatin M regulates the synthesis and turnover of gp130, leukemia

- inhibitory factor receptor alpha, and oncostatin M receptor beta by distinct mechanisms. *J Biol Chem* 2001;276:47038-47045.
70. Magrangeas F, Boisteau O, Denis S, Jacques Y, Minvielle S. Negative cross-talk between interleukin-3 and interleukin-11 is mediated by suppressor of cytokine signalling-3 (SOCS-3). *Biochem J* 2001;353:223-230.
 71. Matsumoto A, Masuhara M, Mitsui K, et al. CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood* 1997;89:3148-3154.
 72. Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, et al. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J* 1999;18:1309-1320.
 73. Nicholson SE, De Souza D, Fabri LJ, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 2000;97:6493-6498.
 74. Sasaki A, Yasukawa H, Suzuki A, et al. Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells* 1999;4:339-351.
 75. Sasaki A, Yasukawa H, Shouda T, Kitamura T, Dikic I, Yoshimura CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J Biol Chem* 2000;275:29338-29347.
 76. Bromberg, J. Stat proteins and oncogenesis. *J. Clin. Invest.* 2002;109:1139-1142.
 77. Garcia R, Jove R. Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. *J Biomed Sci.* 1998;5:79-85.
 78. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene.* 2000;19:2474-2488.
 79. Bromberg JF, Horvath CM, Besser D, et al. Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol.* 1998;18:2553-2558.
 80. Yu CL, Meyer DJ, Campbell GS, et al. Enhanced DNA-binding activity of a STAT3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* 1995;269:81-83.
 81. Cao X, Tay A, Guy GR, Tan YH. Activation and association of Stat3 with Src in v-Src-transformed cell lines. *Mol Cell Biol.* 1996;16:1595-1603.
 82. Turkson J, Bowman T, Garcia R, et al. Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol Cell Biol.* 1998;18:2545-2552.
 83. Garcia R, Bowman TL, Niu G, et al. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 2001;20:2499-2513.
 84. Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 1999;10:105-115.
 85. Puthier D, Thabard W, Rapp M, et al. Interferon alpha extends the survival of human myeloma cells through an upregulation of the Mcl-1 antiapoptotic molecule. *Br J Haematol.* 2001;112:358-363.
 86. Grandis JR, Zeng Q, Drenning SD. Epidermal growth factor receptor-mediated stat3 signaling blocks apoptosis in head and neck cancer. *Laryngoscope* 2000;110:868-874.

87. Song JI, Grandis JR. STAT signaling in head and neck cancer. *Oncogene*. 2000;19:2489-2495. Reddy MVR, Chaturvedi P, Reddy EP. Src kinase mediated activation of STAT3 plays an essential role in the proliferation and oncogenicity of human breast, prostate and ovarian carcinomas. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1999;40:376.
88. Garcia R, Yu CL, Hudnall A, et al. Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 1997;8:1267-1276.
89. Sartor CI, Dziubinski ML, Yu CL, et al. Role of epidermal growth factor receptor and STAT-3 activation in autonomous proliferation of SUM-102PT human breast cancer cells. *Cancer Res* 1997;57:978-987.
90. Watson CJ, Miller WR. Elevated levels of members of the STAT family of transcription factors in breast carcinoma nuclear extracts. *Br J Cancer* 1995;71:840-844.
91. Grandis JR, Drenning SD, Chakraborty A, et al. Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth in vitro. *J Clin Invest* 1998;102:1385-1392.
92. Fernandes A, Hamburger AW, Gerwin BI. ErbB-2 kinase is required for constitutive stat 3 activation in malignant human lung epithelial cells. *Int J Cancer* 1999;83:564-570.
93. Gao B, Shen X, Kunos G, et al. Constitutive activation of JAK-STAT3 signaling by BRCA1 in human prostate cancer cells. *FEBS Lett* 2001;488:179-184.
94. Frank DA, Mahajan S, Yuan H. The chemoprotectant butyrate downregulates IL-6 induced signaling events in colorectal carcinoma cells. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1999;40:318.
95. Niu G, Heller R, Catlett-Falcone R, et al. Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer Res* 1999;59:5059-5063.
96. De Vos J, Jourdan M, Tarte K, et al. JAK2 tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 downregulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways and induces apoptosis in myeloma cells. *Br J Haematol* 2000;109:823-828.
97. Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 2000;19:2548-2556.
98. Rawat R, Rainey GJ, Thompson CD, et al. Constitutive activation of STAT3 is associated with the acquisition of an interleukin 6-independent phenotype by murine plasmacytomas and hybridomas. *Blood* 2000;96:3514-3521.
99. Yu CL, Jove R, Burakoff SJ. Constitutive activation of the Janus kinase-STAT pathway in T lymphoma overexpressing the Lck protein tyrosine kinase. *J Immunol* 1997;159:5206-5210.
100. Weber-Nordt RM, Egen C, Wehinger J, et al. Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood* 1996;88:809-816.
101. Takemoto S, Mulloy JC, Cereseto A, et al. Proliferation of adult T cell leukemia/lymphoma cells is associated with the constitutive activation of JAK/STAT proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:13897-13902.

102. Skinnider BF, Elia AJ, Gascoyne RD, et al. Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002;99:618-626.
103. Lowenberg B, Touw IP. Hematopoietic growth factors and their receptors in acute leukemia. *Blood* 1993;81:281-292.
104. Xia Z, Baer MR, Block AW, et al. Expression of signal transducers and activators of transcription proteins in acute myeloid leukemia blasts. *Cancer Res* 1998;58:3173-3180.
105. Hayakawa F, Towatari M, Iida H, et al. Differential constitutive activation between STAT-related proteins and MAP kinase in primary acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1998;101:521-528.
106. Biethahn S, Alves F, Wilde S, et al. Expression of granulocyte colony-stimulating factor- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-associated signal transduction proteins of the JAK/STAT pathway in normal granulopoiesis and in blast cells of acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 1999;27:885-894.
107. Aronica MG, Brizzi MF, Dentelli P, Rosso A, Yarden Y, Pegoraro L. p91 STAT1 activation in interleukin-3-stimulated primary acute myeloid leukemia cells. *Oncogene* 1996;13:1017-1026.
108. Birkenkamp KU, Geugien M, Lemmink HH, Kruijer W, Vellenga E. Regulation of constitutive STAT5 phosphorylation in acute myeloid leukemia blasts. *Leukemia* 2001;15:1923-1931.
109. Benekli M, Xia Z, Donohue KA, et al. Constitutive activity of signal transducer and activator of transcription 3 protein in acute myeloid leukemia blasts is associated with short disease-free survival. *Blood* 2002;99:252-257.
110. Spiekermann K, Pau M, Schwab R, Schmieja K, Franzrahe S, Hiddemann W. Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is induced by leukemic fusion proteins with protein tyrosine kinase activity and is sufficient for transformation of hematopoietic precursor cells. *Exp Hematol* 2002;30:262-271.
111. Ilaria RL Jr, Van Etten RA. P210 and P190(Bcr-Abl) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem* 1996;271:31704-31710.
112. Lacronique V, Boureux A, Valle VD, et al. A TELJAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* 1997;278:1309-1312.
113. Lacronique V, Boureux A, Monni R, et al. Transforming properties of chimeric TEL-JAK proteins in Ba/F3 cells. *Blood* 2000;95:2076-2083.
114. Danial NN, Pernis A, Rothman PB. Jak-STAT signaling induced by the v-abl oncogene. *Science* 1995;269:1875-1877.
115. Danial NN, Rothman P. JAK-STAT signaling activated by Abl oncogenes. *Oncogene* 2000;19:2523-2531.
116. Carlesso N, Frank DA, Griffin JD. Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr-Abl. *J Exp Med* 1996;183:811-820.
117. Chai SK, Nichols GL, Rothman P. Constitutive activation of JAKs and STATs in Bcr-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J Immunol* 1997;159: 4720-4728.
118. Sillaber C, Gesbert F, Frank DA, et al. STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr-Abl-transformed cells. *Blood* 2000;95:2118-2125.

119. de Groot RP, Raaijmakers JA, Lammers JW, et al. STAT5 activation by Bcr-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. *Blood* 1999;94:1108-1112.
120. Nieborowska-Skorska M, Wasik MA, Slupianek A, et al. Signal transducer and activator of transcription (STAT)5 activation by Bcr-Abl is dependent on intact Src homology (SH)3 and SH2 domains of Bcr-Abl and is required for leukemogenesis. *J Exp Med* 1999;189:1229-1242.
121. Keating MJ. Chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol.* 1999;26(5 Suppl 14):107-114. Frank DA, Mahajan S, Ritz J. B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues. *J Clin Invest* 1997;100:3140-3148.
122. Epling-Burnette, P.K., et al.. Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocytemacrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils. *J. Immunol* 2001;166:7486–7495.
123. Bowman, T., et al.. Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001;98:7319–7324.
124. Niu, G., et al. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 2002;21: 2000-2008.
125. Ivanov, V.N., et al. Cooperation between STAT3 and c-jun suppresses Fas transcription. *Mol. Cell* 2001;7:517–528.
126. Wen, T.C., Peng, H., Hata, R., Desaki, J., and Sakanaka, M.. Induction of phosphorylated-Stat3 following focal cerebral ischemia in mice. *Neurosci.Lett* 2001;303:153–156.
127. Deon, D., et al. Cross-talk between IL-1 and IL-6 signaling pathways in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J. Immunol* 2001;167:5395–5403.
128. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH . "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions". *Endocr. Rev.* 2001;22 (2): 153–83.
129. Krishna M, Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci.* 2008 ;65(22):3525-44.
130. Krens, S. F. G., He, S., Spaink, H. P. and Snaar-Jagalska, B. E. Characterization and expression patterns of the MAPK family in zebrafish. *Gene Expr. Patterns* 2006;6: 1019–26.
131. Uhlik, M. T., Abell, A. N., Cuevas, B. D., Nakamura, K and Johnson, G. L. Wiring diagrams of MAPK regulation by MEKK1, 2, and 3. *Biochem. Cell Biol.* 2004;82: 658–63.
132. Shapiro, P. S., Whalen, A. M., Tolwinski, N. S., Wilsbacher, J., Froelich-Ammon, S. J., Garcia, M., Osheroff, N. and Ahn, N.G. Extracellular signal-regulated kinase activates topoisomerase IIalpha through a mechanism independent of phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 1999;9, 3551–3560.
133. Tanoue, T. and Nishida. E. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell. Signal.* 2003;15, 455–462.
134. Lewis, T. S., Shapiro, P. S. and Ahn, N. G. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* 1998;7: 49–139.
135. Alessi, D.R., Gomez, N., Moorhead, G., Lewis, T., Keyse, S. M. and Cohen, P. Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein

- tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines. *Curr. Biol.* 1995;5: 283 – 295
136. Pulido, R., Zuniga, A. and Ullrich, A. PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal regulated kinases ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif. *EMBO J.* 1998;17:7337–7350.
 137. Sun, H., Charles, C. H., Lau, L. F. and Tonks, N. K.. MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* 1993;75: 487–493.
 138. McKay, M. M. and Morrison, D. K. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 2007;26:3113–3121.
 139. Goldsmith, Z. G. and Dhanasekaran, D. N. G Protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 2007; 26: 3122–3142.
 140. Wood, K., Sarnecki, C., Roberts, T.M. and Blenis, J. c-Ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1 and RSK. *Cell* 1992;68:1041–1050.
 141. Pouyssegur J. Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45MAPKK) in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 1993;122:1079–1088.
 142. Yoon, S. and Seger, R. The extracellular signal regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 2006;24:21–44.
 143. Eferl, R. and Wagner, E. F. AP-1: A double-edged word in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 2003;3:859–868.
 144. Lin, L. L., Wartmann, M., Lin, A. Y, Knopf, J. L, Seth, A., Davis, R. J. cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 1993;7: 269–278.
 145. Richards, S. A., Dreisbach V. C., Murphy L. O. and Blenis J. Characterization of regulatory events associated with membrane targeting of p90 ribosomal S6 kinase 1. *Mol. Cell. Biol.* 2001;21:7470–7480.
 146. Xing, J., Ginty, D.D. and Greenberg, M.E. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 1996;273:959–63.
 147. Schuck, S., Soloaga, A., Schrott, G., Arthur, J. S. and Nordheim, A. The kinase MSK1 is required for induction of c-fos by lysophosphatidic acid in mouse embryonic stem cells. *BMC Mol. Biol.* 2003;4:6.
 148. Downward, J. () Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2003;3: 11–22.
 149. Galabova-Kovacs, G., Kolbus, A., Matzen, D., Meissl, K., Piazzolla, D., Rubiolo, C., Steinitz, K. and Baccarini, M. ERK and beyond: Insights from B-Raf and Raf-1 conditional knockouts. *Cell Cycle* 2006;5: 1514–1518.
 150. Thomson, S., Mahadevan, L. C. and Clayton, A. L. MAP kinase mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. *Semin. Cell Dev. Biol.* 1999;10: 205–214.
 151. Tsujita, E., Taketomi, A., Gion, T., Kuroda, Y. ., Endo, K., Watanabe, A. Nakashima, H., Aishima, S., Kohnoe, S. and Maehara, Y. Suppressed MKP-1 is an independent predictor of outcome in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2005;69: 342–347.
 152. Fong, C.W., Chua, M. S., McKie, A.B., Ling, S.H., Mason, V., Li R. Yusoff, P., Lo, T. L., Leung, H. Y., So, S. K. and Guy, G.R. Sprouty 2, an inhibitor of

