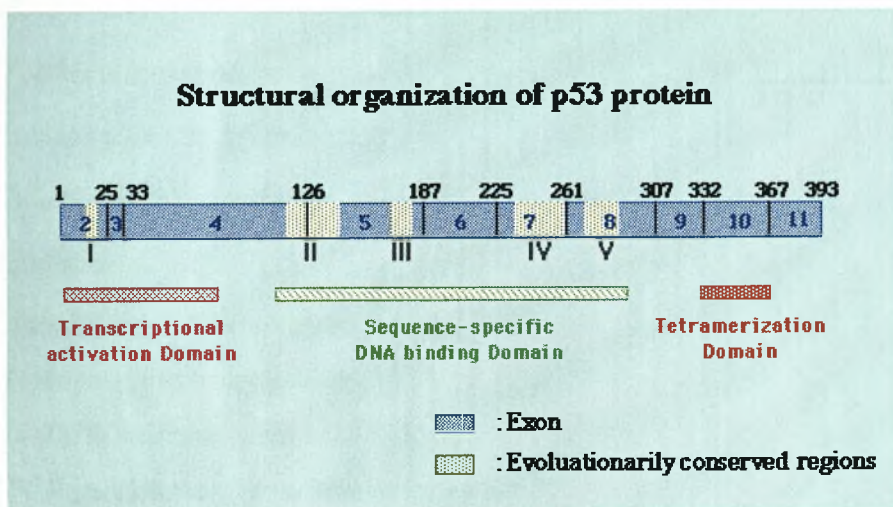




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ
ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ p53 ΣΕ ΜΗ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ
ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΓΚΑΚΟΥ ΧΡΥΣΟΥΛΑ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2008



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 6590/1
Ημερ. Εισ.: 27-03-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2008
ΓΚΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087326

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ABSTRACT

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- A.1. Βιολογία του καρκίνου*
- A.2. Καρκίνος του πνεύμονα*
- A.3. Ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53*

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- B.1. Προέλευση δειγμάτων*
- B.2. Εργαστηριακός εξοπλισμός*
- B.3. Χημικά αντιδραστήρια*
- B.4. Μέθοδοι*
 - B.4.1. Απομόνωση RNA από ιστούς*
 - B.4.2. Ποσοτικοποίηση δειγμάτων*
 - B.4.3. RT-PCR για δημιουργία cDNA*
 - B.4.4. PCR για ενίσχυση τμημάτων του γονιδίου p53*
 - B.4.5. Έλεγχος των PCR προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης*
 - B.4.6. Ανάλυση αλληλουχίας βάσεων DNA (DNA- Sequencing)*

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- Γ.1. Ανίχνευση του p53 mRNA για τις αλληλουχίες που περιλαμβάνονται από τα εξόνια 4-6, 6-9 και 4-9 με τη μεθοδολογία της RT-PCR*
- Γ.2. Διερεύνηση σε p53 mRNA για την έκφραση του εσωτερικού υποκινητή P2 στο ιντρόνιο 4*
- Γ.3. Ανίχνευση και αλληλούχιση των μικρών p53 ειδικών μεταγράφων*

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε εξολοκλήρου στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Γεώργιο Τζημαγιώργη, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής Α.Π.Θ., για την ανάθεση της εκπόνησης της συγκεκριμένης εργασίας, για τις πολύτιμες συμβουλές, καθώς και για τη συνεχή παρακολούθηση και επίμονη καθοδήγηση που μου έδειξε κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών και της συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστίες οφείλω στην κα. Νόρμα Βαβάτση, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας του τμήματος Ιατρικής Α.Π.Θ., που με δέχτηκε στο εργαστήριο, καθώς και τους κα. Σοφία Κουϊδου-Ανδρέου, Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής ΑΠΘ και κ. Κωνσταντίνο Χαϊτογλου, για την πολύτιμη βοήθεια της κατά την διάρκεια της πειραματικής εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω, στην υποψήφια διδάκτωρ Κατερίνα Φράγκου για την πολύτιμη βοήθεια καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων, για τις πολύτιμες συμβουλές αλλά και για την ηθική υποστήριξη. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους δουλεύουν στο εργαστήριο για τη βοήθεια και την υποστήριξη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί τη δεύτερη κατά σειρά πιο θανατηφόρα μορφή καρκίνου σε παγκόσμια κλίμακα. Τόσο εξωγενείς (πχ. κάπνισμα) όσο και ενδογενείς (πχ. μεταλλάξεις γονιδίων, μεθυλίωση προαγωγέων ογκοκατασταλτικών γονιδίων) παράγοντες έχουν συσχετιστεί κατά καιρούς με την επαγωγή της νόσου αυτής.

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53* εμφανίζεται μεταλλαγμένο σε 80% των SCLC και σε 50% των NSCLC περιπτώσεων. Το επικρατέστερο είδος μεταλλάξεων του *p53* είναι αυτό της παρανοηματικής μετάλλαξης τύπου GC>AT ή GC>TA, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό των μεταλλάξεων αυτών εντοπίζεται σε θέσεις CpG δινουκλεοτιδίων.

Αντικείμενο μελέτης της παρούσας πειραματικής εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση της έκφρασης των αλληλουχιών μεταξύ των εξονίων 4-6, 6-9, 4-9 καθώς και του εναλλακτικού υποκινητή (P2) που εντοπίζεται στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου *p53* σε καρκίνο του πνεύμονα.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποδεικνύουν ότι η έκφραση του γονιδίου *p53* παρουσιάζει διακυμάνσεις στις αλληλουχίες ανάμεσα στα εξόνια 4-6, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στην έκφραση του υποκινητή P2 που βρίσκεται στο ιντρόνιο 4. Μάλιστα, ο υποκινητής αυτός φαίνεται να εκφράζεται εντονότερα σε παρακείμενα φυσιολογικά δείγματα (NC). Επιπρόσθετα, η αλληλούχιση ορισμένων *p53* «μικρών» μεταγράφων, που ενισχύθηκαν μέσω RT-PCR, έδειξε ότι αποτελούν προϊόντα εναλλακτικής συναρμολόγησης.

ABSTRACT

Lung cancer constitutes the second death-causing type of cancer worldwide. Exogenous (eg., smoking) as well as endogenous (eg., gene mutations, promoter methylation of tumor suppressor genes) factors have been implicated in the promotion of the disease.

Tumor suppressor gene p53 appears to be mutated in 80% of SCLC and in 50% of NSCLC cases. The most often type of p53 mutation is the non-sense transition GC>AT or GC>TA, whereas, the greatest number of these mutations occur at CpG dinucleotides

The aim of this experimental project, was the investigation of the expression of sequences between exons 4-6, 6-9, 4-9 as well as of the alternative promoter (P2) which is located in intron 4 of the P53 gene in lung cancer specimens.

The results of this project, prove that the expression of P53 gene shows fluctuations in the sequences between exons 4-6, a fact which is probably caused by the expression of P2 promoter, located in intron 4. Besides, this promoter appears to be more intensely expressed in adjacent non - cancerous samples. Moreover, the sequencing of certain "small" transcriptions of P53, that were amplified with the RT-PCR method, showed that they were products of alternative splicing.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

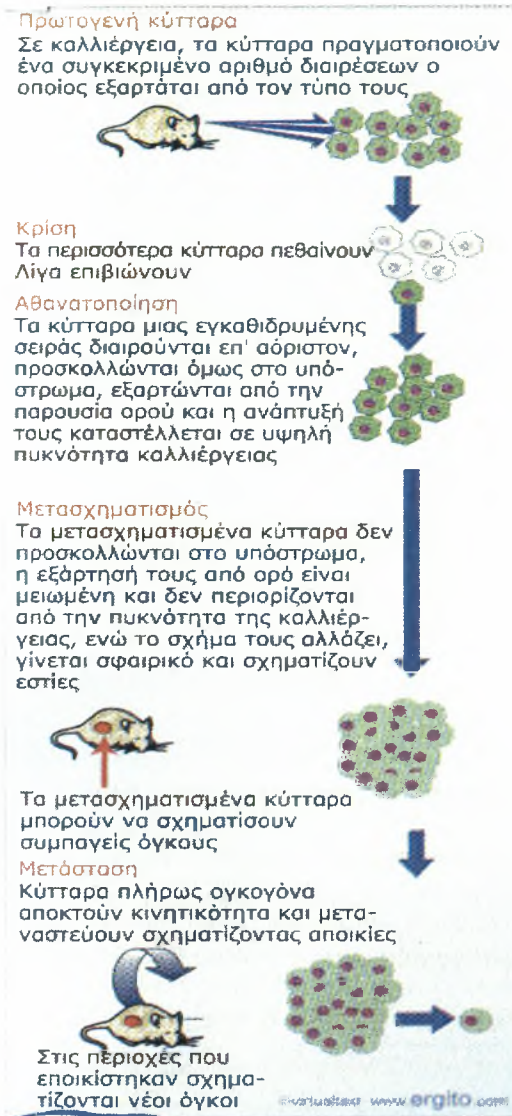
Η φυσιολογική κατάσταση ενός οργανισμού στηρίζεται σε ένα πολύπλοκο και ακριβές σύστημα ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής διαφοροποίησης. Έτσι ως καρκινικό χαρακτηρίζεται εκείνο το κύτταρο που παρουσιάζει απώλεια των φυσιολογικών μηχανισμών ρύθμισης της αύξησης και του πολλαπλασιασμού του (1,2).

Σύμφωνα με το βασικό μοντέλο της καρκινογένεσης, η κακοήθης εξαλλαγή συνιστά μια πολυσταδιακή διαδικασία: η έναρξη της δημιουργίας ενός όγκου απαιτεί μια σειρά βημάτων που ακολουθούνται από επιπρόσθετες αλλαγές, ενισχύοντας το ογκογόνο υπόβαθρο. Στη συνέχεια, η εξέλιξη του όγκου καθορίζεται από την επιλογή των καρκινικών κυττάρων που διαθέτουν επιθετικότερο δυναμικό. Οι δύο σημαντικότεροι τύποι αλλαγών που συμβαίνουν στο γονιδίωμα κατά την κακοήθη εξαλλαγή είναι η συσσώρευση σωματικών αλλαγών και η ανάπτυξη γενετικής αστάθειας (3).

Η σημερινή άποψη για την καρκινογένεση είναι ότι εξελίσσεται με πολλαπλούς κύκλους μετάλλαξης και επιλογής: ο αυξημένος ρυθμός μετάλλαξης ευθύνεται για τη δημιουργία κυττάρων με διαφορετικές ικανότητες πολλαπλασιασμού, από τα οποία στη συνέχεια επιλέγονται τα κύτταρα με αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού (4).

Συγκρίνοντας καρκινικά με φυσιολογικά κύτταρα, μπορούμε να προσδιορίσουμε γονίδια που έχουν διαφοροποιηθεί με μετάλλαξη. Από αυτά τα γονίδια, εκείνα που έχουν άμεση επίδραση στη δημιουργία καρκίνου μπορούν να διακριθούν σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο καρκίνος εκδηλώνεται εξαιτίας της συσσώρευσης μιας ποικιλίας μεταλλάξεων σε ένα σωματικό κύτταρο, οι

οποίες ενεργοποιούν τα ογκογονίδια ή/και απενεργοποιούν τα ογκοκατασταλτικά (1).



αλλαγές που συνοδεύουν την κακοήθη εξαλλαγή.

Τρία είδη αλλαγών συμβαίνουν σε ένα καρκινικό κύτταρο(5),

A) **Αθανατοποίηση.** Είναι η ικανότητα για συνεχή και επ' αόριστον ανάπτυξη, χωρίς απαραίτητα άλλη φαινοτυπική αλλαγή.

B) **Μετασχηματισμός.** Περιγράφει την διαφυγή από τον έλεγχο των φυσιολογικών ρυθμιστικών περιοριστικών μηχανισμών της ανάπτυξης.

Γ) **Μετάσταση.** Περιγράφει το στάδιο στο οποίο τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν ικανότητα έκτοπης ανάπτυξης, μπορούν δηλαδή να εισβάλλουν σε φυσιολογικούς ιστούς διαφορετικούς από αυτόν από τον οποίο προέρχονται και να ιδρύουν νέες δευτερογενείς αποικίες (μεταστατικές εστίες).

