



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και  
Βιοτεχνολογίας**

**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ  
ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

**ΕΝΖΥΜΑ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ RNA ΩΣ ΝΕΟΙ ΜΟΡΙΑΚΟΙ  
ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ:**

**Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΩΝ ΣΤΟΥΣ  
ΥΠΟΤΥΠΟΥΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ**

**ΑΛΙΠΡΑΝΤΗ ΜΑΡΟΥΣΩ**



**ΛΑΡΙΣΑ 2014**





**Ένζυμα αποικοδόμησης RNA ως νέοι μοριακοί δείκτες καρκίνου:**

**Η έκφραση των αποαδενυλασών στους υποτύπους του καρκίνου του πνεύμονα**

**RNA degradation enzymes as new molecular biomarkers of lung cancer:**

**The expression of deadenylases in lung cancer subtypes**

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

#### **ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

- Μπαλατσός Νικόλαος, Λέκτορας Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Υπεύθυνος διπλωματικής εργασίας).
- Γουργουλιάνης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## *Ευχαριστίες*

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μπαλατσό Νικόλαο για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την παρούσα εργασία καθώς επίσης και για τις γνώσεις και τις εμπειρίες που μου μετέδωσε και το χρόνο που διέθεσε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Λεωνίδα Δημήτριο και τον κ. Γουργουλιάνη Κωνσταντίνο που αποτελούν μέλη της τριμελούς επιτροπής για τη συμβολή τους στη διεξαγωγή της διπλωματικής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Π. Μαραγκοζίδη για τη αμέριστη βοήθεια του, τη σημαντική συμβολή του στη διεξαγωγή των πειραμάτων και για την άψογη συνεργασία μας καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένεια μου, στον Γιάννη και στον αδερφικό μου φίλο Νίκο, που βρίσκονται δίπλα μου και με στηρίζουν συνεχώς ηθικά και πνευματικά.

Τέλος, η παρούσα εργασία αφιερώνεται στον ξάδερφο μου Νικόλα και τον ευχαριστώ που συνέβαλε στην εκπλήρωση του στόχου μου.

## Περίληψη

Οι μετα-μεταγραφικοί μηχανισμοί ρυθμίζουν την σταθερότητα του mRNA και συμβάλουν στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης. Η αποαδενυλίωση είναι συνήθως στάδιο που καθορίζει το ρυθμό της αποικοδόμησης και καταστολής της μετάφρασης του mRNA, γεγονός που καθιστά την αποαδενυλίωση ως το κυριότερο σημείο ελέγχου για τις δύο αυτές διαδικασίες. Οι αποαδενυλάσες είναι μία διατηρημένη κατηγορία ενζύμων μέσω των οποίων γίνεται η βράχυνση των πολύ (A)ουρών των ευκαρυωτικών mRNAs και οι βιοχημικές τους δραστηριότητες έχουν κατά βάση μελετηθεί στο πλαίσιο των μονοκύτταρων οργανισμών. Λίγα είναι γνωστά σχετικά με τον βιολογικό ρόλο των αποαδενυλασών στους πολυκύτταρους οργανισμούς. Τουλάχιστον εννέα αποαδενυλάσες έχουν ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο.

Στις νεοπλασίες, η απορρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη παραγωγή ογκογόνων και/ή μειωμένη παραγωγή ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών. Για την κατανόηση του ρόλου των αποαδενυλασών στον καρκίνο του πνεύμονα σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης, στην παρούσα μελέτη ερευνάται η διαφοροποίηση της έκφρασης των αποαδενυλασών σε καρκινικούς ιστούς πνεύμονα, σε σχέση με παρακείμενο φυσιολογικό ιστό.

Μέσω της μεθόδου RT-PCR μελετήθηκε η μεταβολή έκφρασης των αποαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT7 και NOC σε κύτταρα προέλευσης μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα καθώς και του πλακώδους καρκινώματος. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως η έκφραση των αποαδενυλασών αλλάζει και στους δύο τύπους καρκίνου του πνεύμονα, καθώς στην συντριπτική πλειοψηφία των καρκινικών δειγμάτων που εξετάστηκαν, παρατηρήθηκε είτε υπερέκφραση ή υποέκφραση τους, σε άλλες σε μεγαλύτερο (PARN, CNOT6) και σε άλλες σε μικρότερο βαθμό (CNOT7, NOC). Πιο συγκεκριμένα, με βάση τη διάμεση τιμή έκφρασης των αποαδενυλασών, παρατηρήθηκε διπλασιασμός της έκφρασης των PARN και CNOT6 στο μικροκυτταρικό καρκίνο, ενώ υποδιπλασιασμός των αποαδενυλασών PARN και CNOT7 στο πλακώδες καρκίνωμα. Επιπλέον, στο μικροκυτταρικό καρκίνο παρατηρείται αμελητέα μεταβολή έκφρασης της CNOT7, ενώ η NOC, σύμφωνα με την τιμή της διάμεσης έκφρασης, παρουσίασε αμελητέα μεταβολή και στους 2 τύπους καρκίνου. Επιπροσθέτως, έγινε στατιστική ανάλυση με βάση την ηλικία των ασθενών και την συχνότητα καπνίσματος, σύμφωνα με την οποία μπορούν να εξαχθούν κάποια συγκεκριμένα συμπεράσματα για την έκφραση των αποαδενυλασών σε σχέση με την ηλικία και την συχνότητα καπνίσματος των ασθενών.

Οι παρατηρήσεις μας, σε συνδυασμό με την τεκμηριωμένη αλλαγή έκφρασης ογκογονιδίων ή ογκοκατασταλτικών παραγόντων, θα μπορούσαν να δώσουν νέα προοπτική στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών του καρκίνου μέσω των μηχανισμών αποικοδόμησης των mRNAs, αναδεικνύοντας τους παράγοντες που συμμετέχουν σε αυτούς ως υποσχόμενο στόχο θεραπείας.

## Abstract

Post-transcriptional mechanisms modulate mRNA stability and contribute to the control of gene expression. Deadenylation is often a rate-limiting step for mRNA decay and translational silencing, making it an ideal control point for both processes. Deadenylases are a conserved class of enzymes that facilitate poly(A) tail removal, and their biochemical activities have been mainly studied in the context of single-cell systems. Little is known about the different deadenylases and their biological role in multicellular organisms. At least 9 deadenylases have been recognized in humans.

In cancer, deregulation of mRNAs stability can lead to increased production of oncogene products and/or decrease of tumor suppressor protein levels. In order to understand the role of deadenylases in lung cancer, at gene expression level, in the present study we examine the diversification of the deadenylases expression in lung cancer tissues, with respect to adjacent normal tissue.

The variation of the expression of PARN, CNOT6, CNOT7 and NOC deadenylases is examined through the RT-PCR method, in cells originated from small cell lung cancer and squamous cancer tissues. The outcomes show that the expression of deadenylases varies in both types of lung cancer, since the vast majority of the cancer samples that examined, show either overexpression or underexpression, in others at larger (PARN, CNOT6) and other lower extent (CNOT7, NOC). Specifically, according to the statistical median of the expression values of deadenylases, doubling of PARN and CNOT6 expression in small cell lung cancer and halving of PARN and CNOT7 in squamous cancer are observed. In addition, insignificant fluctuation of CNOT7 expression is observed, while NOC present negligible variation in both types of cancer, in accordance with median value. Moreover, based on the age and smoking habits of the patients, statistical analysis was carried out and reveals interesting conclusions concerning the expression of deadenylases with respect to the age and smoking frequency of the patients.

Our observations, combined with the documented changes in expression of oncogenes or tumor suppressors could provide new perspective in our understanding of the molecular mechanisms in cancer through the mechanisms of mRNA degradation, revealing the factors involved as promising candidate targets for therapy.

# Περιεχόμενα

1	ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
1.1	ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.....	1
1.1.1	Γενικά Χαρακτηριστικά-Στατιστικά Δεδομένα.....	1
1.1.2	Ιστολογική Ταξινόμηση.....	1
1.1.3	Μορφολογία.....	2
1.1.4	Διαφορές SCLC και NSCLC.....	2
1.1.5	Σταδιοποίηση.....	4
1.1.6	Αιτιολογία.....	4
1.2	ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.....	5
1.2.1	Προσεγγίσεις των Μοριακών Προφίλ Στην Ανάπτυξη Της Εξατομικευμένης Θεραπείας.....	8
1.3	ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	8
1.3.1	Νευροενδοκρινική ενολάση (NSE).....	9
1.3.2	Προγαστρίνο-πεπτίδιο απελευθέρωσης (ProGRP).....	9
1.3.3	Καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA).....	10
1.3.4	Κυτταροκερατίνη 21-1 (CYFRA 21-1).....	10
1.3.5	Αντιγόνο πλακώδους καρκινώματος (SCCA).....	11
1.3.6	Ογκοκατασταλτικά γονίδια.....	11
1.4	ΩΡΙΜΑΝΣΗ mRNA.....	12
1.4.1	Κυριότερα στάδια της ωρίμανσης του mRNA – Φυσικός ρόλος.....	12
1.5	ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ mRNA.....	16
1.5.1	Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από αποαδενυλίωση.....	17
1.5.2	Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αφαίρεση της καλύπτρας.....	17
1.5.3	Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από ενδονουκλεοτιδική διάσπαση.....	17
1.6	ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΕΛΑΤΤΩΜΑΤΙΚΩΝ mRNAs.....	18



1.6.1	Μη-νοηματικά (ανερμηνεύσιμα) διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση NMD (Nonsense-mediated decay) .....	19
1.6.2	Αποικοδόμηση μη-τερματισμού (Non-stop decay) .....	20
1.6.3	No-go αποικοδόμηση (No-go decay) .....	21
1.6.4	Παράγοντες που επηρεάζουν την αποικοδόμηση του mRNA.....	22
1.7	ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΙΩΣΗ .....	23
1.7.1	Σύμπλοκα Αποαδενυλασών .....	25
1.7.2	Ρύθμιση αποαδενυλίωσης mRNA .....	28
1.7.3	Βιολογικές λειτουργίες των αποαδενυλασών .....	30
1.8	ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ .....	31
2	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ .....	34
2.1	ΣΚΟΠΟΣ.....	34
2.2	ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	35
2.2.1	Μεθοδος Real Time .....	35
2.2.2	Ιστορικό ασθενών από τους δύο τύπους καρκίνου του πνεύμονα.....	41
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	43
3.1	ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ .....	43
3.1.1	Βελτιστοποίηση προγενέστερων τεχνικών .....	43
3.1.2	Επίπεδα έκφρασης mRNA αποαδενυλασών σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνο του πνεύμονα (SCC) με quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) .....	43
3.1.3	Επίπεδα έκφρασης mRNA αποαδενυλασών σε ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (SCLC) με quantitative Real Time PCR (qRT-PCR).....	44
3.1.4	Σύγκριση αποτελεσμάτων μεταξύ SCC και SCLC.....	45
3.2	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ .....	46
4	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	57



# 1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

### 1.1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά-Στατιστικά Δεδομένα

Το 2010, στους άνδρες, οι πιο συχνές μορφές καρκίνου είναι εκείνες του πνεύμονα, του προστάτη, των βρόγχων και παχέος εντέρου, που μαζί αντιπροσωπεύουν το 52% όλων των νέων κρουσμάτων σε παγκόσμιο επίπεδο. Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η πιο συχνή μορφή καρκίνου που διαγιγνώσκεται και η κύρια αιτία θανάτου, αντιπροσωπεύοντας το 23-26% του συνόλου των θανάτων από καρκίνο (1). Όπως οι περισσότεροι συμπαγείς όγκοι, αναγνωρίζεται αργά σε σχέση με τη φυσική εξέλιξή του (2). Η μεγαλύτερη συχνότητα του καρκίνου του πνεύμονα παρατηρείται μεταξύ των ηλικιών 55 και 65 ετών. Επιπλέον, παραμένει η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο στις Ηνωμένες Πολιτείες, καθώς ευθύνεται για το θάνατο 163.000 ασθενών το χρόνο. Στην Ελλάδα ο καρκίνος του πνεύμονα είναι υπεύθυνος για το 30% των θανάτων από κακοήγη νεοπλασμάτα στους άνδρες αλλά μόνο για το 10% στις γυναίκες (1), (2), (3).

Η μέση τιμή 5-ετής επιβίωσης είναι μόλις 67% για ασθενείς με TNM στάδιο IA NSCLC και 57% για TNM-στάδιο IB NSCLC <sup>1</sup>. Η 5ετής θνησιμότητα από τη στιγμή που θα διαγνωστεί ο καρκίνος του πνεύμονα παραμένει στο 85-90%. Η θνησιμότητα σχετίζεται με το στάδιο νόσου κατά τη διάγνωση. Υπολογίζεται, με βάση τα μέχρι τώρα δεδομένα και την αύξηση του πληθυσμού παγκοσμίως, ότι το 2050 ο ρυθμός ανάπτυξης του καρκίνου θα έχει διπλασιαστεί. Μολαταύτα η έγκαιρη διάγνωση φαίνεται ότι βελτιώνει την πρόγνωση του καρκίνου του πνεύμονα (4) (1).

### 1.1.2 Ιστολογική Ταξινόμηση

Οι πιο συνήθεις καλοήθεις αλλοιώσεις είναι τα σφαιρικά, μικρά (3 έως 4 cm), διακριτά αμαρτώματα που συνήθως εμφανίζονται ως νομισματοειδείς αλλοιώσεις στις ακτινογραφίες θώρακος. Αποτελούνται κυρίως από ώριμο χόνδρο αλλά συχνά προσμιγνύονται με λίπος, ινώδη ιστό και αιμοφόρα αγγεία σε ποικίλες αναλογίες (3).

Οι όγκοι του πνεύμονα σε γενικές γραμμές κατηγοριοποιούνται σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (Non Small Cell Lung Cancer, NSCLC) που επιδρά σχεδόν στα 2/3 των ασθενών με χαμηλό ποσοστό επιβίωσης και στον μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (Small Cell Lung Cancer, SCLC). Και οι δύο τύποι ανταποκρίνονται σε διαφορετικές μορφές θεραπείας. Αυτό οδηγεί στην ανάγκη να προσδιορισθούν με ακρίβεια παθολογικές διαφορές μεταξύ αυτών των δύο τύπων. Πρότυπα γονιδιακής έκφρασης από την ανάλυση μικροσυστοιχιών επέτρεψαν στην υπο-κατηγοριοποίηση των τύπων καρκίνου του πνεύμονα που σχετίζεται με το βαθμό διαχωρισμού του όγκου, την φύση της θεραπείας και το ποσοστό επιβίωσης (5). Οι τύποι του καρκίνου του πνεύμονα παρατίθεται στον Πίνακα 1.

---

<sup>1</sup> TNM: T-Πρωτοπαθής νεοπλασία, N-Προσβολή λεμφαδένων, M-Απομακρυσμένες Μεταστάσεις

### 1.1.3 Μορφολογία

Τα *καρκινώματα από πλακώδες επιθήλιο*, εμφανίζουν την τάση να αναπτύσσονται κεντρικά στους κύριους βρόγχους και να διασπείρονται στους επιχώριους πυλαίους λεμφαδένες. Ιστολογικά, χαρακτηρίζονται από επιδερμοειδή κύτταρα που παρουσιάζουν ενδοκυτταρικές γέφυρες (3) (6) (Εικόνα 1Α).

Τα *αδενοκαρκινώματα*, ιστολογικά, συνήθως εμφανίζονται (Εικόνα 1Δ) με ανομοιογενείς περιφερικές μάζες που μεθίστανται εύκολα ενώ στον ασθενή πιθανόν να προϋπάρχει υπόστρωμα πνευμονικής νόσου (7). Τα αδενοκαρκινώματα εμφανίζουν την ασθενέστερη σχέση με το κάπνισμα μεταξύ των τεσσάρων κυρίων ιστολογικών τύπων του καρκίνου του πνεύμονα και σχηματίζουν μικρότερες μάζες συγκριτικά με τους άλλους ιστολογικούς τύπους (3) (8).

Τα *καρκινώματα από μεγάλα κύτταρα*, αναπτύσσονται στην περιφέρεια του πνεύμονα όπως τα αδενοκαρκινώματα και ιστολογικώς μοιάζουν με το πλακώδες καρκίνωμα. (Εικόνα 1Γ). Επίσης, έχουν κακή πρόγνωση λόγω της τάσης τους να διασπείρονται σε απομακρυσμένες περιοχές πρώιμα κατά την πορεία τους.

Τα *μικροκυτταρικά καρκινώματα* (Εικόνα 1Β), προέρχονται από τα νευροενδοκρινικά κύτταρα του πνεύμονα και αναπτύσσονται ενδοβρογχικώς. Συνεπώς, εκφράζουν ποικίλους νευροενδοκρινικούς δείκτες, καθώς και ένα πλήθος πολυπεπτιδικών ορμονών που μπορούν να προκαλέσουν παρανεοπλασματικά σύνδρομα. Οι όγκοι αυτοί μεθίσταται ταχύτατα στους πυλαίους λεμφαδένες (9) (3).

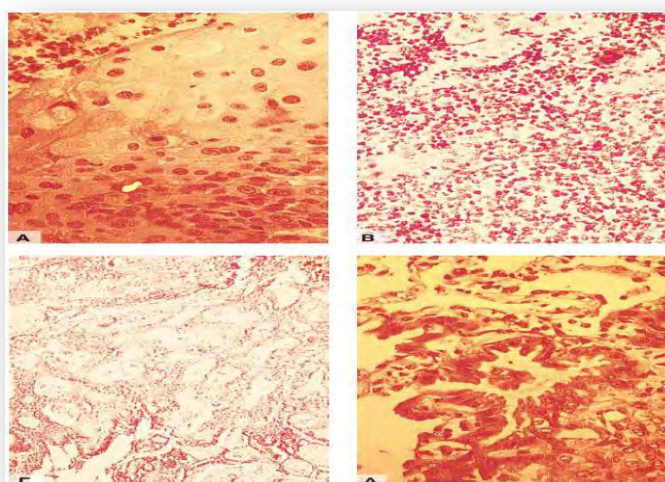
*Συνδυασμένοι τύποι: Μικτό καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο και αδενοκαρκίνωμα (adenosquamous carcinoma)*. Τα νεοπλάσματα εμφανίζονται στην κορυφή των πνευμόνων και συνυπάρχουν κύτταρα αδενοκαρκινώματος με κύτταρα πλακώδους καρκινώματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι μία σημαντική μειονότητα βρογχογενών καρκινωμάτων αποκαλύπτει περισσότερες από μία κυτταρικές διαφοροποιήσεις. Το εύρημα αυτό εισηγείται το ενδεχόμενο ότι όλα τα βρογχογενή καρκινώματα προέρχονται από ένα πολυδύναμο προγονικό κύτταρο (3) (10).

### 1.1.4 Διαφορές SCLC και NSCLC

Ο βασικός λόγος για την διάκριση μεταξύ SCLC και NSCLC, είναι ότι ουσιαστικά όλα τα SCLC έχουν δώσει ήδη μεταστάσεις κατά την διάγνωση και ως εκ τούτου δεν επιδέχονται θεραπευτική χειρουργική επέμβαση. Κατά συνέπεια, αντιμετωπίζονται καλύτερα με χημειοθεραπεία, με ή χωρίς συμπληρωματική ακτινοθεραπεία. Αντίθετα, τα NSCLC αποκρίνονται συνήθως πτωχά στη χημειοθεραπεία και αντιμετωπίζονται καλύτερα με χειρουργική επέμβαση. Συνολικά, τα NSCLC έχουν καλύτερη πρόγνωση από τα SCLC. Τα SCLC αν και είναι πολύ ευαίσθητα στη χημειοθεραπεία, σταθερά υποτροπιάζουν. Η μέση επιβίωση είναι ένα έτος, ακόμη και με θεραπεία. (7) (3).

**Πίνακας 1. Ιστολογική ταξινόμηση του βρογχογενούς καρκινώματος και επίπτωση κατά προσέγγιση (11)**

<p><b>I. <u>Μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (NSCLC) 70-75%</u></b></p> <p>1. Καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο (επιδερμοειδές) 25-30%</p> <p>2. Αδενοκαρκίνωμα, συμπεριλαμβανομένου του βρογχιολοκυψελιδικού καρκινώματος (30-35%)</p> <p>3. Καρκίνωμα από μεγάλα κύτταρα (10-15%)</p>
<p><b>II. <u>Μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (SCLC) 20-25%</u></b></p>
<p><b>III. <u>Συνδυασμένοι τύποι (5-10%)</u></b></p> <p>1. Μικτό καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο και αδενοκαρκίνωμα</p> <p>2. Μικτό καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο και SCLC</p>



**Εικόνα 1. Ιστολογική απεικόνιση των τεσσάρων τύπων του βρογχογενούς καρκίνου  
Α. Πλακώδες καρκίνωμα Β. Μικροκυτταρικός καρκίνος Γ. Μεγαλοκυτταρικός καρκίνος Δ. Αδενοκαρκίνωμα (6)**

Εκτός από τις διαφορές στη μορφολογία, στα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά και στην απόκριση στη θεραπεία μεταξύ των SCLC και NSCLC, υπάρχουν επίσης και γενετικές διαφορές, οι οποίες αναφέρονται στην παρακάτω ενότητα 2.2 (Πίνακας 3). Για παράδειγμα, τα SCLC χαρακτηρίζονται από υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων στα γονίδια TP53 και RB, ενώ στα NSCLC είναι συνήθως απενεργοποιημένο το p16/CDKN2A. Παρομοίως, μεταλλάξεις οι οποίες ενεργοποιούν το K-RAS ογκογονίδιο περιορίζονται στα αδενοκαρκινώματα στην ομάδα των NSCLC και είναι σπάνιες στα SCLC (3).

### 1.1.5 Σταδιοποίηση

Σε όλους τους καρκίνους του πνεύμονα, η σταδιοποίηση είναι απαραίτητη για τον προσδιορισμό του κυτταρικού τύπου, του μεγέθους και της επέκτασης της νόσου σε άλλα όργανα του σώματος, οι οποίοι είναι παράγοντες καθοριστικής σημασίας και δίνουν βασικές πληροφορίες για την πρόγνωση και καλύτερη δυνατή θεραπευτική προσέγγιση για τον καρκίνο (1). Με βάση το μέγεθος του όγκου, την ανεύρεση καρκινικών κυττάρων στους λεμφαδένες και τη μετάστασή τους σε άλλα όργανα διακρίνονται τέσσερα στάδια καρκίνου του πνεύμονα:

- Στάδιο I – Ο καρκίνος περιορίζεται στο εσωτερικό των πνευμόνων και δεν έχει επεκταθεί σε κανένα από τους λεμφαδένες. Το μέγεθος των όγκων δε ξεπερνά τα 3cm.
- Στάδιο II – Ο καρκίνος έχει επεκταθεί σε λεμφαδένες ή στα τοιχώματα των πνευμόνων, ή εντοπίζεται σε μία συγκεκριμένη περιοχή του κύριου βρόγχου. Οι όγκοι έχουν μέγεθος μεγαλύτερο από 3cm
- Στάδιο III – Ο καρκίνος έχει επεκταθεί σε ιστό πλησίον των πνευμόνων.
- Στάδιο IV – Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί μέσω μετάστασης σε άλλα σημεία του σώματος (12)(13)

Το σύστημα σταδιοποίησης τροποποιήθηκε το 2009, διαιρώντας τα διάφορα στάδια του συστήματος TNM σε υποκατηγορίες, με βάση τις παρατηρήσεις των σημαντικών διαφορών σε ποσοστά επιβίωσης. Πρόσφατα η *Union Internationale Contre le Cancer* και η *American Joint Committee on Cancer*, καθιέρωσαν νέα κριτήρια για τη TNM σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα και η πρόγνωση ορίσθηκε εκ νέου για τις διάφορες ομάδες του TNM (1).

### 1.1.6 Αιτιολογία

Παρατηρείται σχεδόν μια γραμμική σχέση μεταξύ της συχνότητας του καρκίνου του πνεύμονα και των πακέτων-ετών ( pack-years) καπνίσματος. Ο κίνδυνος είναι 60 φορές μεγαλύτερος στους βαρείς καπνιστές ( δύο πακέτα ημερησίως για 20 χρόνια). Αν και η παύση του καπνίσματος μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα με την πάροδο του χρόνου, δεν μπορεί ποτέ να επιστρέψει στα αρχικά επίπεδα. Στην πραγματικότητα, οι γενετικές μεταβολές που προηγούνται του καρκίνου του πνεύμονα μπορούν να εμμένουν για πολλά χρόνια στο βρογχικό επιθήλιο των πρώην καπνιστών.

Επίσης, το παθητικό κάπνισμα αυξάνει τον κίνδυνο του καρκίνου του πνεύμονα περίπου δύο φορές σε σχέση με τους μη καπνιστές. Άλλοι παράγοντες κινδύνου μπορεί να είναι η έκθεση στον αμίαντο, ράδιο, αρσενικό, χρώμιο, νικέλιο, βινυλοχλωρίδιο και υπερίτη ( ασφυξιογόνο δηλητηριώδες αέριο ) καθώς επίσης και η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία. Η έκθεση σε αμίαντο αυξάνει τον κίνδυνο του καρκίνου του πνεύμονα πέντε φορές στους μη καπνιστές (14) (3).

## 1.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Η Μοριακή-Γενετική ταξινόμηση του καρκίνου, που γίνεται μέσω της ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης, χρησιμοποιείται συχνά σε συνδυασμό με τα κλινικά χαρακτηριστικά για την πραγματοποίηση δύσκολων διαγνώσεων. Το μοριακό προφίλ των όγκων και ο προσδιορισμός των νέων υπογραφών της γονιδιακής έκφρασης, μέσω μικροσυστοιχιών, συμβάλλουν στην αποσαφήνιση μοριακών γεγονότων που συνδέονται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου του πνεύμονα (1).