- mitogen-activated protein kinase signaling, is down-regulated in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2006;66: 2048–2058
153. Reddy, K. B., Nabha, S. M. and Atanaskova, N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2003;22: 395–403.
 154. Pages, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J. C., Meloche, S. and Pouyssegur, J. () Mitogen-activated protein kinases p42MAPK and p44MAPK are required for fibroblast proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993;90: 8319–8323.
 155. Servant, M. J., Giasson, E. and Meloche, S. Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1996;271: 16047–16052.
 156. Murphy, L. O. and Blenis, J. MAPK signal specificity: The right place at the right time. *Trends Biochem. Sci.* 2006;31: 268–275
 157. Lavoie, J. N., L'Allemain, G., Brunet, A., Muller, R. and Pouyssegur, J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/ HOGMAPK pathway. *J. Biol. Chem.* 1996;271: 20608–20616.
 158. Rousseau, D., Kaspar, R., Rosenwald, I., Gehrke, L. and Sonenberg, N. Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells over expressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996;93: 1065–1070.
 159. Cheng, M., Sexl, V., Sherr, C. J. and Roussel, M. F. Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;95: 1091–1096.
 160. Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed S, Sicinski P, Bartek J. and Eilers M. Direct induction of cyclinD2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *EMBO J.* 1999;18: 5321–5333.
 161. Collier, H. A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E. S., Eisenman, R. N. and Golub T. R. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000;97: 3260–3265.
 162. Galaktionov, K., Chen, X. and Beach, D. Cdc25 cell cycle phosphatase as a target of c- myc. *Nature* 1996;382: 511–517.
 163. Adhikary, S. and Eilers, M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005;6: 635–645.
 164. Palmer, A., Gavin, A. C. and Nebreda, A. R. A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *EMBO J.* 1998;17: 5037–5047.
 165. Sassone-Corsi, P., Mizzen, C. A., Cheung, P., Crosio, C., Monaco, L., Jacquot, S., Hanauer, A. and Allis, C. D. Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor- activated phosphorylation of histone H3. *Science* 1999;285: 886–891.
 166. Sewing, A., Wiseman, B., Lloyd, A. C. and Land, H. High intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol. Cell. Biol.* 1997;17: 5588–5597.

167. Mirza, A. M., Gysin, S., Malek, N., Nakayama, K., Roberts, J.M. and McMahon, M. Cooperative regulation of the cell division cycle by the protein kinases RAF and AKT. *Mol. Cell. Biol.* 2004;24: 10868–10881.
168. Erhardt, P., Schremser, E. J. and Cooper, G. M. B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/ERK pathway. *Mol. Cell. Biol.* 1999;19: 308–315.
169. Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C. B. and Korsmeyer, S. J. Bad, a heterodimeric partner for Bcl_xL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 1995;80: 285–291.
170. Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. and Korsmeyer, S. J. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-X. *Cell* 1996;87: 619–628.
171. Bhat, N. R. and Zhang, P. Hydrogen peroxide activation of multiple mitogen activated protein kinases in an oligodendrocyte cell line: Role of extracellular signal-regulated kinase in hydrogen peroxide-induced cell death. *J. Neurochem.* 1999 ;72: 112–119.
172. Kyriakis, J. M. and Avruch, J. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J. Biol. Chem.* 1990;265: 17355–17363.
173. Leppa, S. and Bohmann, D. Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. *Oncogene* 1999;18: 6158–6162.
174. Behrens, A., Jochum, W., Sibilias, M. and Wagner, E. F. Oncogenic transformation by ras and fos is mediated by c-Jun N-terminal phosphorylation. *Oncogene* 2000;19: 2657–2663.
175. Behrens, A., Sibilias, M. and Wagner, E. F. Aminoterminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat. Genet.* 1999;21: 326–329.
176. Barr, R. K. and Bogoyevitch, M. A. The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2001;33: 1047–1063.
177. Kyriakis, J. M. and Avruch, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* 2001;81:807–869.
178. Wan, Y. Y., Chi, H., Xie, M., Schneider, M. D., Flavell, R. A. The kinase TAK1 integrates antigen and cytokine receptor signaling for T cell development, survival and function. *Nat. Immunol* 2006;7:851–858.
179. Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O. and Akira, S. Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005;6:1087–1095.
180. Qin, J., Yao, J., Cui, G., Xiao, H., Kim, T. W., Fraczek, J., Wightman, P., Sato, S., Akira, S., Puel, A., Casanova JL, Su B. and Li X. TLR8-mediated NF- κ B and JNK activation are TAK1-independent and MEKK3-dependent. *J. Biol. Chem.* 281, 21013–21021.
181. Das, S., Cho, J., Lambertz, I., Kelliher, M. A., Eliopoulos, A. G., Du, K. and Tschlis, P. N. (2005) Tpl2/cot signals activate ERK, JNK, and NF κ B in a cell-type and stimulus-specific manner. *J. Biol. Chem.* 280:23748–23757.

182. Brancho,D.,Ventura, J. J., Jaeschke,A., Doran,B., Flavell, R.A. and Davis, R. J. Role of MLK3 in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Mol. Cell Biol.* 2005;25:3670–3681.
183. Dong, C., Davis, R. J. and Flavell, R. A. MAP kinases in the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 2002;20:55–72.
184. Bachar,O., Adner,M., Uddman, R. and Cardell, L.O. Toll-like receptor stimulation induces airway hyper-responsiveness to bradykinin, an effect mediated by JNK and NFkappa B signaling pathways. *Eur. J. Immunol.* 2004;34:1196–1207.
185. Davis, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000;103:239–252.
186. Chaussepied, M., Lallemand, D., Moreau, M. F., Adamson, R., Hall, R. and Langsley, G. Upregulation of Jun and Fos family members and permanent JNK activity lead to constitutive AP-1 activation in Theileria-transformed leukocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1998;94:215–226.
187. Liu, J., Lin, A. Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword. *Cell Res.* 2005;15:36–42.
188. Lan, K. P., Wang, C. J., Hsu, J. D., Chen, K. M., Lai, S. C. and Lee, H. H. Induced eosinophilia and proliferation in *Angiostrongylus cantonensis*-infected mouse brain are associated with the induction of JAK/STAT1, IAP/NF-kappaB and MEKK1/JNK signals. *J. Helminthol.* 2004;78:311–317.
189. Mizukami, Y., Yoshioka, K., Morimoto, S. and Yoshida, K. A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion. *J. Biol. Chem.* 1997;272:16657–16662.
190. Bogoyevitch, M. A. and Kobe, B. Uses for JNK: The many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol. Mol. Biol.* 2006;70:1061–1095.
191. Zhang, Y., Zhong, S., Dong, Z., Chen, N., Bode, A. M., Ma,W. and Dong Z. UVA induces Ser381 phosphorylation of p90RSK/MAPKAP-K1 via ERK and JNK pathways. *J.Biol. Chem.* 2001;276:14572–14580.
192. Fuchs, S. Y. B., Xie, V., Fried, VA., Davis, R J. and Ronai, Z. c-Jun NH2-terminal kinases target the ubiquitination of their associated transcription factors. *J. Biol. Chem.* 1997;272:32163–32168.
193. Gao, M., Labuda, T., Xia, Y., Gallagher, E., Fang, D., Liu, Y.C. and Karin, M. Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science* 2004;306:271–275.
194. Kennedy, N. J and Davis, R. J. Role of JNK in tumor development. *Cell Cycle* 2003;2: 199–201.
195. Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D. A., Birrer, M and Karin, M. Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature* 1991;354: 494–496.
196. Nateri, AS, Spencer-Dene, B and Behrens, A. Interaction of phosphorylated c-jun with TCF-4 regulated intestinal cancer development. *Nature* 2005;437: 281–285.
197. Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Mohle-Steinlein, U., Tian, J. Karin M., Angel P. and Wagner E. F. Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev.* 1999;13: 607–619.

198. Eferl, R., Ricci, R., Kenner, L., Zenz, R., David, J. P., Rath, M. and Wagner E. F. Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell* 2003;112: 181–192.
199. Sakurai, T., Maeda, S., Chang, L. and Karin, M. Loss of hepatic NF- κ B activity enhances chemical hepatocarcinogenesis through sustained c-Jun N-terminal kinase 1 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006;103: 10544–10551.
200. Liu, J., Lin, A. Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword. *Cell Res.* 2005;15: 36–42.
201. Fuchs, S. Y., Adler, V., Buschmann, T., Yin, Z., Wu, X., Jones, S. N. and Ronai, Z. JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev.* 1998;12: 2658–2663.
202. Maundrell, K., Antonsson, B., Magnenat, E., Camps, M., Muda, M., Chabert, C., Gillieron, C., Boschert, U., Vial-Knecht, E., Martinou, J. C. and Arkinstall, S. Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1. *J. Biol. Chem.* 1997;272: 25238–25242.
203. Yamamoto, K., Ichijo, H. and Korsmeyer, S. J. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol. Cell. Biol.* 1999;19: 8469–8478.
204. Kim, B. J., Ryu, S. W. and Song, B. J. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* 2006;281: 21256–21265.
205. Sunayama, J., Tsuruta, F., Masuyama, N. and Gotoh, Y. JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *J. Cell Biol.* 2005;170: 295–304.
206. Chang, L., Kamata, H., Solinas, G., Luo, J. L., Maeda, S., Venuprasad, K., Liu, Y. C. and Karin, M. The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF α -induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell* 2006;124: 601–613.
207. Lu, C., Zhu, F., Cho, Y. Y., Tang, F., Zykova, T., Ma, W. Y., Bode, A. M., Dong, Z. Cell apoptosis: Requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3. *Mol. Cell* 2006;23: 121–132.
208. Widmann, C., Gerwins, P., Johnson, N. L., Jarpe, M. B. and Johnson, G. L. MEK kinase 1, a substrate for DEVD-directed caspases, is involved in genotoxin-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 1998;18: 2416–2429.
209. Ventura, J. J., Hubner, A., Zhang, C., Flavell, R. A., Shokat, K. M. and Davis, R. J. Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol. Cell* 2006;21: 701–710.
210. Brewster, J. L., de Valoir, T., Dyer, N. D., Winter, E. and Gustin, M. C. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 1993;259: 1760–1763.
211. Han, J., Lee, J.-D., Bibbs, L. and Ulevitch, R. J. MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 1994;265, 808–811.
212. Freshney, N. W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J. and Saklatvala, J. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* 1994;78: 1039–1049.