Τρεις χαρακτηριστικές ιδιότητες διακρίνουν ένα καρκινικό κύτταρο από ένα φυσιολογικό. Οι διαδοχικές αλλαγές που παρατηρούνται σε κύτταρα σε καλλιέργεια *in vitro* μπορούν να συσχετιστούν με τις

Υπάρχουν δύο ομάδες γονιδίων που, όταν μεταλλαχθούν, προκαλείται μετασχηματισμός (1,2,4)

Υπάρχουν δύο ομάδες γονιδίων που, όταν μεταλλαχθούν, προκαλείται μετασχηματισμός (1,2,4)

1) Τα *ογκογονίδια*, αρχικά ταυτοποιήθηκαν σε ιούς ως τα γονίδια εκείνα που προκαλούν μετασχηματισμό στα κύτταρα-ξενιστές. Στη συνέχεια αποκαλύφθηκε ότι στα κύτταρα των ευκαρυωτικών οργανισμών υπάρχουν ομόλογα τέτοιων ιικών ογκογονιδίων που ενέχονται σε φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες. Τα γονίδια αυτά καλούνται *ογκογονίδια* και σε ορισμένες περιπτώσεις η μετατροπή τους σε ογκογονίδια εξαιτίας μετάλλαξης ή ανώμαλης ενεργοποίησης τους σχετίζεται με το σχηματισμό όγκων. Υποδιαιρούνται σε αρκετές ομάδες ανάλογα με τον τύπο της δράσης τους, καλύπτοντας ένα ευρύ φάσμα από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες έως και μεταγραφικούς παράγοντες. Η δημιουργία ενός ογκογονιδίου μπορεί να οφείλεται σε κάποια μετάλλαξη που έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση μιας πρωτεΐνης, η οποία δρα ιδιοστατικά, δηλαδή είναι μόνιμα ενεργοποιημένη, υπερεκφράζεται ή αποτυγχάνει να τερματιστεί η έκφρασή της την κατάλληλη στιγμή. (6)

2) Τα *ογκοκατασταλτικά γονίδια* που ταυτοποιούνται βάσει της ανίχνευσης ογκογόνων μεταλλάξεων. Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας γονιδίων που συνήθως επιβάλουν κάποιον περιορισμό στον κυτταρικό κύκλο ή στην κυτταρική αύξηση. Η άρση του περιορισμού οδηγεί σε καρκινογένεση.

Ο μετασχηματισμός των ευκαρυωτικών κυττάρων μπορεί να συμβεί αυτόματα, να προκληθεί από συγκεκριμένους χημικούς παράγοντες ή ακόμη και να είναι το αποτέλεσμα μόλυνσης από ένα ογκογόνο ιό.

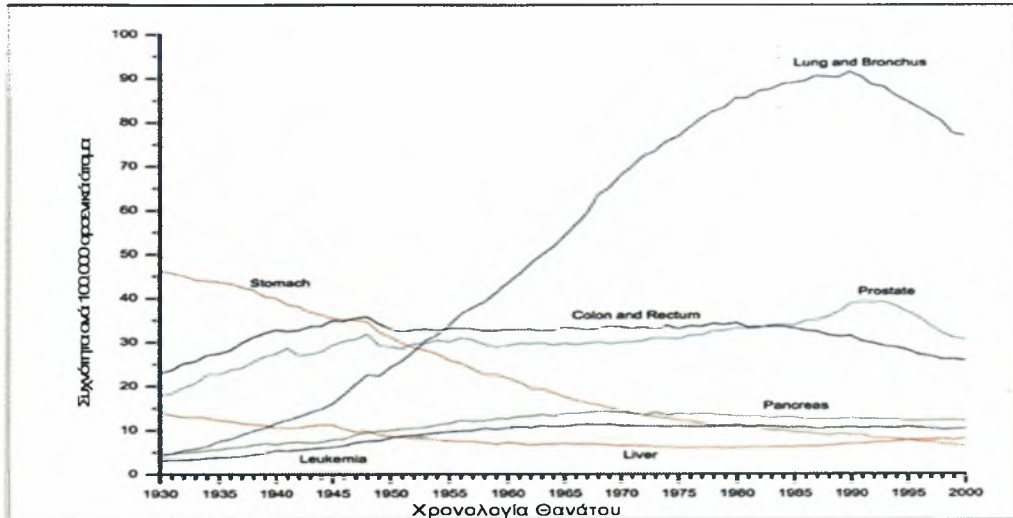
Τα ογκογονίδια μπορεί να προέλθουν από ένα γονίδιο που κωδικοποιεί οποιοδήποτε στοιχείο ενός καταρράκτη μεταγωγής σημάτων, από τον αυξητικό παράγοντα ή υποδοχέα που δίνει το έναυσμα του καταρράκτη έως το μεταγραφικό παράγοντα, που είναι ο ύστατος τελεστής (7,8). Είτε το ογκογονίδιο εισάγεται στο γονιδίωμα από έναν ιό είτε προκύπτει από μετάλλαξη, είναι κυρίαρχο έναντι των αλληλόμορφων πρώτο-ογκογονίδιο. Οι ογκοπρωτεΐνες σύμφωνα με τις λειτουργίες τους ταξινομούνται σε

αυξητικούς παράγοντες, υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, ενδοκυτταρικές κινάσες που φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα τυροσίνης σε πρωτεΐνες στόχους (src), κυτταροδιαλυτές κινάσες σερίνης/θρεονίνης, μεταγραφικοί παράγοντες. Το κοινό χαρακτηριστικό είναι ότι καθεμιά από αυτές τις ομάδες πρωτεϊνών μπορεί να προκαλέσει γενικές αλλαγές του κυτταρικού φαινοτύπου, είτε πυροδοτώντας αλλαγές στη διαδικασία της κυτταρικής αύξησης είτε μεταβάλλοντας άμεσα τη γονιδιακή έκφραση. Πολλά ογκογονίδια δρουν σε πρώιμα στάδια του μονοπατιών που τελικά οδηγούν σε αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης, ενώ άλλα δρουν άμεσα στο επίπεδο της μεταγραφής. Τα ογκογονίδια που επηρεάζουν τη μεταγραφή μπορούν είτε να αυξήσουν είτε να μειώσουν την έκφραση ορισμένων γονιδίων. Αποτέλεσμα της αυξημένης έκφρασης ή ενεργότητάς τους μπορεί να είναι η επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων των οποίων τα προϊόντα επιτρέπουν τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων μόνο όταν βρίσκονται σε χαμηλές ποσότητες. Η αδυναμία απόκρισης στη φυσιολογική ρύθμιση της ενεργότητας τους από άλλους κυτταρικούς παράγοντες μπορεί επίσης να οδηγήσει σε αυξημένη έκφραση γονιδίων. Μια μικρότερη πιθανότητα είναι η απόκτηση εξειδίκευσης για νέους υποκινητές-στόχους. Εναλλακτικά, εάν οι ογκοπρωτεΐνες είναι ανίκανες να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή, ίσως λειτουργούν επικρατείς αρνητικοί καταστολείς των κυτταρικών μεταγραφικών παραγόντων.(9)

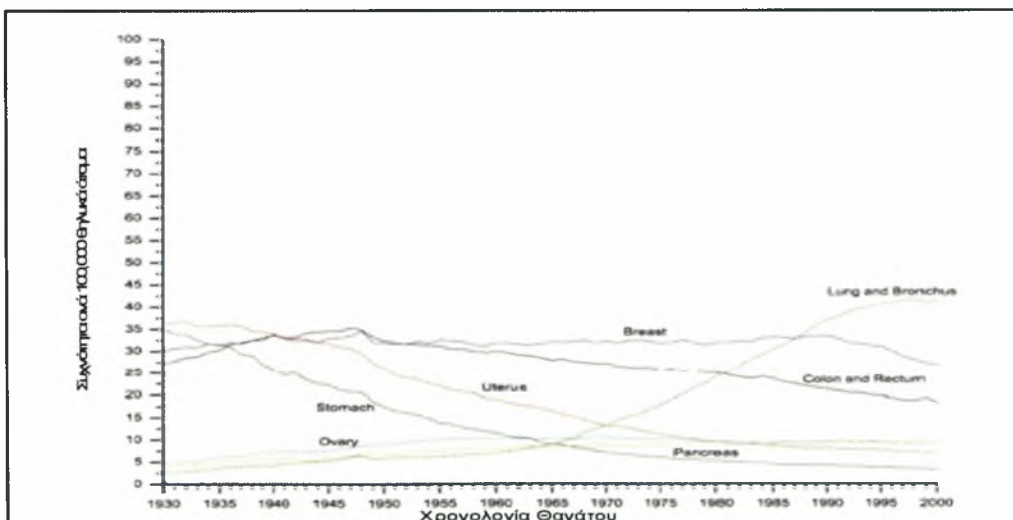
Ορισμένοι όγκοι προκαλούνται με διαφορετικό μηχανισμό. Για την ογκογονικότητα απαιτείται η απώλεια και των δύο αλληλομόρφων ενός γονιδιακού τόπου. Η προδιάθεση δημιουργίας όγκων τέτοιου είδους μπορεί είτε να κληρονομηθεί μέσω της αναπαραγωγικής σειράς είτε να είναι αποτέλεσμα σωματικής μετάλλαξης. Τέτοιες περιπτώσεις χαρακτηρίζουν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα προϊόντα των οποίων είναι απαραίτητα για την ομαλή λειτουργία του κυττάρου και η απώλειά τους προκαλεί όγκους. Τα δύο πλέον χαρακτηρισμένα γονίδια αυτής της κατηγορίας κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες RB και p53.

Α.2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η δεύτερη πιο συχνή μορφή καρκίνου παγκοσμίως (μετά τον καρκίνο του προστάτη στους άνδρες και τον καρκίνο του στήθους στις γυναίκες), ενώ κατέχει τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας από όλες τις μορφές καρκίνου.



Εικόνα 1: Ετήσιοι ρυθμοί θανάτων από καρκίνο σε άνδρες για συγκεκριμένες μορφές καρκίνου από το 1930 μέχρι το 2000 στις ΗΠΑ (Jemal et al., 2004).

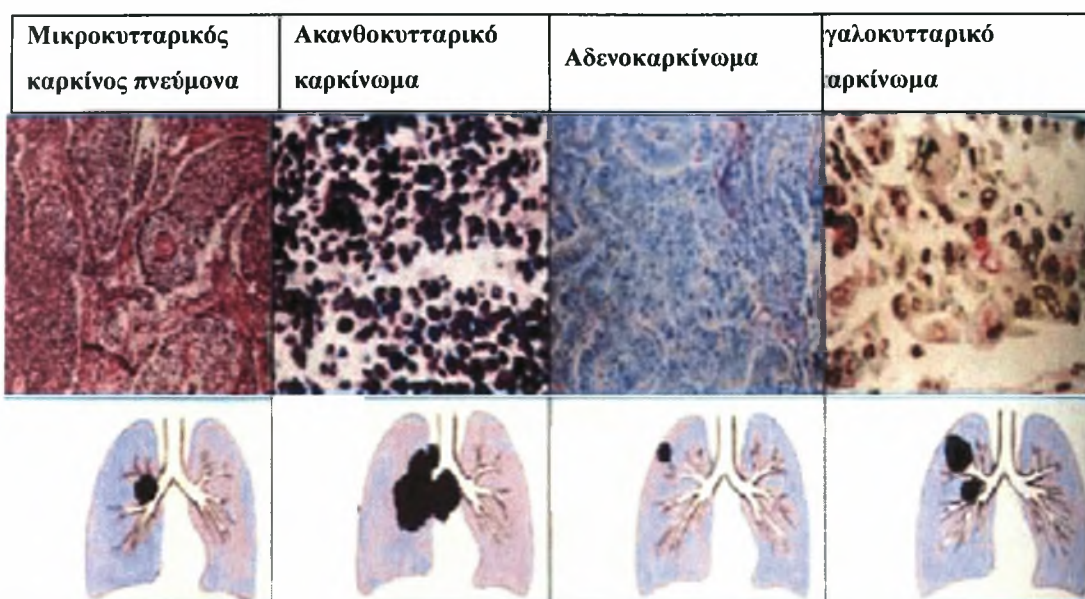


Εικόνα 2: Ετήσιοι ρυθμοί θανάτων από καρκίνο σε γυναίκες για συγκεκριμένες μορφές καρκίνου από το 1930 μέχρι το 2000 στις ΗΠΑ (Jemal et al., 2004).

Ο καρκίνος του πνεύμονα διακρίνεται σε δύο κύριους τύπους, τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (SCLC, small cell lung cancer) και τον μη-μικροκυτταρικό (NSCLC, non-small cell lung cancer). Ένας τρίτος τύπος είναι ο συνδυασμένος μικροκυτταρικός/μη-μικροκυτταρικός που παρουσιάζει χαρακτηριστικά και των δύο προηγούμενων τύπων (18).

1. **Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (SCLC):**
αντιπροσωπεύει το 20-25% όλων των περιπτώσεων. Κύρια αιτία εμφάνισής του είναι η κατανάλωση καπνού. Χαρακτηρίζεται από ταχύτατο ρυθμό ανάπτυξης και διάδοσης σε όλο το σώμα. Εμφανίζεται κυρίως στη βρογχική βλεννώδη μεμβράνη κάτω από το επιθήλιο στο κέντρο των πνευμόνων (80%), ενώ πιο σπάνια (20%) η νόσος ξεκινά από την περιφέρεια (βρόγχοι). Τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζονται μικρά σε μέγεθος και με πολυπλευρικό ή ατρακτοειδές σχήμα.
2. **Μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC):**
αντιπροσωπεύει το 75-80% όλων των περιπτώσεων. Διακρίνεται σε τρεις επιμέρους υποκατηγορίες, η καθεμία από τις οποίες εμφανίζει μεμονωμένα χαρακτηριστικά στοιχεία.
 - Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (squamous cell carcinoma). Είναι η πιο κοινή μορφή καρκίνου του πνεύμονα και ευθύνεται για το 30% περίπου όλων των περιπτώσεων. Ξεκινάει συνήθως από τους μεγάλους βρόγχους και παραμένει στην περιοχή του θώρακα χωρίς να προχωρεί σε μεταστάσεις.
 - Αδενοκαρκίνωμα (adenocarcinoma). Ευθύνεται για το 40% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα και είναι ίσως η πιο διαδεδομένη μορφή. Τα αδενοκαρκινικά κύτταρα εμφανίζονται με σωληνοειδές σχήμα κυρίως πρώτα στις εξωτερικές άκρες των πνευμόνων.
 - μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (large cell carcinoma). Εδώ εντάσσονται όλες οι περιπτώσεις καρκίνων του πνεύμονα

που δεν ανήκουν σε καμία από τις προηγούμενες κατηγορίες. Μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε περιοχή του πνεύμονα και ευθύνεται για το 15% όλων των περιπτώσεων (19).