Τα βρογχογενή καρκινώματα ,όπως και τα καρκινώματα σε πολλές άλλες ανατομικές περιοχές, προκύπτουν από μια σταδιακή συσσώρευση γενετικών ανωμαλιών που έχουν ως αποτέλεσμα τη μετατροπή του καλοήθους βρογχικού επιθηλίου σε νεοπλασματικό. Η ακολουθία ανάπτυξης των μοριακών μεταβολών δεν είναι τυχαία, αλλά ακολουθεί μια προβλέψιμη ακολουθία παράλληλη με την ιστολογική εξέλιξη προς τον καρκίνο. Για παράδειγμα, η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων που βρίσκονται στο 3p χρωμόσωμα εμφανίζεται πολύ νωρίς, ενώ οι μεταλλάξεις στο TP53 ή η ενεργοποίηση του K-RAS ογκογονιδίου (Πίνακας 2) συμβαίνουν σχετικά αργά. Σημαντικότερο είναι το γεγονός ότι ορισμένες γενετικές μεταβολές, όπως η απώλεια υλικού του χρωμοσώματος 3p, μπορούν να ανευρεθούν ακόμη και στο καλοήθες βρογχικό επιθήλιο ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, καθώς και στο αναπνευστικό επιθήλιο καπνιστών χωρίς καρκίνο του πνεύμονα. Σε αυτό το εύφορο έδαφος, τα κύτταρα που συσσωρεύουν πρόσθετες μεταλλάξεις αναπτύσσουν τελικά καρκίνο (3).

Εκτός από το κάπνισμα και την γενετική προδιάθεση, έχουν προταθεί και άλλοι παράγοντες, όπως γενετικές, ορμονικές, και ιογενείς λοιμώξεις (π.χ των ανθρωπίνων θηλωμάτων), μεταλλάξεις, μεθυλίωση υποκινητή και γενικά μεταγραφικών αλλαγών. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να παραμείνουν μακροπρόθεσμα και τελικά να οδηγήσουν σε παρεκκλίνουσα ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού και της κυτταρικής λειτουργίας (π.χ., πολλαπλασιασμό και απορυθμισμένη απόπτωση) (8).

Επιπλέον, η ρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs παρέχει στα ευκαρυωτικά κύτταρα ένα μηχανισμό ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης. Μέσω αυτής, ρυθμίζεται η σταθερή και ακριβής μετάφραση και αποικοδόμησή τους, και κατ' επέκταση η ποιότητα και η ποσότητα των πρωτεϊνών που συνθέτονται. Στον καρκίνο του πνεύμονα και γενικότερα στις νεοπλασίες, η απορρύθμιση της σταθερότητας των mRNAs μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη παραγωγή ογκογόνων και/ή μειωμένη παραγωγή ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών (15).

Επιγραμματικά τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από:

- αυτο-επάρκεια σε αυξητικά σήματα, λόγω μεταλλάξεων σε πρωτοογκογονίδια,
- απώλεια ευαισθησίας σε αντι-αυξητικά σήματα, λόγω μεταλλάξεων σε ογκοκατασταλτικά γονίδια
- αναστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση)
- απεριόριστη δυνατότητα αντιγραφής, εξαιτίας της δράσης της τελομεράσης
- διατήρηση της αγγειογένεσης
- προσβολή του ιστού και μετάσταση (16)

### Επιγενετικές αλλαγές

Οι επιγενετικές αλλαγές είναι κληρονομήσιμες και δεν αφορούν αλλαγές στην αλληλουχία του DNA. Οι κυριότερες επιγενετικές τροποποιήσεις, είναι η παρεκκλίνουσα μεθυλίωση του DNA (υπομεθυλίωση και υπερμεθυλίωση των κυτοσινών σε συγκεκριμένες θέσεις), η μετα-μεταφραστική τροποποίηση των ιστονών (ακετυλίωση, φωσφορυλίωση και μεθυλίωση) και η επαγωγή γονιδιακής καταστολής από τη μεσολάβηση ποικίλων μορφών RNA, αντινοσηματικά μετάγραφα, μη κωδικό RNA ή RNAi (17).

Στους Πίνακες 2 και 3 παριστάνονται οι συχνότερες χρωμοσωμικές ατυπίες και κυτταρογενετικές αλλαγές ανάμεσα στους δύο τύπους καρκίνου SCLC και NSCLC.

**Πίνακας 2. Συχνές χρωμοσωμικές ατυπίες σε καρκίνο πνεύμονα ανάμεσα στους δύο τύπους καρκίνου SCLC και NSCLC (8)**

Τροποποιήσεις	SCLC	NSCLC
Ελλείψεις	3p, 4p, 4q, 5q, 8p, 10q, 13q, 17q	3p, 6q, 8p, 9p, 9q, 13q, 17p, 18q, 19p, 21q, 22q
Προσθήκες	3q, 5p, 8q, 19q, Xq	1p, 1q, 3q, 5p, 7p, 7q, 8q, 11q, 12q



**Πίνακας 3. Σύγκριση μικροκυτταρικού καρκινώματος του πνεύμονα (SCLC) και του μη μικροκυτταρικού καρκινώματος του πνεύμονα (NSCLC) ως προς τις κυτταρογενετικές αλλαγές (3)**

	SCLC	NSCLC
<b>Αδρανοποίηση του FHIT</b>	~75%	~50 - 75%
<i>Ανωμαλίες βασικών ογκογονιδίων</i>		
Μεταλλάξεις K-RAS	< 1	~20
Υπερέκφραση οικογένειας MYC	15 – 30%	5 – 10%
Υπερέκφραση του BCL-2	75 - 95%	10 - 35%
Υπερέκφραση ERB1/EGFR	~ 60%	-
Υπερέκφραση ERB2/HER/NEU	~ 20%	-
Δραστηριότητα τελομεράσης	~ 100%	~ 80 - 85%
<i>Ανωμαλίες ογκοκατασταλτικών γονιδίων</i>		
Εξαλείψεις 3p	> 90%	> 80%
Απενεργοποίηση RB (έλλειψη/μετάλλαξη)	~90%	~15 – 30%
Απενεργοποίηση p16/CDKN2A (έλλειψη/μετάλλαξη/ υπερμεθυλίωση)	0 – 10 %	~70%
Απενεργοποίηση TP53 (έλλειψη/μετάλλαξη)	80 – 90%	~50%

### **1.2.1 Προσεγγίσεις των Μοριακών Προφίλ Στην Ανάπτυξη Της Εξατομικευμένης Θεραπείας**

Αυτές οι πρόοδοι έχουν διευκολυνθεί από την ανάπτυξη μοριακών τεχνικών και βιοδεικτών για τον προσδιορισμό του κινδύνου του καρκίνου, την πρόγνωση και τη βέλτιστη θεραπεία με στόχο την εξατομικευμένη πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα. Επιδημιολογικές μελέτες που δείχνουν τη σύνδεση μεταξύ του οικογενειακού ιστορικού και του αυξημένου κινδύνου του καρκίνου του πνεύμονα δίνουν την πρώτη απόδειξη για την ευαισθησία του ξενιστή.

Οι προγνωστικοί δείκτες για τον προσδιορισμό των ομάδων των ασθενών που είναι πιθανό να έχουν αυξημένη ευαισθησία ή αντοχή σε μια συγκεκριμένη θεραπεία, είναι ένα κρίσιμο βήμα στην εξατομικευση της θεραπείας. Παραδοσιακά η εκτίμηση γίνεται μέσω των μεμονωμένων γενετικών ή προγνωστικών δεικτών (π.χ. HER2 για καρκίνο του μαστού), αλλά αναδυόμενες τεχνικές επιτρέπουν συνολικές αναλύσεις της γονιδιακής έκφρασης, των πρωτεϊνικών προφίλ, συμπεριλαμβανομένων των δεικτών του αίματος, του κακοήθους ή καλοήθους ιστού του πνεύμονα. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η μέθοδος SNP, μέσω της οποίας εκτιμούνται οι γονιδιακές μεταλλάξεις, η μέθοδος PCR για την εκτίμηση επιγενετικών μεταλλάξεων, οι μικροσυστοιχίες για την εκτίμηση της έκφρασης των γονιδίων ή των επιπέδων microRNA καθώς και η μέθοδος πρωτεομικής για την εκτίμηση της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης.

## **1.3 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ**

Σημαντικό εργαλείο για την ανίχνευση του καρκίνου του πνεύμονα, την πρόγνωση και την πρόβλεψη είναι οι καρκινικοί δείκτες. Πρόκειται για βιομόρια που ανιχνεύονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο αίμα, στα ούρα, στους ιστούς, στο εγκεφαλονωτιαίο, ασκητικό, πλευριτικό υγρό. Δίνουν πληροφορίες σχετικά με την ύπαρξη, τη φύση, το μέγεθος, την υποτροπή ή την μεταστατική εξάπλωση μιας κακοήθους διεργασίας στον οργανισμό. Ωστόσο αυξημένες τιμές τους εμφανίζονται και σε ορισμένες μη καρκινικές παθολογικές καταστάσεις.

Οι βιολογικοί, μοριακοί και γενετικοί δείκτες που αναζητούνται στον καρκίνο του πνεύμονα είναι οι εξής: το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA), το καρκινικό αντιγόνο 15-3 (CA 15-3), η Κυτταροκερατίνη 21-1 (CYFRA 21-1), η νευροενδοκρινική ενολάση (NSE), η B-B Κρεατινική κινάση (B-B creatine kinase), το αντιγόνο πλακώδους καρκινώματος (SCC), το ιστικό πολυπεπτιδικό αντιγόνο (TPA) και το ειδικό Ιστικό Πολυπεπτιδικό Αντιγόνο (TPS).

Νεότεροι δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί στον καρκίνο του πνεύμονα είναι οι υποδοχείς ορμονικών υποδοχέων στεροειδικών ορμονών. Επιπλέον, άλλοι μοριακοί και γενετικοί καρκινικοί δείκτες είναι: τα ογκογονίδια και ογκοπρωτεΐνες, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, οι αυξητικοί παράγοντες του όγκου, η παραγωγή χειμερικών πρωτεϊνών, η απώλεια ετεροζυγωτείας και μικροδορυφορικό DNA και ο προσδιορισμός τελομεράσης.

### **1.3.1 Νευροενδοκρινική ενολάση (NSE)**

#### Εξέταση και διάγνωση

Η NSE πρόκειται για διαλυτό γλυκολυτικό μεταλλοένζυμο που παρέχει απαραίτητα συστατικά για την αερόβια γλυκόλυση.

Είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης επιβίωσης, αλλά χρησιμεύει σε πολλές μελέτες ως βοήθημα στη διάγνωση του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα SCLC (18). Υψηλά επίπεδα ορού της NSE ( $> 100 \mu\text{g} / \text{L}$ ) σε ασθενείς με υπόνοια κακοήθειας υποδηλώνουν την παρουσία SCLC. Μέτριες αυξήσεις της NSE βρίσκονται επίσης σε ασθενείς με καλοήθεις όγκους των πνευμόνων, καθώς και σε ορισμένες μορφές καρκίνου του παγκρέατος, του στομάχου, του παχέους εντέρου και του μαστού. Η NSE χρησιμοποιείται επίσης στη διάγνωση ειδικότερα σε συνδυασμό με την μέτρηση του ProGRP (19).

#### Πρόγνωση και παρακολούθηση

Η προγνωστική αξία της NSE έχει αποδειχθεί σε πολυπαραγοντικές δοκιμές τόσο για SCLC, όσο και για NSCLC. Μελέτες έδειξαν ότι η NSE είναι πιο χρήσιμη στην παρακολούθηση των ασθενών με SCLC που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία καθώς και για την ανίχνευση της υποτροπής της νόσου του SCLC (20).

#### Αναλυτικές αναφορές

Η NSE είναι παρούσα στα ερυθροκύτταρα, τα κύτταρα του πλάσματος και των αιμοπεταλίων. Έτσι, ο ορός ή το πλάσμα θα πρέπει να διαχωρίζονται από τα ερυθρά κύτταρα μέσα σε 60 λεπτά από τη λήψη, για την αποφυγή ψευδών αποτελεσμάτων. Τα δείγματα του ορού θα πρέπει να αποθηκεύονται στους  $+4^\circ \text{C}$  (βραχυπρόθεσμα) και στους  $-70^\circ \text{C}$  (μακροπρόθεσμα).

### **1.3.2 Προγαστρίνο-πεπτίδιο απελευθέρωσης (ProGRP)**

#### Εξέταση και διάγνωση

Το ProGRP είναι ένας αξιόπιστος δείκτης για SCLC, με ευαισθησία 65-80% και ειδικότητα 93-96%. Είναι σπάνια αυξημένα σε άλλες κακοήθειες, και αν ναι, γενικά μόνο ήπια. Εξαιρέση, είναι η νεφρική νόσος μπορεί να προκαλέσει αύξηση έως  $300 \text{ ng} / \text{L}$ . Συγκεντρώσεις του ProGRP  $> 200 \text{ ng} / \text{L}$  είναι εξαιρετικά ύποπτες για καρκίνο του πνεύμονα. Το ProGRP έχει αποδειχθεί ότι είναι χρήσιμο καρκινικός δείκτης στην διαφορική διάγνωση, κυρίως όσον αφορά τη διάκριση του SCLC από άλλες μορφές καρκίνου του πνεύμονα. Όταν το ProGRP χρησιμοποιείται μόνος του ως δείκτης, τότε προτιμάται από την NSE, ενώ συνδυασμός και των δύο παρέχει επιπρόσθετες πληροφορίες. Τα επίπεδα του Pro-GRP αυξάνονται κατά μέσο όρο 35 μέρες πριν την κλινική ένδειξη ύπαρξης υποτροπής ενώ τα επίπεδα του NSE αυξάνονται 20 μέρες μετά την ανίχνευση υποτροπής (21).

### Πρόγνωση και παρακολούθηση

Μόνο μία μελέτη υποστηρίζει τη χρήση των ProGRP στην πρόγνωση. Εντούτοις, διάφορες μελέτες προτείνουν ότι μπορεί να είναι χρήσιμο στην παρακολούθηση του SCLC ή στην ανίχνευση υποτροπιάζουσας νόσου μετά από χημειοθεραπεία.

### Αναλυτικές αναφορές

Λόγο δυσκολίας του προσδιορισμού των επιπέδων του GRP στον ορό εξαιτίας αστάθειας του στο αίμα, χρησιμοποιείται ως ειδικός δείκτης για το SCLC το ProGRP (22).

## **1.3.3 Καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA)**

### Εξέταση και διάγνωση

Το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο εκφράζεται κατά την κυτταρική ανάπτυξη και αποτελεί γλυκοπρωτεΐνη επιφάνειας, που αλληλεπιδρά με τον μικροσκελετό του κυττάρου και απελευθερώνεται στην κυκλοφορία σε ασθενείς με νεοπλασίες.

Οι συγκεντρώσεις του CEA είναι ιδιαίτερα υψηλά σε αδenoκαρκίνωμα και στον μεγαλοκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα., με οριακή τιμή 2,5 ng/ml (23). Παρόλο που το CEA παρουσιάζει ιδιαίτερα αυτές τις υψηλές συγκεντρώσεις, δεν αποτελεί αξιόπιστο και προγνωστικό δείκτη, γιατί οι αυξημένες τιμές συγκεντρώσεις του μπορούν να εντοπιστούν σε καλοήθειες καταστάσεις. Ωστόσο το CEA μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην διαφορική διάγνωση του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, κατά προτίμηση σε συνδυασμό με το CYFRA 21-1 (24).

### Πρόγνωση και παρακολούθηση

Το CEA παίζει σημαντικό ρόλο στη θεραπεία σε προχωρημένα στάδια και την ανίχνευση υποτροπής του αδenoκαρκινώματος.

### Αναλυτικές αναφορές

Ελαφρώς υψηλότερα αποτελέσματα CEA μπορεί να παρατηρηθούν σε καπνιστές.

## **1.3.4 Κυτταροκερατίνη 21-1 (CYFRA 21-1)**

### Εξέταση και διάγνωση

Η κυτταροκερατίνη 19 είναι μία πρωτεΐνη κυτταροσκελετού των επιθηλιακών κυττάρων. Βρίσκεται στο επιθήλιο των βρόγχων και σε καρκίνο των πνευμόνων απελευθερώνονται μεγάλες ποσότητες της κυτταροκερατίνης 19 στον ορό. Το CYFRA 21-1 αποτελεί τμήμα της κυτταροκερατίνης 19 και προσδιορίζεται στον ορό με μονοκλωνικά αντισώματα. Είναι ο πιο ευαίσθητος καρκινικός δείκτης για NSCLC, ιδιαίτερα για το πλακώδες καρκίνωμα, με οριακή τιμή 3,3 ng/ml και διαγνωστική ευαισθησία 72%. Επίσης παρατηρούνται οι τιμές του αυξημένες σε γυναικολογικό καρκίνο και καρκίνο του ουροποιητικού. Ωστόσο, η μέτρηση του μπορεί να είναι

χρήσιμη στην διαφορική διάγνωση των ύποπτων όγκων των πνευμόνων, ιδιαίτερα εάν η βιοψία δεν είναι δυνατή (22).

#### Πρόγνωση και παρακολούθηση

Μια πρόσφατη ανάλυση των συγκεντρωτικών δεδομένων από 9 ερευνητικά κέντρα έδειξε ότι ο CYFRA 21-1 αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα τόσο στα πρώιμα όσο και στα όψιμα στάδια του NSCLC, επιβεβαιώνοντας προηγούμενες μελέτες που αποδεικνύουν την πολυπαραγοντική προγνωστική σημασία του. Άλλες μελέτες έχουν προτείνει ο CYFRA 21-1 ως προγνωστικό δείκτη στο SCLC.

Επιπλέον, πρόσφατες έρευνες σε ασθενείς με προχωρημένο στάδιο NSCLC, που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία, υποδηλώνουν ότι ο CYFRA 21-1, κατά τη διάρκεια της αρχικής φάσης της θεραπείας, θεωρείται ως προγνωστικός δείκτης για τις επόμενες θεραπείες (5).

#### Αναλυτικές αναφορές

Οι τιμές του CYFRA 21-1 μπορεί να επηρεαστούν σημαντικά σε περιπτώσεις νεφρικής ανεπάρκειας, κατά την οποία μπορούν να παρατηρηθούν υψηλότερα αποτελέσματα (25).

### **1.3.5 Αντιγόνο πλακώδους καρκινώματος (SCCA)**

#### Εξέταση και διάγνωση

Παρόλο που είναι λιγότερο ευαίσθητο στο NSCLC απ'ότι είναι ο CYFRA 21-1, ο SCCA έχει καλύτερη εξειδίκευση στο πλακώδες καρκίνωμα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ιστολογικούς υπότυπους, με οριακή τιμή 2,5 ng/ml (26). Ωστόσο, μπορεί να αυξηθεί σημαντικά σε πλακώδη καρκινώματα του τραχήλου της μήτρας, του οισοφάγου, της κεφαλής, του λαιμού και των πνευμόνων, καθώς και σε δερματολογικές παθήσεις. Το SCCA μπορεί να χρησιμοποιείται στη διαφορική διάγνωση του πλακώδους καρκινώματος του NSCLC, ιδιαίτερα σε συνδυασμό με το CEA και CYFRA 21-1.

#### Πρόγνωση και παρακολούθηση

Έχει αναφερθεί ως πιθανός προγνωστικός δείκτης στο NSCLC.

### **1.3.6 Ογκοκατασταλτικά γονίδια**

Παρατηρείται απώλεια λειτουργικότητας. Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι είναι το γονίδιο το Ρετινοβλαστώματος που απαντάται κυρίως στο SCLC και λιγότερο συχνά σε NSCLC και το γονίδιο p53 που παρατηρείται 75-78% σε SCLC και 50% σε NSCLC. Οι μεταλλάξεις αυτές σχετίζονται με μεταστάσεις σε πυλαίους και μεσοθωρακικούς λεμφαδένες. Οι απώλειες στο χρωμόσωμα 3p παρατηρούνται 100% στο SCLC και 50% στο NSCLC και αφορούν σε ομόζυγη εξάλειψη των περιοχών 3p12-3p22.

Άλλοι παράγοντες που ο ρόλος τους ακόμη συζητείται στην κλινική αξιολόγηση των καρκίνων του πνεύμονα είναι οι αυξητικοί παράγοντες GRP, EGF, GF-a, IGF-1 και ο προσδιορισμός επιφανειακών επιτόπων που αναμένεται να πλουτίσουν τις γνώσεις μας και να συμβάλλουν στην πληρέστερη αντιμετώπιση του καρκίνου (25) (22).

Επίσης, οι ρυθμιστικές διαταραχές στην γονιδιακή έκφραση είναι χαρακτηριστικό πολλών καρκίνων. Μελέτες τα τελευταία δέκα χρόνια έχουν αποκαλύψει την σημαντικότητα του μετα-μεταγραφικού μηχανισμού στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης ειδικά στο πεδίο της αποικοδόμησης του mRNA. Οι διαδικασίες που αναφέρονται στην σταθερότητα του mRNA, στην μεταγραφική καταστολή και στην αποικοδόμηση μεταγράφων συνδέονται πολύπλοκα μεταξύ τους και μπορούν να επηρεαστούν από διάφορα cis-acting στοιχεία όπως η πολύ (A) ουρά, τα στοιχεία ARES (αλληλουχίες πλούσιες σε AU) και από trans-acting παράγοντες όπως τα μη κωδικοποιητικά RNAs (ncRNAs), RBPs (πρωτεΐνες που συνδέονται με το RNA) και οι ριβονουκλεάσες. Οι παραπάνω παράγοντες θα αναφερθούν αναλυτικότερα στις παρακάτω ενότητες 2.6 και 2.7

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει ένας σημαντικός σύνδεσμος μεταξύ καρκινογένεσης και δυσλειτουργικών trans-acting παραγόντων στον μεταβολισμό του mRNA. Οι ριβονουκλεάσες εμπλέκονται στην καρκινογένεση και έχουν σημαντική επίδραση στον μετα-μεταγραφικό έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης και μπορούν να δράσουν ως ογκοπρωτεΐνες ή καταστολείς όγκων δίνοντας μία άλλη στροφή στην ρύθμιση της αφθονίας του mRNA και στους ρυθμούς μετάφρασης. Επιπλέον, διάφορες ριβονουκλεάσες εμπλέκονται στο στάδιο αποαδενυλίωσης του mRNA (27).

## 1.4 ΩΡΙΜΑΝΣΗ mRNA

### 1.4.1 Κυριότερα στάδια της ωρίμανσης του mRNA - Φυσικός ρόλος

Όπως προαναφέρθηκε, η απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου. Είναι απαραίτητος, λοιπόν ο μετα-μεταγραφικός μηχανισμός για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης. Τα μετα-μεταγραφικά γεγονότα περιλαμβάνουν τη επεξεργασία του mRNA, την εξαγωγή του mRNA από το πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, τον εντοπισμό του mRNA, τη σταθερότητα του mRNA και τη μεταφραστική ρύθμιση. Ο ρυθμός σύνθεσης του mRNA καθώς επίσης και ο ρυθμός αποικοδόμησης του επηρεάζει σημαντικά τη σταθερότητά του (28).

Ο μηχανισμός της μεταγραφής του DNA σε RNA είναι ο ίδιος σε όλους τους οργανισμούς. Ωστόσο, η επεξεργασία των RNA μεταγράφων για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν από το κύτταρο διαφέρει πολύ ανάμεσα στα βακτήρια και τους ευκαρυώτες. Το βακτηριακό DNA είναι άμεσα εκτεθειμένο στο κυτταρόπλασμα, το οποίο περιέχει τα ριβοσώματα πάνω στα οποία επιτελείται η σύνθεση των πρωτεϊνών. Καθώς διεξάγεται η μεταγραφή των μορίων του mRNA, τα ριβοσώματα προσκολλώνται αμέσως στο ελεύθερο 5' άκρο του RNA μεταγράφου και αρχίζει η πρωτεινοσύνθεση (29). Στα προκαρυωτικά κύτταρα το mRNA είναι πολυκιστρονικό,

κατά συνέπεια δεν τροποποιείται μετά τη μεταγραφή. Είναι άμεσα λειτουργικό μετά τη σύνθεση του, και η μετάφραση του συχνά ξεκινά πριν η μεταγραφή ολοκληρωθεί.

Αντίθετα, στα ευκαρυωτικά κύτταρα, η μεταγραφή ξεκινάει με τη δημιουργία ενός μεταγράφου με 5' τριφωσφορικό άκρο. Ωστόσο, το 3' άκρο δημιουργείται αποκόπτοντας ένα τμήμα του μεταγράφου και όχι τερματίζοντας τη μεταγραφή σε μια προκαθορισμένη θέση (29). Πριν από την έξοδο από τον πυρήνα, το RNA υποβάλλεται σε αρκετά διαφορετικά στάδια επεξεργασίας (μεταμεταγραφικές τροποποιήσεις). Τα διάφορα mRNA πρέπει να εξέλθουν έχοντας αποκτήσει χαρακτηριστικά που θα τα καθιστούν λειτουργικά στο κυτταρόπλασμα, όπου επιτελείται η μετάφραση. Τα κύριο όμως χαρακτηριστικό είναι η ρυθμιζόμενη σταθερότητα που καθορίζει τη γονιδιακή ρύθμιση (30).

Οι τροποποιήσεις αυτές είναι: **1)** η προσθήκη της 5' καλύπτρας (capping), **2)** το μάτισμα (splicing) και **3)** η προσθήκη poly(A) ουράς στο 3' άκρο (πολυαδενυλίωση)

**ΣΤΑΔΙΟ I:** Ο σχηματισμός της καλύπτρας του RNA περιλαμβάνει μια τροποποίηση του 5' άκρου του mRNA μεταγράφου, δηλαδή του άκρου που συντίθεται πρώτο κατά τη διάρκεια της μεταγραφής. Το 5' άκρο καλύπτεται με την προσθήκη ενός ασυνήθιστου νουκλεοτιδίου, ένα νουκλεοτίδιο γουανίνης (G) το οποίο περιέχει μια μεθυλομάδα. Το ένζυμο που ευθύνεται για αυτή την τροποποίηση ονομάζεται 7-μεθυλο-τρανσφεράση της γουανίνης. Συνεπώς, ο σχηματισμός της καλύπτρας είναι μια ανεστραμμένη 7μεθυλογουανοσίνη που προσδένεται μέσω μιας τριφωσφορικής γέφυρας (5'-5' τριφωσφορικός δεσμός) στο πρώτο νουκλεοτίδιο του mRNA (31). Έτσι εμφανίζεται και ένα “νοητικό παράδοξο” στα καλυμμένα mRNA, δηλαδή να έχουν δηλαδή 3'-OH και στα δύο άκρα. Στην προσθήκη αυτή συμμετέχουν και άλλα δύο ένζυμα, μία φωσφατάση, και μία μεθυλάση. Ο σχηματισμός της καλύπτρας γίνεται αμέσως, μόλις η RNA πολυμεράση συνθέσει περίπου 25 νουκλεοτίδια RNA, πολύ προτού ολοκληρώσει τη μεταγραφή του γονιδίου.