213. Hu, M. C., Wang, Y. P., Mikhail, A., Qiu, W. R. and Tan, T. H. Murine p38-delta mitogen-activated protein kinase, a developmentally regulated protein kinase that is activated by stress and proinflammatory cytokines. *J. Biol. Chem* 1999;274:7095–7102.
214. Takekawa, M., Posas, F. and Saito, H. A human homolog of the yeast Ssk2/Ssk22 MAP kinase kinase kinases, MTK1, mediates stress-induced activation of the p38 and JNK pathways. *EMBO J* 1997;16:4973–4982.
215. Ben-Levy, R., Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H. F. and Marshall, C. J. Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAPkinase-2. *Curr. Biol* 1998;8:1049–1057.
216. Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J. and Davis, R. J. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem* 1995;270:7420–7426.
217. Cook, R., Wu, C. C., Kang, Y. J. and Han, J. The role of the p38 pathway in adaptive immunity. *Cell. Mol. Immunol* 2007;4: 253–259.
218. Dodeller, F. and Schulze-Koops, H. The p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in CD4 T cells. *Arthritis Res. Ther.* 2006;8:205.
219. Rinc'on, M., Enslin, H., Raingeaud, J., Recht, M., Zapton, T., Su, M. S-S., Penix, L. A., Davis, R. J. and Flavell, R. A. Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *EMBO J* 1998;17:2817–2829.
220. Dong, C., Davis, R. J. and Flavell, R. A. MAPkinases in the immune response. *Annu. Rev. Immunol* 2002;20: 55–72.
221. Foltz, I. N., Lee, J. C., Young, P. R. and Schrader, J. W. Hemopoietic growth factors with the exception of interleukin-4 activate the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 1997;272:3296–3301.
222. Cheng, H. L. and Feldman, E. L. Bidirectional regulation of p38 kinase and c-Jun N-terminal protein kinase by insulin-like growth factor-I. *J. Biol. Chem* 1998;273:14560–14565.
223. Yamauchi, J., Nagao, M., Kaziro, Y. and Itoh, H. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by signaling through G protein-coupled receptors. Involvement of Gbetagamma and Galphaq/11 subunits. *J. Biol. Chem.* 1997;272:27771–77.
224. Clerk, A., Michael, A. and Sugden, P. H. Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists, endothelin-1 and phenylephrine: A role in cardiac myocyte hypertrophy? *J. Cell Biol* 1998;142:523–35.
225. Bogoyevitch, M. A., Gillespie-Brown, J., Ketterman, A. J., Fuller, S. J., Ben-Levy, R., Ashworth, A., Marshall, C. J. and Sugden, P. H. Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ. Res* 1996;79:162–173.
226. Kusuhara, M., Takahashi, E., Peterson T. E., Abe, J., Ishida, M., Han, J., Ulevitch, R. and Berk, B. C. p38 Kinase is a negative regulator of angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle cells: Effects on Na⁺/H⁺ exchange and ERK1/2. *Circ. Res* 1998;83:824–831.

227. Reynolds, C. H., Nebreda, A. R., Gibb, G. M., Utton, M. A. and Anderton, B. H. Reactivating kinase/p38 phosphorylates tau protein in vitro. *J. Neurochem.* 1997;69: 191–198.
228. Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E. A. and Saito, H. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Mol. Cell. Biol.* 1997;17:1289–97.
229. Zarubin, T. and Han, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 2005;15:11–18.
230. Rousseau, S., Morrice, N., Pegg, M., Campbell, D. G., Gaestel, M. and Cohen, P. Inhibition of SAPK2a/p38 prevents hnRNP A0 phosphorylation by MAPKAP-K2 and its interaction with cytokine mRNAs. *EMBO J* 2002;21:6505–6514.
231. Bollig, F., Winzen, R., Gaestel, M., Kostka, S., Resch, K. and Holtmann, H. Affinity purification of ARE-binding proteins identifies polyA-binding protein 1 as a potential substrate in MK2-induced mRNA stabilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2003; 301:665–670.
232. Takenaka, K., Moriguchi, T. and Nishida, E. Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest. *Science* 1998;280: 599–602.
233. Yee, A. S., Paulson, E. K., McDevitt, M. A., Rieger-Christ K, Summerhayes, I., Berasi, S. P., Kim, J., Huang, C. Y. and Zhang, X. The HBP1 transcriptional repressor and the p38 MAP kinase: Unlikely partners in G1 regulation and tumor suppression. *Gene* 2004;336: 1–13.
234. Olson, J. M. and Hallahan, A. R. p38 MAP kinase: A convergence point in cancer therapy. *Trends Mol. Med.* 2004;10: 125–129.
235. Bradham, C. and McClay, D. R. p38 MAPK in development and cancer. *Cell Cycle* 2006;5: 824–828.
236. Losa, J. H., Parada Cobo, C., Viniestra, J.G., Sanchez-Arevalo Lobo, V. J., Ramon y Cajal, S. and Sanchez-Prieto, R. Role of the p38 MAPK pathway in cisplatin-based therapy. *Oncogene* 2003;22: 3998–4006.
237. Juo, P., Kuo, C. J., Reynolds, S. E., Konz, R. F., Raingeaud, J., Davis, R. J., Biemann, H. P. and Blenis, J. Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases. *Mol. Cell. Biol.* 1997;17: 24–35.
238. Cardone, M. H., Salvesen, G. S., Widmann, C., Johnson, G. and Frisch, S. M. The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell* 1997;90: 315–323.
239. Iyoda, K., Sasaki, Y., Horimoto, M., Toyama, T., Yakushijin, T., Sakakibara, M., Takehara, T., Fujimoto, J., Hori, M., Wands, J. R. and Hayashi, N. Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003;97: 3017–3026.
240. Allen, M., Svensson, L., Roach, M., Hambor, J., McNeish J. and Gabel, C. A. Deficiency of the stress kinase p38 alpha results in embryonic lethality: Characterization of the kinase dependence of stress responses of enzyme-deficient embryonic stem cells. *J. Exp. Med.* 2000;191: 859–870.
241. Morooka, T. and Nishida, E. Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 1998;273: 24285–24288.

242. Engelman, J. A., Lisanti, M. P. and Scherer, P. E. Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3- L1 adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 1998;273: 32111–32120.
243. de Angelis, L, Zhao, J., Andreucci, J. J., Olson, E. N., Cossu, G. and McDermott, J. C. Regulation of vertebrate myotome L. development by the p38 MAP kinase-MEF2 signaling pathway. *Dev. Biol.* 2005;283: 171–179
244. Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P, et al. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 1984;307(5951):521–7.
245. Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 1993;53(15):3579–84.
246. Grandis JR, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, et al. Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(11):824–32.
247. Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH, et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 2002;62(24):7350–6.
248. Gupta AK, McKenna WG, Weber CN, Feldman MD, Goldsmith JD, Mick R, et al. Local recurrence in head and neck cancer: relationship to radiation resistance and signal transduction. *Clin Cancer Res* 2002;8(3):885–92.
249. Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, Jelinek J, Tang H, Liu DD, et al. Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients
250. Quon H, Liu FF, Cummings BJ. Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 2001;23(2):147–59.
251. Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, Lango MN, Xi S, Hunt JL, et al. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res* 2006;12(17):5064–73.
252. Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7(2):79–94.
253. Gschwind A, Zwick E, Prenzel N, Leserer M, Ullrich A. Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene* 2001;20(13):1594–600.
254. Song JI, Grandis JR (2000). STAT signaling in head and neck cancer. *Oncogene* 19:2489-2495.
255. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49(17):4682–9.
256. Saranath D, Chang SE, Bhoite LT, Panchal RG, Kerr IB, Mehta AR, et al. High frequency mutation in codons 12 and 61 of H-ras oncogene in chewing tobacco-related human oral carcinoma in India 1991;63(4):573–8.
257. Das N, Majumder J, DasGupta UB. ras gene mutations in oral cancer in eastern India. *Oral Oncol* 2000;36(1):76–80.
258. Clark LJ, Edington K, Swan IR, McLay KA, Newlands WJ, Wills LC, et al. The absence of Harvey ras mutations during development and progression of squamous cell carcinomas of the head and neck 1993;68(3):617–20.

259. Feng DY, Zheng H, Tan Y, Cheng RX. Effect of phosphorylation of MAPK and Stat3 and expression of c-fos and c-jun proteins on hepatocarcinogenesis and their clinical significance. *World J Gastroenterol*, 2001;7(1):33-36
260. Park JI, Strock CJ, Ball DW, Nelkin BD. The Ras/Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway induces autocrine-paracrine growth inhibition via the leukemia inhibitory factor/JAK/STAT pathway. *Mol Cell Biol*. 2003 Jan;23(2):543-54
261. Darnell JE. Validating Stat3 in cancer therapy. *Nat Med* 2005;11(6):595–6.
262. Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 2002;109(9):1139–42.
263. Grandis JR, Drenning SD, Zeng Q, Watkins SC, Melhem MF, Endo S, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(8):4227–32.
264. Rubin Grandis J, Zeng Q, Drenning SD. Epidermal growth factor receptor--mediated stat3 signaling blocks apoptosis in head and neck cancer. *Laryngoscope* 2000;110(5 Pt 1):868.
265. Leeman RJ, Lui VW, Grandis JR. STAT3 as a therapeutic target in head and neck cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2006;6(3):231–41.
266. Masuda M, Suzui M, Yasumatu R, Nakashima T, Kuratomi Y, Azuma K, et al. Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2002;62(12):3351–5.
267. Kar P, Supakar PC. Expression of Stat5A in tobacco chewing-mediated oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 2006;240(2):306–11.
268. Xi S, Zhang Q, Gooding WE, Smithgall TE, Grandis JR. Constitutive activation of Stat5b contributes to carcinogenesis in vivo. *Cancer Res* 2003;63(20):6763–71.
269. Sriuranpong V, Park JI, Amornphimoltham P, Patel V, Nelkin BD, Gutkind JS. Epidermal growth factor receptor-independent constitutive activation of STAT3 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated by the autocrine/paracrine stimulation of the interleukin 6/gp130 cytokine system. *Cancer Res* 2003;63(11):2948–56.
270. Lai SY, Childs EE, Xi S, Coppelli FM, Gooding WE, Wells A, et al. Erythropoietin-mediated activation of JAK-STAT signaling contributes to cellular invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2005;24(27):4442–9.
271. Weber A, Hengge UR, Bardenheuer W, Tischoff I, Sommerer F, Markwarth A, et al. SOCS-3 is frequently methylated in head and neck squamous cell carcinoma and its precursor lesions and causes growth inhibition. *Oncogene* 2005;24(44):6699–708.
272. Lee TL, Yeh J, Van Waes C, Chen Z. Epigenetic modification of SOCS-1 differentially regulates STAT3 activation in response to interleukin-6 receptor and epidermal growth factor receptor signaling through JAK and/or MEK in head and neck squamous cell carcinomas. *Mol Cancer Ther* 2006;5(1):8–19.
273. Kijima T, Niwa H, Steinman RA, Drenning SD, Gooding WE, Wentzel AL, et al. STAT3 activation abrogates growth factor dependence and contributes to

- head and neck squamous cell carcinoma tumor growth in vivo. *Cell Growth Differ* 2002;13:355-362.
274. Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW et al. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:1369-1379.
 275. Ondrey FG, Dong G, Sunwoo J, Chen Z, Wolf JS, Crowl-Bancroft CV, et al. Constitutive activation of transcription factors NF-(kappa)B, AP-1, and NF-IL6 in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines. *Mol Carcinogen* 1999;26:119-129.
 276. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 2007;26:3279–3290
 277. Wada T, Penniger J Mitogen-activated kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 2004;23:2838–2849
 278. Riebe C, Pries R, Kemkers A, Wollenberg B. Increased cytokine secretion in head and neck cancer upon p38 mitogenactivated protein kinase activation. *Int J Mol Med* 2007;20:883–887
 279. Junttila MR, Ala-Aho R, Jokilehto T, Peltonen J, Kallajoki M, Grenman R, Jaakkola P, Westermarck J, Kaˆhaˆri VM. p38alpha and p38delta mitogen-activated protein kinase isoforms regulate invasion and growth of head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene* 2007;26:5267–5279
 280. Aguirre-Ghiso JA, Estrada Y, Liu D, Ossowski L ERK(-MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK). *Cancer Res* 2003;63:1684–1695
 281. Luangdilok S, Box C, Harrington K, Rhyˆs-Evans P, Eccles S. MAPK and PI3K signalling differentially regulate angiogenic and lymphangiogenic cytokine secretion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer* 2011;47:520–529
 282. Brozovic A, Osmak M. Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance. *Cancer Lett* 2007;251:1–16
 283. Masuda M, Toh S, Koike K, Kuratomi Y, Suzui M, Deguchi A, Komiyama S, Weinstein IB. The roles of JNK1 and Stat3 in the response of head and neck cancer cell lines to combined treatment with all-trans-retinoic acid and 5-fluorouracil. *Jpn J Cancer Res* 2002;93:329–339
 284. Boivin A, Hanot M, Malesys C, Maalouf M, Rousson R, Rodriguez-Lafrasse C, Ardail D. Transient alteration of cellular redox buffering before irradiation triggers apoptosis in head and neck carcinoma stem and non-stem cells. *PLoS One* 2011 ;6:e14558
 285. Goˆroˆgh T, Berwig J, Scola N, Lippert BM. Differential regulation of MAPK (JNK 3) gene expression in human head and neck squamous cell carcinomas. *Onkologie* 2004;27:353–357
 286. Gross ND, Boyle JO, Du B, Kekatpure VD, Lantowski A, Thaler HT, Weksler BB, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Inhibition of Jun NH2-terminal kinases suppresses the growth of experimental head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:5910–5917
 287. Smalley KS. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *Int J Cancer* 2003;104:527–532