Οι 4 τύποι καρκινικών κυττάρων στον πνεύμονα και οι περιοχές του πνεύμονα που εμφανίζονται

Αιτίες για την εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα είναι ο καπνός του τσιγάρου (85%), άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες (15%), αλλά και γενετικές και επιγενετικές αλλοιώσεις.

- **Γενετικές αλλαγές.** για να μετατραπεί το φυσιολογικό βρογχικό επιθήλιο σε καρκινικό, είναι απαραίτητη η συσσώρευση πολλών γενετικών αλλοιώσεων (20). Αυτές, αφορούν είτε την υπερέκφραση ογκογονιδίων, είτε την απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Ελέγχουν έτσι την κυτταρική ανάπτυξη, δημιουργώντας αλλοιώσεις σε γονίδια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο. Πολλές περιπτώσεις καρκίνου του πνεύμονα οφείλονται σε απώλεια ετεροζυγωτίας κάποιων χρωμοσωμικών θέσεων (21).

Γενετικές αλλαγές	SCLC	NSCLC
Συχνές απώλειες αλληλομόρφων	3p, 4p, 4q, 5q, 8p, 10q, 13q, 17q, 22q	3p, 6p, 8p, 9p, 13q
Υπερέκφραση <i>ras</i>	< 1%	15-20%
Υπερέκφραση <i>bcl2</i>	75-95%	10-35%
Υπερέκφραση <i>myc</i>	15-30%	5-10%
Απενεργοποίηση RB1	~90%	15-30%
Απενεργοποίηση p53	80-90%	~50%
Απενεργοποίηση p16	0-10%	30-70%
Απενεργοποίηση FHIT	~75%	50-75%

Συχνές γενετικές αλλαγές σε καρκίνο του πνεύμονα (Mitsuuchi et al., 2002).

- ▶ **Επιγενετικές αλλαγές.** Στην απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων μπορούν να οδηγήσουν και επιγενετικοί παράγοντες. Αυτοί οι παράγοντες είναι κληρονομήσιμοι και δεν αφορούν αλλαγές στην αλληλουχία του DNA. Επιγενετική αλλαγή που σχετίζεται άμεσα με την καρκινογένεση είναι η μεθυλίωση του DNA, κυρίως σε περιοχές προαγωγέων ογκοκατασταλτικών γονιδίων (22). Τέτοιες αλλοιώσεις μπορούν να επιφέρουν την παρεμπόδιση της μεταγραφής γονιδίων και έτσι ανωμαλίες στην έκφραση των πρωτεϊνών

- ▶ **Δράση τελομεράσης.** Η παρουσία των τελομερών εξασφαλίζει ότι η αντιγραφή στα άκρα των χρωμοσωμάτων δεν είναι πλήρης. Έτσι επιτυγχάνεται μόνιμη αναστολή του πολλαπλασιασμού μετά από ένα πεπερασμένο όριο κυτταρικών διαιρέσεων. Η τελομεράση αντισταθμίζει τυχόν απώλειες που προκύπτουν μετά από κάθε κύκλο διπλασιασμού του DNA, προσθέτοντας στα άκρα των χρωμοσωμάτων την αλληλουχία TTAGGG. Τα φυσιολογικά κύτταρα δεν εμφανίζουν δράση τελομεράσης ενώ αντίθετα στα καρκινικά κύτταρα αυτή εμφανίζεται αυξημένη. Μελέτες σε όγκους πνευμόνων έδειξαν ότι η τελομεράση εκφράζεται στο 80% των NSCLC περιπτώσεων και στο 100% των SCLC περιπτώσεων (23).

► **Χρήση καπνού.** Η κατανάλωση καπνού κατέχει κύρια θέση ανάμεσα στους εξωγενείς παράγοντες που αυξάνουν τις πιθανότητες για εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα. (87% των περιπτώσεων σχετίζονται με το κάπνισμα). Ο κίνδυνος σχετίζεται με το συσσωρευτικό ποσό που καπνίζεται ή με τα “pack-years”, τα οποία καθορίζονται με τη διαίρεση του μέσου αριθμού τσιγάρων που καπνίζονται ανά ημέρα δια του 20, από 20^ο έτος και έπειτα, πολλαπλασιάζοντας με τον αριθμό ετών καπνίσματος. Η ηλικία της έναρξης του καπνίσματος είναι επίσης σημαντική. Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει διάφορες χημικές ουσίες, εκ των οποίων πολλές έχουν χαρακτηριστεί ως καρκινογόνες. Μερικές από αυτές γίνονται καρκινογόνες μόνο μετά την ενεργοποίηση τους από συγκεκριμένα ένζυμα που υπάρχουν σε διάφορους ιστούς του σώματος. Οι διάφορες μεταλλάξεις που προκαλούν αυτές οι ουσίες επηρεάζουν πολλά γονίδια με συνέπεια την εμφάνιση καρκίνου (24).

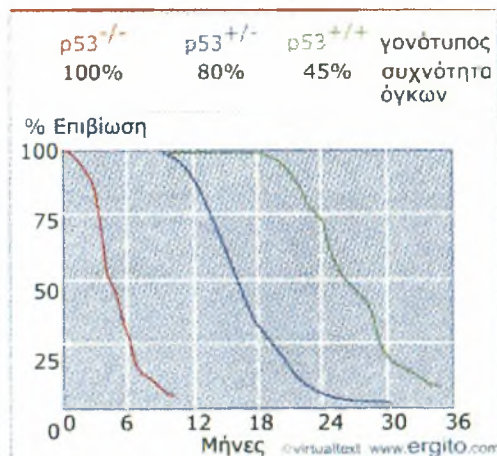
Τύπος	Αρ. Συστατικών
Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες	10
N-Νιτροζαμίνες	7
Αρωματικές Αμίνες	3
Ετεροκυκλικές αρωματικές αμίνες	8
Αλδεύδες	2
Διάφορα οργανικά συστατικά	15
Ανόργανα συστατικά	7
Σύνολο	52

Τα κύρια καρκινογόνα που περιέχονται στον καπνό του τσιγάρου (Hecht, 1999).

► **Διατροφή.** Η κακή διατροφή, κυρίως αυτή που είναι φτωχή σε φρούτα και λαχανικά, σε συνάρτηση με το κάπνισμα μπορεί να αυξήσει τις πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα (25).

A.3. Η ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ p53

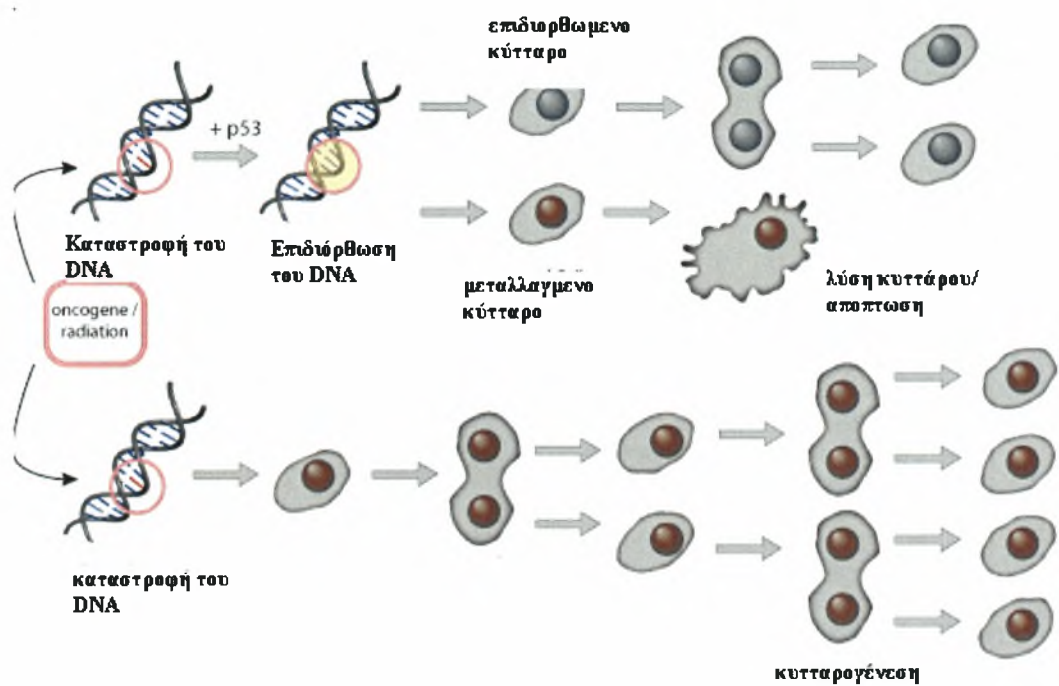
Η πιο σημαντική ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη είναι η p53, που ονομάστηκε έτσι από το μοριακό της βάρος. Περισσότερα από τα μισά περιστατικά καρκίνου στον άνθρωπο οφείλονται είτε σε έλλειμμα είτε σε μετάλλαξη του γονιδίου p53, καθιστώντας την απώλεια της p53 την πιο κοινή μετατροπή που παρατηρείται σε καρκίνους στον άνθρωπο (10,11).



Η απώλεια των αλληλομόρφων p53 οδηγεί σε συσσώρευση όγκων

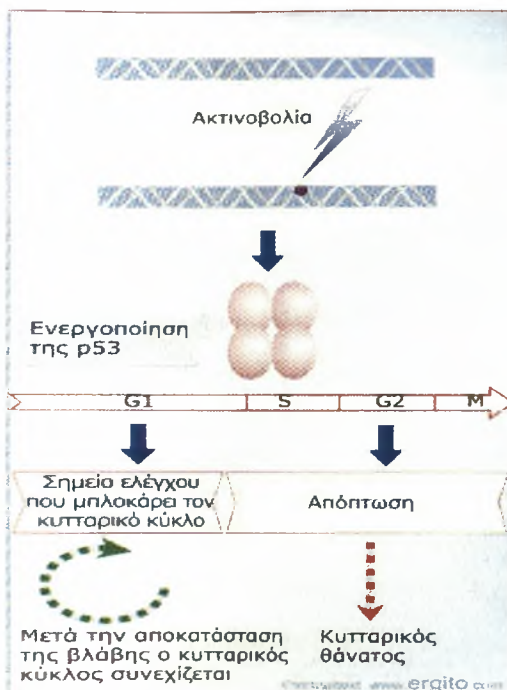
Η p53 είναι μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη. Στα μετασχηματισμένα κύτταρα ή στις κυτταρικές σειρές που προέρχονται από όγκους παρατηρείται μεγάλη αύξηση της ποσότητας της πρωτεΐνης p53. Στα αρχικά πειράματα βρέθηκε ότι η εισαγωγή κλωνοποιημένου γονιδίου p53 αθανατοποιεί τα κύτταρα χαρακτηρίζοντας το p53 ως ογκογονίδιο. Αργότερα όμως αποδείχθηκε ότι όλες οι μετασχηματιστικές μορφές της p53 ήταν μεταλλαγμένες παραλλαγές της πρωτεΐνης. Πρόκειται για επικρατή αρνητικά μεταλλάγματα που παρεμβάλλονται και υπερκαλύπτουν τη φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης άγριου τύπου. Η πιο συνηθισμένη μορφή κυρίαρχου αρνητικού μεταλλάγματος σχηματίζει ένα ετερομερές σύμπλοκο που περιέχει τόσο την υπομονάδα άγριου τύπου όσο και την μεταλλαγμένη. Στο σύμπλοκο αυτό, η υπομονάδα άγριου τύπου είναι ανίκανη να λειτουργήσει (12).

Οι μεταλλάξεις του *p53* συσσωρεύονται σε πολλούς τύπους καρκίνου, ενδεχομένως επειδή η απώλεια του προσδίδει στα κύτταρα ένα πλεονέκτημα ανάπτυξης. Η ποικιλία στην προέλευση αυτών των καρκίνων δείχνει ότι η *p53* δε συμμετέχει σε ένα ιστοειδικό φαινόμενο αλλά σε κάποιο γενικό και μάλλον πιο κοινό μηχανισμό ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η απώλεια αυτού του ελέγχου ίσως να είναι ένα δευτερογενές γεγονός που υποβοηθά την ανάπτυξη πολλών όγκων. Τα κύτταρα με μεταλλαγμένη πρωτεΐνη *p53* έχουν αυξημένη τάση για ενίσχυση του DNA, πιθανόν αντικατοπτρίζοντας το ρόλο της *p53* στη χαρακτηριστική αστάθεια του γονιδιώματος των καρκινικών κυττάρων.