Τρία είδη καλύμματος διακρίνουμε, που εξαρτώνται απ' την παρουσία ή όχι μεθυλομάδων στα δύο καθοδικά νουκλεοτίδια της έναρξης, δηλαδή ανάλογα με το πλήθος μεθυλιώσεων που φέρουν:

- α) Κάλυμμα 0, προκύπτει όταν δεν υπάρχει επιπρόσθετη μεθυλίωση καθοδικά.
- β) Κάλυμμα 1, προκύπτει όταν το πρώτο σάκχαρο ριβόζης καθοδικά είναι μεθυλιωμένο.
- γ) Κάλυμμα 2, προκύπτει όταν και τα δύο σάκχαρα ριβόζης καθοδικά είναι μεθυλιωμένα.

Η καλύπτρα τοποθετείται για να εξυπηρετήσει δύο λειτουργίες: Πρώτον, τα mRNAs με καλύπτρα μεταφράζονται πιο αποδοτικά διότι αναγνωρίζονται από το ριβόσωμα για το σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης. Δεύτερον η καλύπτρα σταθεροποιεί τα mRNAs, προστατεύοντάς τα από ριβονουκλεάσες που δρουν στο 5' άκρο (5' νουκλεάσες και φωσφατάσες). Κατά συνέπεια, η καλύπτρα φαίνεται να εμπλέκεται τόσο στην πολυαδενυλίωση του mRNA, όσο στην έξοδο του από τον πυρήνα, καθώς και στη σταθερότητα του mRNA και στην αναγνώριση του από το ριβόσωμα. Επιπλέον, η καλύπτρα βοηθά στην αποκοπή και στην απομάκρυνση των ιντρονίων.

**ΣΤΑΔΙΟ II:** Η διαδικασία του ματίσματος περιλαμβάνει την αποκοπή των εσονίων και συρραφή των εξονίων, με στόχο να παραμείνει στο μετάγραφο το κωδικό τμήμα του γονιδίου, το οποίο είναι συμπληρωματικό με το πολυπεπτιδικό προϊόν (31). Η διαδικασία αυτή καταλύεται από μικρά πυρηνικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (small nuclear ribonucleoprotein, snRNPs), δηλαδή ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών και RNA, γνωστό ως σωματίδιο συρραφής (spliceosome). Σε κάθε ιντρόνιο, μια ομάδα snRNPs συναθροίζεται πάνω στο RNA, αποκόπτει το ιντρόνιο, επανασυνδέει την αλυσίδα του RNA και απελευθερώνει το κομμένο ιντρόνιο υπό μορφή μιας θηλιάς. Ένας ρόλος των snRNPs είναι να αναγνωρίζουν τις αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων που σημαδεύουν την αρχή και το σημείο διακλάδωσης κάθε ιντρονίου και να ζευγαρώνουν μαζί τους σύμφωνα με τους κανόνες της συμπληρωματικότητας των βάσεων. Με τον τρόπο αυτό τα snRNPs φέρνουν τα δύο άκρα του ιντρονίου κοντά το ένα στο άλλο έτσι ώστε να συμβεί η συρραφή. Μολονότι τα snRNPs κατέχουν κεντρική θέση στην αντίδραση της συρραφής, εντούτοις για την πραγματοποίηση της απαιτούνται επιπρόσθετες πρωτεΐνες.

**ΣΤΑΔΙΟ III:** Η πολυαδενυλίωση παρέχει στα περισσότερα νεοσυντεθειμένα mRNA μετάγραφα μια εξειδικευμένη δομή στο 3' άκρο και είναι το τελευταίο στάδιο στην μετα-μεταγραφική επεξεργασία του mRNA. Στα βακτήρια, το 3' άκρο ενός mRNA είναι απλώς το τέλος της αλυσίδας που έχει συντεθεί από την RNA πολυμεράση. Αντίθετα, στους ευκαρυώτες, το 3' άκρο του mRNA παράγεται με αποκοπή και πολυαδενυλίωση. Συγκεκριμένα, τα 3' άκρα των RNA μεταγράφων βραχύνονται από ένα σύμπλοκο ενζύμων που κόβει την αλυσίδα του RNA σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων. Το σύμπλοκο αυτό είναι μια ενδονουκλεάση που αποτελείται από τους παράγοντες CFI και CFII (Cleavage Factor I και II, παράγοντες αποκοπής I και II) (30). Στη συνέχεια η αλυσίδα ολοκληρώνεται από ένα δεύτερο σύμπλοκο ενζύμων, το οποίο προσθέτει στο κομμένο άκρο μια σειρά διαδοχικών (250-300) νουκλεοτιδίων αδεΐνης (A) ή αλλιώς, μια ουρά πολύ(A) (29).

Συγκεκριμένα (Εικόνα 2), η RNA πολυμεράση II μεταγράφει πέρα από την θέση που αντιστοιχεί στο 3' άκρο, 1500 ακόμη νουκλεοτίδια. και κάποιες αλληλουχίες στο RNA αναγνωρίζονται ως στόχοι για ενδονουκλεοτιδική πέψη. Πριν το τέλος της αλληλουχίας που κωδικοποιεί την πολυπεπτιδική αλυσίδα μεταγράφεται η αλληλουχία AAUAAA. Η αλληλουχία AAUAAA αποτελεί σήμα για την προσθήκη της poly (A) ουράς και βρίσκεται 10-30 περίπου νουκλεοτίδια ανοδικά της τελικής θέσης της πολυαδενυλίωσης στους ανώτερους ευκαρυώτες. Το σήμα αυτό αναγνωρίζεται από ένα ειδικό πρωτεϊνικό παράγοντα CPSF. Επίσης, στο σημείο αυτό προσδένονται και άλλοι πρωτεϊνικοί παράγοντες (29) (30).

Η αλληλουχία πολυ(A) δεν κωδικοποιείται στο DNA, αλλά προστίθεται στο RNA, μέσα στον πυρήνα, μετά τη μεταγραφή. Το σύμπλοκο που αναλαμβάνει την πολυαδενυλίωση είναι μια πολυ(A) πολυμεράση (PAP, Poly(A) Polymerase), για να συνθέσει την ουρά πολύ(A), προσθέτοντας κατάλοιπα A στο ελεύθερο 3'-OH άκρο του mRNA. Όμως, το 5' άκρο που δημιουργείται από την αποκοπή είναι απροστάτευτο, με συνέπεια το υπόλοιπο του μεταγράφου να αποικοδομείται γρήγορα. Αυτό δυσχεραίνει τον προσδιορισμό των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα πέραν του σημείου αποκοπής (31).



Η διαγραφή ή μετάλλαξη του εξαμερούς AAUAAA εμποδίζει την παραγωγή του πολυαδενυλιωμένου 3' άκρου. Το σήμα χρειάζεται τόσο για την αποκοπή όσο και για την πολυαδενυλίωση. Η αλληλουχία πολυ(A), τόσο του πυρηνικού RNA όσο και του mRNA, είναι συνδεδεμένη την πολυ(A)-συνδεόμενη πρωτεΐνη (PABP, Poly(A) binding protein). Ο παράγοντας έναρξης της μετάφρασης 4G (eIF4G) αλληλεπιδρά με την PABP και τον παράγοντα eIF3, ο οποίος συνδέει τον eIF4G και την ριβοσωμική υπομονάδα 40S (32). Επίσης στην παραπάνω διαδικασία συμμετέχει και ο παράγοντας ενίσχυσης (CstF, Cleavage stimulatory Factor), που προσδέεται σε μια αλληλουχία πλούσια σε G-U καθοδικά της περιοχής αποκοπής.

Η PABP είναι μια εξελικτικά διατηρημένη πρωτεΐνη, η οποία περιγράφηκε για πρώτη φορά, πριν από τέσσερις δεκαετίες η οποία προστατεύει το mRNA από εξωριβονουκλεάσες. Η PABP περιέχει τέσσερα μοτίβα αναγνώρισης του RNA (RRMs) και μία C- τελική περιοχή, πλούσια σε προλίνη, η οποία συμμετέχει στη αλληλεπίδραση πρωτεΐνης – πρωτεΐνης. Όπως προαναφέρθηκε, αλληλεπιδρά ταυτόχρονα με την 3' πολύ (A) ουρα του mRNA και με τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4G (eIF4G) , για την έναρξη της μετάφρασης με ένα συνεργατικό τρόπο και έχει περιοδικότητα, 27 νουκλεοτιδίων. Το 3' -άκρο, στο οποίο συνδέεται η PABP είναι ένας καθοριστικός παράγοντας της μεταφραστικής δραστηριότητας του mRNA, το οποίο δρα in cis. Ένα μονομερές PABP των 70 kDa συνδέεται σε κάθε 10-20 βάσεις της ουράς πολυ(A) (33).

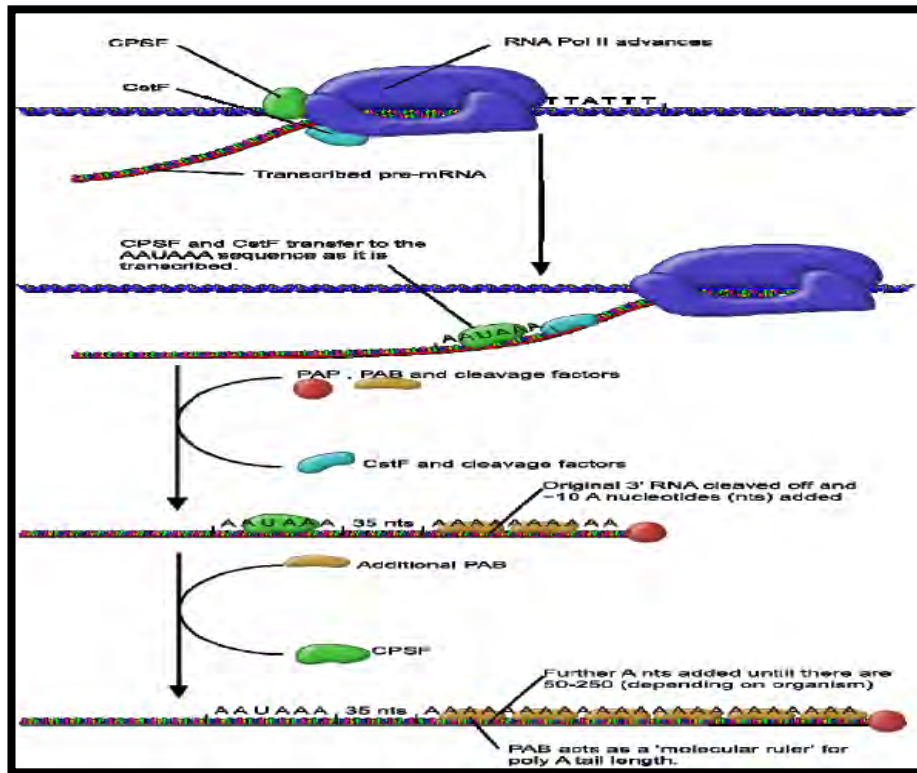
Έχουν βρεθεί δύο PABP-πρωτεΐνες αλληλεπίδρασης, η Pair1 και Pair2, που τροποποιούν την δραστηριότητα της PABP κατά την μετάφραση. Η Pair1 είναι ένας θετικός ρυθμιστής της μετάφρασης . Σε αντίθεση, η Pair2 αναστέλλει την μετάφραση, εκτοπίζοντας την PABP από την πολυ (A) ουρά και τον παράγοντα eIF4G. Η απενεργοποίηση της PABP, μειώνει τη σχέση δέσμευσης του eIF4E στην καλύπτρα και αναστέλλει δραματικά τον σχηματισμό των ριβοσωμικών υπομονάδων 48S και 80S (31).

Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι όταν αναστέλλεται η PABP, μια ισομορφή 2 της πυρηνικής πρωτεΐνης Q του ποντικού, η hnRNP-Q2/SYNCRIP, δεσμεύεται στην πολύ(A) ουρά. In vitro, η hnRNP-Q2 συναγωνίζεται την PABP για την πρόσδεση της στην πολύ (A) ουρά. Έτσι η αντικατάσταση της PABP από την hnRNP-Q2, μειώνει την σχέση σύνδεσης του eIF4G με 5' m<sup>7</sup> G- καλύπτρα του mRNA, που έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή του σχηματισμού του συμπλόκου έναρξης των ριβοσωμικών υπομονάδων 48S και 80S . Επιπλέον έχει παρατηρηθεί και στους ινοβλάστες των ποντικών, πως η απενεργοποίηση της hnRNP-Q2 διεγείρει την μετάφραση. Συνεπώς, η hnRNP-Q2, ανταγωνιζόμενη με την PABP, παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μετάφρασης και στην miRNA-μεσολαβούμενη καταστολή συγκεκριμένων mRNAs. (32).

Εν κατακλείδι, η πολυαδενυλίωση σταθεροποιεί τα mRNAs διότι στο κυτταρόπλασμα η πολυA ουρά μειώνεται σταδιακά. Όταν αυτή έχει πλήρως απομακρυνθεί τα mRNAs είναι επιδεκτικά στην αποικοδόμηση.

-- Εναλλακτική πολυαδενυλίωση: Έρευνες έχουν δείξει ότι περισσότερα από τα μισά ανθρώπινα γονίδια έχουν πολλαπλά σημεία πολυαδενυλίωσης (34). Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση συμβάλει στην πολυπλοκότητα που παρουσιάζουν τα ανθρώπινα κύτταρα σε σχέση με τους άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς με την παραγωγή mRNA με διαφορετικές 3' αμετάφραστες περιοχές (3' UTRs) κωδικοποιώντας έτσι

διάφορων ειδών πρωτεΐνες. Η επίδραση της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης στην διαδικασία της μετάφρασης είναι συνήθως συνδεδεμένη με το εναλλακτικό μάτισμα. (Alternative Splicing) όπως έχει αποδειχθεί για διάφορα γονίδια (30).



Εικόνα 2. Διαδικασία της Πολυαδενυλίωσης

## 1.5 ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ mRNA

Η αποικοδόμηση mRNA παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η αποικοδόμηση του mRNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα συμβαίνει μέσω διαφόρων οδών οι οποίες διαφοροποιούνται ανάλογα με το αν η αποικοδόμηση του «σώματος» του mRNA συμβαίνει με κατεύθυνση 5'→3' ή 3'→5' και αν η αποαδενυλίωση προηγείται ή όχι της αποικοδόμησης αυτής (35). Μόλις το mRNA βρεθεί στο κυτταρόπλασμα, η πολυ (A) έχει δύο καθήκοντα: την προώθηση της μετάφρασης και τη σταθεροποίηση του mRNA. Και οι δύο αυτές διεργασίες προκαλούνται από την πολυ (A) πρωτεΐνη συνδέσεως (PABP), που επικαλύπτει την πολυ (A) ουρά. Η αποικοδόμηση του mRNA μπορεί να ξεκινήσει με αποαδενυλίωση στο 3' άκρο και στη συνέχεια με την αφαίρεση της 5' καλύπτρας ή με ενδονουκλεοτιδική διάσπαση.

### 1.5.1 Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από αποαδενυλίωση

Η αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs περιλαμβάνει πολλαπλά στάδια και είναι μια περίπλοκη διαδικασία. Σχεδόν όλα τα μονοπάτια αποικοδόμησης των mRNAs, ξεκινούν από αποαδενυλίωση, γνωστό ως μονοπάτι αποικοδόμησης εξαρτώμενο από αποαδενυλίωση (Εικόνα 3A). Η αντίδραση καταλύεται από μαγνήσιο-εξαρτώμενες εξωριβονουκλεάσες, τις αποαδενυλάσες, με κυρίαρχο το σύμπλοκο αποαδενυλασών Ccr4-Caf1 (36).

Όταν η πολυ (A) μειώνεται σε ένα ορισμένο μήκος (τυπικά 10 έως 15 A στις ζυμες), το mRNA αποικοδομείται μέσω δύο μονοπατιών. Κατά το πρώτο μονοπάτι, το mRNA αποικοδομείται με κατεύθυνση 5→3, αφαιρείται η 5' καλύπτρα μέσω ενός ειδικού ενζύμου 'decapping', το οποίο αποτελείται από δύο υπομονοάδες, (Dcp1p και Dcp2p). Στη συνέχεια λόγω αφαίρεσης της καλύπτρας, το 5' άκρο του mRNA αποικοδομείται ταχύτατα από την XRN1 εξωριβονουκλεάση. Κατά το δεύτερο μονοπάτι, το mRNA αποικοδομείται με κατεύθυνση 3→5. Η αποικοδόμηση καταλύεται από ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών, (> 9 εξωνουκλεάσες) που ονομάζεται εξώσωμα. Πρόκειται για ένα σύμπλοκο 10-12 υπομονάδων που αποτελείται από 6 πρωτεΐνες με σημαντική ομολογία 3'→5' φωσφορυλιτικών εξωριβονουκλεασών, αρκετές πρωτεΐνες με ομολογία 3'→5' υδρολυτικών εξωνουκλεασών και Rna ελικάσες (37). Κάθε μία από τις καταλυτικές υπομονάδες του εξώσωματος έχει μια PH περιοχή RNase η οποία ενδέχεται να συμβάλλει στην καταλυτική δραση. Ωστόσο, παραμένει ασαφές αν όλες οι υπομονάδες είναι καταλυτικά ενεργές ή αν κάποιες από αυτές παίζουν ρόλο στην αναγνώριση και την τοποθέτηση του υποστρώματος. Το εξώσωμα εκτός από την κυτταροπλασματική διάσπαση του mRNA συμμετέχει στην 3' επεξεργασία των μη-κωδικοποιούμενων (noncoding) mRNA στο πυρήνα. Μετά την 3'→5' αποικοδόμηση (38), το προκύπτον ολιγονουκλεοτίδιο-καλύπτρα υδρολύεται από το DcpS, έτσι απελευθερώνεται 5' AMP. Τα δύο αυτά μονοπάτια δεν είναι απαραίτητα ανεξάρτητα (39) (40).

### 1.5.2 Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αφαίρεση της καλύπτρας

Δύο μη συνδεδεμένα μετάγραφα RPS28B και EDC1 παρακάμπτουν την αποαδενυλίωση, προκαλώντας άμεσα την αφαίρεση της καλύπτρας (Εικόνα 3B).

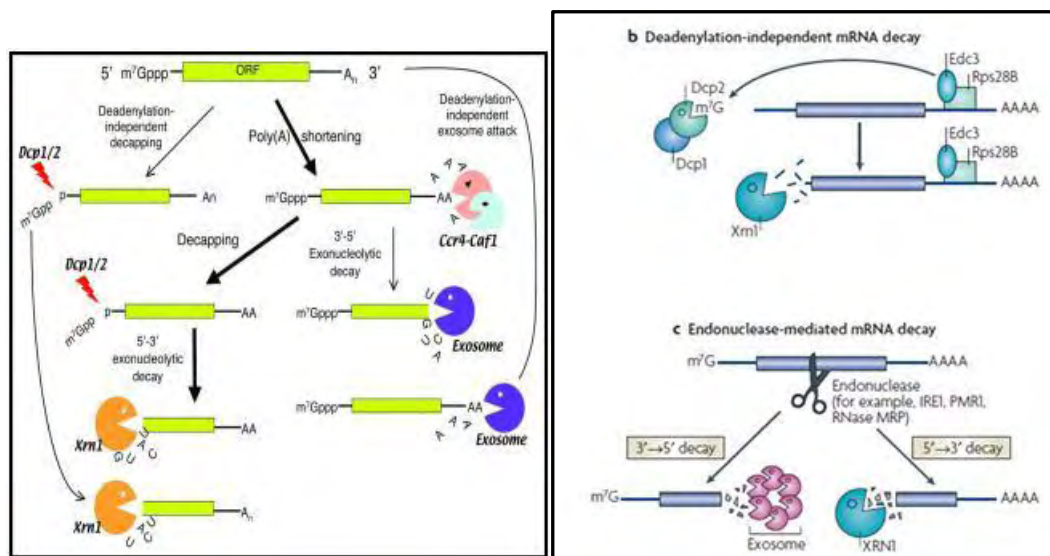
Η πρωτεΐνη Rps28B προσδέεται στην 3' αμετάφραστη περιοχή του δικού της mRNA και στρατολογεί την Edc3, έναν ενισχυτή αφαίρεσης της καλύπτρας. Αυτό προφανώς επιφέρει σύνδεση και άλλων παραγόντων αφαίρεσης της καλύπτρας και επιτρέπει την αποικοδόμηση που είναι ανεξάρτητη από την αποαδενυλίωση (41).

### 1.5.3 Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από ενδονουκλεοτιδική διάσπαση

Ένας αποτελεσματικός τρόπος καταστροφής του mRNA είναι μέσω ενδονουκλεοτιδικής διάσπασης, όπου παράγονται δύο τμήματα που είναι ευάλωτα σε εξωνουκλεάσες (Εικόνα 3Γ). Διάφορες ενδονουκλεάσες που στοχεύουν το mRNA έχουν χαρακτηριστεί πρόσφατα συμπεριλαμβανομένου τις PMR1, IRE1 και το ένζυμο επεξεργασίας του ριβοσωμικού RNA (RNase MRP) το οποίο φαίνεται να επιτελεί επιπρόσθετο ρόλο αφού επιτίθεται και σε συγκεκριμένα μόρια mRNA. Επιπλέον ενδονουκλεάσες φαίνεται να εμπλέκονται στην αποικοδόμηση ελαττωματικών

mRNAs (8), ενώ τα siRNAs ξεκινούν την αποικοδόμηση μέσω ενδονουκλεοτιδικής διάσπασης όπου εμπλέκεται η Argonaute protein-2 (Ago2) (39) (40).

Η αποικοδόμηση των mRNAs λαμβάνει χώρα σε κυτταροπλασματικές κοκκώδεις δομές, στα P bodies όπου βρίσκονται παράγοντες που εμπλέκονται στην έναρξη της μετάφρασης, στην αποαδενυλίωση, στην αφαίρεση της καλύπτρας, στην 5'→3' εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση, στην ανερμηνεύσιμα διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση (nonsense-mediated decay) και στην microRNA (miRNA) διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση.



**Εικόνα 3. Μηχανισμοί αποικοδόμησης:** Α) Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από αποαδενυλίωση. Τα έντονα βέλη δείχνουν το σημαντικό μονοπάτι της αποικοδόμησης του mRNA στο κυτταρόπλασμα που προκαλείται από την αποαδενυλίωση (36). Β) Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την αφαίρεση της καλύπτρας. Γ) Αποικοδόμηση εξαρτώμενη από ενδονουκλεοτιδική διάσπαση (42).

## 1.6 ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΕΛΑΤΤΩΜΑΤΙΚΩΝ mRNAs

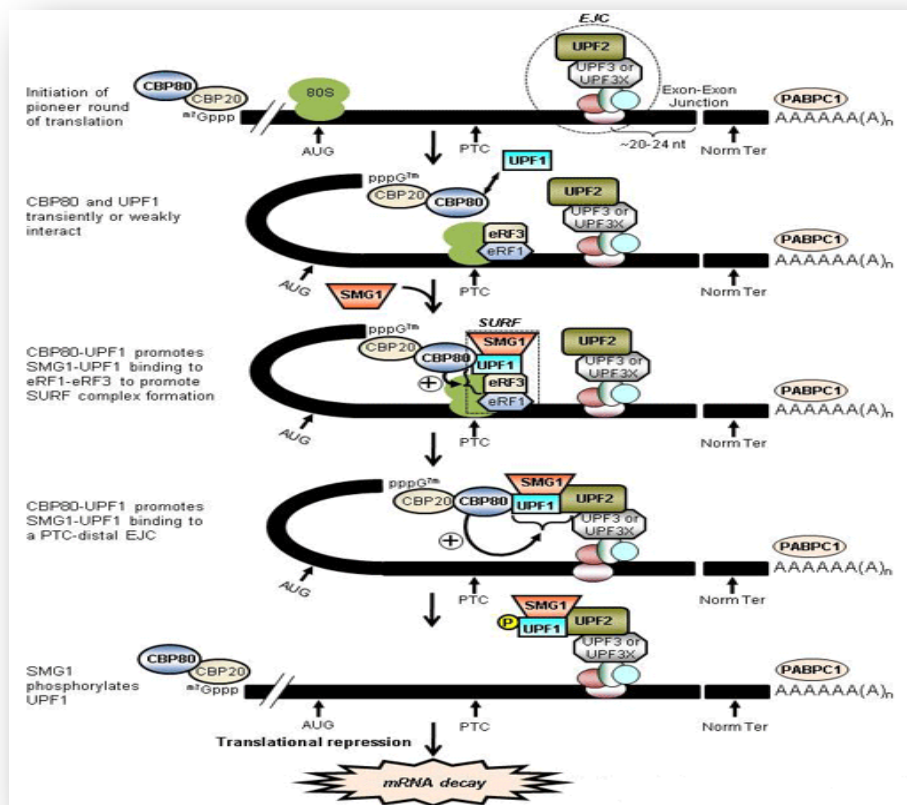
Κάθε βήμα στην παραγωγή ενός ώριμου μεταγράφου παρέχει δυνατότητες εισαγωγής λαθών. Για να εξασφαλίζεται η πιστότητα της μεταγραφής το κύτταρο έχει αναπτύξει την ικανότητα να εντοπίζει τα ελαττωματικά μετάγραφα και να τα αποικοδομεί, προφυλάσσοντας το κύτταρο από τοξικές πρωτεΐνες. Ο έλεγχος της ωρίμανσης του mRNA συμβαίνει στον πυρήνα, ενώ οι πορείες ελέγχου που αναφέρονται παρακάτω σχετίζονται με την μετάφραση και ανιχνεύουν ελαττωματικά ριβονουκλεϊνικά σύμπλοκα στο κυτταρόπλασμα (19).