288. Liang B, Wang S, Zhu XG, Yu YX, Cui ZR, Yu YZ. Increased expression of mitogen-activated protein kinase and its Oncol Rev upstream regulation signal in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005;11:623–628
289. Gan Y, Shi C, Inge L, Hibner M, Balducci J, Huang Y. Differential roles of ERK and Akt pathways in regulation of EGFR-mediated signaling and motility in prostate cancer cells. *Oncogene* 2010;29:4947–4958
290. Mishima K, Yamada E, Masui K, Shimokawara T, Takayama K, Sugimura M, Ichijima K. Overexpression of the ERK/MAP kinases in oral squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* 1998;11:886–891
291. Albanell J, Codony-Servat J, Rojo F, Del Campo JM, Sauleda S, Anido J, Raspall G, Giralt J, Rosello` J, Nicholson RI, Mendelsohn J, Baselga J. Activated extracellular signal-regulated kinases: association with epidermal growth factor receptor/ transforming growth factor alpha expression in head and neck squamous carcinoma and inhibition by anti-epidermal growth factor receptor treatments. *Cancer Res* 2001;61:6500–6510
292. Wang L, Liu T, Nishioka M, Aguirre RL, Win S, Okada N. Activation of ERK1/2 and cyclin D1 expression in oral tongue squamous cell carcinomas: relationship between clinicopathological appearances and cell proliferation. *Oral Oncol* 2006;42:625–631
293. Richter P, Bo`hmer F, Hindermann W, Borsi L, Hyckel P, Schleier P, Katenkamp D, Kosmehl H, Berndt A. Analysis of activated EGFR signalling pathways and their relation to laminin-5 gamma2 chain expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Histochem Cell Biol* 2005;124:151–160
294. Serewko MM, Popa C, Dahler AL, Smith L, Strutton GM, Coman W, Dicker AJ, Saunders NA. Alterations in gene expression and activity during squamous cell carcinoma development. *Cancer Res* 2002;62:3759–3765
295. Roman E, Meza-Zepeda LA, Kresse SH, Myklebost O, Vasstrand EN, Ibrahim SO. Chromosomal aberrations in head and neck squamous cell carcinomas in Norwegian and Sudanese populations by array comparative genomic hybridization. *Oncol Rep* 2008;20:825–843
296. Bancroft CC, Chen Z, Dong G, Sunwoo JB, Yeh N, Park C, Van Waes C. Coexpression of proangiogenic factors IL-8 and VEGF by human head and neck squamous cell carcinoma involves coactivation by MEK-MAPK and IKK-NF-kappaB signal pathways. *Clin Cancer Res* 2001;7:435–442
297. Zeng Q, Li S, Chepeha DB, Giordano TJ, Li J, Zhang H, Polverini PJ, Nor J, Kitajewski J, Wang CY. Crosstalk between tumor and endothelial cells promotes tumor angiogenesis by MAPK activation of Notch signaling. *Cancer Cell* 2005;8:13–23
298. Affolter A, Fruth K, Brochhausen C, Schmidtmann I, Mann WJ, Brieger J. Activation of mitogen-activated protein kinase extracellular signal-related kinase in head and neck squamous cell carcinomas after irradiation as part of a rescue mechanism. *Head Neck* 2011 ;33(10):1448-57.
299. Tosi L, Rinaldi E, Carinci F, Farina A, Pastore A, Pelucchi S, Cassano L, Evangelisti R, Carinci P, Volinia S. Akt, protein kinase C, and mitogen-activated protein kinase phosphorylation status in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2005;27:130–137
300. Garavello W, Nicolini G, Aguzzi A, Maggioni D, Leone BE, Vigano` P, Gaini RM, Tredici G. Selective reduction of extracellular signal-regulated protein

- kinase (ERK) phosphorylation in squamous cell carcinoma of the larynx. *Oncol Rep* 2006 ;16:479–484
301. Aguzzi A, Maggioni D, Nicolini G, Tredici G, Gaini RM, Garavello W. MAP kinase modulation in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Anticancer Res* 2009;29:303–308 72.
 302. Mukhopadhyay S, Munshi HG, Kambhampati S, Sassano A, Plataniotis LC, Stack MS. Calcium-induced matrix metalloproteinase 9 gene expression is differentially regulated by ERK1/2 and p38 MAPK in oral keratinocytes and oral squamous cell carcinoma. *J Biol Chem* 2004;279:33139–33146
 303. Kumagai S, Kojima S, Imai K, Nakagawa K, Yamamoto E, Kawahara E, Nakanishi I. Immunohistologic distribution of basement membrane in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 1994;16:51–57
 304. Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Beppu M, Hiraki A, Takeuchi H, Shirasuna K. Expression of MMPS, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck* 1999;21:627–638
 305. Chen P, Hsieh YS, Chiang CL, Chiou HL, Yang SF, Chu SC. Silibinin inhibits invasion of oral cancer cells by suppressing the MAPK pathway. *J Dent Res* 2006;85:220–225
 306. Zhang X, Blenis J, Li H-C, Schindler C and Chen-Kiang S.. *Science*, 1995;267:1990 ± 1994.
 307. Wen Z, Zhong Z and Darnell Jr JE.. *Cell*, 1995;82: 241 ±250.
 308. David M, Petricoin E III, Benjamin C, Pine R, Weber MJ and Larner AC.. *Science*, 1995;269: 1721 ± 1723.
 309. Chung J, Uchida E, Grammer TC and Blenis J.. *Mol. Cell. Biol.*, 1997;17: 6508 ± 6516.
 310. Jain N, Zhang T, Fong SL, Lim CP, Cao X. Repression of Stat3 activity by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Oncogene*. 1998;17:3157-67.
 311. Zhu X, Wen Z, Xu ZL and Darnell Jr JE.. *Mol. Cell. Biol.*, 1997;17: 6618 ± 6623.
 312. Krasilnikov M, Ivanov VN, Dong J, Ronai Z. ERK and PI3K negatively regulate STAT-transcriptional activities in human melanoma cells: implications towards sensitization to apoptosis. *Oncogene*. 2003 ;22:4092-101.
 313. Cacalano NA, Sanden D and Johnston JA.. *Nat. Cell Biol.*, 2001;3: 460–465.
 314. Irie-Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, Opavsky A, Cheng M, Welstead G, Griffiths E, Krawczyk C, Richardson CD, Aitken K, Iscove N, Koretzky G, Johnson P, Liu P, Rothstein DM and Penninger JM.. *Nature*, 2001;409: 349–354.
 315. Paumelle R, Tulasne D, Kherrouche Z, Plaza S, Leroy C, Reveneau S, Vandebunder B, Fafeur V and Tulashe D.. *Oncogene*, 2002;21: 2309–2319.
 316. von Gise A, Lorenz P, Wellbrock C, Hemmings B, Berberich-Siebelt F, Rapp UR and Troppmair J.. *Mol. Cell. Biol.*, 2001;21: 2324–2336.
 317. Edwards E, Geng L, Tan J, Onishko H, Donnelly E and Hallahan DE.. *Cancer Res.*, 2002;62: 4671–4677.
 318. Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., and Levine, B. *Mol Cell* 2008;30: 678–688
 319. Gupta, R. K., Bhatia, V., Poptani, H., and Gujral, R. B. *J Pediatr* 1995;126: 389–392

320. Galcheva-Gargova, Z., De'rijard, B., Wu, I. H., and Davis, R. J. *Science* 1994;265: 806–808
321. Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., and White, M. F. *J. Biol. Chem.* 2000;275: 9047–9054
322. Chen, C. Y., Del Gatto-Konczak, F., Wu, Z., and Karin, M. *Science* 1998;280:1945–1949
323. Shirakawa T, Kawazoe Y, Tsujikawa T, Jung D, Sato S, Uesugi M. Deactivation of STAT6 through serine 707 phosphorylation by JNK. *J Biol Chem.* 2011;286:4003-10.
324. Lim CP, Cao X. Serine phosphorylation and negative regulation of Stat3 by JNK. *J Biol Chem.* 1999;274:31055-61.
325. Miyazaki T, Bub JD, Iwamoto Y. c-Jun NH(2)-terminal kinase mediates leptin-stimulated androgen-independent prostate cancer cell proliferation via signal transducer and activator of transcription 3 and Akt. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1782:593-604.
326. Ahmed, S. T., Ivashkiv, L. B. Inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and stat activation by inflammatory and stress pathways. *J. Immunol.* 2000;165:5227–5237.
327. Bode, J. G., Nimmesgern, A., Schmitz, J., Schaper, F., Schmitt, M., Frisch, W., Haussinger, D., Heinrich, P. C., Graeve, L. LPS and TNFalpha induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages. *FEBS Lett.* 1999;463: 365–370.
328. Schmitz, J., Weissenbach, M., Haan, S., Heinrich, P. C., Schaper, F. SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J. Biol. Chem.* 2000;275: 12848–12856.
329. Nicholson, S. E., De Souza, D., Fabri, L. J., Corbin, J., Willson, T. A., Zhang, J. G., Silva, A., Asimakis, M., Farley, A., Nash, A. D., Metcalf, D., Hilton, D. J., Nicola, N. A., Baca, M. Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000;97:6493–6498
330. Tian, Z., Shen, X., Feng, H., Gao, B. IL-1beta attenuates IFNalpha-induced antiviral activity and STAT1 activation in the liver: involvement of proteasome-dependent pathway. *J. Immunol.* 2000;165: 3959–3965.
331. Ahmed ST, Mayer A, Ji JD, Ivashkiv LB. Inhibition of IL-6 signaling by a p38-dependent pathway occurs in the absence of new protein synthesis. *J Leukoc Biol.* 2002;72:154-62.
332. Seki, E., Tsutsui, H., Nakano, H., Tsuji, N., Hoshino, K., Adachi, O., Adachi, K., Futatsugi, S., Kuida, K., Takeuchi, O., Okamura, H., Fujimoto, J., Akira, S., Nakanishi, K. Lipopolysaccharide-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of myeloid differentiation factor 88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1beta. *J. Immunol.* 2001;166: 2651–2657.
333. Bright, J. J., Kerr, L. D., Sriram, S. TGF-beta inhibits IL-2-induced tyrosine phosphorylation and activation of Jak-1 and Stat 5 in T lymphocytes. *J. Immunol.* 1997;159: 175–183.
334. Decker, T., Kovarik, P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 2000;19:2628–2637.