Όλα τα φυσιολογικά κύτταρα έχουν χαμηλά επίπεδα *p53*, εξαιτίας ενός συστήματος αυτορύθμισης. Τα συστήματα στα οποία ενεργοποιείτε η *p53* φανερώνουν τον τρόπο της λειτουργίας της. Οι θεραπείες που προκαλούν βλάβες στο DNA (π.χ. ακτινοβολίες) επιφέρουν μεγάλη αύξηση της ποσότητας της *p53*. Η ενεργοποίηση της *p53* μπορεί να πυροδοτήσει δύο τύπους γεγονότων, τη διακοπή της αύξησης και την απόπτωση. Το αποτέλεσμα εξαρτάται εν μέρει από το στάδιο του κυτταρικού κύκλου στο οποίο βρίσκεται το κύτταρο. Έτσι, σε κύτταρα που βρίσκονται νωρίς στη

φάση G1, η p53 ενεργοποιεί ένα σημείο ελέγχου και έτσι παρεμποδίζει την περαιτέρω πρόοδο στον κυτταρικό κύκλο. Αυτό επιτρέπει τη διόρθωση του DNA που έχει υποστεί βλάβη, πριν το κύτταρο εισέλθει στη φάση S. Εάν όμως έχει ήδη καθοριστεί το κύτταρο να προχωρήσει σε διαίρεση, τότε η p53 πυροδοτεί το πρόγραμμα κυτταρικού θανάτου. Το στάδιο του κυτταρικού κύκλου όπου θα δράσει η p53 δεν είναι ο μοναδικός καθοριστικός παράγοντας του αποτελέσματος. Για παράδειγμα, μερικοί κυτταρικοί τύποι είναι πιο επιρρεπείς στην εκδήλωση της αποπτωτικής απόκρισης (12,13).



Οι βλάβες του DNA ενεργοποιούν την p53. Το τελικό αποτέλεσμα εξαρτάται από το στάδιο του κυτταρικού κύκλου. Στην αρχή του κύκλου η p53 ενεργοποιεί ένα σημείο ελέγχου το οποίο σταματά την πρόοδό του έως ότου να επιδιορθωθεί η βλάβη. Εάν είναι πολύ αργά για την ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου, η p53 πυροδοτεί την απόπτωση.

Η ύπαρξη αυτών των δυο εναλλακτικών αποτελεσμάτων της δράσης της p53, οφείλεται στο ότι οι βλάβες του DNA μπορεί να προκαλέσουν ογκογένεση και ότι σκοπός της p53 είναι να προστατεύσει τον οργανισμό από αυτήν. Εάν αυτό είναι εφικτό, ενεργοποιείτε το σημείο ελέγχου και επιβραδύνεται ο κυτταρικός κύκλος, ώστε να επιτραπεί η επιδιόρθωση της βλάβης. Εάν όμως αυτό δεν είναι δυνατό, το κύτταρο καταστρέφεται (13).

Η πρωτεΐνη p53 έχει πολλές και σημαντικές λειτουργίες

- Είναι **μεταγραφικός παράγοντας** και ενεργοποιεί την έκφραση πολλών γονιδίων. Παράδειγμα τέτοιου γονιδίου είναι το p21 που είναι καταστολέας του συμπλόκου της κυκλίνης E-Cdk2. Το σύμπλοκο αυτό επιτρέπει στα κύτταρα να περάσουν στη G1 φάση. Ακόμη, το p21 καταστέλλει την αντιγραφή σε κύτταρα που έχουν ήδη εισέλθει στη φάση S. Απουσία λοιπόν λειτουργικής p53, το κύτταρο δεν παράγει τον καταστολέα p21 και έτσι μπαίνει στη φάση S ανεξέλεγκτα.
- Είναι **αναστολέας του κυτταρικού κύκλου** σε περίπτωση βλάβης του DNA δίνοντας τον απαραίτητο χρόνο στον μηχανισμό επιδιόρθωσης του. Ενεργοποιεί το γονίδιο GADD45, η πρωτεΐνη που παράγεται σχηματίζει σύμπλοκο με την πρωτεΐνη PCNA και συμμετέχει στο σύστημα επιδιόρθωσης με εκτομή.
- Κατευθύνει την **αποπτωτική πορεία**. Επάγει την απόπτωση των κυττάρων εκείνων που έχει υποστεί βλάβες στο DNA και έχει αλλάξει τόσο που γίνεται υποψήφιο για την ανάπτυξη όγκου. Έτσι δρα ως παράγοντας μεταγραφής αυξάνοντας την έκφραση του γονιδίου bax το οποίο ενεργοποιεί την απόπτωση με ταυτόχρονη ελάττωση της πρωτεΐνης bcl (15).
- **Δρα συνεργατικά με την Rb**. Μια συνεργασία που στόχο έχει να εμποδίσει το σχηματισμό του καρκίνου.

Βασική βιοχημική ιδιότητα της πρωτεΐνης p53 είναι να σχηματίζει τετραμερή και να προσδένεται ειδικά σε αλληλουχίες του DNA που ρυθμίζουν την μεταγραφή. Ακόμη, η πρωτεΐνη p53 μπορεί να αλληλεπιδρά με κυτταρικές πρωτεΐνες, κυρίως παράγοντες μεταγραφής και αντιγραφής του DNA, επηρεάζοντας έτσι την σύνθεση συγκεκριμένων γονιδίων. Για παράδειγμα, μέσω του αμινοτελικού της άκρου μπορεί να συνδεθεί με την πρωτεΐνη TBP που προσδένεται στο στοιχείο TATA και αναστέλλει έτσι έμμεσα την έκφραση γονιδίων όπως τα c-jun και c-fos, αναστέλλοντας τη δράση τους και συνεπώς τη μεταγραφή του DNA (14). Άλλη πρωτεΐνη με

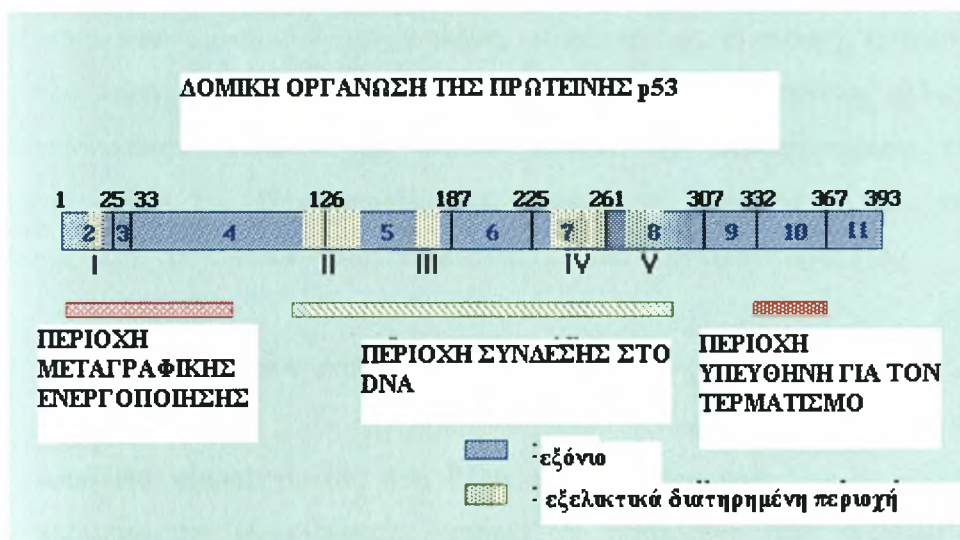
την οποία αλληλεπιδρά η p53, είναι η πρωτεΐνη πρόσδεσης στο στοιχείο CAAT, η CBP, με αποτέλεσμα την αναστολή της μεταγραφής του DNA. Μία ακόμη πρωτεΐνη με την οποία αλληλεπιδρά η p53 είναι η RPA, η οποία είναι παράγοντας αντιγραφής του DNA. Εμποδίζει μ'αυτόν τον τρόπο την έναρξη της φάσης S του κυτταρικού κύκλου. Τέλος, η p53 μπορεί να αναγνωρίζει μονόκλινα νουκλεϊκά οξέα, DNA ελικάσες και να εμπλέκεται στην επανασύνδεση των DNA αλυσίδων.

Η πρωτεΐνη p53 αποτελείται από 393 αμινοξέα και διαχωρίζεται στα παρακάτω τμήματα.

- Το αμινοτελικό άκρο (περίπου 100 αμινοξέα). Τα 50 πρώτα αμινοξέα είναι υπεύθυνα για την μεταγωγή του κυτταρικού σήματος, την ενεργοποίηση της μεταγραφής του DNA και είναι υπεύθυνα για τη δέσμευση της πρωτεΐνης Mdm2 (υπεύθυνη για την αποικοδόμηση της p53). Η αλληλουχία των επόμενων 40 αμινοξέων είναι πλούσια σε πουρίνες και είναι μάλλον υπεύθυνη για την πλήρη ογκοκατασταλτική ικανότητα της p53.
- Την περιοχή σύνδεσης στο DNA Η αλληλουχία μεταξύ των αμινοξέων 102 και 292 περιλαμβάνει ειδικές θέσεις πρόσδεσης στο DNA διαφόρων γονιδίων. Πρωτεΐνες p53 ανεπαρκείς στην περιοχή αυτή χάνουν την ικανότητά τους για τις περισσότερες από τις ιδιότητές τους. Οι συχνότερες μεταλλάξεις σε καρκίνους του ανθρώπου εμφανίζονται στην αλληλουχία αυτή, γεγονός που υποδεικνύει τη σημασία του τμήματος αυτού.
- Το καρβοξυτελικό άκρο. Η αλληλουχία μεταξύ των αμινοξέων 313-393, είναι υπεύθυνη για τον ολιγομερισμό και τον σχηματισμό ομοτετραμερών. Ενώ το κομμάτι της αλληλουχίας μεταξύ των 316-325 αμινοξέων, δρα ως ακολουθία πυρηνικής μεταφοράς που βοηθά στη χωροθέτηση της πρωτεΐνης στον

πυρήνα. Τα αμινοξέα μεταξύ των 360-393 έχουν ρυθμιστικό ρόλο στην ιδιότητα της πρωτεΐνης να προσδέεται στο DNA. Φυσιολογικά το καρβοξυτελικό άκρο δρα ως αυτοανασταλτική περιοχή. Η λειτουργία της p53 μπορεί να ενεργοποιηθεί με έλλειμμα του C-τελικού άκρου, φωσφορυλίωση ή άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ή με τη σύνδεση ολιγοπεπτιδίων σ' αυτό.

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53* εντοπίζεται στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 17, και εμφανίζει υψηλό βαθμό συντήρησης στα διάφορα είδη. Αποτελείται από 11 εξόνια, από τα οποία το πρώτο δεν εκφράζεται και διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα με ένα μεγάλο ιντρόνιο. Η έκφραση του γονιδίου ελέγχεται τουλάχιστον από την παρουσία δύο υποκινητών του p1 που βρίσκεται στο 5' άκρο του πρώτου εξονίου και p2 που βρίσκεται στο ιντρόνιο 4.



Ο εναλλακτικός υποκινητής που εντοπίζεται στο ιντρόνιο 4, οδηγεί στην έκφραση μιας κομμένης στο N-τελικό άκρο ισομορφής της p53 πρωτεΐνης. Όλες οι ισομορφές της p53 εκφράζονται σε φυσιολογικούς ιστούς στο επίπεδο του mRNA. Το πρότυπο μάλιστα της έκφρασής τους είναι ιστοειδικό, δείχνοντας έτσι ότι η έκφρασή τους μπορεί να ρυθμιστεί εκλεκτικά. Οι p53 ισομορφές που προκύπτουν από τον 4b υποκινητή

δεσμεύονται διαφορετικά στους υποκινητές γονιδίων στόχων του *p53* όπως τα BAX, p21, mdm2 και έτσι ρυθμίζουν διαφορετικά την έκφρασή τους. Όπως διαφορετικά ρυθμίζουν και την εξαρτώμενη από την *p53* απόπτωση. Οι διάφορες λοιπόν ισομορφές της *p53* και η διαφορετική έκφρασή τους, μπορεί ίσως να εξηγήσει την δυσκολία της σύνδεση των επιπέδων της *p53* και διάφορων βιολογικών καταστάσεων και την αδυναμία της δράσης διαφόρων φαρμάκων σε καρκινικούς ιστούς. Έτσι, η αποτυχία της κατάλληλης ρύθμισης της έκφρασης των *p53* ισομορφών ίσως παίζει ένα ρόλο στο σχηματισμό όγκων, που ξεκινά από την εξασθένιση της αντίδρασης της πρωτεΐνης άγριου τύπου που προκαλεί στα κύτταρα μεγαλύτερη ευαισθησία σε γενετικές καταστροφές και σε νεοπλασματικές μεταστροφές και έτσι οδηγεί στο σχηματισμό όγκων (26).

Η απενεργοποίηση του γονιδίου *p53* συνδέεται άμεσα με την ανάπτυξη όγκων. Η άρση αυτή της ογκοκατασταλτικής δράσης του εν λόγω γονιδίου, οφείλεται στη συχνή παρουσία μονοσημειακών μεταλλάξεων, που κυρίως εντοπίζονται στα εξόνια 5-8 του γονιδίου, αλλά και σε απαλοιφή τμήματος ή και ολόκληρης της θέσης του γονιδίου. Κάτι τέτοιο συνεπάγεται αλλαγή του αναγνωστικού πλαισίου και ως εκ τούτου την απενεργοποίηση της πρωτεΐνης *p53*. Το ίδιο αποτέλεσμα μπορεί να προκληθεί και από αλληλεπίδραση της φυσιολογικής πρωτεΐνης με ιικές ογκοπρωτεΐνες (16).