### 1.6.1 Μη-νοηματικά (ανερμηνεύσιμα) διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση NMD (Nonsense-mediated decay)

Είναι ένα ιδιαίτερα διατηρημένο μονοπάτι που αρχικά αναγνωρίστηκε ως ένας μηχανισμός "παρακολούθησης" του mRNA. Η κύρια λειτουργία του είναι να μειώνει τα λάθη της γονιδιακής έκφρασης, αποικοδομώντας τα ελαττωματικά mRNAs (32). Σε γενικές γραμμές, η NMD στοχεύει συγκεκριμένα μετάγραφα που περιέχουν μια πρόωρη αλληλουχία τερματισμού (premature-termination codon) (PTC) (43). Αν αυτά τα ελαττωματικά μετάγραφα μεταφραστούν τότε προκύπτουν πρωτεΐνες με αρνητική δραστηριότητα. Η πρόωρη αλληλουχία τερματισμού μπορεί να οφείλεται σε μεταλλάξεις, μετατοπίσεις του αναγνωστικού πλαισίου, σε αναποτελεσματική επεξεργασία, στην ελαττωματική έναρξη της μετάφρασης και στην εκτενή 3' αμετάφραστη περιοχή. Ενώ πολλές από τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην NMD δεν διατηρούνται μεταξύ των ειδών, υπάρχουν τρεις βασικοί παράγοντες στην NMD, οι οποίοι είναι οι UPF1, UPF2 και UPF3 (UPF3A και UPF3B στον άνθρωπο), οι οποίοι συνθέτουν αυτό το μονοπάτι. Και οι τρεις αυτές πρωτεΐνες είναι trans-μεταφορείς και ονομάζονται up-frameshift proteins (UPF).

Στα θηλαστικά, μετά την ωρίμανση του mRNA στον πυρήνα, η UPF3 που αποτελεί μέρος του συμπλόκου σύνδεσης εξονίων (EJC), συνδέεται με το μεταγράφο και μαζί και με άλλες πρωτεΐνες όπως είναι η eIF4AIII, MLN51, και η ετεροδιμερής πρωτεΐνη Y14/MAGOH, οι οποίες επίσης έχουν κύρια λειτουργία στο μονοπάτι NMD. Επίσης, στο κυτταρόπλασμα, μια δεύτερη πρωτεΐνη NMD, η UPF2, συνδέεται με τη UPF3 (Εικόνα 4). Η διαδικασία ανίχνευσης ελαττωματικών μεταγράφων συμβαίνει κατά την μετάφραση του mRNA (43). Κατά τη διάρκεια της μετάφρασης όταν το ριβόσωμα συναντήσει το πρόωρο κωδικόνιο λήξης (PTC), σταματά. Ο τερματισμός της μετάφρασης οδηγεί το σύμπλοκο SURF (που περιλαμβάνει SMG1, UPF1 και πεπτιδικούς-παράγοντες απελευθέρωσης eRF1 και eRF3) να προσδεθεί στο ριβόσωμα. Συγκεκριμένα η UPF1 προσδέεται στη UPF2, συνδέοντας το EJC στην PTC όπου η UPF1 φωσφορυλιώνεται από την SMG1. Επίσης, η φωσφορυλιωμένη UPF1 αλληλεπιδρά στη συνέχεια με τις SMG-5, SMG-6 και SMG-7 και έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση των eRF1 και eRF3. Έτσι το mRNA αποικοδομείται.

Ωστόσο, τα κυτταρικά γεγονότα που επάγουν την δημιουργία του συμπλόκου UPF1 και SMG1 και αυξάνουν την αποτελεσματικότητα του NMD πριν από την αναγνώριση PTC παραμένουν ασαφείς. Η φωσφορυλίωση από την κινάση καζείνης (CK2) αυξάνει την σταθερότητα της SMG1, η οποία με την σειρά της αυξάνει την φωσφορυλίωση της UPF1 και τελικά αυξάνει την έκφραση της NMD. Αναστολή της CK2 προκαλεί μείωση της έκφρασης της NMD (44). Η SMG-7, ο τελεστής τερματισμού της NMD, συσσωρεύεται στους P-bodies. Μελέτες στα ευκαρυωτικά κύτταρα έδειξαν ότι η απενεργοποίηση της NMD μεταβάλλει την έκφραση του 10% των μεταγράφων. Ακόμη έχει αποδειχθεί ότι η αποτελεσματικότητα της NMD ποικίλλει σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων και ιστών. Η NMD υπόκειται σε αναπτυξιακό έλεγχο τόσο στους ανώτερους όσο και στους κατώτερους ευκαρυώτες (43).



Εικόνα 4. Μη νοηματικά (ανερμηνεύσιμα) διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση

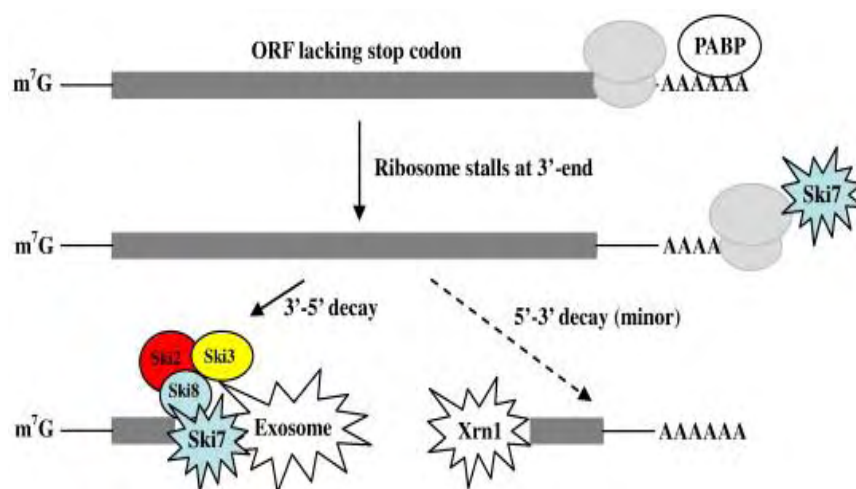
### 1.6.2 Αποικοδόμηση μη-τερματισμού (Non-stop decay)

Όπως και το μονοπάτι NMD, έτσι και το Non-stop decay (NSD), είναι ένας μηχανισμός "παρακολούθησης" του mRNA που ανιχνεύει mRNAs τα οποία δεν έχουν κωδικόνιο τερματισμού. Το μονοπάτι NSD, απελευθερώνει τα ριβοσώματα που διέρχονται από την πολύ(A) ουρά, εκτοπίζοντας την PABP (Εικόνα 5), με αποτέλεσμα να ακινητοποιούνται στο 3' άκρο του mRNA. Στη συνέχεια καθοδηγεί το mRNA σε ταχύτατη αποικοδόμηση με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταρικό εξώσωμα. Στις ζύμες, η αναγνώριση των non-stop mRNAs προϋποθέτει την ύπαρξη της πρωτεΐνης Ski7, που είναι μέλος της οικογένειας της eRF3 των GTP- πρωτεϊνών (45).

Η πρωτεΐνη Ski7 δεσμεύει το ακινητοποιημένο ριβόσωμα, μέσω της περιοχή A του ριβοσώματος, για να αποδεσμεύσει το μετάγραφο και στη συνέχεια προσλαμβάνει το εξώσωμα που αποικοδομεί το μετάγραφο. Ωστόσο, η Ski7 δεν βρίσκεται σε κύτταρα θηλαστικών, ακόμη και η παρουσία του μηχανισμού της NSD έχει παραμείνει ασαφής. Έχει αποδειχθεί στα θηλαστικά, ότι η αποικοδόμηση των ασταθών non-stop mRNAs απαιτεί και άλλες δύο πρωτεΐνες, την Hbs1, η οποία ανήκει στην οικογένεια eRF3 και την Dom34, η οποία προσδένεται στην Hbs1, καθώς και τα συστατικά του συμπλόκου εξώσωμα-Ski (Ski2/Mtr4 and Dis3). Έτσι το σύμπλοκο HBS1-Dom34 συνδέεται για να σχηματίσει ένα σύμπλεγμα με το εξώσωμα-Ski. Συνεπώς, ο μηχανισμός NSD

υπάρχει σε κύτταρα θηλαστικών και περιλαμβάνει το σύμπλοκο HBS1, Dom34, και το exosome-Ski (46).

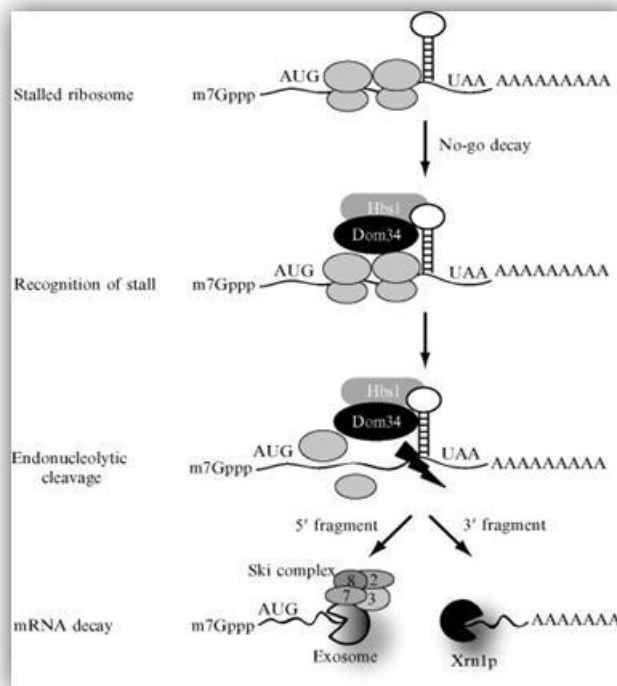
Επιπλέον, υπάρχει ένα άλλο αξιοσημείωτο μονοπάτι που έχει περιγραφεί στο *S. cerevisiae*, όπου απουσία του Ski7, η μετατόπιση της PABP από το ριβόσωμα καθιστά το mRNA ευπαθή στην αφαίρεση της καλύπτρας και στην αποικοδόμηση 5'→3' από την 5'→3' εξωριβονουκλεάση Xrn1 (Εικόνα 5) (47) (48).



Εικόνα 5. Αποικοδόμηση μη-τερματισμού

### 1.6.3 No-go αποικοδόμηση (No-go decay)

Όπως προαναφέρθηκε, τα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν αναπτύξει πολλαπλούς μηχανισμούς επιτήρησης που αναγνωρίζουν και να εξαλείφουν τα ελαττωματικά mRNAs κατά τη διαδικασία της μετάφρασης. Εκτός από τις προαναφερθείσες διαδικασίες αποικοδόμησης, ένας άλλος μηχανισμός είναι ο Non-go decay, ο οποίος στοχεύει mRNAs πάνω στα οποία το ριβόσωμα ακινητοποιείται στο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, λόγω σχηματισμού ειδικής δευτεροταγούς δομής στο ελαττωματικό mRNA (Εικόνα 6) (49). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενδονουκλεοτιδική διάσπαση στην περιοχή του ακινητοποιημένου ριβοσώματος και την απελευθέρωσή του. Συγκεκριμένα η NGD επάγεται από τις εξελικτικά συντηρημένες πρωτεΐνες Dom34 και HBS1, οι οποίες σχετίζονται με τους παράγοντες τερματισμού μετάφρασης και eRF1 eRF3, αντίστοιχα. Η NGD είναι πιθανό να συμβαίνει κατά την αλληλεπίδραση του συμπλέγματος Dom34/Hbs1 με περιοχή A του ριβοσώματος, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του πεπτιδίου ή του πεπτιδυλ-tRNA. Η διαδικασία της NGD και η λειτουργία του συμπλόκου Dom34/Hbs1, φαίνεται να είναι σημαντικές σε πολλές διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες (50).



Εικόνα 6. No-go αποικοδόμηση

#### 1.6.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την αποικοδόμηση του mRNA

Microarrays αναλύσεις αποκάλυψαν ότι το 40-50% των αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης σε απάντηση στα κυτταρικά μηνύματα εμφανίζεται στο επίπεδο σταθερότητας του mRNA. Οι αλλαγές αυτές συνήθως προκαλούνται από αλλαγές στη σύνθεση των mRNPs που είτε αναστέλλουν ή διεγείρουν την αποικοδόμηση. Βρέθηκε ότι οι καθοριστές της σταθερότητας των mRNAs βρίσκονται κυρίως στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) όπου τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα προστατεύονται από τη διάσχιση των ριβοσωμάτων κατά μήκος των mRNAs, αλλά και στην 5' UTR καθώς και στην κωδική περιοχή (19). Τα πιο καλά μελετημένα στοιχεία σταθερότητας των mRNAs, είναι οι αλληλουχίες που περιέχουν βάσεις A και U σε διάφορα μοτίβα (AU-rich elements, ARE). Οι αλληλουχίες αυτές βρίσκονται στην 3' UTR περιοχή πολλών μεταγράφων που κωδικοποιούν κυτοκίνες, πρωτοογκογονίδια και μεταγραφικούς παράγοντες. Το πιο απλό μοτίβο ενός στοιχείου ARE συνίσταται στο πεντανουκλεοτίδιο AUUUA, ενώ η αποσταθεροποίηση που προκαλείται από τα στοιχεία αυτά είναι αποτέλεσμα οργάνωσης των διαφόρων μοτίβων (πεντανουκλεοτίδια AUUUA, εννιαμερή UUAUUUUA (U/A)(U/A), κ.α.) σε δευτεροταγείς ή τριτοταγείς δομές. Ανάλογα με το μοτίβο του στοιχείου ARE και την αντίστοιχη κινητική της αποικοδόμησης του μορίου mRNA που το περιέχει, χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

- I. Τα ARE τύπου I που αποτελούνται από 1-3 επαναλήψεις του μοτίβου AUUUA και απαντώνται συνήθως στα mRNA των «γονιδίων πρώιμης



απόκρισης» (early-response genes) που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες π.χ. c-fos.

- II. Τα ARE τύπου II που αποτελούνται από περισσότερα μοτίβα AUUUA (5-6 αντίγραφα) και βρίσκονται συνήθως σε γονίδια κυτοκινών, π.χ. GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-3.
- III. Τα ARE τύπου III, τα οποία δεν περιέχουν το μοτίβο AUUUA, αλλά επαναλήψεις U (U-stretches), π.χ ο μεταγραφικός παράγοντας c-jun.

Στα στοιχεία ARE τύπου I και τύπου III η αποικοδόμηση πραγματοποιείται σε δυο στάδια- στο πρώτο στάδιο συμβαίνει η αποαδενυλίωση όπου η νουκλεοτιδική αλληλουχία του mRNA δεν μεταβάλλεται, και στο δεύτερο στάδιο τα μόρια mRNA αποικοδομούνται ταχύτατα και έχουν πλέον μια πολύ μικρή poly (A) ουρά (30-60 βάσεις αδενοσίνης). Η κινητική της αποδόμησης στις περιπτώσεις των ARE τύπου II, διαφέρει στο ότι η αποαδενυλίωση και η αποικοδόμηση του μορίου mRNA συμβαίνουν ταυτόχρονα (51).

Οι πρωτεΐνες που συνδέονται με τα στοιχεία ARE μπορεί να είναι είτε ειδικές όπως παράγοντες AUBFs (AU-rich binding factors, AUBFs), είτε να ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών hnRNP. Αρκετοί τέτοιοι παράγοντες έχουν ταυτοποιηθεί όπως : AUF1, TTP, KSRP, RHAU, TIAR. Οι παράγοντες αυτοί αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με παράγοντες που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση mRNA όπως οι αποαδενυλάσες (PARN, CCR4-NOT), τα DCP1-2 και το εξώσωμα. Αναλυτικότερα το AUF1 αλληλεπιδρά με το εξώσωμα, το KSRP και το RHAU προσδέονται στην αποαδενυλίωση PARN και στο εξώσωμα, με αποτέλεσμα αυτό να οδηγεί σε αυξημένη διάσπαση του mRNA-στόχου (19).

## 1.7 ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΙΩΣΗ

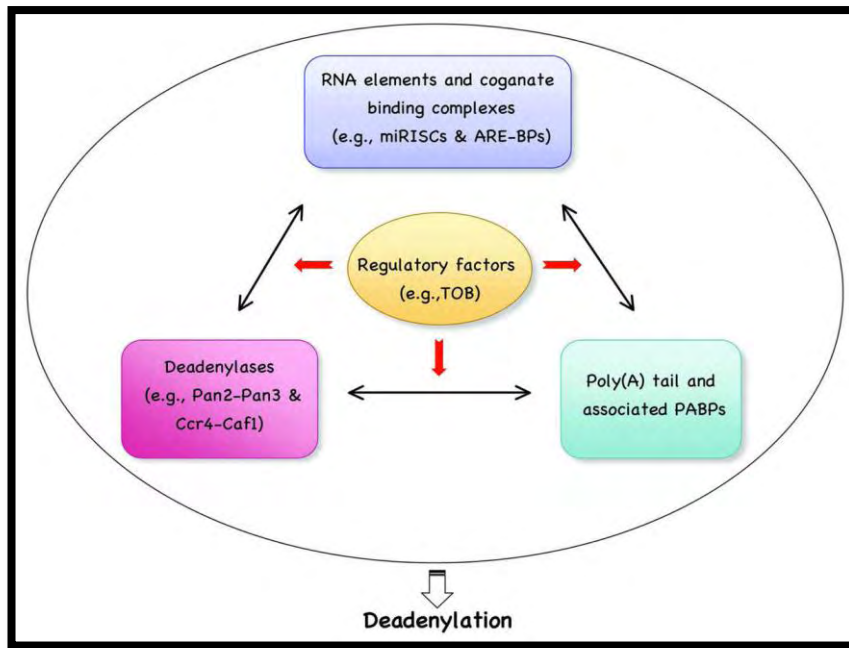
Το αγγελιοφόρο RNA (mRNA) διαμεσολαβεί για την ροή της γενετικής πληροφορίας από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, που χρησιμεύει ως εκμαγείο για την μετάφραση από τα ριβοσώματα σε πρωτεϊνικό προϊόν. Ως γνωστόν, όταν βρεθεί στο κυτταρόπλασμα, η μοίρα του mRNA επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το πόσο σωστή είναι η διαδικασία μετάφρασής του και πού εντοπίζεται και αποθηκεύεται υποκυτταρικά. Η αποικοδόμηση των mRNAs παίζει σημαντικό ρόλο στην γονιδιακή έκφραση (36) (52). Όπως έχει προαναφερθεί σε όλα τα 3' άκρα των mRNA, με εξαίρεση την ιστόνη, μια πολυ (A) ουρά μαζί με την πολυ (A) πρωτεΐνη συνδέσεως (PABP), προστατεύουν το mRNA από τις 3' ριβονουκλεάσες. Επιπλέον, το σύμπλοκο 5' m7G-cap/cap-binding και σύμπλοκο 3' πολυ (A) / PABP μπορούν να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για να σχηματίσουν ένα κλειστό βρόγχο που ενισχύει την έναρξη της μετάφρασης και παρέχει ένα αποτελεσματικό μέσο για την προστασία των άκρων του mRNA από την προσβολή νουκλεασών. Μετά την μεταφορά των mRNA στο κυτταρόπλασμα, η πολυ (A) ουρά μειώνεται με διαφορετικούς ρυθμούς σε περίπου 10-60 νουκλεοτίδια (nt). Αυτή η διαδικασία ονομάζεται αποαδενυλίωση (36).

Βιοχημικές και γενετικές προσεγγίσεις είναι ουσιαστικής σημασίας για την μελέτη της αποαδενυλίωσης. Στηριζόμενοι στις γνώσεις που έχουμε για τους μηχανισμούς και τα βήματα της αποαδενυλίωσης στα κύτταρα των ζυμών και των θηλαστικών, έχει εξετασθεί το μονοπάτι αποαδενυλίωσης στους ευκαρυώτες. Ο ρυθμός της αποαδενυλίωσης οποιουδήποτε mRNA σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό περιβάλλον είναι ένα άθροισμα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων βασικών συντελεστών που συμμετέχουν στην αποαδενυλίωση, συμπεριλαμβανομένων των αποαδενυλασών, το σύμπλοκο πολυ (A)/PABP, συμπλέγματα που συνδέονται στο mRNA, καθώς και τους άλλους παράγοντες που ρυθμίζουν αυτές τις αλληλεπιδράσεις (Εικόνα 7).

Τα ένζυμα που συμμετέχουν στην αποαδενυλίωση ονομάζονται αποαδενυλάσες και είναι ποικίλα. Οι πρώτες αποαδενυλάσες ανακαλύφθηκαν με *in vitro* δοκιμασίες. Τα πλεονεκτήματα των *in vitro* αναλύσεων είναι πολλαπλά, όπως ότι η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την μελέτη των απομονωμένων αποαδενυλασών σε πολλά ευκαρυωτικά κύτταρα.

Στα θηλαστικά υπάρχουν μέχρι και 12 αποαδενυλάσες. Ορίζονται από διατηρημένα μοτίβα αλληλουχιών νουκλεάσης που είναι απαραίτητα για κατάλυση. Η υπεροικογένεια DEDD περιλαμβάνει τις αποαδενυλάσες POP2, PARN, και PAN2 ονομάστηκαν έτσι εξαιτίας των συντηρημένων καταλυτικών αμινοξικών καταλοίπων Asp και Glu τα οποία είναι διάσπαρτα σε τρία μοτίβα εξωνουκλεάσης που δεσμεύουν ιόντα μαγνησίου. Η δεύτερη υπεροικογένεια περιλαμβάνει μέλη που σχετίζονται με μια κατηγορία των εξωνουκλεασών, ενδονουκλεασών, και φωσφατασών, που είναι γνωστή ως η υπεροικογένεια EEP. Οι αποαδενυλάσες CCR4, NOCTURNIN, ANGEL και η 2' phosphodiesterase (2'PDE) ανήκουν στην σε αυτή την υπεροικογένεια και έχουν συντηρημένα κατάλοιπα Asp και His στην περιοχή με δράση νουκλεάσης.

Όλες οι γνωστές αποαδενυλάσες είναι Mg<sup>2+</sup> εξαρτώμενα ένζυμα που ανήκουν σε μία από τις δύο υπεροικογένειες, οι οποίες υδρολύουν το mRNA με 3'→5' κατεύθυνση, απελευθερώνοντας 5' – AMP (52) Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον εννέα αποαδενυλάσες (Πίνακας 4).



Εικόνα 7. Ο ρυθμός αποαδενλίωσης ενός mRNA σε κύτταρα θηλαστικών καθορίζεται από πολλούς βασικούς παράγοντες

Πίνακας 4. Ποικιλομορφία των αποαδενυλασών SC: *S.cerevisiae*, CE: *C. elegans*, DM: *D.melanogaster*, XL: *X.laevis*, MM: *M. musculus*, HS: *H.sapiens* (+): είναι παρούσα στον οργανισμό (-): δεν είναι παρούσα στον οργανισμό (53)

Group	Name	SC	CE	DM	XL	MM	HS
<i>DEDD nucleases</i>	<b>CNOT7/Caf1a</b>	+	+	+	+	+	+
	<b>CNOT8/Caf1b</b>	-	-	-	+	+	+
	<b>PAN2</b>	+	+	+	+	+	+
	<b>PARN</b>	-	+	-	+	+	+
	<b>CAF1Z</b>	-	+	-	+	+	+
<i>EEP nucleases</i>	<b>CNOT6/CCR4a</b>	+	+	+	+	+	+
	<b>CNOT6L/CCR4b</b>	-	-	-	-	+	+
	<b>NOC/CCR4C</b>	-	-	+	+	+	+
	<b>2'PDE</b>	-	+	+	+	+	+

### 1.7.1 Σύμπλοκα Αποαδενυλασών

Οι αποαδενυλάσες συνήθως σχηματίζουν σύμπλοκα ενώ άλλες ομοδιμερή ή ετεροδιμερή όπως το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο CCR4-NOT, το ετεροδιμερές PAN2-PAN3 και το ομοδιμερές της PARN (54). Σε κάποιες περιπτώσεις ο ομοδιμερισμός

είναι απαραίτητος για την ενεργότητα της. Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στα σύμπλοκα αυτά μπορεί να επηρεάζουν την δραστικότητα των αποαδενυλασών. Ο ετεροδιμερισμός αυξάνει σημαντικά το ρεπερτόριο των συμπλόκων των αποαδενυλασών. Για παράδειγμα, η αποαδενυλάση PAN2 προσδένεται στην PAN3 η οποία με την σειρά της αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη PABP 4. Επίσης, διάφορα ετεροδιμερή μπορεί να έχουν διαφορετική ενζυμική ή ρυθμιστική ικανότητα. Όπως η CNOT8 που ανήκει στην οικογένεια της POP2, έχει την ικανότητα να προσδένεται στην PUF ρυθμιστική πρωτεΐνη περισσότερο από ότι προσδένεται η CNOT7, που επίσης ανήκει στην οικογένεια POP2 (55) (44).

Ανώτερα σύμπλοκα όσον αφορά το επίπεδο οργάνωσης προσθέτουν επιπλέον λειτουργίες και ρυθμιστική δυνατότητα. Υπάρχουν ειδικά ετεροδιμερή αποτελούμενα από την CCR4 και την POP2 πρωτεΐνη σε διάφορα είδη, συνδέονται με πρωτεΐνες NOT για να σχηματίσουν μεγάλα συμπλέγματα πολλαπλών υπομονάδων. Τα σύμπλοκα των αποαδενυλασών πέρα της συμμετοχής τους στην αποικοδόμηση του mRNA προσθέτουν σε επίπεδο οργάνωσης επιπλέον λειτουργίες και ρυθμιστική δυνατότητα.