335. Bowie, A. G., O'Neill, L. A. Vitamin C inhibits NF-kappaB activation by TNF via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Immunol.* 2000;165: 7180–7188.
336. Pesu M, Aittomäki S, Takaluoma K, Lagerstedt A, Silvennoinen O. p38 Mitogen-activated protein kinase regulates interleukin-4-induced gene expression by stimulating STAT6-mediated transcription. *J Biol Chem.* 2002;277:38254-61.
337. McMurray J. S., A New Small-Molecule Stat3 Inhibitor. *Chem. Biol.* 2006;13:1123–1124.
338. Nam S, Buettner R, Turkson J, Kim D, Cheng JQ, et al. Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells., *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 205;102:5998-6003.
339. Mohapatra S, Chu B, Wei S, Djeu J, Epling-Burnette PK, Loughran T, Jove R, Pledger WJ. Roscovitine inhibits STAT5 activity and induces apoptosis in the human leukemia virus type 1-transformed cell line MT-2. *Cancer Res.* 2003;63:8523–30.
340. Nagashima S, Yokota M, Nakai E, Kuromitsu S, Ohga K, Takeuchi M, Tsukamoto S, Ohta M. Synthesis and evaluation of 2-{{[2-(4-hydroxyphenyl)-ethyl]amino}pyrimidine-5-carboxamide derivatives as novel STAT6 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2007;15:1044–1 055.
341. Iwamaru A, Szymanski S, Iwado E, Aoki H, Yokoyama T, Fokt I, Hess K, Conrad C, Madden T, Sawaya R, Kondo S, Priebe W, Kondo Y. A novel inhibitor of the STAT3 pathway induces apoptosis in malignant glioma cells both in vitro and in vivo. *Oncogene* 2007; 26:2435 –2444.
342. Berg T. Signal transducers and activators of transcription as targets for small organic molecules. *Chembiochem.* 2008;9:2039-44.
343. Hautzel et al. Screening of Basidiomycetes and Ascomycetes for Plant Growth Regulating Substances. Introduction of the Gibberellic Acid Induced de-novo Synthesis of Hydrolytic Enzymes in Embryoless Seeds in *Triticum aestivum* as Test System. *Z. Naturforsch.* 1990;45c:1093-1098.
344. Weidler M, Rether J, Anke T, Erkel G. Inhibition of interleukin-6 signaling by galiellalactone. *FEBS Lett.* 2000;484:1–6.
345. Johansson M., Sterner O, Synthesis of (-)-galiellalactone. *J. Antibiot.* 2002; 55:663–6 65.
346. Johansson M, Sterner O. Synthesis of (+)-galiellalactone. Absolute configuration of galiellalactone. *Org. Lett.* 2001; 3:2843–2 845.
347. Turkson J, Zhang S, Mora LB, Burns A, Sebt S, Jove R. A novel platinum compound inhibits constitutive Stat3 signaling and induces cell cycle arrest and apoptosis of malignant cells. *J. Biol. Chem.* 2005;280:3297 9–32988.
348. Coleman DR 4th, Ren Z, Mandal PK, Cameron AG, Dyer GA, Muranjan S, Campbell M, Chen X, McMurray JS. Investigation of the binding determinants of phosphopeptides targeted to the SRC homology 2 domain of the signal

- transducer and activator of transcription 3. Development of a high-affinity peptide inhibitor, *J. Med. Chem.* 2005; 48: 6661–6670.
349. Turkson J, Ryan D, Kim JS, Zhang Y, Chen Z, Haura E, Laudano A, Sebti S, Hamilton AD, Jove R. Phosphotyrosyl peptides block Stat3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:45443–45455.
 350. Ren Z, Cabell LA, Schaefer TS, McMurray JS. Identification of a high-affinity phosphopeptide inhibitor of Stat3. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003;13:633–636.
 351. Mandal PK, Heard PA, Ren Z, Chen X, McMurray JS. Solid-phase synthesis of Stat3 inhibitors incorporating O-carbamoylserine and O-carbamoylthreonine as glutamine mimics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007;17:654–656.
 352. Chen J, Nikolovska-Coleska Z, Yang CY, Gomez C, Gao W, Krajewski K, Jiang S, Roller P, Wang S. Design and synthesis of a new, conformationally constrained, macrocyclic small-molecule inhibitor of STAT3 via 'click chemistry'. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007;17:3939–3942.
 353. Stolzenberger S, Haake M, Duschl A. Specific inhibition of interleukin-4-dependent Stat6 activation by an intracellularly delivered peptide. *Eur. J. Biochem.* 2001; 268:4809–4814.
 354. McCusker CT, Wang Y, Shan J, Kinyanjui MW, Villeneuve A, Michael H, Fixman ED. Inhibition of experimental allergic airways disease by local application of a cell-penetrating dominant-negative STAT-6 peptide. *J. Immunol.* 2007;179:2556–2564.
 355. Turkson J, Kim JS, Zhang S, Yuan J, Huang M, Glenn M, Haura E, Sebti S, Hamilton AD, Jove R. Novel peptidomimetic inhibitors of signal transducer and activator of transcription 3 dimerization and biological activity. *Mol. Cancer Ther.* 2004; 3:261–269.
 356. Song H, Wang R, Wang S, Lin J. A low-molecular-weight compound discovered through virtual database screening inhibits Stat3 function in breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005;102: 4700–4705.
 357. Siddiquee K, Zhang S, Guida WC, Blaskovich MA, Greedy B, Lawrence HR et al. Selective chemical probe inhibitor of Stat3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007;104:7391–7396.
 358. Bhasin D, Cisek K, Pandharkar T, Regan N, Li C, Pandit B, Lin J, Li PK. Design, synthesis, and studies of small molecule STAT3 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008;18:391–395.
 359. Schust J, Sperl B, Hollis A., Mayer T.U, Berg T. Stattic: A Small-Molecule Inhibitor of STAT3 Activation and Dimerization. *Chem. Biol.* 2006;13:1235–1242.
 360. J. Schust, T. Berg, *Anal. Biochem.* 2004; 330:114–118.
 361. Vinkemeier U, Moarefi I, Darnell JE Jr, Kuriyan J. Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science* 1998; 279:1048–1052.

362. Timofeeva OA, Gaponenko V, Lockett SJ, Tarasov SG, Jiang S, Michejda CJ, Perantoni AO, Tarasova NI. Rationally designed inhibitors identify STAT3 N-domain as a promising anticancer drug target. *ACS Chem. Biol.* 2007;2:799–809.
363. Marais R, Light Y, Paterson HF, Mason CS, Marshall CJ. Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1997; 272: 4378-4383.
364. Davies H, Bignell GR, Cox C, *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-954.
365. Cohen Y, Xing M, Mambo E, *et al.* BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 625-627.
366. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, *et al.* High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: Genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63:1454-1457.
367. Singer G, Oldt R, 3rd, Cohen Y, *et al.* Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 484-486.
368. Wong KK, Gershenson D. The continuum of serous tumors of low malignant potential and low-grade serous carcinomas of the ovary. *Dis Markers* 2007; 23: 377-387.
369. Forbes SA, Bhamra G, Bamford S, *et al.* The catalogue of somatic mutations in cancer (COSMIC). *Curr Protoc Hum Genet* 2008; Chapter 10:Unit 10-11.
370. Calipel A, Lefevre G, Pouponnot C, *et al.* Mutation of B-Raf in human choroidal melanoma cells mediates cell proliferation and transformation through the MEK/ERK pathway. *J Biol Chem* 2003; 278: 42409-42418.
371. Hingorani SR, Jacobetz MA, Robertson GP, *et al.* Suppression of BRAF(V599E) in human melanoma abrogates transformation. *Cancer Res* 2003; 63: 5198-5202.
372. Karasarides M, Chiloehes A, Hayward R, *et al.* B-RAF is a therapeutic target in melanoma. *Oncogene* 2004; 23: 6292-6298.
373. Gross I, Bassit B, Benezra M, Licht JD. Mammalian sprout proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation. *J Biol Chem* 2001; 276: 46460-46468.
374. Tsavachidou D, Coleman ML, Athanasiadis G, *et al.* SPRY2 is an inhibitor of the ras/extracellular signal-regulated kinase pathway in melanocytes and melanoma cells with wild-type BRAF but not with the V599E mutant. *Cancer Res* 2004; 64: 5556-5559.
375. Wong KK. Recent developments in anti-cancer agents targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2009;4:28-35
376. Abel, U., Deppe, H., Feurer, A., Gradler, U., Goutopoulos, A., Schwarz, M.: US20070293544 (2007).
377. Aftab, D., Laird, D., Lamb, P., Martini, J.: WO2008021389 (2008).

378. Albaugh, P., Chopiuk, G., Ding, Q., Huang, S., Liu, Z., Pan, S., Ren, P., Wang, X., Wang, X., Xie, Y., Zhang, C., Zhang, Q., Zhang, G., Poon, D.M.: WO2008042639 (2008).
379. Aquila, B., Cook, D., Johnstone, C. Lee, S., Lyne, P., Rudge, D., Vasbinder, M., Wang, H.: WO2008020203 (2008).
380. Aquila, B., Lyne, P., Pontz, T.: WO2007113558 (2007).
381. Bruge, D., Buchstaller, H-P., Finsinger, D., Baumgarth, M., Sirrenberg, C., Zenke, F., Amendt, C., Grell, M.: US20070213374(2007).
382. Flynn, D., Petillo, P., Kaufman, M., Patt, W.: US20080114006 (2008).
383. Gould, A., Greenspan, P., Vos, T.: WO2008030448 (2008).
384. Johnson, D., Sarma, J., Subrahmanyam, D., Sudarsanam, S., Grant, F.: WO2008042867 (2008).
385. Lapierre, J., Namdev, N., Ashwell, M., France, D. S., Hui W., Hutchins, P. M., Tandon, M., Liu, Y., Link, J. S., Ali, S. M., Brassard, C. J., Nicewonger, R. B. , Filikov, A., Carazza, R. J.: WO2007123892 (2007).
386. Savy, P., Price, S., Dyke, H. J., Montana, J. G., Williams, K., Stanley, M. S., Bao, L.: US20080081821 (2008).
387. Lamb, P.: WO2008076415 (2008).
388. Rinehart J, Adjei AA, Lorusso PM, *et al.* Multicenter phase II study of the oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non-small-cell lung, breast, colon, and pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4456-4462.
389. Thompson N, Lyons J. Recent progress in targeting the Raf/MEK/ERK pathway with inhibitors in cancer drug discovery. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5: 350-356.
390. Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, *et al.* BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* 2006; 439: 358-362.
391. Dean, D. K., Takle, A. K., Wilson, D. M.: US20077199137 (2007).
392. Steadman, J. G., Takle, A. K.: US20077235658 (2007).
393. Takle AK, Brown MJ, Davies S, *et al.* The identification of potent and selective imidazole-based inhibitors of B-Raf kinase. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16: 378-381.
394. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2012;16:103-19
395. King AJ, Patrick DR, Batorsky RS, *et al.* Demonstration of a genetic therapeutic index for tumors expressing oncogenic BRAF by the kinase inhibitor SB-590885. *Cancer Res.* 2006; 66:11100–5.
396. Lui VW, Peyser ND, Ng PK, Hritz J, Zeng Y, Lu Y, Li H, Wang L, Gilbert BR, General IJ, Bahar I, Ju Z, Wang Z, Pendleton KP, Xiao X, Du Y, Vries JK, Hammerman PS, Garraway LA, Mills GB, Johnson DE, Grandis JR. Frequent mutation of receptor protein tyrosine phosphatases provides a mechanism for STAT3 hyperactivation in head and neck cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(3):1114-9.