Αλλαγές του γονιδίου που οδηγούν σε απενεργοποίηση της *p53* είναι

- **Απώλεια ετεροζυγωτίας στη θέση του γονιδίου *p53***

Η απώλεια της ετεροζυγωτίας μπορεί να προκληθεί από ενδιάμεσες ελλείψεις ή απαλείψεις μεγάλων χρωμοσωμικών τμημάτων κατά τη μιτωτική διαίρεση. Όμως στην πραγματικότητα εκτός από την περίπτωση του πολύ σπάνιου συνδρόμου Li-Fraumeni και ένα μικρό ποσοστό σαρκωμάτων της παιδικής ηλικίας, οι μεταλλάξεις του *p53* αποτελούν περιπτώσεις επίκτητης και όχι κληρονομικής ανωμαλίας.

- **Μονοσημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου p53**

Υπεύθυνες για τέτοιου είδους μεταλλάξεις είναι είτε εξωγενείς παράγοντες (π.χ. ακτινοβολίες), είτε ενδογενείς παράγοντες (π.χ. ελεύθερες ρίζες). Οι περισσότερες από αυτές τις μεταλλάξεις είναι παρανοηματικές και το 80% αυτών εντοπίζονται στο τμήμα πρόσδεσης της πρωτεΐνης στο DNA και ως επί των πλείστων στα εξόνια 5-8. Μάλιστα το 40% αυτών, είναι μεταλλάξεις μετάπτωσης G-C σε A-T και συμβαίνουν κυρίως σε θέσεις CpG.

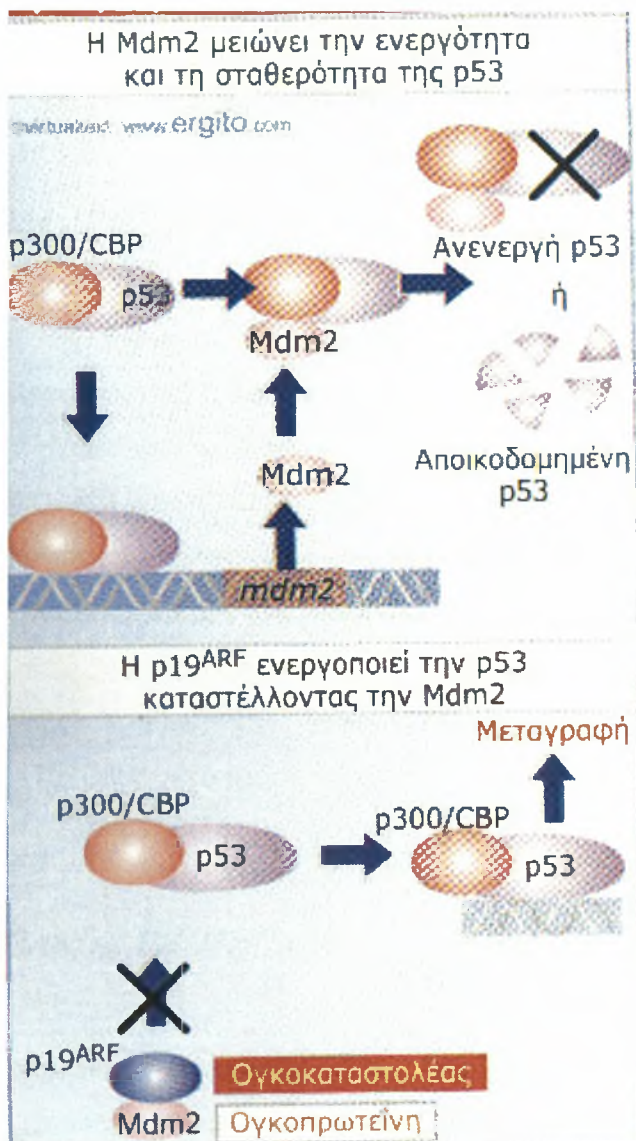
- **Μεταλλάξεις λόγω εξωγενών παραγόντων**

Από τους πιο σημαντικούς εξωγενείς παράγοντες που συνδέονται με μεταλλάξεις στο p53 είναι οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, τα αλκύλια, και άλλα χημικά παράγωγα του καπνού. Οι ουσίες αυτές προκαλούν κυρίως μεταλλάξεις μεταστροφής και ιδιαίτερα την αντικατάσταση γουανίνης από θυμίνη. Ακόμη παρατηρούνται μεταλλάξεις προσθήκης και απαλοιφής βάσεων κυρίως σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, υποδηλώνοντας έτσι τη βραδεία επιδιόρθωση κατά τη διάρκεια της αντιγραφής όπου προκαλείται αλλαγή αναγνωστικού πλαισίου καθώς και απαλοιφές σε θέσεις συναρμογής κάτι που καταδεικνύει ότι συμβαίνουν αλλαγές του DNA και μέσα στα ιντρόνια.

Στα φυσιολογικά κύτταρα η συγκέντρωση της p53 παραμένει σε χαμηλά επίπεδα εξαιτίας ενός μηχανισμού αυτορύθμισης. Σύμφωνα με αυτόν τον μηχανισμό, η p53 ενεργοποιεί την μεταγραφή του πρώτο-ογκογονιδίου mdm2. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο αυτό, καταστέλλει μέσω ενός μηχανισμού αρνητικής ανάδρασης την ικανότητα της να δρα ως μεταγραφικός παράγοντας, με πρόσδεσή της στο N-τελικό άκρο της p53 και μεταφορά της στο σύστημα ουβικουιτίνης για αποικοδόμηση.

Όταν φωσφορυλιωθούν οι σερίνες στις θέσεις 15 και 37 του “p53”, αυτές παύουν να είναι ελεύθερες για την πρόσδεση της mdm2 και έτσι δεν μπορεί να δημιουργηθεί το απαραίτητο σύμπλοκο για την αποικοδόμηση της

p53 και έτσι αυξάνεται η δράση της στο κύτταρο. Το ίδιο συμβαίνει και σε περιπτώσεις μεταλλαγμένης p53, το παραπάνω σύμπλοκο δεν μπορεί να δημιουργηθεί και έτσι αυξάνεται η δράση της, εφόσον δεν μπορεί αυτή να καταστραφεί (17).



Η ενεργότητα της p53 βρίσκεται σε ανταγωνισμό με την Mdm2, η οποία εξουδετερώνεται από την p19ARF.

Έτσι, παρεμποδίζεται η ογκοκατασταλτική δράση του γονιδίου p53 με αποτέλεσμα την απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, τη χρωσωμική αστάθεια και την ανευλοειδία του κυττάρου.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ποιοτική ανάλυση των επιπέδων του p53 mRNA, καθώς και η διερεύνηση της έκφρασης του υποκινητή P2 του γονιδίου σε καρκινώματα πνεύμονα.

Β.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Β.1. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Το βιολογικό υλικό της παρούσας πειραματικής εργασίας προήλθε από την Πνευμονολογική Χειρουργική Κλινική του Νοσοκομείου «Θεαγένειο». Το βιολογικό υλικό προέρχεται από ασθενείς οι οποίοι έπασχαν από καρκίνο του πνεύμονα. Σε κάθε περίπτωση ασθενούς, κατά την προγραμματισμένη χειρουργική αφαίρεση του όγκου, λαμβάνονταν μικρή ποσότητα παθολογικού και παρακειμένου ιστού για επεξεργασία. Τα δείγματα προς επεξεργασία, αμέσως μετά την παραλαβή τους, τοποθετούνταν σε υγρό άζωτο και μεταφέρονταν στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του ΑΠΘ, όπου διατηρούνταν στους $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι τη χρήση τους.

Β.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Ο βασικός εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών περιλαμβάνει:

1. Ανακινούμενο υδατόλουτρο.
2. Ρότορας.
3. Μηχανήματα φυγοκέντρωσης.
4. Φασματοφωτόμετρο.
5. Μηχάνημα PCR.
6. Αναδευτήρας Vortex.
7. Φυγόκεντρο ψυγείου-κενού.

8. pH-μετρο.
9. Φούρνος μικροκυμάτων.
10. Μηχάνημα αποστείρωσης.
11. Μηχάνημα οριζόντιας ηλεκτροφόρησης.
12. Τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Για την Παρασκευή των απαραίτητων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν χημικά αντιδραστήρια της εταιρείας “Sigma Chemical Company”, ενώ τα ένζυμα Taq πολυμεράση και RT-Superscript προήλθαν από την εταιρεία “Invitrogen™”. Τέλος, στις ηλεκτροφορήσεις των PCR προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιούνταν μοριακός δείκτης μεγέθους 100bp της εταιρείας “Invitrogen™”.

B.3. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα χημικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πειραματική εργασία καθώς και η ακριβής σύστασή τους ακολουθούν:

- Διάλυμα μετουσίωσης (Solution D): 4 M Guanidine Thiocyanate
25 mM Sodium Citrate pH 7.0
0,5% Sacrosyl
0,1 M 2-mercaptoethanol

Φυλάσσεται στους 4 °C.

- Διάλυμα γλωσσοφομίου-
Ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1): 24 ml χλωροφόρμιο
1 ml ισοαμυλικής αλκοόλης

Φυλάσσεται σε RT.

- Διάλυμα προσδιορισμού συγκέντρωσης
RNA (Concentration Buffer): 3 M NaOH
1 M NaCl

Αποστειρώνεται και φυλάσσεται στους 4 °C

• Διάλυμα 10X TBE:

108 gr Tris base
55 gr Boric acid
40 ml 0,5M EDTA (pH 8.0)
ddH₂O

Φυλάσσεται σε RT.

• Διάλυμα φόρτωσης ηλεκτροφόρησης
(Loading Buffer):

0.25% Βρωμοφαινόλη
0.25% Xylene cyanol
40% Γλυκερόλη
ddH₂O

Φυλάσσεται σε RT.

• Διάλυμα 10X TAE:

48,4 gr Tris base
22,96 gr acetic acid
20 ml 0,5M EDTA (pH 8.0)
ddH₂O

Φυλάσσεται στους 4 °C.

B.4. ΜΕΘΟΔΟΙ

B.4.1. Απομόνωση RNA από ιστούς

Μετά τη συλλογή των δειγμάτων και την κατάλληλη συντήρηση τους στους -70 °C, το πρώτο στάδιο της μελέτης έκφρασης εξονίων του *p53* περιλάμβανε την απομόνωση RNA από τους ιστούς. Η μέθοδος που επιλέχθηκε για το σκοπό αυτό είναι αυτή της σταδιακής εκχύλισης του RNA με οργανικούς διαλύτες και περιλάμβανε συνολικά 6 στάδια:

1. Ομογενοποίηση ιστών: η ομογενοποίηση των ιστών πραγματοποιούνταν με χρήση αποστειρωμένων, παγωμένων (-70°C) ιγδίων και υγρού αζώτου. Προς αποφυγή επιμολύνσεων, αμέσως μετά την ομογενοποίηση, ο κονιορτοποιημένος ιστός του κάθε ασθενή διανεμόταν σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf (100-1000μl), ο αριθμός των οποίων καθορίζονταν από τη διαθέσιμη

ποσότητα του ιστού. Το καθένα από αυτά τα σωληνάρια περιείχε περίπου 20mg κονιορτοποιημένου ιστού και φυλάσσονταν στους -70°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί για απομονώσεις RNA.

2. Λύση κυττάρων: προκειμένου να επιτευχθεί λύση των κυττάρων του ομογενοποιημένου ιστού, προστίθονταν αρχικά στα δείγματα συγκεκριμένη ποσότητα διαλύματος μετουσίωσης (Solution D). Η ποσότητα αυτή καθορίζονταν κάθε φορά από τη διαθέσιμη ποσότητα του ιστού. Έτσι, σε 20 mg κονιορτοποιημένου ιστού κάθε δείγματος προστίθονταν αρχικά 500 μl διαλύματος μετουσίωσης, ενώ ακολουθούσαν διαδοχικά προσθήκες: 50 μl 2M οξικού νατρίου (pH 4.0), 500 μl όξινης φαινόλης (pH 4.5) και 100 μl διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1). Μετά τις παραπάνω προσθήκες, τα δείγματα υποβάλλονταν σε έντονη ανακίνηση (Vortex) για 10-20 δευτερόλεπτα, ενώ στη συνέχεια ακολουθούσε επώαση στους 0 - 4 °C (πάγο) για 15 λεπτά. Για τον πλήρη διαχωρισμό των φάσεων, τα δείγματα στη συνέχεια φυγοκεντρούνταν στις 12500 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου 4 °C.
3. Εκχύλιση RNA: μετά την παραπάνω φυγοκέντρωση των δειγμάτων, σε κάθε σωληνάριο εντοπίζονταν δύο διακριτές φάσεις, εκ των οποίων η υδατική φάση (υπερκεείμενη στοιβάδα) συλλέγονταν προσεκτικά με πλαστική πιπέττα Pasteur και τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf (100-1000 μl). Ακολουθούσε επανεκχύλιση του RNA με προσθήκη σε κάθε δείγμα 500 μl όξινης φαινόλης (pH 4.5) και 100 μl διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1). Τα δείγματα στη συνέχεια ανακινούνταν έντονα (Vortex) για 15 λεπτά και ακολούθως φυγοκεντρούνταν στις 12500 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου 4 °C.
4. Απομάκρυνση φαινόλης: μετά την παραπάνω φυγοκέντρωση των δειγμάτων σε κάθε σωληνάριο εντοπίζονταν δύο διακριτές φάσεις, εκ των οποίων η υδατική φάση (υπερκεείμενη στοιβάδα) συλλέγονταν προσεκτικά με πλαστική πιπέττα Pasteur και τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf (100-1000 μl). Για την απομάκρυνση της φαινόλης από τα δείγματα ακολουθούσε προσθήκη σε κάθε δείγμα 100 μl διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής

αλκοόλης (24:1). Τα δείγματα στη συνέχεια ανακινούνταν έντονα (Vortex) για 15 λεπτά και ακολούθως φυγοκεντρώνταν στις 12500 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου 4 °C.