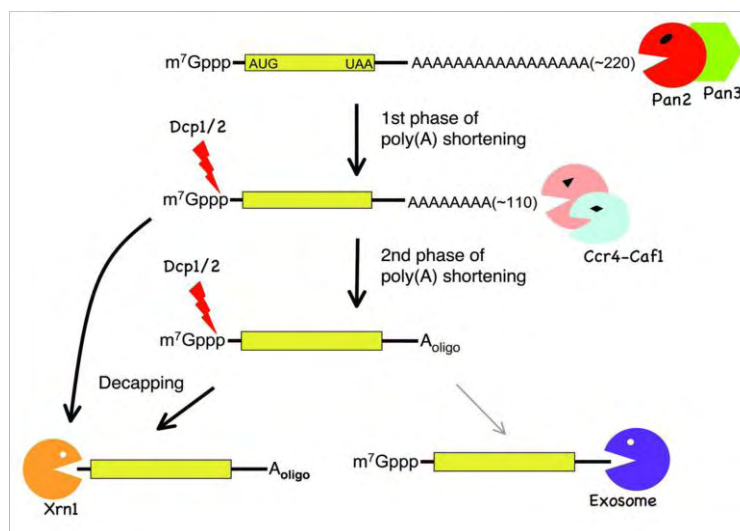
Η διαδικασία αφαίρεσης της καλύπτρας πραγματοποιείται μετά την αποαδενυλίωση και μπορεί να χρησιμεύει ως μηχανισμός "backup" και να προκαλεί διάσπαση του mRNA, σε περιπτώσεις που αποαδενυλίωση τίθεται σε κίνδυνο (36).

Μεταξύ των διαφόρων αποαδενυλασών, τα σύμπλοκα Ccr4-Caf1 και Pan2-Pan3 είναι εξαιρετικά συντηρημένα κατά την εξέλιξη από την ζύμη σε θηλαστικά. Μέλη της οικογένειας BTG/TOB μπορεί να συμβάλλουν στη στρατολόγηση του συμπλόκου. Οι πρωτεΐνες TOB προάγουν την αποαδενυλίωση στρατολογώντας το σύμπλοκο CAF1-CCR4 στο τέλος 3' άκρου του mRNA με ταυτόχρονη πρόσδεση της CAF1 και της PABP. Ωστόσο, ο ακριβής μοριακός μηχανισμός προώθησης της αποαδενυλίωσης μέσω των TOB παραμένει ασαφής (56).

Επίσης, όπως προαναφέρθηκε η PAN είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από τη καταλυτική PAN2 και τη ρυθμιστική PAN3 υπομονάδες. Η αποαδενυλάση PAN2 προσδένεται στην PAN3 η οποία με την σειρά της αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη PABP. Η PABP ρυθμίζει την δράση του συμπλόκου προσελκύνοντας το στην poly(A) ουρά, η οποία με την σειρά της αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη PABP (57). Στη ζύμη, η αποαδενυλίωση του mRNA κυρίως προκαλείται από το σύμπλοκο Ccr4-Caf, ενώ το σύμπλοκο Pan2-Pan, κόβει την πολύ(A) ουρά σε περίπου 70-80 nt στον πυρήνα κατά την διάρκεια της διαδικασίας ωρίμανσης του mRNA. Όταν η λειτουργία του συμπλόκου Ccr4-Caf είναι σε κίνδυνο, το σύμπλοκο Pan2p-Pan3p έχει δευτερεύουσα δράση αποαδενυλάσης στο κυτταρόπλασμα. Αντιθέτως η απενεργοποίηση του συμπλόκου Pan2-Pan, έχει μικρή επίδραση στην αποαδενυλίωση ή στην αποικοδόμηση. Αυτό συμβαίνει και στη *Drosophila*.

Στην πρώτη φάση, τα mRNAs υφίστανται βραδεία αποαδενυλίωση που μειώνει την 3' πολύ (A) ουρά σε περίπου 110 nt από το σύμπλοκο Pan2-Pan3 (Εικόνα 8). Το ένζυμο που καταλύει αυτή την αντίδραση, μπορεί να δράσει στη συνέχεια και σε άλλο mRNA. Στη δεύτερη φάση της αποαδενυλίωσης, το μέγεθος της πολύ (A) ουρά κυμαίνεται από 110 nt σε 10 nt και γίνεται από το σύμπλοκο Ccr4-Caf1. Η δεύτερη φάση σχετίζεται με την ενζυμική πέψη της πολύ (A) ουρά σε ολιγο (A) ουρά. Όταν η δραστικότητα της

Pan2 είναι σε κίνδυνο, η πρώτη φάση της αποαδενλίωσης επιβραδύνεται. Ωστόσο, δεν υπάρχει σημαντική μεταβολή στη αποικοδόμηση του mRNA, πράγμα που υποδηλώνει ότι το σύμπλοκο Ccr4-Caf1 μπορεί τελικά να αναλάβει μόνο του την αποαδενλίωση όταν η δραστηριότητα της Pan2 παρεμποδίζεται. Όταν είτε CCR4 ή Caf1 δραστηριότητα είναι σε κίνδυνο, τελικά ένα ενδιάμεσο mRNA με μια ~ 110 nt πολυ (A) ουρά συσσωρεύεται μετά από την πρώτη φάση της αποαδενλίωσης.



**Εικόνα 8. Οι δυο διαδοχικές φάσεις αποαδενλίωσης των θηλαστικών mRNA (36)**

Στα θηλαστικά, το σύμπλοκο PAN2-PAN3 πραγματοποιεί μια αρχική βράχυνση της poly (A) ουράς του μεταγράφου της β-γλοβίνης από το συνήθως μήκος 200 νουκλεοτιδίων σε 80 νουκλεοτίδια. Η αποαδενλίωση σε αυτό το σημείο συνεχίζεται από ένα άλλο σύμπλοκο, το CCR4-NOT (58).

Επιπλέον η αφαίρεση της καλύπτρας από την Dcp2, οδηγεί στην συσσώρευση δύο ενδιάμεσων mRNAs με πολυ (A) ουρά ~110 nt ή 10–20 nt. Η παραπάνω εικόνα υποδεικνύει ότι η διαδικασία αφαίρεσης της καλύπτρας δεν είναι βήμα για την ενεργοποίηση της αποικοδόμησης των mRNAs των θηλαστικών κυττάρων. Η διαδικασία της αφαίρεσης της καλύπτρας εμφανίζεται μετά από την πρώτη ή μετά από την δεύτερη φάση της αποαδενλίωσης.

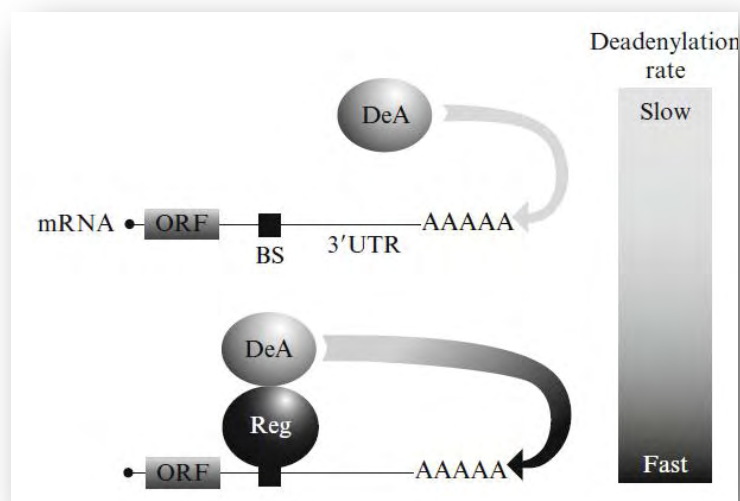
Έτσι, ενώ υπάρχει μια διαφορά μεταξύ των μηχανισμών για την αποικοδόμηση του mRNA σε ζύμη και σε θηλαστικά, η κύρια οδός διάσπασης του mRNA είναι πολύ συντηρημένη σε όλη την εξέλιξη. Τα σύμπλοκα των αποαδενυλασών εκτός από τα ένζυμα αποαδενλίωσης, έχουν παράγοντες που καταστέλλουν τη μετάφραση και ενισχύουν την αποικοδόμηση του mRNA. Η πολυλειτουργικότητα αυτή παρέχει ευκαιρίες για πολυάριθμα σημεία ρύθμισης της αποαδενλίωσης, της μετάφρασης και της αποικοδόμησης των mRNAs, είτε ξεχωριστά είτε συντονισμένα (53). Συνεπώς, δεδομένου ότι η αποαδενλίωση είναι μια αντιστρεπτή διαδικασία, είναι πιθανό ότι στα ευκαρυωτικά κύτταρα, η αποαδενλίωση χρησιμεύει ως ένα σημαντικό σημείο ελέγχου κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, της κυτταρικής ανάπτυξης και

διαφοροποίησης και επομένως είναι ένα σημαντικό βήμα για την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (36).

### 1.7.2 Ρύθμιση αποαδενύλιωσης mRNA

Η ρύθμιση της δραστηριότητας των αποαδενυλασών είναι απαραίτητη, καθώς η ανεξέλεγκτη αποαδενύλιωση θα οδηγούσε στο θάνατο του κυττάρου.

Τα σταθερά και ενεργά μετάγραφα mRNA θα πρέπει να προστατευτούν από την αποαδενύλιωση ενώ τα ασταθή ή ελαττωματικά mRNA θα πρέπει να αποαδενυλιώνονται ή να αποικοδομούνται. Ο ρυθμός αποαδενύλιωσης ποικίλει στα διάφορα υποστρώματα mRNA για αυτό οι αποαδενυλάσεις ρυθμίζονται τόσο σε γενικό όσο και σε ειδικό επίπεδο. Οι αποαδενυλάσεις έχουν γενική λειτουργία στον κύκλο του mRNA αλλά επίσης έχουν εξειδικευμένους ρυθμιστικούς ρόλους. Συγκεκριμένα ελέγχονται από RNA αλληλουχίες που βρίσκονται σε 3' αμετάφραστες περιοχές (UTRs), που δεσμεύουν ρυθμιστικούς παράγοντες. Οι RNA-δεσμευτικές πρωτεΐνες και τα microRNAs επιταχύνουν την αποαδενύλιωση συγκεκριμένων mRNAs. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ρυθμιστικοί παράγοντες ενισχύουν την αποαδενύλιωση δεσμεύοντας ειδικές αποαδενυλάσεις στο mRNA στόχο (Εικόνα 9).



**Εικόνα 9.** Οι ρυθμιστικοί παράγοντες ενισχύουν την αποαδενύλιωση με την πρόσληψη των αποαδενυλάσεων πάνω στο mRNA στόχο.

Η αποαδενύλιωση αποικοδομεί αργά την πολύ(A) ουρά του mRNA που περιέχει ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), μια 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) και μία περιοχή σύνδεσης της δεσμευτικής-RNA ρυθμιστικής πρωτεΐνης (Reg). Η ρυθμιστική πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με την αποαδενυλάση, επιταχύνοντας την αποαδενύλιωση (52).

Επι προσθέτως, η οικογένεια PUF, δεσμευτικές-RNA πρωτεΐνες, μπορούν και καταστέλλουν συγκεκριμένα mRNAs, αλληλεπιδρώντας με ένα σύμπλοκο αποαδενυλασών. Οι πρωτεΐνες PUF που βρίσκονται τις ζύμες, συνδέονται άμεσα με την υπομονάδα POP2 του συμπλέγματος των αποαδενυλασών Ccr4p-Pop2p και έτσι επιταχύνεται η αποαδενυλίωση και καταστέλλεται η μετάφραση των mRNAs στόχων. Η συνδυαστική δράση των ρυθμιστών επεκτείνει την πολυπλοκότητα των διαδικασιών αποαδενυλίωσης. Πολλαπλοί καταστολείς, είτε πρωτεΐνες είτε miRNAs, μπορούν να προσδένονται στο ίδιο mRNA και σύμπλοκα να προσδένονται στο 3'-UTR μέσω διαφορετικών υπομονάδων. Επίσης, η αποαδενυλίωση μπορεί να ελέγχεται με τροποποίηση της πρόσδεσης του ρυθμιστή με ένα mRNA ή την αποαδενυλίωση ή με την αλληλεπίδραση ρυθμιστή-αποαδενυλάσης.

Η έκφραση των αποαδενυλασών και των ρυθμιστών τους υπαγορεύουν το χρόνο και το τόπο που θα συμβεί η ρύθμιση της αποαδενυλίωσης. Για παράδειγμα η έκφραση της Nocturnin είναι ρυθμική, ενδεχομένως ελέγχεται από τον κερκάδιο ρυθμό. Άλλες αποαδενυλάσες όπως μέλη της οικογένειας POP2 και CCR4 είναι σταθερά και εκφράζονται ιδιосуστατικά. Η αναστολή της ενζυμικής ενεργότητας αποτελεί έναν άλλο τρόπο γενικού ελέγχου της αποαδενυλίωσης. Σε συνθήκες στρες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, τα οξειδωτικά, η οσμωτική πίεση ή το θερμικό στρες, η έλλειψη γλυκόζης, η αποαδενυλίωση αναστέλλεται· ο μοριακός μηχανισμός που ρυθμίζει αυτή την αναστολή δεν είναι ακόμα γνωστός.

Η αποαδενυλίωση επηρεάζεται επίσης από δύο μορφές χωρικού ελέγχου από τον πυρηνο-κυτταροπλασματικό διαχωρισμό των αποαδενυλασών και τον εντοπισμό τους στα P-bodies. Αρκετές αποαδενυλάσες μετακινούνται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος. Αλλαγές στη διαμερισματοποίησή τους μπορούν να επιφέρουν δραματικές συνέπειες, για παράδειγμα στα αμφίβια, η αποσύνθεση του πυρήνα κατά την μείωση απελευθερώνει την PARN στο κυτταρόπλασμα όπου και αποαδενυλιώνει μητρικά mRNAs (53).

Ορισμένες αποαδενυλάσες έχουν εντοπιστεί σε ενδοκυτταρικά κοκκία. Τα κοκκία αυτά όπως τα γαμετοκύτταρα, τα νευρωνικά κοκκία και τα P-bodies περιέχουν mRNA μόρια σε καταστολή τα οποία μπορούν να ενεργοποιηθούν (59). Ενδεχομένως, ο συνεντοπισμός αποαδενυλασών και των υποστρωμάτων τους μπορεί να αυξήσει την κινητική της αποαδενυλίωσης. Η αποαδενυλίωση δεν περιορίζεται μόνο στα κοκκία διότι παλαιότερες έρευνες έχουν εντοπίσει τις ίδιες αποαδενυλάσες σε όλο το κυτταρόπλασμα.

Τα χαρακτηριστικά των mRNAs στόχων μπορούν επίσης να επηρεάσουν την αποαδενυλίωση. Η 5' cap μπορούν να επηρεάσει την αποαδενυλίωση διεγείροντας την ενεργότητα της PARN, ενώ δεν έχει επίδραση στην δράση άλλων αποαδενυλασών. Αυτή η μοναδική ιδιότητα μεσολαβείται από την άμεση αλληλεπίδραση της PARN με την 5' cap του mRNA. Σε ορισμένα mRNAs, η poly (A) ουρά μπορεί να προστατεύεται από τις αποαδενυλάσες μέσω ζευγαρώματος βάσεων. Για παράδειγμα, η πλούσια σε ουριδίνη περιοχή στο πυρηνικό RNA της PAN στο σάρκωμα Kaposi, προκαλούμενο από τον ερπητοϊό, αποτρέπει την αποαδενυλίωση του με ζευγάρισμα βάσεων με την poly(A) ουρά. Η πλούσια σε ουριδίνη περιοχή του mRNA Edc1 του *S. cerevisiae* μπορεί να λειτουργήσει παρομοίως (60).

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την αποαδενυλίωση είναι η PABP. Το υπόστρωμα των αποαδενυλασών, η poly (A) ουρά του mRNA, επικαλύπτεται με μόρια PABP που εμποδίζουν την πρόσβαση των αποαδενυλασών. Η PABP του ζυμομύκητα αναστέλλει την δραστηριότητα της απομονωμένης Ccr4 ενώ στα θηλαστικά αναστέλλει την PARN. Αντίθετα η ρυθμιζόμενη αποδέσμευση της PABP από την poly (A) ουρά ή η αλληλεπίδραση της PABP με μία αποαδενυλάση μπορεί να επάγει την αποαδενυλίωση. Στα θηλαστικά η PABP μπορεί να στρατολογήσει το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης CCR4-CAF1-NOT, μέσω αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες TOB (61) (62).

### 1.7.3 Βιολογικές λειτουργίες των αποαδενυλασών

Πίνακας 5. Βιολογικές Λειτουργίες Αποαδενυλασων

Οικογένεια	Βιολογικές λειτουργίες
DEDD νουκλεάσες <b>POP2</b>	Καταστροφή DNA Κυτταρικό κύκλο (Sc) Ανάπτυξη Γονιμότητα (Ce) Κυτταρική μάζα Ρύθμιση miRNA (Dm) Σπερματογένεση Οστική μάζα (Mm)
<b>CAF1Z</b>	NMD
<b>PARN</b>	Ωκύτωση Ωρίμανση (Xl) NMD (Hs)
<b>PAN2</b>	Βράχυνση poly (A) Replication stress (Sc)
EED νουκλεάσες <b>CCR4</b>	Καταστροφή DNA Κυτταρικό κύκλο Replication stress (Sc) Ωγένεση (Dm) NMD (Mm) Κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Mm)
<b>Nocturnin</b>	Κιρκάδιος ρυθμός (Xl, Mm) Ομοιόσταση (Mm)
<b>Angel</b>	Επεξεργασία του 5,8S rRNA Πηγή άνθρακα (Sc)
<b>2' PDE</b>	Αποικοδόμηση του 2'-5' oligo(A) από ιντερφερόνη (Hs)



Οι αποαδενυλάσες έχουν διάφορες βιολογικές λειτουργίες. Κάποιες από αυτές είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα των οργανισμών, ενώ μεταλλάξεις άλλων αποαδενυλασών παρουσιάζουν μια ποικιλία φαινοτύπων. Αρκετές αποαδενυλάσες συμμετέχουν στην εμβρυογένεση, στον κυτταρικό κύκλο, στην ανάπτυξη, στη γονιμότητα, στη μεταβολική ομοιόσταση.

## 1.8 ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Οι ρυθμιστικές διαταραχές στην γονιδιακή έκφραση είναι χαρακτηριστικό πολλών καρκίνων. Μελέτες δείχνουν ότι αυξημένη αποικοδόμηση ογκοκατασταλτικών mRNA μπορεί να προκαλέσει καρκίνο, ενώ αυξημένη ανακύκλωση του mRNA απαιτείται σε ταχέως διαιρούμενα κύτταρα.

Οι διαδικασίες που αναφέρονται στην σταθερότητα του mRNA, στην μεταγραφική καταστολή και στην αποικοδόμηση μεταγράφων συνδέονται πολύπλοκα μεταξύ τους και μπορούν να επηρεαστούν από διάφορα *cis-acting* στοιχεία όπως η πολύ (A) ουρά, τα στοιχεία ARES (αλληλουχίες πλούσιες σε AU) και από *trans-acting* παράγοντες όπως τα μη κωδικοποιητικά RNAs (ncRNAs), RBPs (πρωτεΐνες που συνδέονται με το RNA) και οι ριβονουκλεάσες (27).

Τα *miRNAs* αποτελούνται από 20-25 νουκλεοτίδια που παράγονται από ενδονουκλεολυτική επεξεργασία με τον μηχανισμό της παρεμβολή του RNA. Συνδέονται στην 3' UTR (αμετάφραστη περιοχή) των mRNAs είτε για να αναστείλουν την μετάφραση του είτε για να πυροδοτήσουν την αποικοδόμησή του.

Οι RBPs (πρωτεΐνες που συνδέονται με το mRNA) επηρεάζουν σημαντικά τον χρόνο ζωής των mRNAs. Επιτρέπουν την ποικιλία των χρόνων ημίσειας ζωής των mRNAs και ρυθμίζουν τους ρυθμούς αποσύνθεσής του σε ανταπόκριση σε διάφορα ερεθίσματα. Συνδέονται στην 3' UTR (αμετάφραστη περιοχή) των mRNAs καθώς και στην κωδικοποιητική περιοχή του mRNA προστατεύοντάς το από την αποικοδόμηση.

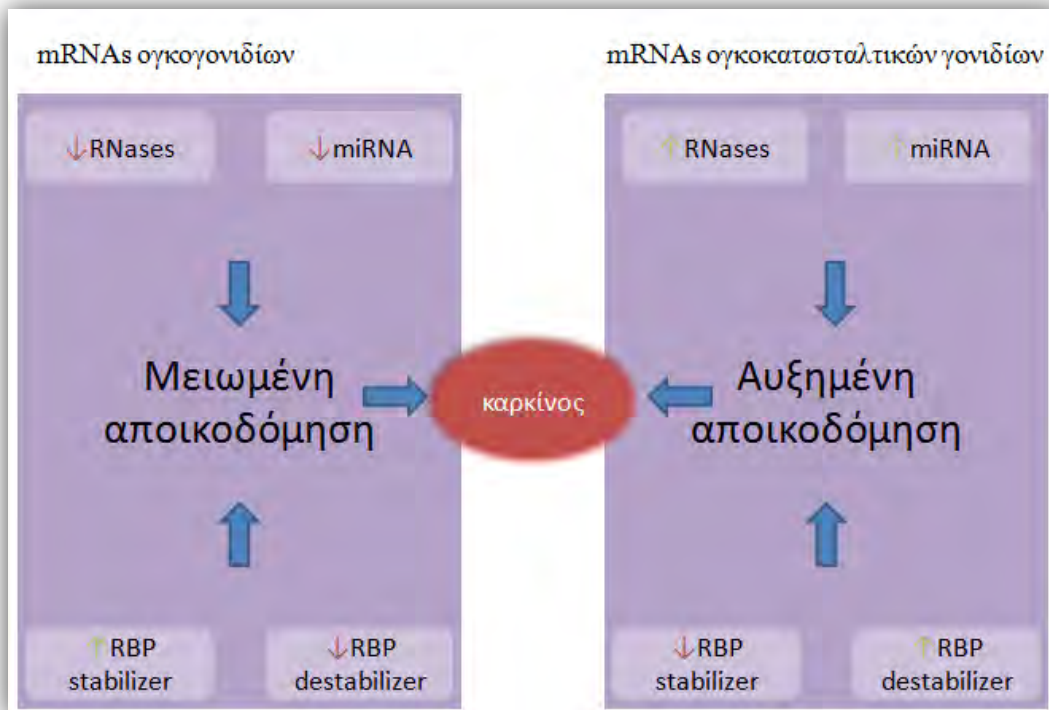
Επίσης, διάφορες ριβονουκλεάσες εμπλέκονται στο στάδιο αποαδενυλίωσης του mRNA και μερικές εξωριβονουκλεάσες κόβουν τα 3' και 5' άκρα των mRNA μετά την αφαίρεση καλύπτρας και πολύ(A) ουράς. Οι ενδοριβονουκλεάσες κόβουν εσωτερικά το mRNA και παράγουν προϊόντα που αποικοδομούνται από τις εξωριβονουκλεάσες. Απουσία ρυθμιστικών μηχανισμών οι ενδοριβονουκλεάσες έχουν μία προφανή επίδραση στην γονιδιακή έκφραση αφού μία και μόνο ενδονουκλεολυτική κοπή οδηγεί στην αδρανοποίηση του mRNA.

Τα κύτταρα έχουν μηχανισμούς για την αποτροπή μίας τέτοιας ανώμαλης αποικοδόμησης του mRNA ρυθμίζοντας αυτές τις ενδοριβονουκλεάσες. Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι ορισμένες από αυτές ελέγχονται από κυτταρικά σήματα. Έτσι τα κύτταρα ανταποκρίνονται ικανοποιητικά σε αλλαγές του περιβάλλοντός τους ρυθμίζοντας την γονιδιακή έκφραση σε επίπεδο mRNA

Η εξέλιξη του καρκίνου περιλαμβάνει την έκφραση των κυρίαρχων ογκογονιδίων ή την δυσλειτουργική trans-δράση των παραγόντων και διαταράσσει τη λειτουργία των συγκεκριμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων μέσω της αύξησης των ποσοστών αποικοδόμησης των mRNAs τους. Επομένως, η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης απαιτεί τον ακριβή έλεγχο του mRNA και οι αποαδενυλάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την πρόοδο των διαφόρων τύπων καρκίνου.

Λίγες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στον ρόλο των ενζύμων αυτών στο καρκίνο. Η αποαδενυλάση CCR4b του συμπλόκου CCR4b–NOT επάγει την κυτταρική αύξηση σε σειρές ινοβλαστών ως πρώτο-ογκογονίδιο. Σε φυσιολογικές συνθήκες το ένζυμο αυτό ρυθμίζει τα επίπεδα του p27Kip1 mRNA, ενός ογκοκατασταλτικού που αναστέλλει κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες και προάγει τον κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον όταν από τα κύτταρα λείπει το ένζυμο αυτό τα επίπεδα του p27Kip1 αυξάνονται και αναστέλλεται η ανάπτυξη των κυττάρων. Η CCR4b αναστέλλεται in vitro από την Tob πρωτεΐνη η οποία αναστέλλει των πολλαπλασιασμό. Ωστόσο δεν υπάρχει καμία μελέτη με αλλαγή των επιπέδων της CCR4b σε όγκους, ενώ δεν υπάρχουν μελέτες που να σχετίζουν μία πλεονάζουσα δράση του ενζύμου με τα επίπεδα ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε καρκινικές σειρές. Η PARN από την άλλη δρα ογκοκατασταλτικά με το να στοχεύει τα mRNAs των αυξητικών παραγόντων IL-8 και VEGF. Μεταλλάγματα της RNA προσδεδεμένης πρωτεΐνης TTP όπου δεν μπορεί πλέον να στρατολογήσει την PARN έχουν βρεθεί σε μεταστατικά γλοιοκύτταρα. Επίσης η PARN και το σύμπλοκο εξωσώματος στρατολογούνται από τις KSRP και DHAU με αποτέλεσμα να μειώνονται τα επίπεδα c-jun και uPA, τα οποία αυξάνονται στον καρκίνο. Μια άλλη μελέτη εστιάζει στην αλληλεπίδραση της PARN με την CUG-BP η οποία την στρατολογεί για να αποσταθεροποιήσουν τα c-fos και TNF-alpha mRNAs. Προσφάτως αποδείχθηκε ότι η έκφραση της PARN αυξάνεται σε οξεία λεμφοβλαστική και οξεία μυελογενή λευχαιμία και ότι μία σημαντική ποσότητα του ενζύμου είναι φωσφορυλιωμένη (63). Μια άλλη μελέτη εστιάζει στην αλληλεπίδραση της PARN με την CUG-BP η οποία προσδέεται σε υποστρώματα mRNA στρατολογεί την PARN για να αποσταθεροποιήσουν τα c-fos και TNF-alpha mRNAs.