397. Leeman RJ, Lui VW and Grandis JR: STAT3 as a therapeutic target in head and neck cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6: 231-241.
398. Chen Z, Gibson TB, Robinson F, *et al*: MAP kinases. *Chem Rev* 2001;101: 2449-2476.
399. Maggioni D, Gaini R, Nicolini G, *et al*: MAPKs activation in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncol Rev* 2011;5: 223-231.
400. Lee SH, Lee JW, Soung YH, *et al*: Colorectal tumors frequently express phosphorylated mitogen-activated protein kinase. *APMIS* 2004;112: 233-238.
401. Bessard A, Frémin C, Ezan F, *et al*: RNAi-mediated ERK2 knockdown inhibits growth of tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* 2008;27: 5315-5325.
402. Obajimi O and Melera P: Suppression of ERK1/2 with siRNA restores drug sensitivity in DU145 cells selected for resistance to AG2034 (abstract 77). *Cancer Res* 2010;70: Suppl 1.
403. Smalley KS: A pivotal role for ERK in the oncogenic behavior of malignant melanoma? *Int J Cancer* 2003;104: 527-532.
404. Gao J, Zhao Y, Lv Y, *et al*: Mirk/Dyrk1B mediates G0/G1 to S phase cell cycle progression and cell survival involving MAPK/ ERK signaling in human cancer cells. *Cancer Cell Int* 2013;13: 2.
405. Balmanno K and Cook SJ: Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ* 2009;16: 368-377.
406. Mishima K, Yamada E, Masui K, Shimokawara T, Takayama K, Sugimura M, Ichijima K. Overexpression of the ERK/MAP kinases in oral squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* 1998;11:886–891.
407. Wang L, Liu T, Nishioka M, Aguirre RL, Win S, Okada N. Activation of ERK1/2 and cyclin D1 expression in oral tongue squamous cell carcinomas: relationship between clinicopathological appearances and cell proliferation. *Oral Oncol* 2006; 42:625–631.
408. Psyrris A, Lee JW, Pectasides E, Vassilakopoulou M, Kosmidis EK, Burtress BA, Rimm DL, Wanebo HJ, Forastiere AA. Prognostic biomarkers in phase II trial of cetuximab-containing induction and chemoradiation in resectable HNSCC: Eastern cooperative oncology group E2303. *Clin Cancer Res*. 2011;20(11):3023-32.
409. Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, *et al*: Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 1996;271: 20608-20616.
410. Zhao Y, Lv M, Lin H, *et al*: Rho-associated protein kinase isoforms stimulate proliferation of vascular smooth muscle cells through ERK and induction of cyclin D1 and PCNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;432: 488-493.
411. Si H, Peng C, Li J, Wang X, *et al*: RNAi-mediated knockdown of ERK1/2 inhibits cell proliferation and invasion and increases chemosensitivity to cisplatin in human osteosarcoma U2-OS cells *in vitro*. *Int J Oncol* 2012;40: 1291-1297.
412. Dumesic PA, Scholl FA, Barragan DI and Khavari PA: Erk1/2 MAP kinases are required for epidermal G2/M progression. *J Cell Biol* 2009;185: 409-422.
413. Duvvuri U, ShiwarSKI DJ, Xiao D, *et al*: TMEM16A induces MAPK and contributes directly to tumorigenesis and cancer progression. *Cancer Res* 2012;72: 3270-3281.

414. Judd NP, Winkler AE, Murillo-Sauca O, *et al*: ERK1/2 regulation of CD44 modulates oral cancer aggressiveness. *Cancer Res* 2012;72:365-374.
415. Katada K, Tomonaga T, Satoh M, *et al*: Plectin promotes migration and invasion of cancer cells and is a novel prognostic marker for head and neck squamous cell carcinoma. *J Proteomics* 2012;75:1803-1815.
416. Zuo JH, Zhu W, Li MY, *et al*: Activation of EGFR promotes squamous carcinoma SCC10A cell migration and invasion via inducing EMT-like phenotype change and MMP-9-mediated degradation of E-cadherin. *J Cell Biochem* 2011;112: 2508-2517.
417. Chen B, Liu J, Chang Q, Beezhold K, Lu Y, Chen F. JNK and STAT3 signaling pathways converge on Akt-mediated phosphorylation of EZH2 in bronchial epithelial cells induced by arsenic. *Cell Cycle*. 2013;12:112-21.
418. Sau A, Filomeni G, Pezzola S, D'Aguanno S, Tregno F.P, Urbani A, Serra M, Pasello M, Picci P, Federici G, Caccuri A.M. Targeting GSTP1-1 induces JNK activation and leads to apoptosis in cisplatin-sensitive and -resistant human osteosarcoma cell lines. *Mol. Biosyst.* 2012;8:994–1006.
419. Tang R.X, . Kong F.Y, Fan B.F, Liu X.M, You H.J, Zhang P, Zheng K.Y. HBx activates FasL and mediates HepG2 cell apoptosis through MLK3-MKK7-JNK signal module. *World J. Gastroenterol.* 2012;18:1485–1495.
420. Sui X, Kong N, Ye L, Han W, Zhou J, Zhang Q, He C, Pan H. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Lett.* 2014;344:174-179.
421. Chen F. JNK-induced apoptosis, compensatory growth, and cancer stem cells. *Cancer Res* 2012; 72:379-386.
422. Bubici C, Papa S. JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets. *Br J Pharmacol.* 2014;171:24-37.
423. Seki E, Brenner DA, Karin M. A liver full of JNK: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches. *Gastroenterology* 2012;143: 307–320.
424. Leventaki V, Drakos E, Medeiros LJ, Lim MS, Elenitoba-Johnson KS, Claret FX, Rassidakis GZ. NPM-ALK oncogenic kinase promotes cell-cycle progression through activation of JNK/cJun signaling in anaplastic large-cell lymphoma. *Blood.* 2007;110:1621-1630.
425. Jia G, Kong R, Ma ZB, Han B, Wang YW, Pan SH, Li YH, Sun B. The activation of c-Jun NH2-terminal kinase is required for dihydroartemisinin-induced autophagy in pancreatic cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014;33:8.
426. Shi Y, Nikulenkov F, Zawacka-Pankau J, Li H, Gabdoulline R, Xu J, Eriksson S, Hedström E, Issaeva N, Kel A, Arnér ES, Selivanova G. ROS-dependent activation of JNK converts p53 into an efficient inhibitor of oncogenes leading to robust apoptosis. *Cell Death Differ.* 2014;21(4):612-23.
427. Gross ND, Boyle JO, Du B, Kekatpure VD, Lantowski A, Thaler HT, Weksler BB, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Inhibition of Jun NH2-terminal kinases suppresses the growth of experimental head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:5910–5917.

428. Boivin A, Hanot M, Malesys C, Maalouf M, Rousson R, Rodriguez-Lafrasse C, Ardail D. Transient alteration of cellular redox buffering before irradiation triggers apoptosis in head and neck carcinoma stem and non-stem cells. *PLoS One*. 2011;6(1):e14558.
429. Chen YH, Hao LJ, Hung CP, Chen JW, Leu SF, Huang BM. Apoptotic effect of cisplatin and cordycepin on OC3 human oral cancer cells. *Chin J Integr Med*. 2014;20(8):624-32.
430. Yunoki T, Kariya A, Kondo T, Hayashi A, Tabuchi Y. The combination of silencing BAG3 and inhibition of the JNK pathway enhances hyperthermia sensitivity in human oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Lett*. 2013;335(1):52-57.
431. Chen HM, Liu CM, Yang H, Chou HY, Chiang CP, Kuo MY. 5-aminolevulinic acid induce apoptosis via NF- κ B/JNK pathway in human oral cancer Ca9-22 cells. *J Oral Pathol Med*. 2011;40(6):483-9.
432. Kim JH, Chakravarti N, Oridate N, Choe C, Claret FX, Lotan R. N-(4-hydroxyphenyl) retinamide-induced apoptosis triggered by reactive oxygen species is mediated by activation of MAPKs in head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene*. 2006;25(19):2785-94.
433. Hour MJ, Lee KH, Chen TL, Lee KT, Zhao Y, Lee HZ. Molecular modelling, synthesis, cytotoxicity and anti-tumour mechanisms of 2-aryl-6-substituted quinazolinones as dual-targeted anti-cancer agents. *Br J Pharmacol*. 2013;169(7):1574-86.
434. Bhattarai G, Lee YH, Lee NH, Lee IK, Yun BS, Hwang PH, Yi HK. Fomitocide-K from *Fomitopsis nigra* induces apoptosis of human oral squamous cell carcinomas (YD-10B) via mitochondrial signaling pathway. *Biol Pharm Bull*. 2012;35(10):1711-9.
435. Sakai T, Banno Y, Kato Y, Nozawa Y, Kawaguchi M. Pepsin-digested bovine lactoferrin induces apoptotic cell death with JNK/SAPK activation in oral cancer cells. *J Pharmacol Sci*. 2005;98(1):41-8.
436. Zhang S, Wang XL, Gan YH, Li SL. Activation of c-Jun N-terminal kinase is required for mevastatin-induced apoptosis of salivary adenoid cystic carcinoma cells. *Anticancer Drugs*. 2010;21(7):678-86.
437. Li Q, Song XM, Ji YY, Jiang H, Xu LG. The dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD8055 inhibits head and neck squamous cell carcinoma cell growth in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;440(4):701-6.
438. Li C, Johnson DE. Bortezomib induces autophagy in head and neck squamous cell carcinoma cells via JNK activation. *Cancer Lett*. 2012;314(1):102-7.
439. Schramek D, Kotsinas A, Meixner A, Wada T, Elling U, Pospisilik JA, Neely GG, Zwick RH, Sigl V, Forni G, Serrano M, Gorgoulis VG, Penninger JM. The stress kinase MKK7 couples oncogenic stress to p53 stability and tumor suppression. *Nat Genet*. 2011;43(3):212-9.
440. Tang B, Du J, Wang J, Tan G, Gao Z, Wang Z, Wang L. Alpinetin suppresses proliferation of human hepatoma cells by the activation of MKK7 and elevates sensitization to cis-diammined dichloridoplatium. *Oncol Rep*. 2012;27(4):1090-6.

441. Dai Y, Guzman ML, Chen S, Wang L, Yeung SK, Pei XY, Dent P, Jordan CT, Grant S. The NF (Nuclear factor)- κ B inhibitor parthenolide interacts with histone deacetylase inhibitors to induce MKK7/JNK1-dependent apoptosis in human acute myeloid leukaemia cells. *Br J Haematol.* 2010;151(1):70-83.
442. Noutomi T, Itoh M, Toyota H, Takada E, Mizuguchi J. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces apoptotic cell death through c-Jun NH2-terminal kinase activation in squamous cell carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2009 ;22(5):1169-72.
443. Guo W, Wu S, Wang L, Wei X, Liu X, Wang J, Lu Z, Hollingshead M, Fang B. Antitumor activity of a novel oncrasin analogue is mediated by JNK activation and STAT3 inhibition. *PLoS One.* 2011;6(12):e28487.
444. Park JI, Lee MG, Cho K, et al. Transforming growth factor-beta1 activates interleukin-6 expression in prostate cancer cells through the synergistic collaboration of the Smad2, p38-NFkappaB, JNK, and Ras signaling pathways. *Oncogene.* 2003;22(28):4314-32.
445. Khandrika L, Lieberman R, Koul S, et al. Hypoxia-associated p38 mitogen-activated protein kinase-mediated androgen receptor activation and increased HIF-1alpha levels contribute to emergence of an aggressive phenotype in prostate cancer. *Oncogene.* 2009;28(9):1248-60.
446. Maroni PD, Koul S, Meacham RB, Koul HK. Mitogen activated protein kinase signal transduction pathways in the prostate. *Cell Commun Signal.* 2004;2(1):5.
447. Suarez-Cuervo C, Merrell MA, Watson L, et al. Breast cancer cells with inhibition of p38alpha have decreased MMP-9 activity and exhibit decreased bone metastasis in mice. *Clin Exp Metastasis.* 2004;21(6):525-33.
448. Kumar B, Sinclair J, Khandrika L, Koul S, Wilson S, Koul HK. Differential effects of MAPKs signaling on the growth of invasive bladder cancer cells. *Int J Oncol.* 2009;34(6):1557-64.
449. Kumar B, Koul S, Petersen J, et al. p38 mitogenactivated protein kinase-driven MAPKAPK2 regulates invasion of bladder cancer by modulation of MMP-2 and MMP-9 activity. *Cancer Res.* 2010;70(2):832-41.
450. Huang Q, Lan F, Wang X, Yu Y, Ouyang X, Zheng F, Han J, Lin Y, Xie Y, Xie F, Liu W, Yang X, Wang H, Dong L, Wang L, Tan J. IL-1beta-induced activation of p38 promotes metastasis in gastric adenocarcinoma via upregulation of AP-1/c-fos, MMP2 and MMP9. *Mol Cancer.* 2014;13(1):18.
451. Cui XP, Qin CK, Zhang ZH, Su ZX, Liu X, Wang SK, Tian XS. HOXA10 Promotes Cell Invasion and MMP-3 Expression Via TGF β 2-Mediated Activation of the p38 MAPK Pathway in Pancreatic Cancer Cells. *Dig Dis Sci.* 2014;59(7):1442-51.
452. Avisetti DR, Babu KS, Kalivendi SV. Activation of p38/JNK pathway is responsible for embelin induced apoptosis in lung cancer cells: transitional role of reactive oxygen species. *PLoS One.* 2014;9(1):e87050.
453. Bulavin DV, Fornace AJ Jr. p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. *Adv Cancer Res.* 2004;92:95-118.