5. Κατακρήμιση RNA: μετά τη φυγοκέντρωση του προηγούμενου σταδίου, σε κάθε σωληνάριο εντοπίζονταν δύο διακριτές φάσεις, εκ των οποίων η υδατική φάση (υπερκείμενη στοιβάδα) συλλέγονταν προσεκτικά με πλαστική πιπέττα Pasteur και τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf (100-1000 μl). Με στόχο την αφυδάτωση και κατακρήμιση του RNA, ακολουθούσε προσθήκη 250 μl ισοπροπανόλης σε κάθε δείγμα. Στη συνέχεια, τα δείγματα επωάζονταν στους -20 °C για 20 λεπτά και φυγοκεντρώνταν στις 12500 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου 4°C. Μετά τη φυγοκέντρωση, πραγματοποιούνταν κατακρήμιση του RNA στη βάση των σωληναρίων, αφού η ισοπροπανόλη απομακρύνονταν προσεκτικά με απόχυση. Έχοντας την όψη «κουβαριού» (pellet), το RNA στις βάσεις των σωληναρίων «ξεπλένονταν» με 500 μl αιθανόλης 70%. Τα δείγματα στη συνέχεια αναδεύονταν ήπια στο ρότορα για 5 λεπτά, και ακολούθως φυγοκεντρώνταν στις 12500 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου 4 °C. Μετά τη φυγοκέντρωση, τα δείγματα RNA απομονώνονταν με απόχυση της υπερκείμενης αιθανόλης και στέγνωμα στον αέρα.
6. Διάλυση και διατήρηση δειγμάτων RNA: μετά την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης, τα προκύπτοντα δείγματα RNA διαλύονταν σε 50 μl αποστειρωμένου ddH₂O, και φυλάσσονταν στους -20 °C μέχρι τη χρησιμοποίησή τους.

B.4.2. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Μετά την απομόνωση των δειγμάτων RNA, ακολουθούσε ποσοτικός προσδιορισμός με τη μέθοδο της φασματοφωτομέτρησης. Αρχικά πραγματοποιούνταν μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου με ddH₂O και στη συνέχεια ακολουθούσε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) των δειγμάτων RNA, μετά από αραιώση ποσού δείγματος σε διάλυμα

προσδιορισμού συγκέντρωσης (Concentration Buffer). Τυπικά οι αραιώσεις που χρησιμοποιούνται σε φασματοφωτομετρήσεις είναι 15 μl RNA σε 900 μl διαλύματος προσδιορισμού συγκέντρωσης. Η αναλογία αυτή ωστόσο συχνά τροποποιούνταν ανάλογα με τη διαθέσιμη ποσότητα RNA.

Η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων μετρούνταν σε μήκη κύματος 260 nm και 280 nm, ενώ ο λόγος $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ καταγράφονταν για το προσδιορισμό της καθαρότητας των δειγμάτων. Από την οπτική πυκνότητα στα 260 nm υπολογίζονταν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων RNA σύμφωνα με το τύπο: $1\text{OD} = 40 \mu\text{g}/\text{ml}$. Στη συνέχεια, με βάση τις καταγεγραμμένες τιμές του λόγου $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ του φασματοφωτομέτρου, προσδιορίζονταν η καθαρότητα του κάθε δείγματος.

B.4.3. RT-PCR ΓΙΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ c-DNA

Μετά την απομόνωση των δειγμάτων RNA του προηγούμενου σταδίου, ακολουθούσε η σύνθεση του αντίστοιχου cDNA με τη μέθοδο PCR της Αντίστροφης Μεταγραφάσης (RT-PCR). Το ένζυμο που χρησιμοποιούνταν για το σκοπό αυτό είναι αυτό της SuperscriptTM III RNA H⁻ Reverse Transcriptase, ενώ τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθούνταν είναι αυτά του πρωτοκόλλου της κατασκευάστριας εταιρείας (InvitrogenTM).

Το μίγμα της RT-PCR συνολικού όγκου 13 μl για κάθε δείγμα χρησιμοποιούνταν για 1ng-5 μg ολικού RNA (ή 1ng-500ng mRNA), και περιείχε:

Oligo dTs	:	1 μl
mRNA	:	2 μl
10mM dNTPs	:	1 μl
ddH ₂ O	:	9 μl
Σύνολο	:	13 μl

Μετά την ανάμειξη των παραπάνω συστατικών, τα δείγματα επωάζονταν στους 65 °C για 5 λεπτά ώστε να επιτευχθεί αποδιάταξη του RNA.

Μετά την παραπάνω επώαση, τα δείγματα μεταφέρονταν γρήγορα σε πάγο όπου διατηρούνταν για 5 λεπτά, ώστε να ακολουθήσει στη συνέχεια η προσθήκη των ενζύμων.

Το ρυθμιστικό διάλυμα των ενζύμων που χρησιμοποιούνταν και που προστίθονταν σε κάθε δείγμα, περιείχε:

5X Ρυθμιστικό Διάλυμα Σύνθεσης cDNA: 2 μ l

0,1 M DTT: 3 μ l

RNase OUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μ l): 1 μ l

Superscript™ II (200 U/ μ l): 1 μ l

Σύνολο: 7 μ l

Μετά την προσθήκη των παραπάνω συστατικών σε κάθε δείγμα, ακολουθούσε ελαφρά ανακίνηση (πιπετάρισμα) και επώαση στους 55 °C για 50 λεπτά. Τέλος, ο τερματισμός της δράσης των ενζύμων πραγματοποιούνταν με επώαση των δειγμάτων στους 70 °C για 15 λεπτά.

Τα προκύπτοντα δείγματα cDNA συνολικού όγκου 20 μ l για κάθε δείγμα φυλάσσονταν στους -20 °C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν για τη μεγέθυνση των εξονίων του *p53*.

B.4.4. PCR ΓΙΑ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ p53

Η μελέτη της έκφρασης των εξονίων του *p53* επιτεύχθηκε με την εφαρμογή πολλαπλών αντιδράσεων PCR. Με στόχο την ποσοτικοποίηση των ανάλογων μεταγράφων του mRNA, η μεγέθυνση των παραπάνω εξονίων συνοδεύονταν πάντα με παράλληλη μεγέθυνση της β -ακτίνης, η οποία χρησιμοποιούνταν ως θετικός εξωτερικός ή εσωτερικός μάρτυρας των πειραμάτων.

• Προετοιμασία μινυμάτων PCR: για τις PCR μεγεθύνσεις των εξονίων του γονιδίου *p53* χρησιμοποιούνταν 2 μl cDNA από κάθε δείγμα. Κάθε σωληνάριο PCR και σε συνολικό όγκο 50 μl περιείχε:

10x Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	5μl
50 Mm MgCl ₂	1,5μl
25Mm dNTPs	0,4μl
Taq Πολυμεράση	0.25μl
S primer (100 pmol/μl)	1 μl
AS primer (100 pmol/μl)	1 μl
Αποστειρωμένο ddH ₂ O	38,85 μl
cDNA	2μl
Σύνολο	50μl

Το ζεύγος εκκινήτων (S και AS primers) που χρησιμοποιούνταν για τη μεγέθυνση των εξονίων 4-6, είχε τις παρακάτω νουκλεοτιδικές ακολουθίες:

Sense primer : 5'-AAGCAATGGATGATTTGATGC-3'

Anti-sense primer: 5'-CCTTCCACTCGGATAAGATGC-3'

Το ζεύγος εκκινήτων (S και AS primers) που χρησιμοποιούνταν για τη μεγέθυνση των εξονίων 6-9 είχε τις παρακάτω νουκλεοτιδικές ακολουθίες:

Sense primer : 5'-GCATCTTATCCGAGTGGAAGG-3'

Anti-sense primer: 5'-GGAGAGGAGCTGGTGTGTTGG-3'

Το ζεύγος εκκινήτων (S και AS primers) που χρησιμοποιούνταν για τη μεγέθυνση των εξονίων 4-9 είχε τις παρακάτω νουκλεοτιδικές ακολουθίες:

Sense primer : 5'-AAGCAATGGATGATTTGATGC-3'

Anti-sense primer: 5'-GGAGAGGAGCTGGTGTGTTGG-3'

Το ζεύγος εκκινήτων (S και AS primers) που χρησιμοποιούνταν για τη μεγέθυνση των εξονίων 4b-6 είχε τις παρακάτω νουκλεοτιδικές ακολουθίες:

Sense primer : 5'-TAGACGCCAACTCTCTCTAG-3'

Anti-sense primer: 5'-CCTTCCACTCGGATAAGATGC-3'

Για τη μεγέθυνση της β-ακτίνης, το μίγμα της PCR σε συνολικό όγκο 50 μl, περιείχε:

10x Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	5μl
50 Mm MgCl ₂	1,5μl
25Mm dNTPs	0,4μl
Taq Πολυμεράση	0.25μl
S primer (100 pmol/μl)	1 μl
AS primer (100 pmol/μl)	1 μl
Αποστειρωμένο ddH ₂ O	38,85 μl
cDNA	2μl
Σύνολο	50μl

Το ζεύγος εκκινητών (S και AS primers) που χρησιμοποιούνταν για τη μεγέθυνση της ακτίνης, είχε τις παρακάτω νουκλεοτιδικές ακολουθίες:

Sense primer : 5'-ACACTGTGCCCATCTACGAGG-3'

Anti-sense primer: 5'-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3'

• Συνθήκες Θεωρικής Έναρξης PCR: οι συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας κάτω από τις οποίες πραγματοποιούνταν η PCR για τη μεγέθυνση του γονιδίου της β-ακτίνης, είναι οι ακόλουθες:

1. Μετουσίωση (Denaturation): 96 °C για 2 mins
2. Μετουσίωση (Denaturation): 95 °C για 45 secs
3. Σύνδεση εκκινητών (Annealing): 57 °C για 45 secs
4. Σύνθεση νέου DNA (Extension): 72 °C για 1,5 min
5. Επιστροφή στο βήμα 3 και επανάληψη 35 κύκλων.
6. Διακοπή δράσης ενζύμου: 72 °C για 10 mins

Οι συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας κάτω από τις οποίες πραγματοποιούνταν η PCR για τη μεγέθυνση των εξονίων 4-6, 4-9, 6-9 και 4b-6, είναι οι ακόλουθες:

1. Μετουσίωση (Denaturation): 94 °C για 2 mins
3. Μετουσίωση (Denaturation): 94 °C για 45 secs
4. Σύνδεση εκκινητών (Annealing): 57 °C για 45 secs
5. Σύνθεση νέου DNA (Extension): 72 °C για 1,5 min
6. Επιστροφή στο βήμα 2 και επανάληψη 40 κύκλων.
7. Διακοπή δράσης ενζύμου: 72 °C για 10 mins

Μετά την ολοκλήρωση των κύκλων της PCR τα προϊόντα φυλάσσονταν στους 4 °C, μέχρι να διεξαχθεί ο έλεγχος τους με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης.

B.4.5. ΈΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΙΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Μετά την ολοκλήρωση των κύκλων της PCR, τα προκύπτοντα προϊόντα υποβάλλονταν σε έλεγχο, με στόχο την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση τους. Η μέθοδος που επιλέχθηκε για το σκοπό αυτό ήταν αυτή της οριζόντιας ηλεκτροφόρησης σε πηκτή απλής αγαρόζης 1,5% σε 1X TBE. Η ηλεκτροφόρηση διεξάγονταν σε ~ 75 V τάσης και σε ~ 90 mA ηλεκτρικού ρεύματος, και διαρκούσε 20-30 λεπτά.

Σε κάθε εφαρμογή ηλεκτροφόρησης PCR προϊόντων χρησιμοποιούνταν 12μl προϊόντος, αφού πρώτα είχε προηγηθεί ανάμειξή του με 4 μl διαλύματος φόρτωσης ηλεκτροφόρησης (loading buffer). Μετά τη φόρτωση των PCR προϊόντων στην πηκτή αγαρόζης, ακολουθούσε φόρτωση (5 μl) δείκτη γνωστού μοριακού βάρους (100 bp της εταιρείας “InvitrogenTM”), με στόχο το συγκριτικό προσδιορισμό μεγέθους των PCR προϊόντων. Ο θετικός εξωτερικός μάρτυρας της ακτίνης που μεγεθύνονταν σε κάθε εφαρμογή PCR φορτώνονταν στην πηκτή αγαρόζης 10-15 λεπτά περίπου μετά τη φόρτωση των PCR προϊόντων, και ενώ η ηλεκτροφόρηση είχε ήδη προχωρήσει κατά το ήμισυ.