Η CCR4d (ANGEL) ρυθμίζει την έκφραση του p21 μέσω του p53-ανεξάρτητου μονοπατιού. Η θετική ρύθμιση της p21 από τη Ccr4d και αναστολή της ανάπτυξης από την επίδραση της Ccr4d υποδηλώνουν ότι ενδεχομένως η Ccr4d να εμπλέκεται στην καρκινογένεση. Η Ccr4d υποεκφράζεται σε καρκίνους που προέρχονται από διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των νεφρών, της ουροδόχου κύστης, του αιδοίου, του προστάτη, θυρεοειδούς, δέρμα, λεπτό έντερο, και το πάγκρεας (64).



**Εικόνα 10. Μετά-μεταφραφικός έλεγχος στο καρκίνο. Οι δυσλειτουργικοί trans-acting παραγόντες στον μεταβολισμό του mRNA οδηγούν σε καρκινογένεση (65).**

Πρόσφατα από το εργαστήριό μας ανακοινώθηκε πως τα επίπεδα έκφρασης ορισμένων αποαδενυλασών, όπως της PARN και CNOT7, αλλάζουν την έκφρασή τους σε οξείες λευχαιμίες, τόσο σε επίπεδο mRNA, όσο και πρωτεΐνης. Προτάθηκε επίσης πως θα μπορούσε να διερευνηθεί η δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν τα επίπεδα έκφρασης των ενζύμων αυτών ως πιθανοί βιοδείκτες στο μέλλον (66).

## 2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### 2.1 ΣΚΟΠΟΣ

Βασιζόμενοι σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου, Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας (66), που αφορούν την αλλαγή των επιπέδων έκφρασης αρκετών αποαδενυλασών σε οξείες λευχαιμίες, σκοπός της παρούσας έρευνας είναι να εξετασθούν πιθανές αλλαγές των επιπέδων έκφρασης των αποαδενυλασών που σχετίζονται με τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο, πιο συγκεκριμένα με το πλακώδες καρκίνωμα και με τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

Έγινε σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των αποαδενυλασών μεταξύ παθολογικού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού που ελήφθη με βρογχοσκόπηση με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative Real-Time PCR, qRT-PCR).

Για καλύτερη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε μεγάλος αριθμός δειγμάτων ασθενών διαφόρων ηλικιών, διαφορετικής συχνότητας καπνίσματος και διαφορετικού σταδίου καρκίνου.

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας συνδυάζονται με αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών (67) για την κατανόηση και την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης των ενζύμων αυτών στους προαναφερθείσες τύπους καρκίνου του πνεύμονα.

Επίσης, για μεγαλύτερη ακρίβεια των πειραματικών αποτελεσμάτων εκτελεστήκαν επαναληπτικές μετρήσεις.

## 2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

### 2.2.1 Μέθοδος Real Time

#### 2.2.1.1 Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση του RNA έγινε με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRI (SIGMA) βάσει του πρωτοκόλλου:

#### TRI Reagent (SIGMA) Protocol

1. Centrifuge cells: 3000g, 3 min, @ 4°C.  
Keep cell pellet, discard spnt.
2. Add **1 V** TRI Reagent to the cell pellet ( $V = 0,2 - 1,0 \text{ mL}$ ).  
Lyse cells by repeated pipetting. RT up to 5 min.
3. Add **0,1 V** 1-bromo-3-chloropropane.  
Shake vigorously 15 sec. RT up to 15 min.  
Centrifuge 12000g for 15 min @ 4°C.

#### RNA extraction

4. Transfer aqueous phase in new tube.  
Add **0,5 V** 2-propanol, mix, RT 10 min.  
Centrifuge 12000g for 10 min @ 4°C.
5. Remove spnt.  
Wash RNA pellet **1-2 V** EtOH75%, vortex.  
Centrifuge 12000g for 5 min @ 4°C.
6. Remove spnt CAREFULLY. Dry RNA pellet.  
Resuspend in ddH<sub>2</sub>O by pipetting @ 55°C.  
Store @ -80°C

#### 2.2.1.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου δύο βημάτων (RT-qPCR)

Η Real Time PCR αποτελεί μία ιδιαίτερα ακριβή και ευαίσθητη μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού, που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της έκφρασης των επιπέδων mRNA ενός γονιδίου, ακόμη και σε περιπτώσεις που αυτή είναι πολύ χαμηλή. Στην παρούσα εργασία εφαρμόζεται η Real Time PCR δύο βημάτων (two-step Real Time

PCR), κατά την οποία πραγματοποιείται αρχικά η σύνθεση του cDNA των μεταγράφων και σε επόμενο βήμα η ενίσχυση του παραγόμενου cDNA.

### **1<sup>ο</sup> Βήμα: Σύνθεση του cDNA κλώνου**

Για τη μετατροπή του ολικού RNA σε cDNA προκειμένου να ενισχυθεί στη συνέχεια με απλή RT-PCR χρησιμοποιήθηκε το Prime 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit (Takara). Η αντίστροφη μεταγραφή που χρησιμοποιήθηκε απομονώνεται από τον Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) και μπορεί να συνθέσει cDNA μήκους μέχρι και 12000 βάσεων.

1. Ετοιμάζουμε σε ένα μικρό eppendorf τα εξής:

**Πίνακας 6. Ποσότητες αντιδραστηρίων για την σύνθεση cDNA clone <sup>(1)</sup>**

Αντιδραστήρια	Όγκος
<b>Oligo dT Primer (50 μM)*</b>	1.0 μl
<b>dNTP Mixture (10 mM each)</b>	1.0 μl
<b>Template RNA</b>	Ολικό RNA : < 5 μg*
<b>RNase free dH<sub>2</sub>O</b>	μέχρι 10 μl

Η συγκέντρωση του RNA έχει συγκέντρωση 400 ng/rxn.

2. Το μίγμα θερμαίνεται στους 65 °C για 5 min ώστε να αποδιαταχθούν οι δευτεροταγείς δομές του RNA και να γίνει η πρόσδεση των εκκινητών στο στόχο και στη συνέχεια τοποθετείται κατευθείαν στον πάγο
3. Στη συνέχεια προστίθενται τα παρακάτω αντιδραστήρια, μέχρι τον τελικό όγκο που είναι 20 μl.

**Πίνακας 7. Ποσότητες αντιδραστηρίων για την σύνθεση cDNA clone <sup>(2)</sup>**

Αντιδραστήρια	Όγκος
Template RNA Primer Mixture	μέχρι 10.0μl
5 X PrimeScript™ Buffer	4 μl (1X)
RNase Inhibitor (40 U/μl)	0.5 μl (20 units)
PrimeScript™ RTase (200 U/μl)	0.5 μl (200 units)
RNase free dH <sub>2</sub> O	μέχρι 20.0 μl

## **2ο Βήμα: Real Time PCR**

Κατά την Real Time PCR, πραγματοποιείται η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης και καταγραφής της αύξησης του φθορισμού μιας συγκεκριμένης φθορίζουσας ουσίας. Ευρέως χρησιμοποιούμενη ουσία αποτελεί η SYBR green1 η οποία διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497nm και εκπέμπει στα 520 nm. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της SYBR green είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών , για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας – στόχο, ενώ σημαντικό μειονέκτημά της είναι ότι προσδένεται σε όλα τα δίκλιωνα μόρια DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση ενίσχυσης., στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα πιθανά διμερή των εκκινητών καθώς και μη ειδικά προϊόντα που ενδέχεται να προκύψουν. Ωστόσο ο σωστός σχεδιασμός ειδικών εκκινητών καθώς και η βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, μπορούν να συμβάλλουν στην αποτροπή δημιουργίας διμερών των εκκινητών. Η ένταση φθορισμού μετράται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μία καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει την παρακολούθηση ολόκληρης της διαδικασίας της αντίδρασης από τον ερευνητή. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase) , σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την αντίδραση συστατικά βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Στη συνέχεια επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία ορισμένα από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται , σταδιακά και αναστολές της αντίδρασης, Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητά της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau).

Στη συγκεκριμένη εργασία η μελέτη των επιπέδων έκφρασης πραγματοποιήθηκε με την ποσοτική PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της “KAPA™ SYBR® FAST qPCR Kit – Master Mix (2X) Universal”. Στις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε ως χρωστική αναφοράς η ROX και ως εσωτερικό control για την κανονικοποίηση του σήματος των ειδικών προϊόντων, το ιδιοσυστατικό γονίδιο της β-ακτίνης και του 18S rRNA. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε cDNA, από ολικό RNA απομονωμένο από τα εξεταζόμενα δείγματα. Οι ποσότητες των επιμέρους αντιδραστηρίων των αντιδράσεων και οι συνθήκες αυτών παρουσιάζονται στους Πίνακες 8 Πίνακας 9 αντίστοιχα.

### **Εκκινητές**

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των αποαδενυλασών καθώς και των υπολοίπων παραγόντων που εξετάστηκαν χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και σε προηγούμενες έρευνες του εργαστηρίου και παρουσιάζονται στον Πίνακα 10. Ο κάθε εκκινητής ελέγχθηκε ως προς την εξειδίκευσή του για το αντίστοιχο cDNA-στόχο, με το πρόγραμμα Blastn.

**Πίνακας 8. Συστατικά αντίδρασης qPCR**

	Final concentration	20 µl rxn
Forward Primer (10 µM)	200nM	0.4µl
Reverse Primer (10 µM)	200nM	0.4µl
Template DNA	(<20 ng/20 µl rxn)	Variable
<b>Βελτιστοποιημένες συνθήκες (Συγκεντρώσεις εκκινητών και δείγματος) για κάθε αποαδενυλάση (PARN, CNOT6, CNOT7, NOC)</b>		
Forward Primer (10 µM)	100nM	0.2µl
Reverse Primer (10 µM)	100nM	0.2µl
Template DNA	(<20 ng/20 µl rxn)	1 µl



Πίνακας 9. Συνθήκες αντίδρασης qPCR για την ενίσχυση των επιλεγμένων παραγόντων

qPCR steps	Cycling conditions	
<b>Denaturation (Hot Start)</b>	95°C, 3min	(1 cycle)
<b>Amplification</b>	95°C, 3sec 60°C, 30sec 72°C, 11sec	(40 cycles)
<b>Dissociation</b>	95°C, 1min 55°C, 30sec 95°C, 30sec	(1 cycle)

Πίνακας 10. Βιολογική λειτουργία και αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος PCR

Παράγοντας	Βιολογική λειτουργία	Primers (5'→3') Αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
<b><u>ANGEL1</u></b>	Ανήκει στην EEP υπεροικογένεια αποαδενυλασών. Υπάρχει σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (Goldstrohm A. and Wickens M., 2008)	Fwd AGCATAGCACCTGAGCCTGT Rev GGTCCTGAGCCAGGATGTTA 220bp
<b><u>ANGEL2</u></b>	Ανήκει στην EEP υπεροικογένεια αποαδενυλασών. Υπάρχει σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (Goldstrohm A. and Wickens M., 2008)	Fwd GTGTTGCCACCAGAAAGAT Rev GGGGCCAAATTGGAATAGAT 195bp
<b><u>PARN</u></b>	Ανήκει στην DEDD υπεροικογένεια αποαδενυλασών (Goldstrohm A. και Wickens M., 2008)	Fwd GACCCCTCCAGAAAGCTAC Rev GGGGCACTTTGTCTCAACAT 236bp
<b><u>PARNL</u></b> (PNLDC1 poly(A)-specific ribonuclease (PARN)-like domain containing 1)	Ανήκει στην DEDD υπεροικογένεια αποαδενυλασών (Goldstrohm A. and Wickens M., 2008)	Fwd GACCCCTCCAGAAAGCTAC Rev GGGGCACTTTGTCTCAACAT 236bp
<b><u>CNOT6</u></b>	Αποτελεί υπομονάδα του συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT (Lau και συν., 2009)	Fwd AGCTGTCATGGGAAGAATGG Rev

<b>(CCR4-NOT transcription complex, subunit 6)</b>		GGGCAGCCACTGATGTTATT 221bp
<b><u>CNOT6L</u></b> <b>(CCR4-NOT transcription complex, subunit 6-like)</b>	Αποτελεί μεταβλητή υπομονάδα του συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT (Lau και συν., 2009)	Fwd CGGCTCTTCCAGCTACAAAC Rev GGAAGCTGCTCTGGATGAAC 143bp
<b><u>CNOT7</u></b>	Ανήκει στην DEDD υπεροικογένεια (Goldstrohm A. και Wickens M., 2008)	Fwd GTCCTCTGTGAAGGGGTCAA Rev GACTGCTTGTGGCTTCTC 419bp
<b><u>CNOT8</u></b> <b>(CCR4-NOT transcription complex, subunit 8)</b>	Αποτελεί υπομονάδα του συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT (Lau και συν., 2009)	Fwd GGATTTGCAGAGGATTGGAA Rev TCACTGCTGCATGTTGTTGA 232bp
<b><u>NOCTURNIN</u></b> <b>(CCR4 carbon catabolite repression 4-like)</b>	Αποαδενυλάση κατηγορίας EEP, εξαρτώμενη από δισθενή κατιόντα Mg <sup>2+</sup> . Υπόκειται σε κερκάδιο έλεγχο (Goldstrohm A. και Wickens M., 2008)	Fwd GCCAAGACACTGAACAGCAG Rev GGCAATCTGTCTCAGATCC 175bp
<b><u>PAN2</u></b>	Ανήκει στην υπεροικογένεια DEDD αποαδενυλασών. Αποικοδομεί το μισό μήκος της πολύ(A) ουράς μέσα στον πυρήνα, ενώ το υπόλοιπο μέρος αποικοδομείται από τις αποαδενυλάσες CAF1 και CCR4 στο κυτταρόπλασμα (Goldstrohm A. και Wickens M., 2008)	Fwd CTCATCGGGGGACTCTGTTA Rev CCAGGCCTGTGTATTCTGGT 205bp
<b><u>b-actin</u></b>	Η β- ακτίνη είναι μία από τις 6 διαφορετικές ισομορφές ακτίνης που έχουν ταυτοποιηθεί στους ανθρώπους. Είναι μία από τις δύο ακτίνες του κυτταροσκελετού, που δεν βρίσκονται στους μύες. Είναι υψηλά διατηρημένη πρωτεΐνη και εμπλέκεται στην κινητικότητα, τη δομή και την ακεραιότητα του κυττάρου. Τα επίπεδά της παραμένουν σταθερά και χρησιμοποιείται έτσι, σαν control, μεταξύ άλλων, όσων αφορά την ακεραιότητα των κυττάρων, την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και	Fwd GGACTTCGAGCAAGAGATGG Rev AGCACTGTGTTGGCGTACAG 234 bp

<b><u>18S rRNA</u></b>	σε τεχνικές όπως Western Blotting (“Entrez Gene: ACTB actin, beta”)	
	Μέλος του ριβοσωμικού RNA. Αποτελεί συστατικό της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας 40S. Είναι το ευκαρυωτικό πυρηνικό ομόλογο του 16S rRNA των προκαρυωτών και των μιτοχονδρίων. Είναι ένα από τα βασικά συστατικά όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων. Δεν έχει πολυ(A) ουρά, καθώς δεν μεταφράζεται και θεωρείται ως housekeeping gene, γιατί τα επίπεδά του εντός του κυττάρου παραμένουν σταθερά (Lewin, GENES VIII)	Fwd AGAAGGCTGGGGCTCATTTG Rev AGGGGCCATCCACAGTCTTC 253 bp

## 2.2.2 Ιστορικό ασθενών από τους δύο τύπους καρκίνου του πνεύμονα

Τα δείγματα ήταν κύτταρα από βιοψίες παθολογικού και φυσιολογικού ιστού πνεύμονα και η λήψη τους έγινε με βρογχοσκόπηση. Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών ήταν 60,6 ( $\pm 9,7$ ) έτη για τον πλακώδη καρκίνο του πνεύμονα (S.C.C.) και 64,7 ( $\pm 8,2$ ) έτη για τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (S.C.L.C.) (Πίνακας 11 Πίνακας 11).

**Πίνακας 11. Στοιχεία ασθενών με βάση την ηλικία, τη συχνότητα καπνίσματος και το στάδιο καρκίνου του πνεύμονα**

SCC				
ΦΥΛΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ	ΣΤΑΔΙΟ	PYS
ΑΝΔΡΑΣ	52	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟ	80
ΑΝΔΡΑΣ	50	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟ	60
ΑΝΔΡΑΣ	67	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟ	100
ΑΝΔΡΑΣ	55	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟ	100
ΑΝΔΡΑΣ	72	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟ	100
ΑΝΔΡΑΣ	68	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟ	50

<b>SCLC</b>				
<b>ΦΥΛΛΟ</b>	<b>ΗΛΙΚΙΑ</b>	<b>ΚΑΠΝΙΣΜΑ</b>	<b>ΣΤΑΔΙΟ</b>	<b>PYS</b>
<b>ΑΝΔΡΑΣ</b>	66	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟ	50
<b>ΑΝΔΡΑΣ</b>	60	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟ	60
<b>ΑΝΔΡΑΣ</b>	73	ΠΡΩΗΝ ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟ	70
<b>ΑΝΔΡΑΣ</b>	60	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟ	90
<b>ΑΝΔΡΑΣ</b>	56	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟ	40
<b>ΑΝΔΡΑΣ</b>	75	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟ	100
<b>ΓΥΝΑΙΚΑ</b>	64	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟ	70
<b>ΑΝΔΡΑΣ</b>	73	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟ	60
<b>ΑΝΔΡΑΣ</b>	77	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟ	60
<b>ΑΝΔΡΑΣ</b>	67	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΕΝΟ	100
<b>ΑΝΔΡΑΣ</b>	57	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟ	70
<b>ΑΝΔΡΑΣ</b>	54	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟ	70
<b>ΑΝΔΡΑΣ</b>	53	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟ	100
<b>ΑΝΔΡΑΣ</b>	71	ΠΡΩΗΝ ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΕΝΟ	70

## 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

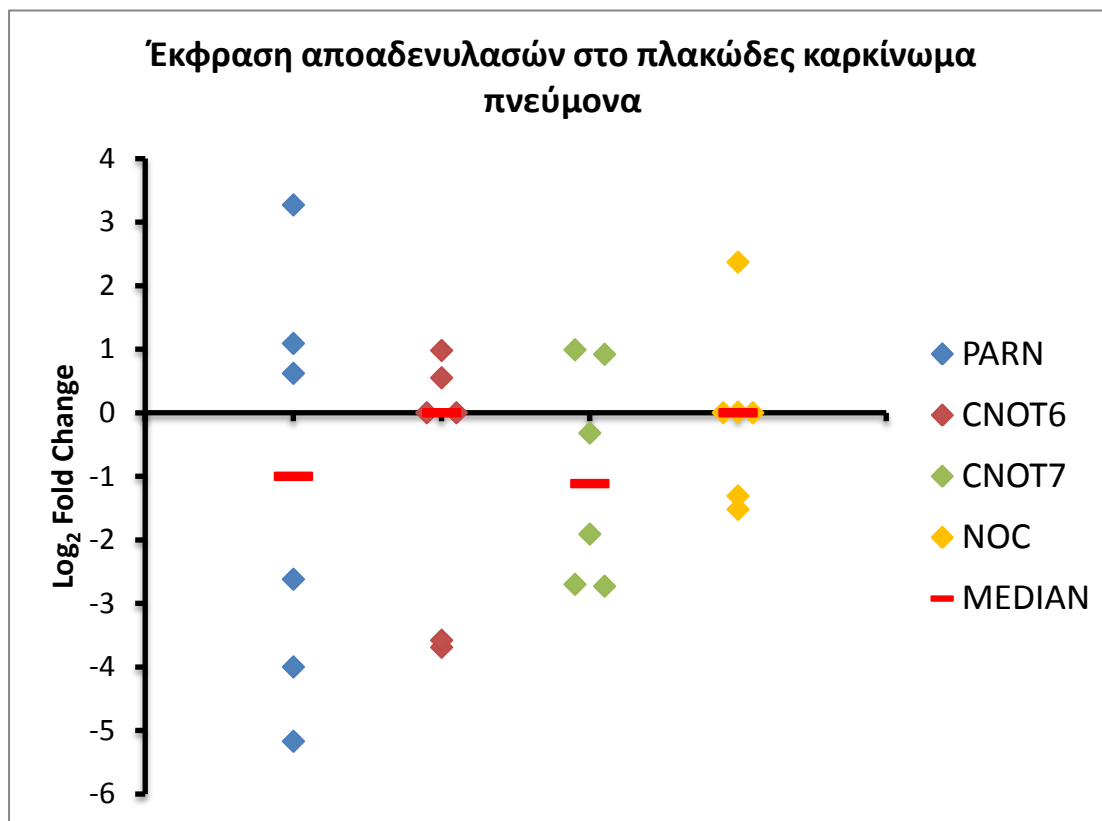
Με βάση τις προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας <sup>(67)</sup> <sup>(68)</sup>, όπου είχε αποδειχθεί ότι οι αποαδενυλάσες PARN, CNOT6, CNOT7 και NOC παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική μεταβολή έκφρασης στα περισσότερα δείγματα των ασθενών, στην παρούσα έρευνα μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των αποαδενυλασών αυτών με qRT-PCR. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν 6 δείγματα ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα και 14 δείγματα ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται δείγμα από μη παθολογικό ιστό του ίδιου ασθενούς.

#### 3.1.1 Βελτιστοποίηση προγενέστερων τεχνικών

Αρχικά στην παρούσα έρευνα δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνθήκες απομόνωσης RNA από βιοψίες και ενίσχυσης του cDNA με RT-PCR για την βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων. Έτσι, αντί για του πρωτοκόλλου Total RNA and Protein Isolation NucleoSpin® RNA/Protein, Macherey-Nagel που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση RNA από ιστό στα παλαιότερες πειραματικές δοκιμές, δοκιμάστηκε με επιτυχία το πρωτόκολλο TRI Reagent (SIGMA) Protocol, χάρη στο οποίο απομονώνεται περισσότερη ποσότητα RNA του συγκεκριμένου ιστού. Σε αρκετά από τα προηγούμενα δείγματα πειραματικών μελετών του εργαστηρίου είχε παρατηρηθεί παραγωγή παραπροϊόντων κατά την μέθοδο της RT-PCR. Γι αυτό το λόγο δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις δείγματος και εκκινητών και καταλήξαμε στις βέλτιστες συνθήκες της RT-PCR για την κάθε αποαδενυλάση που περιγράφονται στον Πίνακα 9.

#### 3.1.2 Επίπεδα έκφρασης mRNA αποαδενυλασών σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνο του πνεύμονα (SCC) με quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

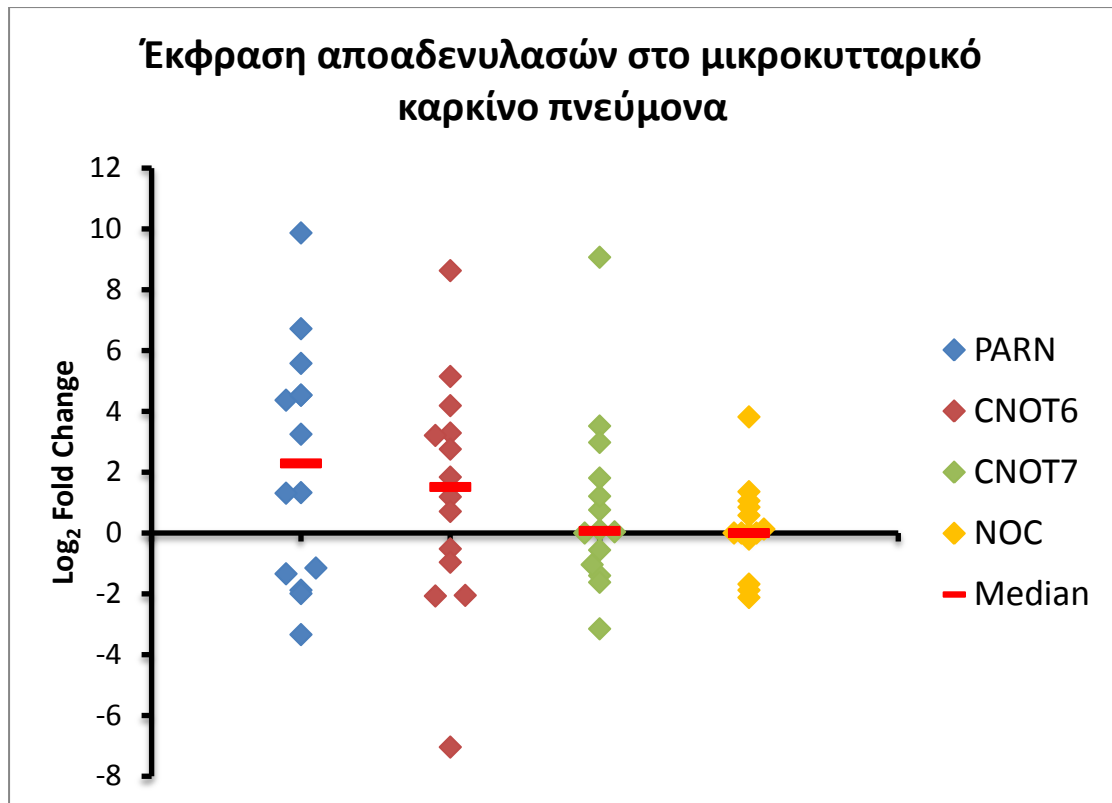
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 1 με βάση τις διαμέσους των αποαδενυλασών για κάθε δείγμα, παρατηρείται η υποέκφραση των αποαδενυλασών στο πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα. Πιο συγκεκριμένα η έκφραση των αποαδενυλασών PARN και CNOT7 υποδιπλασιάζεται ( $\log_2 = -1$ ), ενώ για τις CNOT6 και NOC παρατηρείται αμελητέα αλλαγή έκφρασης. Πρέπει να σημειωθεί ότι η υποέκφραση παρατηρείται με βάση τη διάμεσο, η οποία όμως είναι στατιστικά μη σημαντική ( $p > 0,05$ ) καθώς και το εύρος τιμών έκφρασης είναι μεγάλο για κάθε αποαδενυλάση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η PARN (εύρος τιμών 9).



**Σχήμα 1.** Επίπεδα έκφρασης αποαδενυλασών και διάμεση τιμή της έκφρασης (—) σε δείγματα από 6 ασθενείς με SCC. Τα σημεία που εμφανίζονται αντιστοιχούν στην έκφραση των αποαδενυλασών στον παθολογικό ιστό σε σχέση με την αντίστοιχη επί του φυσιολογικού ιστού (fold change)

### 3.1.3 Επίπεδα έκφρασης mRNA αποαδενυλασών σε ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (SCLC) με quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

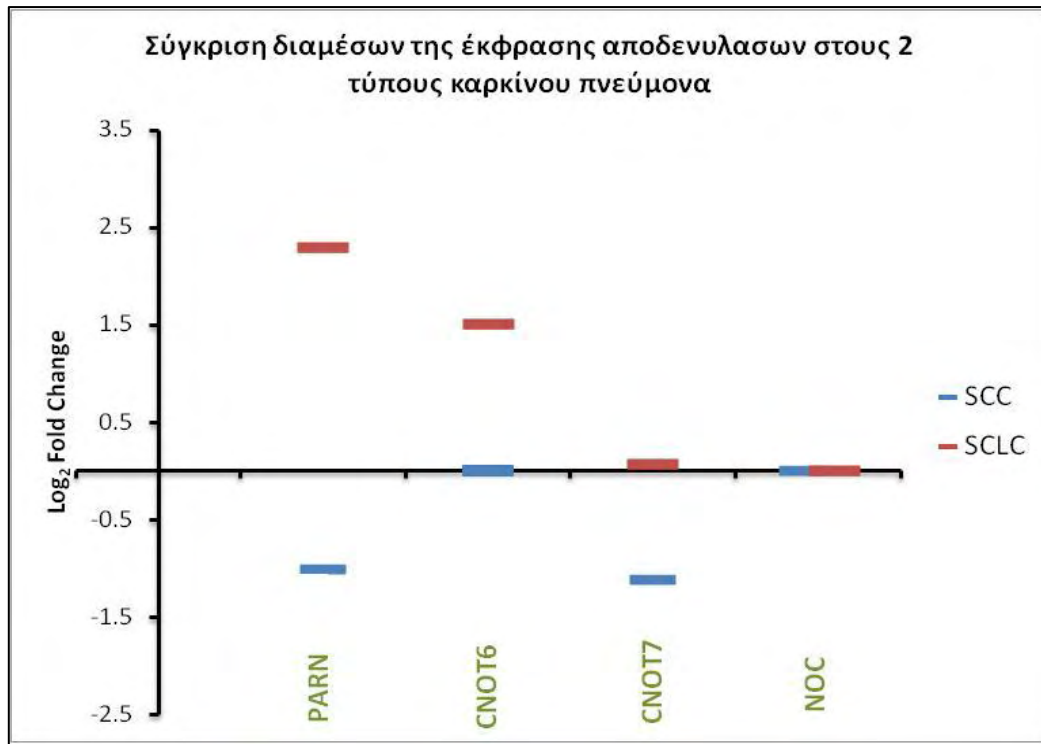
Στο SCLC παρατηρείται, κατά μέσο όρο, υπερέκφραση των αποαδενυλασών PARN και CNOT6. Αντιθέτως, φαίνεται ότι οι αποαδενυλάσες NOC και CNOT7 παρουσιάζουν αμελητέα αλλαγή έκφρασης. Πρέπει να αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή, η οποία όμως είναι στατιστικά μη σημαντική ( $p > 0,05$ ).



Σχήμα 2. Επίπεδα έκφρασης αποαδενυλασών και η διάμεση τιμή έκφρασης (—) σε δείγματα από 14 ασθενείς με SCLC. Τα σημεία που εμφανίζονται αντιστοιχούν στην έκφραση των αποαδενυλασών στον παθολογικό ιστό σε σχέση με την αντίστοιχη επί του φυσιολογικού ιστού (fold change).

### 3.1.4 Σύγκριση αποτελεσμάτων μεταξύ SCC και SCLC

Παρατηρήθηκε διπλασιασμός της έκφρασης των αποαδενυλασών PARN και CNOT6 στο μικροκυτταρικό καρκίνο, ενώ υποδιπλασιασμός των αποαδενυλασών PARN και CNOT7 στο πλακώδες καρκίνωμα. Επιπλέον, στο μικροκυτταρικό καρκίνο παρατηρείται αμελητέα μεταβολή έκφρασης της CNOT7. Τέλος, με βάση τα παραπάνω διαγράμματα η αποαδενυλάση NOC εμφανίζει αμελητέα αλλαγή έκφρασης και στους δύο τύπους καρκίνου.



Σχήμα 3. Σύγκριση διάμεσων της έκφρασης αποαδενυλασών στους δύο τύπους καρκίνου

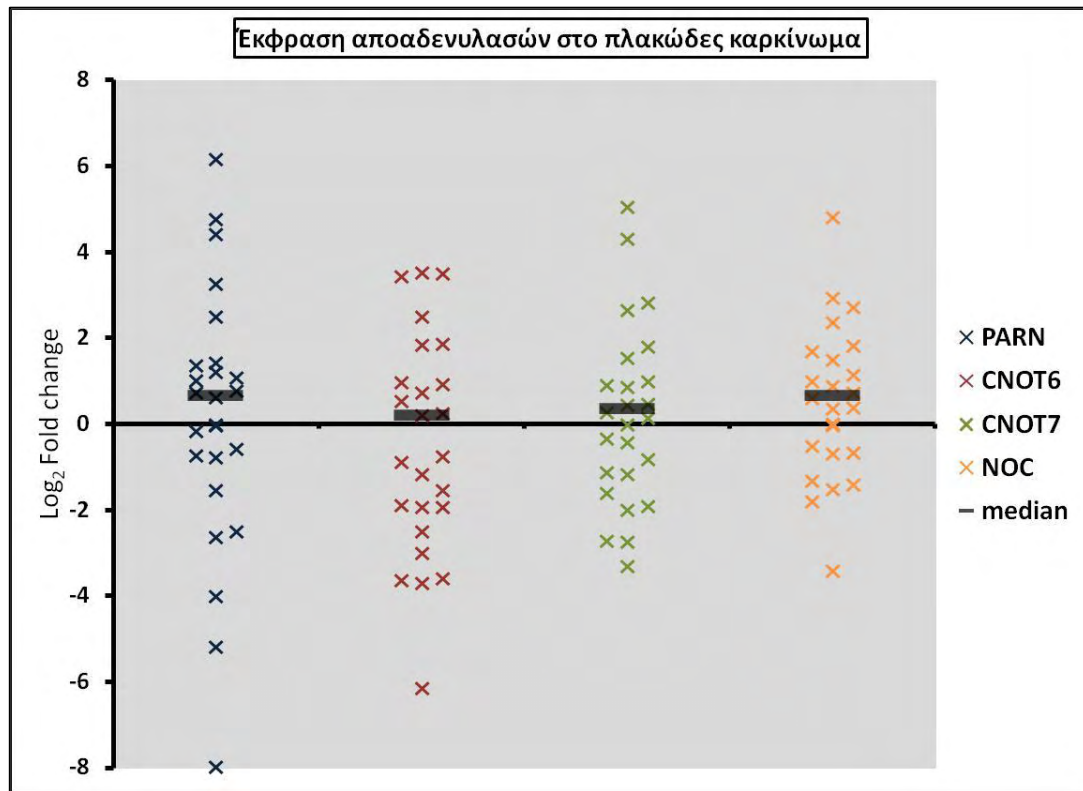
### 3.2 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Στα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας σε 6 δείγματα των ασθενών με πλακώδες καρκίνο παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση των αποαδενυλασών PARN και CNOT7 και αμελητέα μεταβολή έκφρασης των αποαδενυλασών CNOT6 και NOC **Σχήμα 1**. Εντούτοις, λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων, αυτά τα αποτελέσματα δεν μπορούν να θεωρηθούν στατιστικά σημαντικά ( $p > 0,05$ ). Επίσης, η παρούσα έρευνα βασίστηκε στα συμπεράσματα των προηγούμενων ερευνών, όπου υπήρξαν ενδείξεις ότι ένζυμα, όπως η PARN και η CNOT7, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρωματικοί βιοδείκτες και πιθανόν ως χρήσιμα εργαλεία μελέτης της θεραπείας, αφού η έκφραση αυτών μεταβάλλεται μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων. Η μελέτη επεκτάθηκε στον καρκίνο του πνεύμονα, ώστε να εξετασθεί αν οι προηγούμενες παρατηρήσεις σχετικά με τη μεταβολή των επιπέδων έκφρασης των αποαδενυλασών αποτελούν ένα γενικότερο φαινόμενο στον καρκίνο.

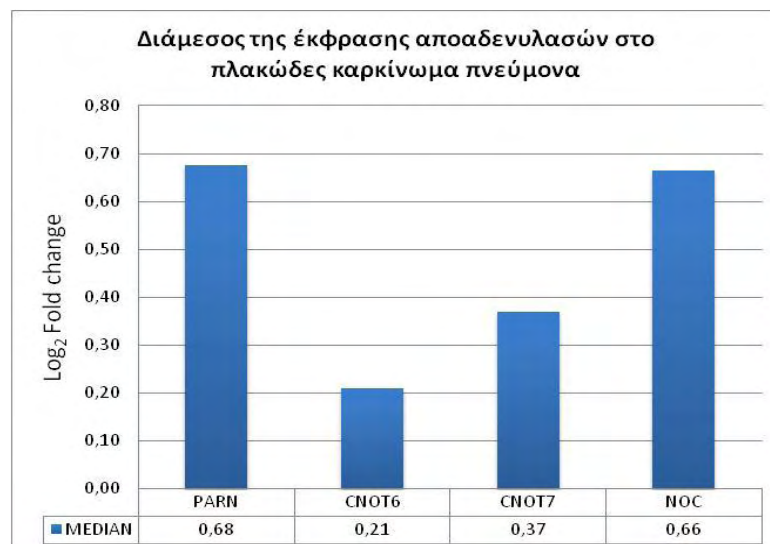
Συνεπώς, τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας για τους δύο τύπους καρκίνου του πνεύμονα προστέθηκαν σε ένα μεγαλύτερο εύρος δειγμάτων προηγούμενων ερευνών <sup>(67)</sup> <sup>(68)</sup> και μελετήθηκε η αλλαγή έκφρασης των 4 αποαδενυλασών (PARN, CNOT6, CNOT7 και NOC) καθώς και των υπολοίπων (ANGEL1, ANGEL2, PARNL, CNOT6L, CNOT8, PAN2), μεταξύ παθολογικών και φυσιολογικών δειγμάτων ασθενών. Στις υπόλοιπες αποαδενυλάσεις δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Με βάση το σύνολο των



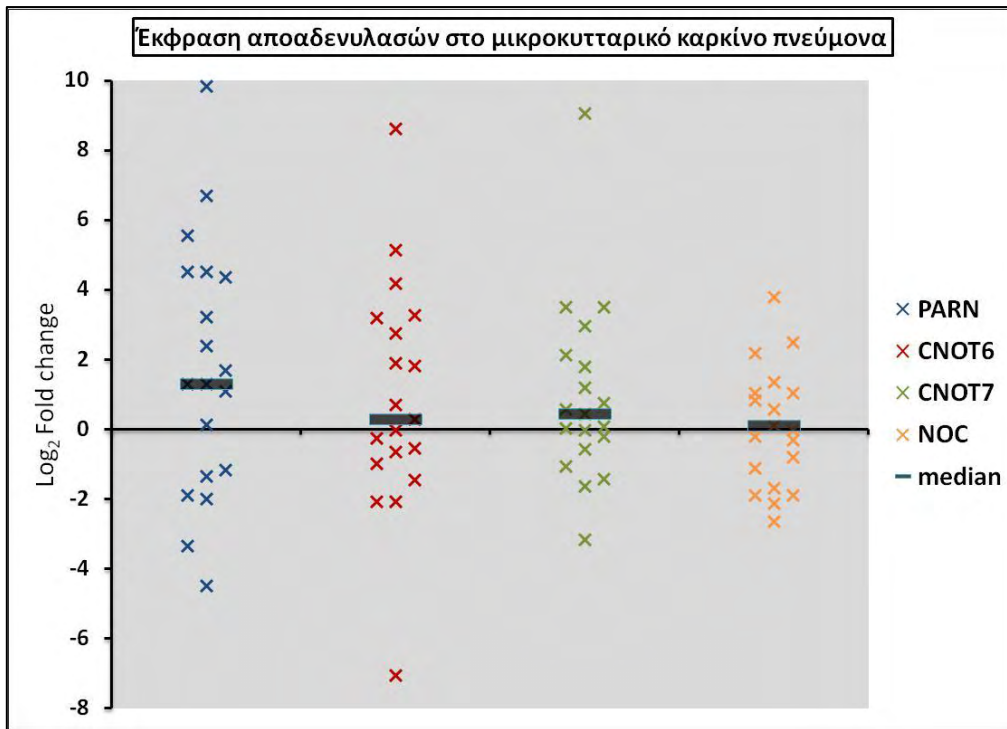
αποτελεσμάτων δημιουργήθηκαν τα παρακάτω διαγράμματα (Σχήμα 4 και Σχήμα 6).



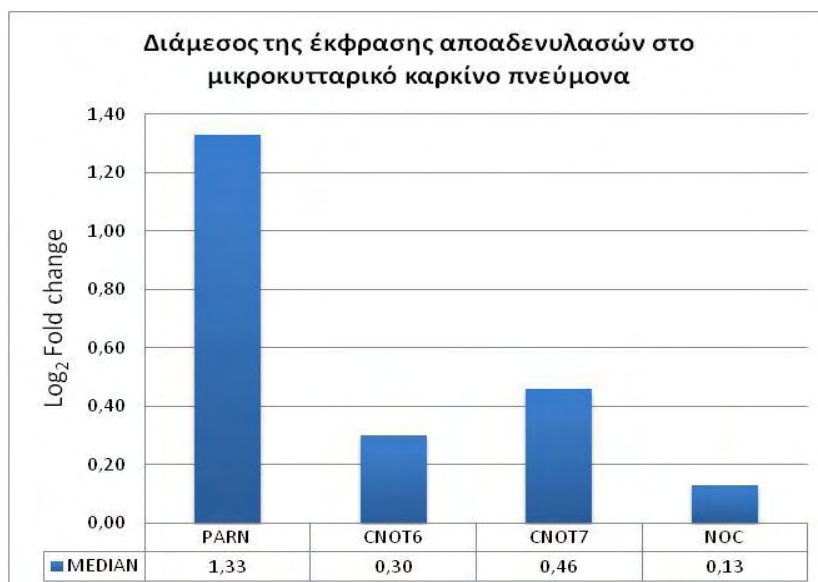
Σχήμα 4. Επίπεδα έκφρασης αποαδενυλασών και διάμεση τιμή της έκφρασης (—) στο σύνολο των δειγμάτων της παρούσας και παλαιότερων ερευνών (67) από ασθενείς με SCC. Τα σημεία που εμφανίζονται αντιστοιχούν στην έκφραση των αποαδενυλασών στον παθολογικό ιστό σε σχέση με την αντίστοιχη επί του φυσιολογικού ιστού (fold change).



Σχήμα 5. Διάμεσος της έκφρασης αποαδενυλασών για τα δείγματα πλακώδους καρκίνου του πνεύμονα



Σχήμα 6. Επίπεδα έκφρασης αποαδενυλασών και η διάμεση τιμή έκφρασης (—) στο σύνολο των δειγμάτων της παρούσας και παλαιότερων ερευνών (67) από ασθενείς με SCLC . Τα σημεία που εμφανίζονται αντιστοιχούν στην έκφραση των αποαδενυλασών στον παθολογικό ιστό σε σχέση με την αντίστοιχη επί του φυσιολογικού ιστού (fold change).



Σχήμα 7. Διάμεσος της έκφρασης αποαδενυλασών για τα δείγματα μικροκυτταρικού καρκίνου

Στα Σχήματα 5 και 7 απεικονίζονται συγκριτικά, οι μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των αποαδενυλασών στους δύο τύπους καρκίνου του πνεύμονα.(μέσω των διάμεσων της έκφρασης των αποαδενυλασών)

Παρατηρείται ότι η PARN παρουσιάζει αυξημένη έκφραση έως και 2 φορές στα παθολογικά δείγματα ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνο, ενώ υπερεκφράζεται στο πλακώδες καρκίνωμα. Επίσης, και στους 2 τύπους καρκίνου τα επίπεδα έκφρασης της CNOT6 εμφανίζονται ασθενώς αυξημένα, ενώ παρατηρείται και αύξηση της έκφρασης της CNOT7. Τέλος, παρατηρείται υπερέκφραση της NOC στο πλακώδες, και αμελητέα αλλαγή της έκφρασής της στο μικροκυτταρικό καρκίνο.

Η σύγκριση των αλλαγών μεταξύ των δύο ειδών καρκίνου (λευχαιμιών και πνεύμονα) αποκαλύπτει ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις. Τα επίπεδα των PARN και CNOT6 μεταβάλλονται με τον ίδιο τρόπο στα δύο είδη, αφού και στις λευχαιμίες έχει παρατηρηθεί αύξηση της έκφρασης των αποαδενυλασών PARN και CNOT6. Αντιθέτως, η CNOT7, ενώ αυξάνεται στον καρκίνο του πνεύμονα, μειώνεται στις οξείες λευχαιμίες.

Οι παρατηρήσεις αυτές μπορεί να είναι ένδειξη πως συγκεκριμένες αποαδενυλάσες ελέγχουν συγκεκριμένα μονοπάτια ή κυτταρικές διεργασίες. Πρέπει να σημειωθεί πως πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι σε κύτταρα προέλευσης από καρκίνο του μαστού, οι αποαδενυλάσες CNOT6 και CNOT6L συμμετέχουν σε διεργασίες γήρανσης και κυτταρικού θανάτου, επιπλέον οι CNOT7 και CNOT8 συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (69). Επί πρόσθετα, παρατηρήθηκε πως η PARN ελέγχει συγκεκριμένη ομάδα γονιδίων που εμπλέκονται στην κινητικότητα κυττάρων μυοβλαστών ποντικών (70). Συνεπώς, εάν οι αποαδενυλάσες ελέγχουν συγκεκριμένα μονοπάτια, μια άλλη ενδιαφέρουσα προοπτική είναι η πιθανότητα οι αποαδενυλάσες να λειτουργούν αλληλοεπικαλυπτόμενα. Συγκεκριμένα, σε περίπτωση που τα επίπεδα μιας αποαδενυλάσης μειώνονται, η δράση της να αντικαθιστάται από μια άλλη ώστε να εξασφαλίζεται η αποικοδόμηση των mRNAs. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αποαδενυλάση CNOT7 που αντικαθιστά τη δράση της CNOT6L (71) Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται και έχουν δρομολογηθεί για να προσεγγισθούν αυτά τα ερωτήματα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι παρόλο που και στους δύο τύπους καρκίνου παρατηρείται ότι στην πλειοψηφία τους οι αποαδενυλάσες (κατά μέσο όρο) υπερεκφράζονται, εντούτοις αυτό δεν αποτελεί γενικό κανόνα, γιατί υπάρχει και ένας αριθμός παθολογικών δειγμάτων όπου αυτές υποεκφράζονται. Μια πιθανή εξήγηση σε μοριακό επίπεδο θα ήταν ότι mRNAs ογκογονιδίων να έχουν μειωμένη αποικοδόμηση αφενός λόγω χαμηλών επιπέδων ή δυσλειτουργίας των αποαδενυλασών που θα τα στόχευαν. Αφετέρου, τα αυξημένα επίπεδα των αποαδενυλασών θα μπορούσαν να προκαλούν αυξημένη αποικοδόμηση mRNA ογκοκατασταλτικών γονιδίων και κατά συνέπεια μειωμένη σταθερότητά τους.

Επειδή η γενικότερη έρευνα βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην στατιστική ανάλυση, για την ασφαλή εκτίμηση και συσχέτιση της έκφρασης των αποαδενυλασών με τον καρκίνο του πνεύμονα πρέπει να γίνει αξιολόγηση μεγαλύτερου εύρους και αριθμού δειγμάτων.

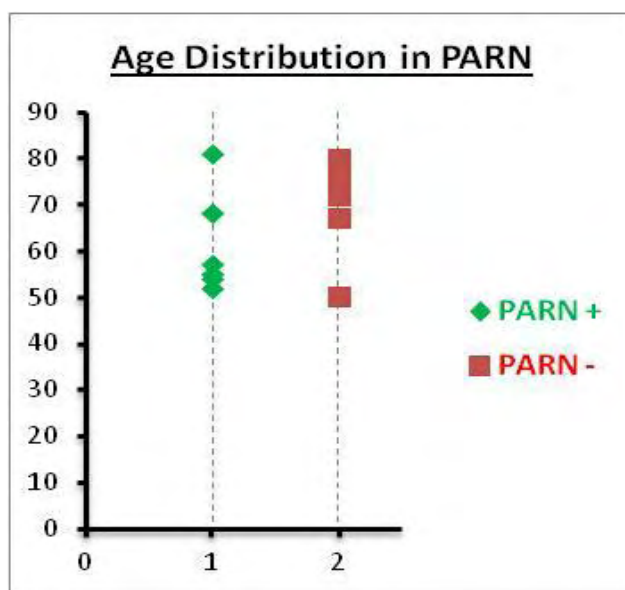
Τέλος, οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 2 κατηγορίες, σε εκείνους που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση και σε εκείνους που παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση των αποαδενυλασών PARN και CNOT6. Περιλαμβάνονται μόνο τα δείγματα που έχουν στατιστικά σημαντική αλλαγή έκφρασης αυτών των ενζύμων. Με βάση την ηλικία των ασθενών και την συχνότητα καπνίσματος, μπορούν να εξαχθούν κάποια συγκεκριμένα συμπεράσματα για την έκφραση των αποαδενυλασών. Αυτά τα συμπεράσματα προκύπτουν λόγω ύπαρξης σημαντικής στατιστικής διαφοράς των παρακάτω δειγμάτων γεγονός που δεν συμβαίνει στις υπόλοιπες αποαδενυλάσες.

### S.C.C.

**Πίνακας 12. Σχέση ασθενών ως προς την ηλικία και την συχνότητα καπνίσματος βάση της μεταβολής έκφρασης της PARN στο πλακώδες καρκίνωμα**

PARN (+)	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ	PYS	PARN (-)	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ	PYS
13	A	57	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	60	12	A	78	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	70
T002	A	54	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	80	T010	A	80	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	100
T008	A	68	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	70	T018	A	76	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	80
T016	A	81	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	100	T030	A	50	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	60
T028	A	52	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	80	T032	A	67	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	100
T035	A	55	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	100	T043	A	72	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	100
M.O.		61,2 ±11,2		82 ±16		M.O.		70,5 ±11,1	
						P <sub>value</sub>		0,178	
								0,74	

Στα συγκεντρωτικά αποτελέσματα του Πίνακας 12, παρατηρείται ότι υπάρχει υπερέκφραση της PARN σε μικρότερες ηλικίες 61,2 ( ± 11,2 ) σε αντίθεση με τις μεγαλύτερες ηλικίες 70,5 ( ± 11,1 ) που παρατηρείται υποέκφραση.

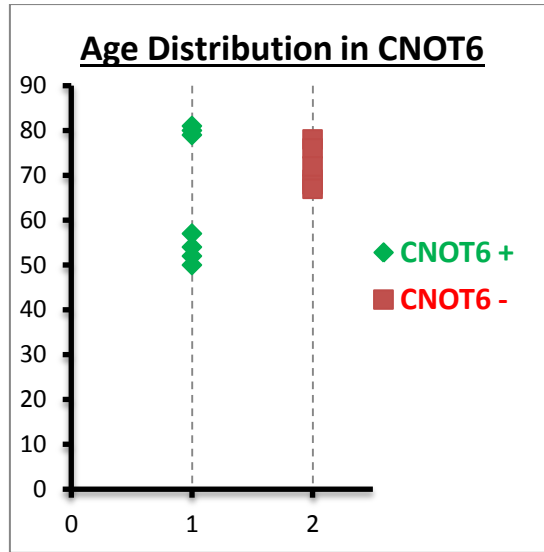


Σχήμα 8. Απεικόνιση κατανομής των ηλικιών των ασθενών που παρουσιάζουν μεταβολή έκφρασης της PARN ως προς την ηλικία

Η ίδια τάση παρατηρείται και στην CNOT6 όπου σε μικρότερες ηλικίες 64,7 ( $\pm 14,5$ ) έχει αυξημένη έκφραση σε αντίθεση με τις μεγαλύτερες ηλικίες 71,7 ( $\pm 4,5$ ) που παρατηρείται υποέκφραση της.