454. Kummer JL, Rao PK, Heidenreich KA. Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1997;272(33): 20490-4.
455. She QB, Bode AM, Ma WY, Chen NY, Dong Z. Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer Res.* 2001;61(4):1604-10.
456. Bradham C, McClay DR. p38 MAPK in development and cancer. *Cell Cycle.* 2006;5(8):824-8.
457. Cheng TL, Symons M, Jou TS. Regulation of anoikis by Cdc42 and Rac1. *Exp Cell Res.* 2004;295(2): 497-511.
458. Leelahavanichkul K, Amornphimoltham P, Molinolo AA, Basile JR, Koontongkaew S, Gutkind JS. A role for p38 MAPK in head and neck cancer cell growth and tumor-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Mol Oncol.* 2014;8(1):105-18.
459. Hour MJ, Lee KT, Wu YC, Wu CY, You BJ, Chen TL, Lee HZ. A novel antitubulin agent, DPQZ, induces cell apoptosis in human oral cancer cells through Ras/Raf inhibition and MAP kinases activation. *Arch Toxicol.* 2013;87(5):835-46.
460. Shen FH, Fan XY, Liu BC. Decrease of cyclin D1 and CDK4 protein and their related factors induced by quartz in human embryonic lung fibroblasts. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi.* 2008;26(7):391-4.
461. Li R, You S, Hu Z, *et al*: Inhibition of STAT3 by niclosamide synergizes with erlotinib against head and neck cancer. *PLoS One* 2013;8: e74670.
462. Nikitakis NG, Siavash H and Sauk JJ: Targeting the STAT pathway in head and neck cancer: recent advances and future prospects. *Curr Cancer Drug Targets* 2004;4: 637-651.
463. Macha MA, Matta A, Kaur J, Chauhan SS, Thakar A, Shukla NK, Gupta SD, Ralhan R. Prognostic significance of nuclear pSTAT3 in oral cancer. *Head Neck.* 2011;33:482-9. doi: 10.1002/hed.21468.
464. Shah NG, Trivedi TI, Tankshali RA *et al*. Stat3 expression in oral squamous cell carcinoma: association with clinicopathological parameters and survival. *Int J Biol Markers* 2006;21:175–183.
465. Masuda M, Suzui M, Yasumatu R, Nakashima T, Kuratomi Y, Azuma K, Tomita K, Komiyama S, Weinstein IB. Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2002;62(12):3351-5.
466. Sen M, Joyce S, Panahandeh M, Li C, Thomas SM, Maxwell J, Wang L, Gooding WE, Johnson DE, Grandis JR. Targeting Stat3 abrogates EGFR inhibitor resistance in cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18:4986-96.
467. Gu F, Ma Y, Zhang Z, Zhao J, Kobayashi H, Zhang L, Fu L. Expression of Stat3 and Notch1 is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2010;23(3):671-6.
468. Reich NC and Liu L: Tracking STAT nuclear traffic. *Nat Rev Immunol* 2006;6: 602-612.

469. Venkatasubbarao K, Choudary A and Freeman JW: Farnesyl transferase inhibitor (R115777)-induced inhibition of STAT3(Tyr705) phosphorylation in human pancreatic cancer cell lines require extracellular signal-regulated kinases. *Cancer Res* 2005;65: 2861-2871.
470. Wakahara R, Kunimoto H, Tanino K, *et al*: Phospho-Ser727 of STAT3 regulates STAT3 activity by enhancing dephosphorylation of phospho-Tyr705 largely through TC45. *Genes Cells* 2012;17:132-145.
471. Sakaguchi M, Oka M, Iwasaki T, *et al*: Role and regulation of STAT3 phosphorylation at Ser727 in melanocytes and melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2012;132: 1877-1885.
472. Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB *et al*. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann NY Acad Sci* 2009;1171:59–76.
473. Hazan-Halevy I, Harris D, Liu Z, Liu J, *et al*: STAT3 is constitutively phosphorylated on serine 727 residues, binds DNA, and activates transcription in CLL cells. *Blood* 2010;115: 2852-2863.
474. Chen RJ, Ho YS, Guo HR and Wang YJ: Rapid activation of Stat3 and ERK1/2 by nicotine modulates cell proliferation in human bladder cancer cells. *Toxicol Sci* 2008;104: 283-293.
475. Gough D, Koetz L and Levy D: The MEK-ERK pathway is necessary for serine phosphorylation of mitochondrial STAT3 and Ras-mediated transformation. *PLoS One* 2013;8: e83395.
476. Sengupta TK, Talbot ES, Scherle PA and Ivashkiv LB: Rapid inhibition of interleukin-6 signaling and Stat3 activation mediated by mitogen-activated protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95: 11107-11112.
477. Tkach M, Rosemlit C, Rivas MA, *et al*: p42/p44 MAPK-mediated Stat3Ser727 phosphorylation is required for progestin-induced full activation of Stat3 and breast cancer growth. *Endocr Relat Cancer* 2013;20: 197-212.
478. Wierenga AT, Vogelzang I, Eggen BJ and Vellenga E: Erythropoietin-induced serine 727 phosphorylation of STAT3 in erythroid cells is mediated by a MEK-ERK-, and MSK1-Dependent pathway. *Exp Hematol* 2003;31: 398-405.
479. Sumimoto H, Imabayashi F, Iwata T and Kawakami Y: The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *J Exp Med* 2006;203: 1651-1656.
480. Nelson EA, Walker SR, Kepich A, *et al*: Nifuroxazide inhibits survival of multiple myeloma cells by directly inhibiting STAT3. *Blood* 2008;112: 5095-5102.
481. Liu J, Chen B, Lu Y, Guan Y, Chen F. JNK-dependent Stat3 phosphorylation contributes to Akt activation in response to arsenic exposure. *Toxicol Sci*. 2012;129:363-71.
482. Plataniias LC. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway and its role in interferon signaling. *Pharmacol Ther*. 2003;98(2):129-42.
483. Riebe C, Pries R, Schroeder KN, Wollenberg B. Phosphorylation of STAT3 in head and neck cancer requires p38 MAPKinase, whereas phosphorylation of STAT1 occurs via a different signaling pathway. *Anticancer Res*. 2011;31:3819-25.
484. Kovarik P, Stoiber D, Eyers PA, Menghini R, Neininger A, Gaestel M, Cohen P, Decker T. Stress-induced phosphorylation of STAT1 at Ser727 requires p38

- mitogen-activated protein kinase whereas IFN-gamma uses a different signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:13956-61.
485. Ahmed ST, Mayer A, Ji JD, Ivashkiv LB. Inhibition of IL-6 signaling by a p38-dependent pathway occurs in the absence of new protein synthesis. *J Leukoc Biol* 2002;72:154-62.
486. Zauberan A, Zipori D, Krupsky M, Ben-Levy R. Stress activated protein kinase p38 is involved in IL-6 induced transcriptional activation of STAT3. *Oncogene*. 1999;18(26):3886-93.
487. Yaman E, Gonul I, Buyukberber S, Coskun U, Yamac D, Sevinc A, Dane F, Uner A, Ozturk B, Kaya A. O. The expression patterns of STAT-3, phosphorylated STAT-3, P38 MAP-kinase, and phosphorylated P38 MAP-kinase in triple-negative breast cancers and their prognostic significance. *Journal of Clinical Oncology, 2010 ASCO Annual Meeting Abstracts. Vol 28, No 15_suppl (May 20 Supplement), 2010: 636*
488. Koul HK, Pal M, Koul S. Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. *Genes Cancer*. 2013;4:342-359.
489. Enslen H, Raingeaud J, Davis RJ: Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem* 1998;273:1741-1748.

Παράρτημα Ανοσοϊστοχημείας

Πίνακες με στατιστικά αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής μελέτης.

p-STAT3(tyr) ΠΟΣΟΣΤΟ

	0	1	2	3	
ΥΨΗΛΗΣ	5	9	2	3	19
ΜΕΤΡΙΑΣ	1	8	6	3	18
ΧΑΜΗΛΗΣ	2	3	4	9	18
	8	13	11	19	55

Στατιστική συσχέτιση έκφρασης
Στατιστικές διαφορές

υψηλής vs μέτριας $p=0,22$
υψηλής vs χαμηλής $p=0,05$
μέτριας vs χαμηλής $p=0,11$

p-STAT3(ser) ΠΟΣΟΣΤΟ

	0	1	2	3	
ΥΨΗΛΗΣ	1	7	6	4	18
ΜΕΤΡΙΑΣ	1	5	6	8	20
ΧΑΜΗΛΗΣ	0	4	7	7	18
	2	16	19	19	56

Στατιστική συσχέτιση έκφρασης
Στατιστικές διαφορές

υψηλής vs μέτριας $p=0,76$
υψηλής vs χαμηλής $p=0,41$
μέτριας vs χαμηλής $p=1,00$

p-cJUN ΠΟΣΟΣΤΟ

	0	1	2	3	
ΥΨΗΛΗΣ	2	3	7	6	18
ΜΕΤΡΙΑΣ	2	6	5	7	20
ΧΑΜΗΛΗΣ	4	4	7	4	19
	8	13	19	17	57

Στατιστική συσχέτιση έκφρασης
Στατιστικές διαφορές

υψηλής vs μέτριας $p=0,78$
υψηλής vs χαμηλής $p=0,79$
μέτριας vs χαμηλής $p=0,58$

p-ERK1/2 ΠΟΣΟΣΤΟ

	0	1	2	3	
ΥΨΗΛΗΣ	4	10	3	1	18
ΜΕΤΡΙΑΣ	0	8	6	6	20
ΧΑΜΗΛΗΣ	1	2	7	8	18
	5	20	16	15	56

Στατιστική συσχέτιση έκφρασης
Στατιστικές διαφορές

υψηλής vs μέτριας $p=0,035$
υψηλής vs χαμηλής $p=0,002$
μέτριας vs χαμηλής $p=0,16$

p-p38 ΠΟΣΟΣΤΟ

	0	1	2	3	
ΥΨΗΛΗΣ	3	5	6	5	19
ΜΕΤΡΙΑΣ	3	5	5	7	20
ΧΑΜΗΛΗΣ	1	4	5	8	18
	7	14	16	20	57

Στατιστική συσχέτιση έκφρασης
Στατιστικές διαφορές

υψηλής vs μέτριας $p=0,97$
υψηλής vs χαμηλής $p=0,70$
μέτριας vs χαμηλής $p=0,87$

p-STAT3(tyr)	ΕΝΤΑΣΗ				
	0	1	2	3	
ΥΨΗΛΗΣ	5	9	4	1	19
ΜΕΤΡΙΑΣ	1	8	6	3	18
ΧΑΜΗΛΗΣ	2	3	5	8	18
	8	20	15	12	55

Στατιστική συσχέτιση έκφρασης
Στατιστικές διαφορές

υψηλής vs μέτριας $p=0,30$
υψηλής vs χαμηλής $p=0,02$
μέτριας vs χαμηλής $p=0,22$

p-STAT3(ser)	ΕΝΤΑΣΗ				
	0	1	2	3	
ΥΨΗΛΗΣ	1	4	3	10	18
ΜΕΤΡΙΑΣ	1	3	5	11	20
ΧΑΜΗΛΗΣ	0	2	5	11	18
	2	9	13	32	56

Στατιστική συσχέτιση έκφρασης
Στατιστικές διαφορές

υψηλής vs μέτριας $p=0,90$
υψηλής vs χαμηλής $p=0,58$
μέτριας vs χαμηλής $p=1,00$

p-cJUN	ΕΝΤΑΣΗ				
	0	1	2	3	
ΥΨΗΛΗΣ	2	2	7	7	18
ΜΕΤΡΙΑΣ	2	1	7	10	20
ΧΑΜΗΛΗΣ	4	7	4	4	19
	8	10	18	21	57

Στατιστική συσχέτιση έκφρασης
Στατιστικές διαφορές

υψηλής vs μέτριας $p=0,88$
υψηλής vs χαμηλής $p=0,19$
μέτριας vs χαμηλής $p=0,04$

p-ERK1/2	ΕΝΤΑΣΗ				
	0	1	2	3	
ΥΨΗΛΗΣ	4	4	2	8	18
ΜΕΤΡΙΑΣ	0	5	3	12	20
ΧΑΜΗΛΗΣ	1	0	2	15	18
	5	9	7	35	56

Στατιστική συσχέτιση έκφρασης
Στατιστικές διαφορές

υψηλής vs μέτριας $p=0,20$
υψηλής vs χαμηλής $p=0,04$
μέτριας vs χαμηλής $p=0,09$

p-p38	ΕΝΤΑΣΗ				
	0	1	2	3	
ΥΨΗΛΗΣ	3	4	3	9	19
ΜΕΤΡΙΑΣ	3	5	3	9	20
ΧΑΜΗΛΗΣ	1	7	4	6	18
	7	16	10	24	57

Στατιστική συσχέτιση έκφρασης
Στατιστικές διαφορές

υψηλής vs μέτριας $p=1,00$
υψηλής vs χαμηλής $p=0,48$
μέτριας vs χαμηλής $p=0,65$

p-STAT3(tyr)	combined score			
	0-2	3-4	5-6	
ΥΨΗΛΗΣ	10	6	3	19
ΜΕΤΡΙΑΣ	5	6	7	18
ΧΑΜΗΛΗΣ	2	5	11	18
	17	17	21	55