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αγαρόζης μεταφέρονταν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (2UVTM Transilluminator) για την ανάγνωση και φωτογράφιση των αποτελεσμάτων.

B.4.6. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΒΑΣΕΩΝ DNA (DNA SEQUENCING)

Μερικά από δείγματα που με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης παρουσίασαν διαφορετική κινητικότητα (μετάγραφα μοριακών μεγεθών μικρότερων των αναμενόμενων) ελέγχθηκαν σε αυτόματο DNA αναλυτή. Ο έλεγχος αυτός περιλάμβανε δύο στάδια:

1. Καθαρισμός προϊόντων PCR: 35 μl από το προϊόν της PCR κάθε δείγματος συμπυκνώθηκαν με φυγοκεντρική εξάτμιση υπό κενό αέρος. Τα δείγματα στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,5% σε 1X TAE. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, οι ζώνες που παρουσίαζαν ενδιαφέρον (αναμενόμενου μοριακού μεγέθους) αποκόπηκαν από την πηκτή με τη χρήση μεταλλικών λεπίδων. Οι απομονωμένες ζώνες υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε επεξεργασία και καθαρισμό με το σύστημα καθαρισμού “DNA JETquick-Gel Extraction Kit”, ακολουθώντας τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας (GENOMED GmbH).
2. Ανάλυση αλληλουχίας βάσεων DNA: μετά την ολοκλήρωση του προηγούμενου σταδίου, τα καθαρά πλέον δείγματα cDNA υποβλήθηκαν σε ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων τους με τη μέθοδο των φθορίζοντων διδεοξυαναλόγων. Η ανάλυση αυτή διεξήχθη από αρμόδιους αναλυτές εκτός του εργαστηρίου (MWG Company).

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ p53 mRNA ΓΙΑ ΤΙΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΕΞΟΝΙΑ 4-6, 6-9 ΚΑΙ 4-9 ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ RT-PCR

Η ανίχνευση του mRNA του γονιδίου p53 για τις αλληλουχίες μεταξύ των εξονίων 4-6, 6-9 και 4-9 σε καρκίνο του πνεύμονα έγινε συνολικά σε 30 δείγματα cDNA. Δεκαπέντε από αυτά προήλθαν από RNA καρκινικών ιστών (χαρακτηρίζονται ως C), ενώ τα υπόλοιπα δεκαπέντε από RNA παρακείμενων φυσιολογικών ιστών των ίδιων ασθενών (χαρακτηρίζονται ως NC)

Σε όλες τις περιπτώσεις το cDNA συντέθηκε χρησιμοποιώντας 2μg RNA, με την παρουσία 0,5μg oligo dT primer και 200U Superscript II Αντίστροφης Μεταγραφάσης σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας Invitrogen. 200ng του cDNA που παρασκευάστηκε χρησιμοποιήθηκε με 1,25U Taq DNA Πολυμεράση σε συνολικό όγκο 50μl και πάλι σύμφωνα με το πρωτόκολλο, για να ακολουθήσουν PCR αντιδράσεις. Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν ως εξής:

Για την αλληλουχία μεταξύ των εξονίων 4-6

S: 5'-AAGCAATGGATGATTTGATGC-3'

AS: 5'-CCTTCCACTCGGATAAGATGC-3'

Για την αλληλουχία μεταξύ των εξονίων 6-9

S: 5'-GCATCTTATCCGAGTGGAAGG-3'

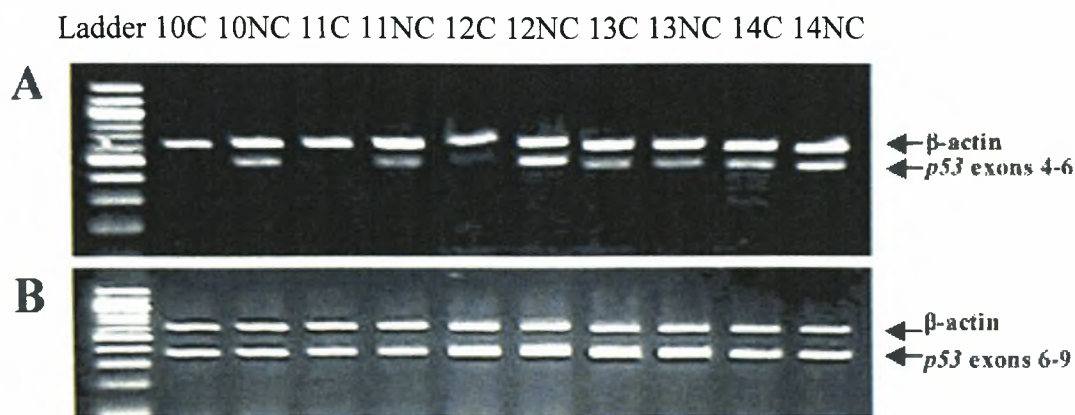
AS: 5'-GGAGAGGAGCTGGTGTGTTGTTGG-3'

Για την αλληλουχία μεταξύ των εξονίων 4-9

S: 5'-AAGCAATGGATGATTTGATGC-3'

AS: 5'-GGAGAGGAGCTGGTGTGTTGTTGG-3'

Σε όλες τις περιπτώσεις η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο ελέγχου.

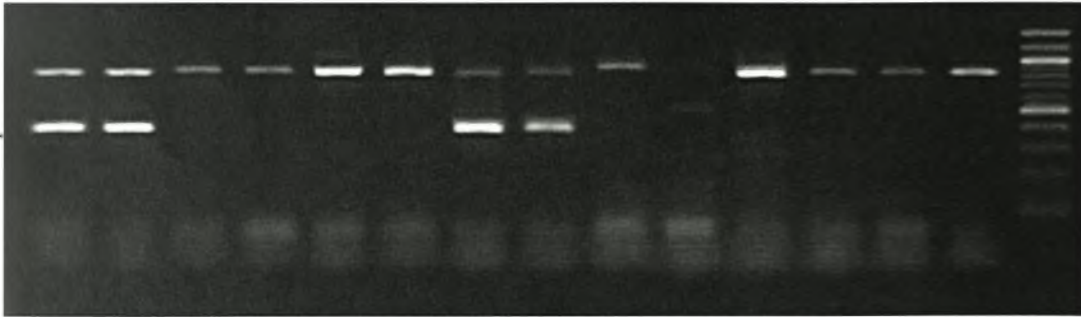


Εικ.1 Ηλεκτροφόρηση των RT-PCR προϊόντων για τις αλληλουχίες 4-6 και 6-9 σε πηκτή αгарόζης 1,2%, από καρκινικά (C) και παρακείμενα φυσιολογικά (NC) δείγματα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Το γονίδιο της β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς. Σε κάθε περίπτωση, το cDNA συντέθηκε από 2μg RNA με την παρουσία 0,5μg oligo dT primer και 200U Αντίστροφης Μεταγραφάσης Superscript II σύμφωνα με το πρωτόκολλο. Έπειτα 200ng cDNA ενισχύθηκαν με 1,25U Taq DNA Πολυμεράση σε συνολικό όγκο 50μl, σύμφωνα με το πρωτόκολλο. Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν ήταν για την αλληλουχία 4-6, S: 5'-AAGCAATGGATGATTTGATGC-3' και AS: 5'-CCTTCCACTCGGATAAGATGC-3'. Ενώ για την αλληλουχία 6-9, S: 5'-GCATCTTATCCGAGTGGAAGG-3' και AS: 5'-GGAGAGGAGCTGGTGTGTTGG-3'. Ο μοριακός μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε (ladder) ήταν 100bp.

Παρατηρήσαμε μετά την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων για τις αλληλουχίες 4-6 και 6-9 ότι η έκφραση της αλληλουχίας 6-9 είναι ανάλογη με την έκφραση του γονιδίου της β-ακτίνης σε ποσοστό μεγαλύτερο από την αλληλουχία 4-6 (εικ 1), γεγονός που ίσως υποδεικνύει ότι υπάρχουν κάποιες ανωμαλίες στην περιοχή πριν το εξόνιο 6 που μειώνει θεαματικά τα επίπεδα του p53 mRNA που περιέχει το εξόνιο 4-6. Αυτό ίσως να επιβεβαιώνεται και από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR για την αλληλουχία 4-9, όπου στα περισσότερα από αυτά (10C, 10NC, 13C, 13NC) εμφανίζεται εκτός από την αλληλουχία των 816bp και ένα ειδικό mRNA μικρότερου μοριακού βάρους 483bp (εικ 2).

10C 10NC 11C 11NC 12C 12NC 13C 13NC 14C 14NC 15C 15NC 16C 16NC Ladder

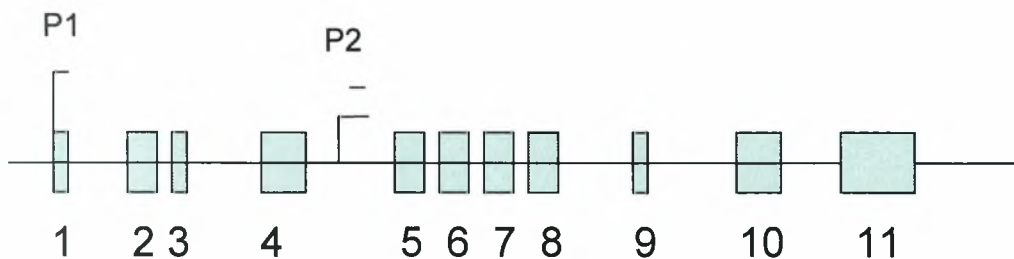
4-9 (816bp)
4-9 (short form)



Εικ. 2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1,2% των RT-PCR προϊόντων για την αλληλουχία μεταξύ των εξονίων 4-9 σε καρκινικά (C) και παρακείμενα φυσιολογικά (NC) δείγματα από ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο πνεύμονα. Ο μοριακός μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε ήταν 100bp. Η RT-PCR αντίδραση έγινε όπως και στην εικόνα 1. Ενώ οι primers που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλουχία 4-9 ήταν, A: 5'-AAGCAATGGATGATTTGATGC-3' και AS: 5'-GGAGAGGAGCTGGTGTGTGG-3'

Γ.2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΣΕ p53 mRNA ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ P2 ΣΤΟ INTRONIO 4

Εξαιτίας των παραπάνω παρατηρήσεων και στα πλαίσια της της διερεύνησης της διαφορετικής έκφρασης των εξονίων 4-6 και 6-9, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία για τον έλεγχο της έκφρασης ενός εναλλακτικού υποκινητή που εντοπίζεται στο ιντρόνιο 4, ώστε να διερευνηθεί τι μπορεί να συμβαίνει πριν το εξόνιο 6 και παίρνουμε τις παραπάνω εικόνες έκφρασης (εικ.1 και 2). Έτσι ανιχνεύθηκε η έκφραση του p53 mRNA των ίδιων 30 δειγμάτων για την αλληλουχία 4b-6.



Εξόνια: Υποκινητές:

Δομή γονιδίου "p53" και θέση υποκινητών.

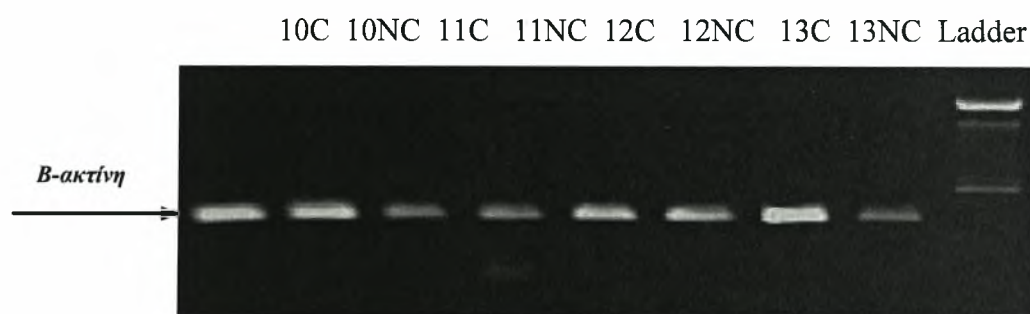
Σε όλες τις περιπτώσεις συντέθηκε cDNA χρησιμοποιώντας 2μg RNA, με την παρουσία 0,5μg oligo dT primer και 200U Superscript II Αντίστροφης Μεταγραφάσης σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παρασκευάστριας εταιρίας. 200ng του cDNA που παρασκευάστηκε χρησιμοποιήθηκε με 1,25U Taq DNA Πολυμεράση σε συνολικό όγκο 50μl και πάλι σύμφωνα με το πρωτόκολλο, για να ακολουθήσουν PCR αντιδράσεις. Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν ως εξής:

Για την αλληλουχία μεταξύ των εξονίων 4b-6

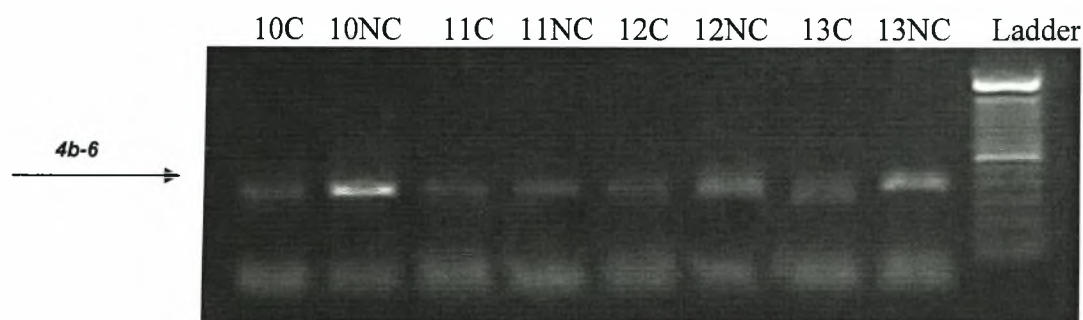
S: 5'-TAGACGCCAACTCTCTCTAG-3'

AS: 5'-CCTTCCACTCGGATAAGATGC-3'

Και πάλι ως γονίδιο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β-ακτίνης.

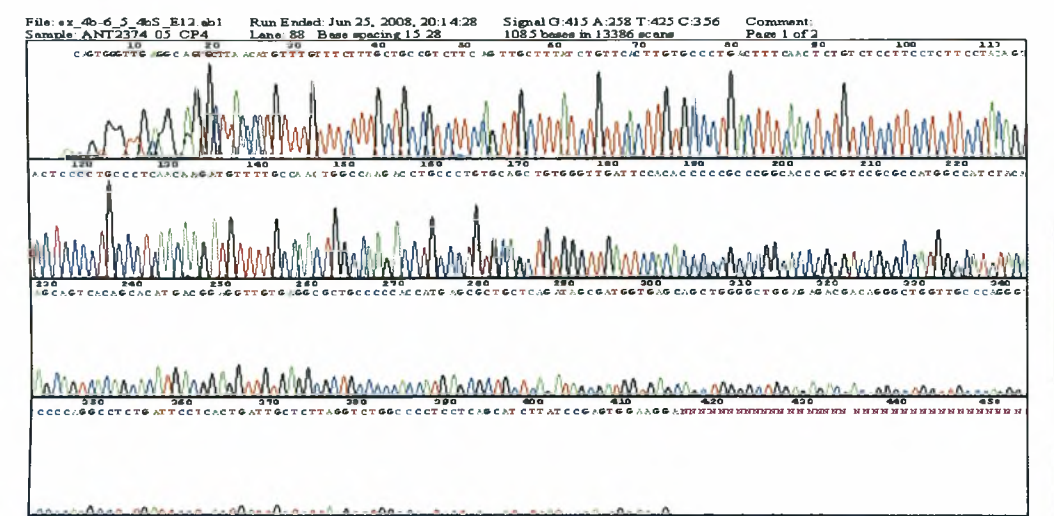


Εικ. 3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1,2% για την έκφραση του γονιδίου της β-ακτίνης που χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς.



Εικ. 4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1,2% των RT-PCR προϊόντων για την αλληλουχία 4b-6 σε καρκινικά (C) και παρακείμενα φυσιολογικά (NC) δείγματα από ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο του πνεύμονα. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ανάλογη αυτών των εικόνων 1 και 2. Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν είναι, A: 5'-TAGACGCCAACTCTCTCTAG-3' και AS: 5'-CCTTCCACTCGGATAAGATGC-3'. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β-ακτίνης (εικ. 3)

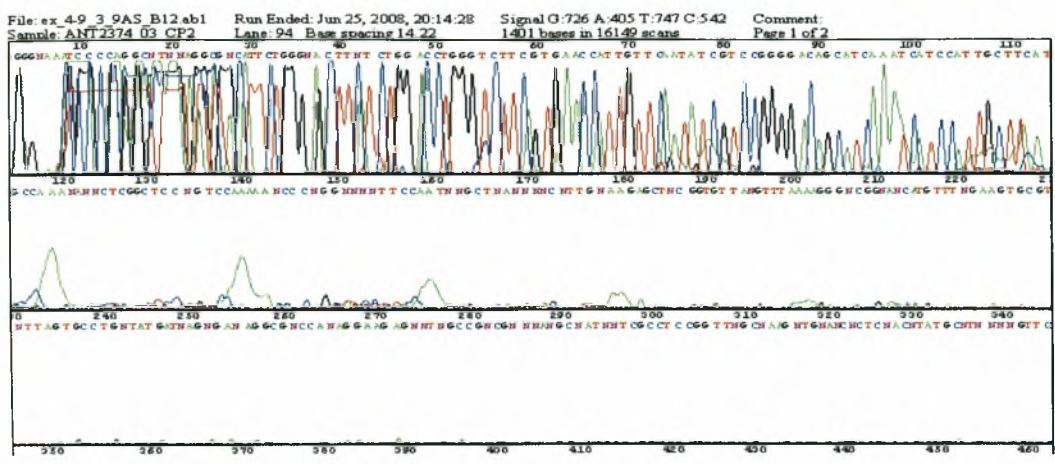
Η εικόνα που πήραμε μετά την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων έδειξε ότι η αλληλουχία 4b-6 εκφράζεται σε όλα τα δείγματα και μάλιστα η έκφραση είναι πιο έντονη στα παρακαείμενα φυσιολογικά (NC) δείγματα (εικ 3 και 4), χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς την β-ακτίνη.



Εικ. 5 Νουκλεοτιδική αλληλουχία της περιοχής 4b-6

Γ.3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ p53 ΕΙΔΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ

Η παρουσία ορισμένων «μικρών» DNA τμημάτων, μικρότερου μεγέθους από το αναμενόμενο συνηγορεί στη ύπαρξη πιθανών p53 μεταγράφων που προέρχονται από εναλλακτική συναρμολόγηση. Για να καθοριστεί η νουκλεοτιδική αλληλουχία αυτών των ανώμαλων «μικρών» p53 ειδικών μεταγράφων έγινε η απομόνωσή τους, ο καθαρισμός και η αλληλούχισή τους.



Εικ. 9. Νουκλεοτιδική αλληλουχία περιοχής 4-9 (short form)

Οι αλληλουχίες 4-6 και 6-9 υπάρχουν ολόκληρες όπως ήταν αναμενόμενο, όμως στη κοντή μορφή της αλληλουχίας 4-9 ενώ εντοπίζεται ο εκκινητής λείπει ένα μεγάλο κομμάτι, γεγονός που συνηγορεί με την άποψη ότι μπορεί να είναι προϊόν εναλλακτικού ματίσματος.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί μία ευρέως διαδεδομένη μορφή καρκίνου στη σύγχρονη κοινωνία. Ως πιθανά αίτια για την επαγωγή καρκίνου του πνεύμονα, έχουν χαρακτηριστεί διάφοροι εξωγενείς παράγοντες μεταξύ των οποίων εξέχουσα θέση κατέχει το κάπνισμα, διάφορες γενετικές ανωμαλίες σε επίπεδο DNA, καθώς και φαινόμενα επιγενετικών τροποποιήσεων όπως για παράδειγμα μεθυλίωση κυτοσινών ιδιαίτερα σε θέσεις προαγωγέων ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Μεταξύ των ογκοκατασταλτικών γονιδίων που σχετίζονται με τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης και τις επιδιορθώσεις του DNA, σημαντικό ρόλο παίζει το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53*. Το γονίδιο αυτό χαρακτηρίζεται και ως «φύλακας του γονιδιώματος».

Το *p53* εμφανίζεται μεταλλαγμένο στις περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου του πνεύμονα. Το επικρατέστερο είδος μεταλλάξεων του *p53* είναι αυτό της

παραιοηματικής μεηάλλαξης GC>AT ή GC>TA. Το 50% των παραιοηματικών αυτών μεηαλλάξεων εντοπίζεται σε θέσεις CpG που αποτελούν «θερμά σημεία» μεηαλλαξιγένεσης.

Αντικείμενο μελέτης της παρούσας πειραματικής εργασίας αποτέλεσε ο ποιοτικός προσδιορισμός της έκφρασης του *p53* γονιδίου σε καρκίνο του πνεύμονα και η ανίχνευση ειδικών προϊόντων εναλλακτικού ματίσματος.

Από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης πειραματικής εργασίας προέκυψε ότι σημαντικές διακυμάνσεις στην έκφραση του γονιδίου *p53* εμφανίζονται στις αλληλουχίες που οριοθετούνται από το εξόνιο 6. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η έκφραση του εναλλακτικού υποκινητή P2 που βρίσκεται στο ιντρόνιο 4. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την έκφρασή του και μάλιστα υποδεικνύουν ότι εκφράζεται εντονότερα στα παρακείμενα φυσιολογικά (NC) σε σχέση με τα καρκινικά (C) δείγματα.

Η ενεργοποίηση της μεηαγραφής μέσω του P2 υποκινητή, έχει ως πιθανό αποτέλεσμα την ρύθμιση των επιπέδων των πλήρων *p53* μεηαγράφων, που περιέχουν και την περιοχή που είναι υπεύθυνη για την μεηαγραφική ενεργοποίηση και έχουν πλήρη λειτουργικότητα. Επιπρόσθετα, η ύπαρξη των *p53* μεηαγράφων που προέρχονται από τον P2 υποκινητή, οδηγεί στην παραγωγή “μικρών” *p53* μορίων, που έχουν την ικανότητα τεηραμερισμού και σύνδεσης στο DNA, όμως τους λείπει η περιοχή ενεργοποίησης. Ως αποτέλεσμα, η συμμετοχή αυτών των μορίων σε εηεροτεηραμερή σύμπλοκα *p53*, οδηγεί στην απώλεια της *p53* λειτουργίας.

Η ανάλυση της νουκλεοηιδικής αλληλουχίας των *p53* ειδικών ανώμαλων μεηαγράφων, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος.

Όλα τα παραπάνω συνηγορούν ότι η έκφραση της *p53* πρωηείνης ελέγχεται σε πολλά επίπεδα, με σημανηότερο το μεηα- και μεηαμεηαγραφικό, μέσω των δύο εναλλακτικών υποκινητών και του εναλλακτικού ματίσματος.

Η διαλεύκανση αυτών των μηχανισμών θα μας βοηθήσει να κατανοήσουμε το βιολογικό ρόλο της p53 πρωτεΐνης τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Balmain A., Cancer as a complex genetic trait: tumor susceptibility in humans and mouse models, *Cell* 108, 2002, 145–152.
2. DePinho R.A., The age of cancer, *Nature* 408, 2000, 248-254.
3. Loeb L.A., Springgate C.F., and Battula, N., Errors in DNA replication as a basis of malignant changes, *Cancer Res.* 34, 1974, 2311-2321.
4. Nowell P.C., The clonal evolution of tumor cell populations, *Science* 194, 1976, 23-28.
5. Hayflick L., and Moorhead P.S., The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp. Cell Res.* 25, 1961, 585-621.
6. Cantley L.C., Auger K.R., Carpenter C., Duck-worth B., Graziani A., Kapeller R., and Soltoff S., Oncogenes and signal transduction, *Cell* 64, 1991, 281-302.
7. Cross M., and Dexter T.M. Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis, *Cell* 64, 1991, 271-280.
8. Heldin C.H. and Westermark B., Growth factors: mechanism of action and relation to oncogenes, *Cell* 37, 1984, 9-20.
9. Nevins J.R., Regulation of early adenovirus gene expression, *Microbiol. Rev.* 51, 1987, 419-430.
10. Levine A., p53, is a tumor suppressor gene, 2002 (www.egrito.com/lookup.jsp?exp=levine).

11. Levine A.J., p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell* 88, 1997, 323-331.
12. Finlay C.A., Hinds P.W., and Levine A.J., The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation, *Cell* 57, 1989, 1083-1093.
13. Malkin D. et al., Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms, *Science* 250, 1990, 1233-1238.
14. Seto E., Usheva A., Zambetti G.P., Momand J., Horikoshi N., Weinmann R., Levine A.J., and Shenk T., Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89, 1992, 12028-1245.
15. Vaux D.L., Cory S., and Adams J.M., Bcl-2 gene promotes hematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre B-cells, *Nature* 335, 1992, 440-442.
16. Maser R.S. and DePinho R.A., Connecting chromosomes, crisis, and cancer, *Science* 297, 2002, 565-569.
17. Momand J., Zambetti G.P., Olson D.C., George D., and Levine A.J., The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation, *Cell* 69, 1992, 1237-1245.
18. Secido Y., Fong K.M., Minna J.D., Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer, *Biochim Biophys. Acta*, Vol: 1378, 1998, 21-59.

19. Schiller J.H., Harrington D., Belani C.P., Comparison of fair chemotherapy regimens for advanced non-small cell lung cancer, 2002.
20. Sekido Y., Fong K.M., Minna J.D., Molecular biology of lung cancer, 2001,
21. Mitsuuchi Y., Testa J.R., Cytogenetics and molecular genetics of lung cancer. *Am. J. Med Genetics*, Vol: 115(3), 2002, 183-188.
22. Herman J.G., Baylin S.B., Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation, 2003.
23. Bunn P.A., Molecular biology and early diagnosis in lung cancer, 2002.
24. Hecht S. (1999): Tobacco smoke carcinogens and lung cancer.
25. Jemal A., Tiwari Z.C., Murray T., Ghafoor A., Samuels A., Ward E., Feuer E.J., and Thun M.J. (2004): Cancer statistics.
26. Jean-Christophe Bourdon, Kenneth Fernandes, Fiona Murray-Zmijewski, Geng Liu, Alexandra Diot, Dimitris P. Xirodimas, Mark K. Saville, and David P. Lane. (2005): p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity.