Πίνακας 13 . Σχέση ασθενών ως προς την ηλικία και την συχνότητα καπνίσματος βάση της μεταβολής έκφρασης της CNOT6 στο πλακώδες καρκίνωμα

CNOT6 (+)	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ	PYS	CNOT6 (-)	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ	PYS
13	A	57	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	60	12	A	78	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	70
T002	A	54	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	80	T008	A	68	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	70
T010	A	80	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	100	T018	A	76	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	80
T016	A	81	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	100	T020	A	69	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	90
T021	A	79	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	100	T032	A	67	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	100
T028	A	52	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	80	T043	A	72	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	100
T030	A	50	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	60		M.O.	71,7 $\pm$ 4,5		85 $\pm$ 14
	M.O.	64,7 $\pm$ 14,5		83 $\pm$ 18					



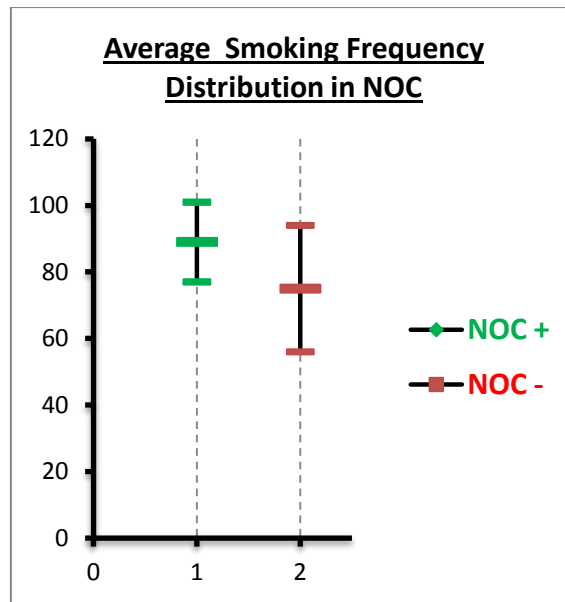
Σχήμα 9. Απεικόνιση κατανομής των ηλικιών των ασθενών που παρουσιάζουν μεταβολή έκφρασης της CNOT6 ως προς την ηλικία.

Επίσης, έγινε στατιστική ανάλυση της σχέσης ασθενών ως προς την ηλικία και την συχνότητα καπνίσματος βάσει της μεταβολής έκφρασης της NOC στο πλακώδες καρκίνωμα.

Βάση του Πίνακα 14 και του Σχήματος 10 παρατηρείται ότι υπάρχει υπερέκφραση της NOC σε μεγαλύτερες ηλικίες  $69 (\pm 12,1)$  με μεγαλύτερη συχνότητα καπνίσματος  $89 (\pm 12)$ , σε αντίθεση με τις μικρότερες ηλικίες  $62,5 (\pm 11,4)$  με μικρότερη συχνότητα καπνίσματος  $75 (\pm 19)$  όπου παρατηρείται υποέκφραση της.

Πίνακας 14. Σχέση ασθενών ως προς την ηλικία και την συχνότητα καπνίσματος βάσει της μεταβολής έκφρασης της NOC στο πλακώδες καρκίνωμα

NOC (+)	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ	PYS	NOC (-)	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ	PYS
T002	A	54	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	80	013	A	57	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	60
T008	A	68	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	70	T018	A	76	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	80
T010	A	80	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	100	T030	A	50	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	60
T016	A	81	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	100	T032	A	67	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	100
T020	A	69	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	90		<b>M.O.</b>	<b>62,5 ±11,4</b>		<b>75 ±19</b>
T021	A	79	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	100		<i>P<sub>value</sub></i>	0,404		0,26
T028	A	52	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	80					
	<b>M.O.</b>	69 ±12,1		<b>89 ±12</b>					



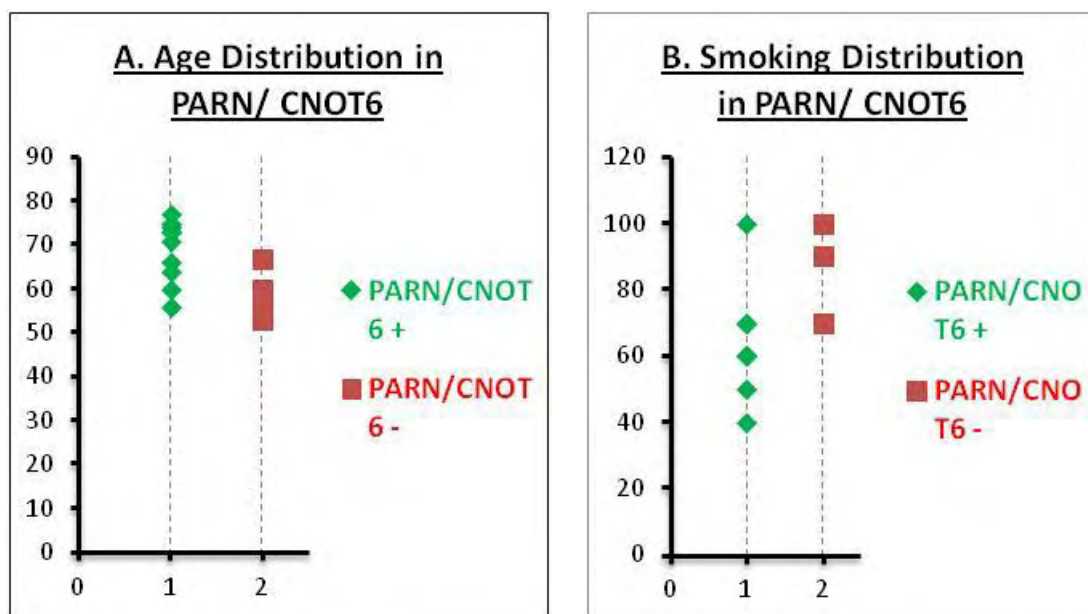
Σχήμα 10. Απεικόνιση του μέσου όρου και της τυπικής απόκλισης των PYS των ασθενών που παρουσιάζουν μεταβολή έκφρασης της NOC

### S.C.L.C.

Στη περίπτωση του μικροκυτταρικού καρκίνου παρατηρούμε ότι εάν ληφθεί υπόψη μας η συνδυαστική έκφραση των PARN και CNOT6, παρατηρείται η υπερέκφραση αυτών των δύο σε μεγαλύτερες ηλικιακές ομάδες 68,9 ( $\pm 7$ ) με μικρότερη συχνότητα καπνίσματος 64 ( $\pm 16$ ), σε αντίθεση παρατηρείται υποέκφραση σε μικρότερες ηλικίες 58,2 ( $\pm 5,6$ ) με μεγαλύτερη συχνότητα καπνίσματος 86 ( $\pm 15$ ) (Πίνακας 15).

Πίνακας 15. Σχέση ασθενών ως προς την ηλικία και την συχνότητα καπνίσματος βάση της συνδυαστικής μεταβολής έκφρασης της CNOT6 και της PARN στο μικροκυτταρικό καρκίνο

PARN/ CNOT6 (+)	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ	PYS	PARN/ CNOT6 (-)	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ	PYS
1	A	66	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	50	11	A	60	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	90
2	A	60	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	60	T009	A	67	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	100
5	A	73	ΠΡΩΗΝ ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	70	T038	A	57	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	70
22	A	56	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	40	T039	A	54	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	70
T001	A	75	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	100	T040	A	53	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	100
T004	A	74	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	60		<b>M.O.</b>	<b>58,2 ±5,6</b>		<b>86 ±15</b>
T005	Θ	64	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	70		<i>P<sub>value</sub></i>	<i>0,01</i>		<i>0,04</i>
T006	A	73	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	60					
T007	A	77	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	60					
T042	A	71	ΠΡΩΗΝ ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	70					
	<b>M.O.</b>	<b>68,9 ±7,0</b>		<b>64 ±16</b>					



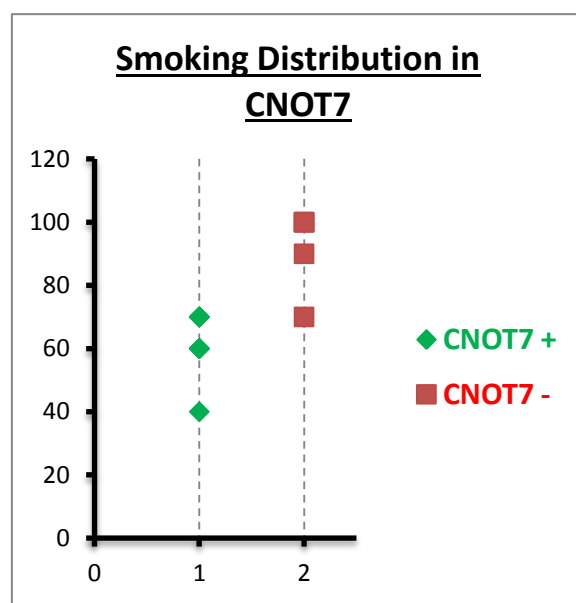
Σχήμα 11. Α) Απεικόνιση κατανομής των ηλικιών των ασθενών που παρουσιάζουν μεταβολή της συνδυαστικής έκφρασης των PARN/CNOT6 και Β) Απεικόνιση κατανομής των PYS των ασθενών που παρουσιάζουν μεταβολή της συνδυαστικής έκφρασης των PARN/CNOT6

Ανάλογο συμπέρασμα εξάγεται και για την συχνότητα καπνίσματος των ασθενών που υποεκφράζουν την CNOT7 στο SCLC με PYS=62±10 έναντι ασθενών με PYS=92±13 ( $p=0,003$ ) (Πίνακας 16). Ως προς την ηλικία δεν παρουσιάστηκαν στατικά σημαντικές διαφορές, αντιθέτως η συχνότητα καπνίσματος θα μπορούσε να συσχετισθεί με την έκφραση των αποαδενυλασών.



**Πίνακας 16. Σχέση ασθενών ως προς την ηλικία και την συχνότητα καπνίσματος βάση της μεταβολής έκφρασης της CNOT7 στο μικροκυτταρικό καρκίνο**

CNOT7(+)	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ	PYS	CNOT7(-)	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ	PYS
2	A	60	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	60	11	A	60	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	90
5	A	73	ΠΡΩΗΝ ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	70	T001	A	75	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	100
22	A	56	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	40	T009	A	67	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	100
T004	A	74	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	60	T038	A	57	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	70
T005	Θ	64	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	70	T040	A	53	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	100
T006	A	73	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	60		<b>M.O.</b>	<b>62,4±8,7</b>		<b>92 ±13</b>
T007	A	77	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	60		<i>P<sub>value</sub></i>	<i>0,379</i>		<i>0,0029</i>
T039	A	54	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	70					
T042	A	71	ΠΡΩΗΝ ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	70					
	<b>M.O.</b>	<b>66,9±8,6</b>		<b>62±10</b>					



**Σχήμα 11 Απεικόνιση κατανομής των PYS των ασθενών που παρουσιάζουν μεταβολή της έκφρασης της CNOT7**

Κατά συνέπεια ανοίγονται νέες προοπτικές στο ρόλο των αποαδενυλασών στον καρκίνο του πνεύμονα και των διαφόρων ειδών του γενικότερα. Για την καλύτερη κατανόηση του ρόλου τους στο σύνολό του, απαιτείται η επέκταση της μελέτης και στις υπόλοιπες αποαδενυλάσες καθώς και παραγόντων που εμπλέκονται στη ρύθμιση τόσο των μονοπατιών, όσο και της γονιδιακής έκφρασης. Σε αυτή την τελευταία

κατεύθυνση, η μελέτη τους στο επίπεδο των microRNAs σε σχέση με την αποαδενυλίωση αναμένεται να είναι ιδιαίτερα αποκαλυπτική.

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας δείχνουν, πως η έκφραση των αποαδενυλασών αλλάζει στον καρκίνο του πνεύμονα. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι σημαντικές γιατί μπορεί να σχετίζονται άμεσα με τις αλλαγές που έγιναν στην έκφραση άλλων κρίσιμων παραγόντων, όπως ογκογονιδίων και βιοδεικτών στον καρκίνο του πνεύμονα. Εν κατακλείδι, η παρούσα έρευνα, σε συνδυασμό με τις προηγούμενες, μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι αποαδενυλάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου. Ακόμη, βάση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων και περισσότερων δεδομένων για τις ημέρες επιβιώσεις των ασθενών και στους 2 τύπους καρκίνου του πνεύμονα, μπορούν να γίνουν περαιτέρω έρευνες. Θα μπορούσαν, λοιπόν, τα ένζυμα αυτά να εξετασθούν περαιτέρω για να χρησιμοποιηθούν ως βοηθητικοί βιοδείκτες, ή ακόμη και για την παρακολούθηση της εξέλιξης των θεραπευτικών σχημάτων.

## 4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Laura Boyero, Abel Sánchez-Palencia, M<sup>a</sup> Teresa Miranda-León et al.** Survival, Classifications and Desmosomal Plaque Genes. *International Journal of Medical Sciences*. 10 07 2013, σσ. 1166-1173.
2. **Hamilton W, Sharp D.** *Diagnosis of lung cancer in primary care*. 2004.
3. **Robbins S.L., Kumar V., Cotran R.S, 7th Edition, W.B. Saunders Company.**, Basic Pathology. 2002, σ. ch:13.
4. **Beckles MA, Spiro SG, Colice GL, Rudd RM.** *Initial evaluation of the patient with lung cancer*. 2003.
5. **R. Geetha Ramani, Shomona Gracia Jacob.** Improved Classification of Lung Cancer Tumors Based on Structural and Physicochemical Properties of Proteins Using Data Mining Models. 7 March 2013.
6. **Alberg AJ, Samet JM.** Epidemiology of lung cancer. 2003, σσ. 215-495.
7. **Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE.** Lung cancer: diagnosis and. 2007, σσ. 56-63.
8. **Roy S. Herbst, John V. Heymach and Scott M. Lippman.** Molecular Origins of Cancer-Lung Cancer. *The new england journal of medicine*. 2008, σσ. 1367-80.
9. **Byrd RB, Carr DT, et al.** Radiological abnormalities in carcinoma of the lung as related to histological cell type. 2000, σσ. 573-575.
10. **Carr DT, Holoye P.** *Bronchogenic Carcinoma*. 2000.
11. **Sekido Y., Fong K.M. and Minna, J.D.** Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. 1998, σσ. 21-59.
12. **Kleihues, Stewart and.** World cancer report. 2003, σσ. 183-87.
13. **Shields.** 2001.
14. **Park BJ, Altorki NK.** *Diagnosis and management of early lung cancer*. 2002. σσ. 76-457.
15. **Julie Leclerc, Elisabeth Courcot-Ngoubo Ngangue et al.** Xenobiotic metabolism and disposition in human lung: Transcript profiling in non-tumoral and tumoral tissues. *Biochimie*. 2011, Τόμ. 1012e1027.
16. **Sasho, Panov.** Molecular biology of the lung cancer. 2005, σσ. 197-210.
17. **Bowman R., Yang I., Semmler A. and Fong K.** Epigenetics of lung cancer, *Respirology*. 2006, σσ. 355–365.

18. **Kushlinsky NE, Lyubimova , Lemeshko.** *CYFRA 21-1 and Neuron Specific Enolase as markers of lung cancer.* In *2nd international congress on lung cance.* 1996.
19. *neuron-specific enolase: a marker for disease extent and response to therapy of small-cell lung cancer.* **Carney D.N., Marangos P.J., Ihde D.C., Bunn P.A. Jr, Cohen M.H., Minna J.D., Gazdar A.F.** 1982, σσ. 583-5.
20. **Jin B., Zhao L., Zhou C., Honghua Jie.** The prognostic value of serum neuron specific enolase detection in small cell lung cance. 2001, σσ. 722-4.
21. **Miyake Y., Kodama T., Yamaguchi K.** Pro-gastrin-releasing peptide (31-98) is a specific tumor marker in patients with small cell lung carcinoma, *Cancer Res.* 1994, σσ. 2136-40.
22. **Petra Stieber, Rudolf Hatz et al.** National Academy of Clinical Biochemistry Guidelines for the Use of Tumor Markers in Lung Cancer. *NACB.* 2004.
23. *Measurments of CEA in patients with bronchogenic carcinoma,* *Cancer,.* **Dent P.B., McCulloch P.B., Wesley-James O., MacLaren R., Muirhead W., Dunnett C.W.,.** 1978, σσ. 1484-1491.
24. *Serum CEA, CA125, and SCC antigens and tumor recurrence in resectable non-small cell lung cancer.* **Diez M., Gomez A., Hernando F., Ortega M.D., Maestro M.L., Torres A., Mugüerza J.M., Gutierrez A., Granell J., Balibrea J.L.,.** 1995, σσ. 105-10.
25. *CYFRA 21-1 in the follow-up of inoperable non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy,* *Anticancer Re.s.* **Muley, Ebert W. and.** 1999, σσ. 2669-72.
26. *Evaluation of SCC Antigen as a new marker for lung cancer,* *Cancer.* **Body J.J., Sculier J.P., Raymakers N.,.** 1986, σσ. 1552-155.
27. **Kim W.C. and Lee C.H.** The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer. *Bioch. et Bioph. Acta.* 2009, Τόμ. 99-113.
28. **Audic Y. and Hartley R.** Post-transcriptional regulation in cancer. *Biology of the Cell.* 2004, σσ. 479–498.
29. **Bruce Alberts, Lewis J et al.** *Cell biology.*
30. **Edwalds-Gilbert et al, Edwalds-Gilbert G, Veraldi KL, Milcarek C.** Alternative poly(A) site selection in complex transcription units. 1997, σσ. 2547-2561.
31. **Lewin.** *Genes VIII.* s.l. : Pearson Education, 2004.

32. **Yuri V. Svitkin, Akiko Yanagiya, Alexey E. Karetnikov et al.** Control of Translation and miRNA-Dependent Repression by a Novel Poly(A) Binding Protein, hnRNP-Q. *Plos.* 21 05 2013.
33. **Eric Huntzinger, Duygu Kuzuog, lu-O ztu" rk, Joerg E. Braun, Ana Eulalio, Lara Wohlbold.** The interactions of GW182 proteins with PABP and deadenylases are required for both translational repression and degradation of miRNA targets. 2012.
34. **Tian, Yan J et al.** 2005.
35. **Paker, Beelman C.A. and.** Degradation of mRNA in eukaryotes, *Cell.* 1995, σσ. 179–183.
36. **Shyu, Chyi-Ying A. Chen and Ann-Bin.** Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 12 04 2013, σσ. 167–183.
37. **Houseley J., LaCava J. and Tollervey D.** RNA-quality control by the exosome. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 7;. 2006, σσ. 529–539.
38. **Liu, H., Rodgers, N. D., Jiao, X. and Kiledjian, M.,.** The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is amember of the HIT family of pyrophosphatases, *EMBO J*, 21;. 2002, σσ. 4699–4708.
39. **He F., Li X., Spatrack P., Casillo R., Dong S., Jacobson A.** Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. *Mol. Cell.* 2003, σσ. 1439–1452.
40. **Houalla R., Devaux F., Fatica A., Kufel J., Barrass D., Torchet C., Tollervey D.,** Microarray detection of novel nuclear RNA substrates for the exosome, *Yeast.* 2006 , σσ. 439–454.
41. **Cheadle C., Fan J., Cho-Chung Y.S., Werner T., Ray J., Do L., Gorospe M., Becker K.G.** Control of gene expression during T cell activation: alternate regulation of mRNA transcription and mRNA stability. *BMC Genomics.* 2005, σ. 75.
42. **Garneau N. L., Wilusz J. and Wilusz C. J.** The highways and byways of mRNA decay, . *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*,. 2007, Τόμ. 8: 113–126.
43. **L.E. Maquat, J. Hwang, H. Sato, and Y. Tang.** CBP80-Promoted mRNP Rearrangements during the Pioneer Round of Translation, Nonsense-Mediated mRNA Decay, and Thereafter. *NIH Public Access.* 2010, σσ. 127–134.
44. **Ahn S, Kim J, Hwang J.** CK2-mediated TEL2 phosphorylation augments nonsense-mediated mRNA decay (NMD) by increase of SMG1 stability. *Elsevier.* 11 2013, σσ. 1047-55.
45. **Van Hoof A., Frischmeyer P.A., Dietz H.C. and Parker R.** Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science.* 2002, σσ. 295: 2262–2264.

46. **Saito S, Hosoda N, Hoshino S.** The Hbs1-Dom34 Protein Complex Functions in Non-stop mRNA Decay in Mammalian Cells. *J.Biol.Chem.* 14 06 2013, σσ. 288(24):17832-43.
47. **Aiba, Inada T. and.** Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3'-UTR is repressed after initiation in yeast. *EMBO J.* 2005, σσ. 24; 1584–1595.
48. **Frischmeyer P.A., Van Hoof A., O'Donnell K., Guerrerio A.L., Parker R. and Dietz H.C.** An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science.* 2002, σσ. 295: 2258–2261.
49. **Doma M.K, Parker R.** Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature.*, 2006, σσ. 440; 561–564.
50. **Harigaya Y, Parker R.** No-go decay: a quality control mechanism for RNA in translation. *Wiley Interdiscip Rev.* 2010, σσ. 132-41.
51. **Xu N., Chen C. and Shyu A.** Modulation of the Fate of Cytoplasmic mRNA by AU-Rich Elements: Key Sequence Features Controlling mRNA Deadenylation and Decay, *Molecular and Cellular Biology.* 1997, σσ. 4611–4621.
52. **Aaron C. Goldstrohm, Brad A. Hook and Marvin Wickens.** Regulated Deadenylation In Vitro. *Methods in Enzymology.*, 2008, σσ. ch5 :0076-6879.
53. **Wickens, Goldstrohm A.C.** Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nat. Rev.* 2008, σσ. 9: 337–344.
54. **Piao Zhang X., Wu L., Belasco J.G.** CCR4-NOT Deadenylation mRNA Associated with RNA-Induced Silencing Complexes in Human Cells. *Mol. Cell Biol.* 2010, σσ. 1486-1494.
55. **Goldstrohm A.C., Hook B.A., Seay D.J. and Wickens, M.** PUF proteins bind Pop2p to regulate messenger RNAs, *Nature Struct. Mol. Biol.* 2006, σσ. 13: 533–539.
56. **Ezzeddine N, Chen CY, Shyu AB.** 26. Evidence providing new insights into TOB-promoted deadenylation and supporting a link between TOB's deadenylation-enhancing and anti-proliferative activities., *Mol. Cell Biol.*, . 2012, σσ. 32(6):1089-98.
57. **Uchida N., Hoshino S., Katada T.** Identification of a human cytoplasmic poly(A) nuclease complex stimulated by poly(A)-binding protein. *J Biol Chem.* 2004, σσ. 279:1383–1391.
58. **Yamashita A., Chang T.C., Yamashita Y., Zhu W., Zhong Z., Chen C.Y., Shyu A.B.** Concerted action of poly(A)nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nature Struct. Mol. Biol.* 2005, σσ. 12:1054–1063.
59. **Eulalio A., Behm-Ansmant I. and Izaurralde E.** P bodies: at the crossroads of posttranscriptional pathways. *Mol. Biol. Cell.* 2007, σσ. 8: 9–22.

60. **Conrad N.K., Shu M.D., Uyhazi K.E., Steitz J.A.** Mutational analysis of a viral RNA element that counteracts rapid RNA decay by interaction with the polyadenylate tail. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007, σσ. 104: 10412–10417.
61. **Gorgoni B. and Gray N.K.** The roles of cytoplasmic poly(A)-binding proteins in regulating gene expression: A developmental perspective, *Brief Funct. Genomic Proteomic.* . Aug 2004, σσ. 125-41.
62. **Tucker M., Staples R.R., Valencia-Sanchez M.A., Muhrad D., Parker R.,** Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadeny-lase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 2002, σσ. 21; 1427–1436.
63. **N.A.Balatsos, P.Maragozidis et al.** Modulation of Poly (A)-Specific Ribonuclease (PARN): Current Knowledge and Perspectives. *Bentham Science.* 2012.
64. **Yi X., Hong M., Gui B., Chen Z., Li L., Xie G., Liang J., Wang X., Shang Y.** RNA Processing and Modification Protein, Carbon Catabolite Repression 4 (Ccr4), Arrests the Cell Cycle through p21 dependent and p53-independent Pathway. *J. Biol. Chem.* 2012, σσ. 15;287(25):21045-57.
65. **C.H, Kim W.C. and Lee.** The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer. *Bioch. et Bioph. Acta,* . 2009, Τόμ. 99-113.
66. **Maragozidis P, Balatsos N et al.** Alterations of Deadenylases Expression in Acute Leukemias: Evidence for Poly (A)-specific Ribonuclease as a Potential Biomarker. *Acta Haematol.* 2012, σσ. 128:39-46.
67. **Ειρήνη, Παπαναστάση.** *Ένζυμα αποικοδόμησης RNA ως νέοι μοριακοί δείκτες καρκίνου.* 2012.
68. **Αθηνά, Τοτόμη.** *Ένζυμα μεταβολισμού RNA ως μοριακοί δείκτες καρκίνου.* Λαρίσα : s.n., 2011.
69. **Mittal S., Aslam A., Doidge R, Medica R., and Winkler G.S.** The Ccr4a (CNOT6) and Ccr4b (CNOT6L) deadenylase subunits of the human Ccr4–Not complex contribute to the prevention of cell death and senescence. *Mol. Biol. Cell.* 2011, Τόμ. 22: 748.
70. **Lee J.E., Lee J.Y., Trembly J, Wilusz J., Tian B., Wilusz C.J.** The PARN Deadenylase Targets a Discrete Set of mRNAs for Decay and Regulates Cell Motility in Mouse Myoblasts. *PLOS Genetics.* 2012, Τόμ. 8: e1002901.
71. **Aslam A., Mittal S., Koch F., Andrau J. and Winkler G.S.** 3.The Ccr4–Not Deadenylase Subunits CNOT7 and CNOT8 Have Overlapping Roles and Modulate Cell Proliferation, *Molecular Biology of the Cell.* 2009, Τόμ. 20: 3840–3850. .