Στατιστική συσχέτιση έκφρασης
Στατιστικές διαφορές

υψηλής vs μέτριας $p=0,20$
υψηλής vs χαμηλής $p=0,008$
μέτριας vs χαμηλής $p=0,31$

p-STAT3(ser)	combined score			
	0-2	3-4	5-6	
ΥΨΗΛΗΣ	3	8	7	18
ΜΕΤΡΙΑΣ	3	4	13	20
ΧΑΜΗΛΗΣ	1	3	14	18
	7	15	34	56

Στατιστική συσχέτιση έκφρασης
Στατιστικές διαφορές

υψηλής vs μέτριας $p=0,22$
υψηλής vs χαμηλής $p=0,07$
μέτριας vs χαμηλής $p=0,77$

p-cJUN	combined score			
	0-2	3-4	5-6	
ΥΨΗΛΗΣ	4	5	9	18
ΜΕΤΡΙΑΣ	3	7	10	20
ΧΑΜΗΛΗΣ	8	6	5	19
	15	18	24	57

Στατιστική συσχέτιση έκφρασης
Στατιστικές διαφορές

υψηλής vs μέτριας $p=0,91$
υψηλής vs χαμηλής $p=0,30$
μέτριας vs χαμηλής $p=0,15$

p-ERK1/2	combined score			
	0-2	3-4	5-6	
ΥΨΗΛΗΣ	8	6	4	18
ΜΕΤΡΙΑΣ	5	7	8	20
ΧΑΜΗΛΗΣ	1	3	14	18
	14	16	26	56

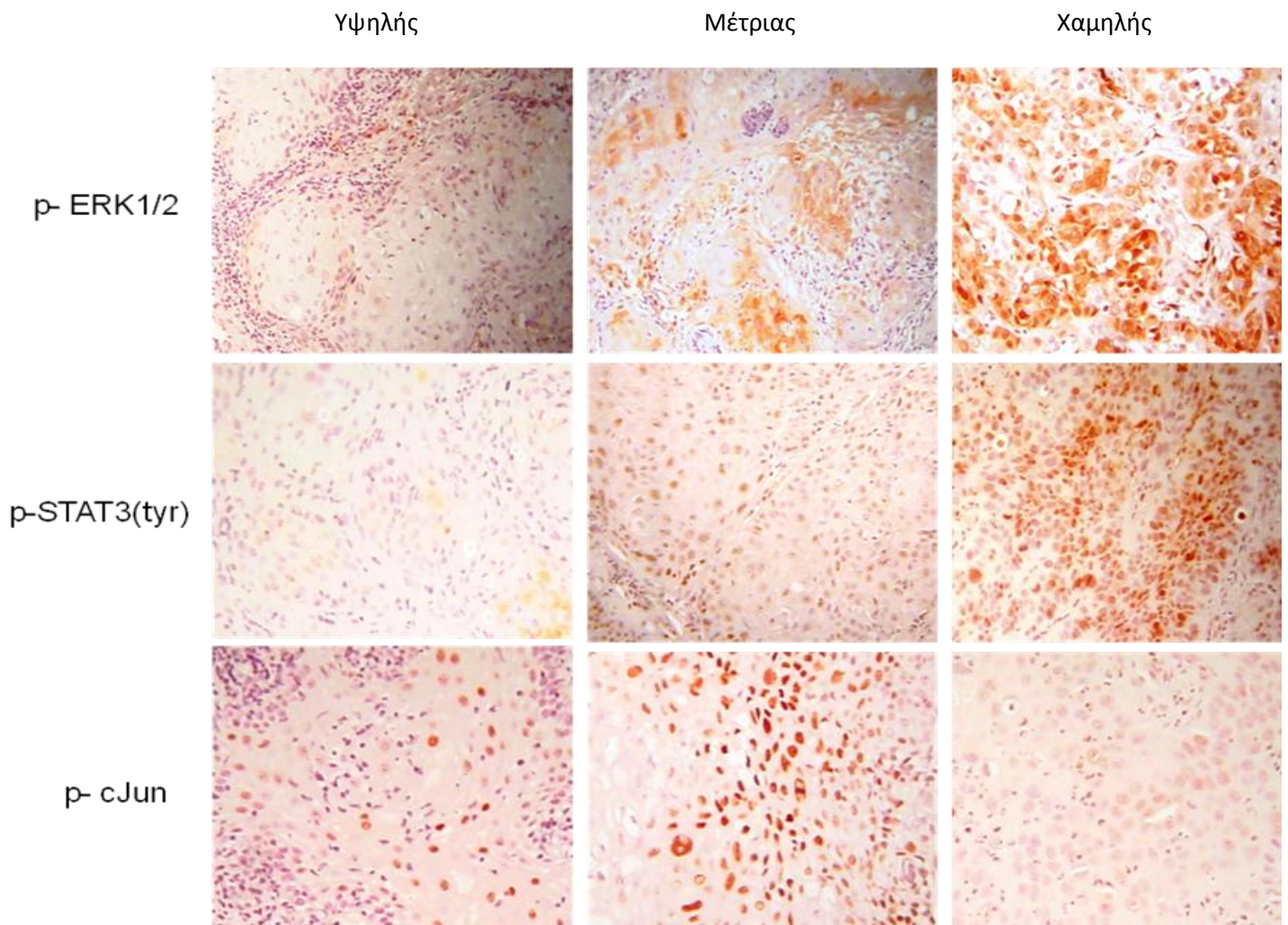
Στατιστική συσχέτιση έκφρασης
Στατιστικές διαφορές

υψηλής vs μέτριας $p=0,43$
υψηλής vs χαμηλής $p=0,003$
μέτριας vs χαμηλής $p=0,07$

p-p38	combined score			
	0-2	3-4	5-6	
ΥΨΗΛΗΣ	6	4	9	19
ΜΕΤΡΙΑΣ	5	7	8	20
ΧΑΜΗΛΗΣ	5	5	8	18
	16	16	25	57

Στατιστική συσχέτιση έκφρασης
Στατιστικές διαφορές

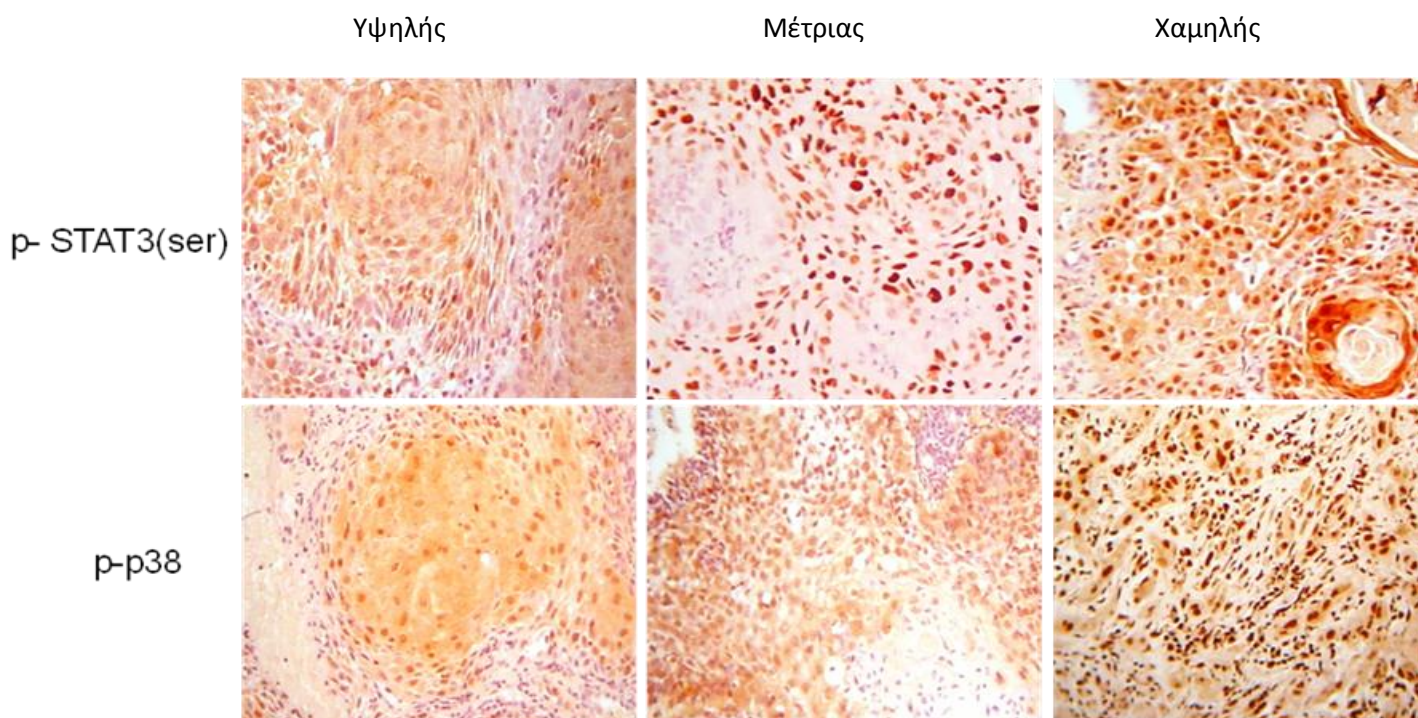
υψηλής vs μέτριας $p=0,71$
υψηλής vs χαμηλής $p=1,00$
μέτριας vs χαμηλής $p=0,92$



Εικόνα 14α. Ενδεικτικές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για τις πρωτεΐνες της μελέτης (H&E x 200).

p-STAT3(tyr) / p-ERK1/2: Τα χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης νεοπλάσματα παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές για το αθροισμά, το ποσοστό και την ένταση της χρώσης σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές και για τις 3 μεταβλητές μεταξύ των περιστατικών χαμηλής και υψηλής διαφοροποίησης

p-cjun: Οι μέσοι όροι του αθροίσματος και του ποσοστού της χρώσης δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές αποκλίσεις σε σχέση με το βαθμό διαφοροποίησης των νεοπλασμάτων. Η τιμή της έντασης της χρώσης διαφέρει σε στατιστικά σημαντικό βαθμό μεταξύ των νεοπλασμάτων μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης, με τα πρώτα να εμφανίζουν τις υψηλότερες τιμές.



Εικόνα 14β. Ενδεικτικές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για τις πρωτεΐνες της μελέτης (H&E x 200).

p-STAT3(ser) / p-p38: Οι μέσοι όροι των τριών μεταβλητών δεν παρουσίασαν σημαντικές αποκλίσεις σε σχέση με το βαθμό διαφοροποίησης των περιπτώσεων.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ, ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης