



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

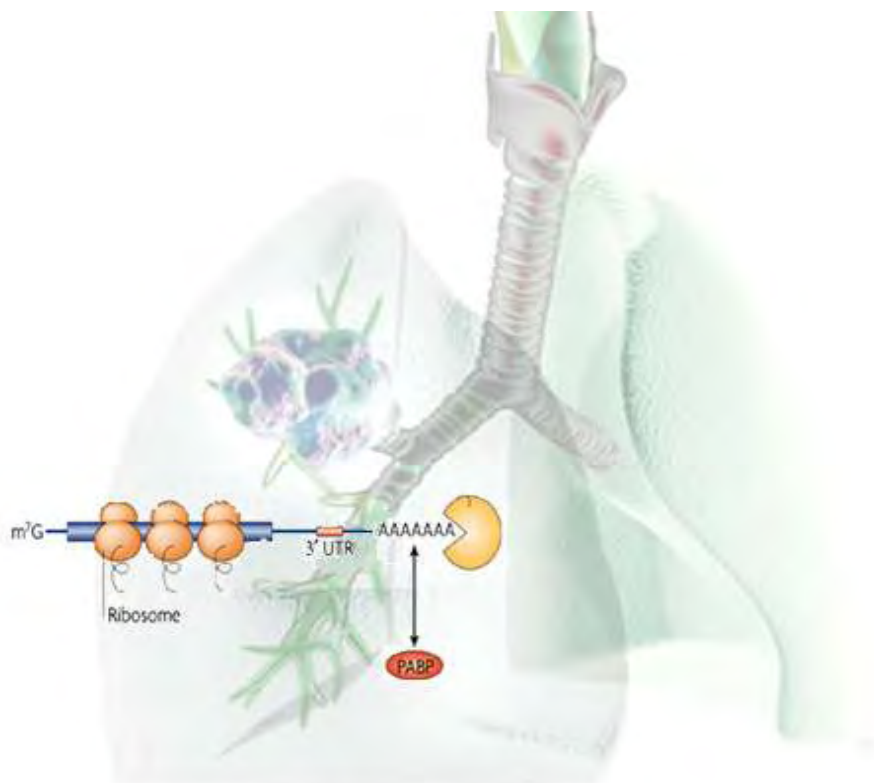
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

“ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ”

Τοτόμη Γ. Αθηνά

Ένζυμα μεταβολισμού RNA ως μοριακοί δείκτες καρκίνου



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

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

- Νικόλαος Μπαλατσός, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, (Υπεύθυνος διπλωματική εργασίας)
- Γουργουλιάνης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Πνευμονολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Ν. Μπαλατσό για την ανάθεση αυτής της εργασίας καθώς και για τις συμβουλές που μου προσέφερε σε επιστημονικό και διδακτικό επίπεδο. Επίσης οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον υποψήφιο Διδάκτορα Μαραγκοζίδη Παναγιώτη για την επιστημονική καθοδήγηση, την αμέριστη βοήθεια και συμπαράσταση κατά την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας μου καθώς και για την άψογη συνεργασία μας. Εκφράζω τις ευχαριστίες μου στον κύριο Γουργουλιάνη Κωνσταντίνο, Καθηγητή Πνευμονολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στις κυρίες Θεοδώρα Κερενίδη και Ειρήνη Τσιλιώνη για την διάθεση των δειγμάτων καθώς και στους διδακτορικούς φοιτητές του εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας (Παν/κό Νοσοκομείο Λάρισας). Τέλος ευχαριστώ θερμά τη μεταπτυχιακή συμφοιτήτρια και φίλη Δήμητρα Χατζηλεοντιάδου, την διδάσκουσα ΠΔ 407/80 Σταματίνα Γιαννούλη καθώς και όλους τους διαδικτορικούς, μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο 1: Καρκίνος του πνεύμονα

- 1.1 Βιολογία του καρκίνου [4]
- 1.2 Καρκίνος του πνεύμονα – Ιστολογικοί τύποι – Σταδιοποίηση [5]
- 1.3 Αιτιοπαθογένεια καρκίνου του πνεύμονα [8]
- 1.4 Μοριακή βιολογία καρκίνου του πνεύμονα [8]

Κεφάλαιο 2: Ένζυμα μεταβολισμού ως μοριακοί δείκτες καρκίνου

- 2.1.1 Καρκινικοί δείκτες [10]
- 2.1.2 Η σημασία της αξιολόγησης των καρκινικών δεικτών στην κλινική πράξη [10]
- 2.1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των καρκινικών δεικτών στα βιολογικά υγρά [11]
- 2.1.4 Χρησιμοποιούμενοι καρκινικοί δείκτες στον καρκίνο του πνεύμονα [12]
- 2.2 Σταθερότητα mRNA [14]
 - 2.2.1 Ωρίμανση του mRNA [14]
 - 2.2.2 Μονοπάτια αποικοδόμησης του mRNA [15]
- 2.3 Αποαδενυλάσες. Κατάταξη, βιολογικές λειτουργίες και έλεγχος της δραστηριότητάς τους [18]
- 2.4 Ο ρόλος των ριβονουκλεασών στον καρκίνο [19]

Μέρος Β' – Ερευνητικό Μέρος

- 1. Σκοπός [22]
- 2. Υλικά και Μέθοδοι [23]
 - 2.1 Υλικά [23]
 - 2.2 Μέθοδοι [26]
 - 2.2.1 Απομόνωση ολικού RNA [26]
 - 2.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου δύο βημάτων (qRT-PCR) [26]
 - 2.3 Εκκινητές [29]
- 3. Αποτελέσματα [33]
 - 3.1 Επίπεδα έκφρασης mRNA αποαδενυλασών και γονιδίων που σχετίζονται με καρκίνο του πνεύμονα σε ασθενείς με Μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (S.C.L.C) με quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) [33]
 - 3.2 Επίπεδα έκφρασης mRNA αποαδενυλασών και γονιδίων που σχετίζονται με καρκίνο του

πνεύμονα σε ασθενείς με μη - Μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, N.S.C.L.C με quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) [34]

3.3 Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης αποαδενυλασών και γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα μεταξύ των δύο βασικών τύπων καρκίνου του πνεύμονα (S.C.L.C και N.S.C.L.C) [36]

4. Συζήτηση [38]

Βιβλιογραφία [41]

ΜΕΡΟΣ Α'

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Καρκίνος του πνεύμονα

1.1. Βιολογία του καρκίνου

Η αναπαραγωγή των ευκαρυωτικών κυττάρων απαιτεί ακριβείς ρυθμιστικούς μηχανισμούς. Οι μηχανισμοί αυτοί είναι αρκετά περίπλοκοι και αφορούν μία οργανωμένη σειρά γεγονότων που ονομάζεται κυτταρικός κύκλος. Ο κυτταρικός κύκλος διακρίνεται σε τέσσερις φάσεις:

Φάση G1: κατά την οποία το κύτταρο υφίσταται πολύπλοκες βιοχημικές διαδικασίες που το προετοιμάζουν για την είσοδό του στην επόμενη φάση της σύνθεσης του θυγατρικού του DNA.

Φάση S (synthesis): στη διάρκεια της οποίας πραγματοποιείται η αντιγραφή του πυρηνικού DNA και συνεπώς ο διπλασιασμός της γενετικής πληροφορίας.

Φάση G2: κατά την οποία το κύτταρο προετοιμάζεται για την είσοδό του στην μίτωση

Φάση M (mitosis): το διπλασιαζόμενο DNA διαχωριζόμενο με ακρίβεια σε δύο ίσα μέρη συμπυκνώνεται σχηματίζοντας χρωμοσώματα ώστε καθένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα, να διαθέτει πλήρες αντίγραφο του γενετικού υλικού του μητρικού κυττάρου.

Επιπλέον το κύτταρο μπορεί να μεταβεί από τη φάση G1 στη φάση G0 (φάση ηρεμίας), ανάλογα με τις συνθήκες και τις ανάγκες του οργάνου, του ιστού ή του οργανισμού. Η επιλογή της εισόδου του κυττάρου στη φάση G0 αντί της G1 καθορίζεται από ποικίλα εξωτερικά ερεθίσματα (επάρκεια ή έλλειψη εξωγενών μιτογόνων, αυξητικών ή άλλων παραγόντων). Ανά πάσα στιγμή με την επίδραση των εξωτερικών ερεθισμάτων το κύτταρο μεταβαίνει από τη φάση ηρεμίας G0 στη φάση G1 όπου προετοιμάζεται για την είσοδό του στη διαίρεση.

Τα γεγονότα του κυτταρικού κύκλου είναι συντονισμένα ώστε να συμβαίνουν με μια καθορισμένη σειρά και έναν ακριβή χρονικό προσδιορισμό, και γι' αυτό απαιτούν την παρουσία μηχανισμών που ελέγχουν τη σωστή πραγματοποίησή τους. Ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου διεκπεραιώνεται σε δύο σημεία, με ανασταλτικό ή διεγερτικό αποτέλεσμα για την εξέλιξή του. α) το σημείο R (restriction point) στο τέλος της φάσης G1 όπου το κύτταρο είτε ολοκληρώνει τον κυτταρικό κύκλο αύξησης και διαίρεσης, ή παραμένει στη φάση G1 και πιθανόν προχωρεί στη φάση ηρεμίας

G0 β) στο τέλος της G2 φάσης όπου λαμβάνεται η απόφαση για είσοδο στη φάση S και μιτωτική διαίρεση του κυττάρου. Φαίνεται πως για τα περισσότερα διπλοϊδικά κύτταρα το σημείο R είναι το σημαντικότερο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου ενώ το σημείο G2/M είναι μικρότερης σημασίας: τα κύτταρα που θα περάσουν τη φάση G1 και θα μπουν στη φάση S, θα ακολουθήσουν τη φάση G2 και τελικά θα διαιρεθούν. Χαρακτηριστικό του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων είναι η ανεξαρτητοποίησή τους από εξωκυττάριους μιτογόνους παράγοντες. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους. Μερικοί όγκοι παράγουν οι ίδιοι αυξητικούς παράγοντες, δημιουργώντας έναν συνεχή αυτοκρινή κύκλο. Σε μερικούς καρκίνους παρατηρείται υπερέκφραση των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων, οπότε το κύτταρο αποκτά ευαισθησία σε συγκεντρώσεις αυξητικών παραγόντων που φυσιολογικά δε θα οδηγούσαν σε μίτωση. Σε ακραίες καταστάσεις, τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και απουσία αυξητικών παραγόντων. Αυτό μπορεί να συμβεί λόγω μεταλλάξεων των αντίστοιχων γονιδίων, με αποτέλεσμα οι υποδοχείς να μετατρέπονται σε ιδιοσυστατικά ενεργά μόρια, εκπέμποντας μιτογόνα σήματα απουσία αυξητικού παράγοντα.

Πολλές μεταλλάξεις αφορούν γονίδια τα οποία κωδικεύουν μόρια που συμμετέχουν στη μεταγωγή του μιτογόνου ερεθίσματος από την επιφάνεια του κυττάρου στον πυρήνα του. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η πρωτεΐνη Ras, που στη μεταλλαγμένη μορφή είναι σε θέση να μεταδίδει μιτογόνα σήματα χωρίς να λαμβάνει εντολές από μόρια που φυσιολογικά προηγούνται στην εντολοδόχο αλυσίδα. Μεταλλάξεις σε γονίδια μεταγραφικών παραγόντων, που καθιστούν τις ογκοπρωτεΐνες ανεξέλεγκτα ενεργείς, παρατηρούνται σε πολλούς τύπους καρκίνων. Η έλλειψη κατασταλτικών εντολών για τη κυτταροδιαίρεση ή η άρση της ευαισθησίας των κυττάρων στα κατασταλτικά μηνύματα είναι μία ακόμη αιτία της ανεξέλεγκτης κυτταροδιαίρεσης. (*Κλινική Ογκολογία, Τόμος Α', 2007 - Alberts, 1998 - Sandaltzopoulos, R. Xatzaki, Aik, 2004*)

1.2 Καρκίνος του πνεύμονα – Ιστολογικοί τύποι - Σταδιοποίηση

Ο καρκίνος του πνεύμονα προκαλείται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό μη φυσιολογικών κυττάρων στον έναν ή και στους δύο πνεύμονες. Αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες και την τρίτη στις γυναίκες (μετά τον καρκίνο του μαστού και τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας).

Σύμφωνα με την ιστοπαθολογική ταξινόμηση (WHO, 1997), ο καρκίνος του πνεύμονα ταξινομείται σε δύο κύριους τύπους, που περιλαμβάνουν ποσοστό μεγαλύτερο από το 90% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα και περιγράφονται με βάση τα βιολογικά και κλινικά τους χαρακτηριστικά. Οι δύο αυτοί τύποι είναι ο μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα (Small Cell Lung

Cancer, SCLC), και ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα (Non Small Cell Lung Cancer, NSCLC). Ωστόσο υπάρχουν περιπτώσεις όπου ο καρκίνος του πνεύμονα εμφανίζει χαρακτηριστικά τόσο του SCLC όσο και του NSCLC, και ονομάζεται «Συνδυασμένος μικροκυτταρικός/μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα». (Πατακάς 2006)

Μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα: αντιπροσωπεύει το 20-25% όλων των περιπτώσεων του καρκίνου του πνεύμονα και έχει δυσμενή πρόγνωση. Αναπτύσσεται ενδοβρογχικώς, προκαλώντας συνήθως συγκεντρική στένωση του αυλού του βρόγχου και μεθίσταται ταχύτατα στους πυλαίους λεμφαδένες. Αιματογενείς μεταστάσεις αναπτύσσονται ταχύτατα σε σημείο ώστε κατά τη στιγμή της διάγνωσης η νόσος να έχει εξαπλωθεί σε πολλά όργανα. Τα καρκινικά κύτταρα του SCLC είναι μικρά σε μέγεθος ενώ το σχήμα τους μπορεί να είναι είτε πολυπλευρικό είτε ατρακτοειδές. Ο κύριος παράγοντας που οδηγεί στην εμφάνιση μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα είναι το κάπνισμα.

Μη-μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα: αντιπροσωπεύει το 75-80% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα και υποδιαιρείται σε τρεις επιμέρους ομάδες με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά η καθεμία.

1. Ακανθοκυτταρικός ή επιδερμοειδής καρκίνος (squamous cell carcinoma): είναι ο συχνότερος βρογχογενής καρκίνος και αποτελεί το 30% όλων των περιπτώσεων του καρκίνου του πνεύμονα. Ιστολογικώς χαρακτηρίζεται από επιδερμοειδή κύτταρα που παρουσιάζουν ενδοκυτταρικές γέφυρες. Τα κύτταρα αυτά αναπτύσσονται κατά στρώματα και σχηματίζουν «φωλιές» με κερατινοποιημένες εστίες. Ο ακανθοκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα αναπτύσσεται ενδοβρογχικώς και προκαλεί απόφραξη του βρόγχου και ατελεκτασία.

2. Αδενοκαρκίνωμα (adenocarcinoma): αποτελεί το 35% των καρκίνων, ενώ η συχνότητά του αυξάνει. Αναπτύσσεται στην περιφέρεια του πνεύμονα και συχνά προσβάλλει τον υπεζωκότα. Ιστολογικώς αποτελείται από κυβικά ή κυλινδρικά κύτταρα, τα οποία σχηματίζουν αδενικούς σχηματισμούς που περιβάλλονται από υπόστρωμα συνδετικού ιστού. Προκαλεί συχνά λεμφογενείς και αιματογενείς μεταστάσεις, πριν ακόμη η αρχική εντόπιση προκαλέσει συμπτώματα.

3. Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (large cell carcinoma): αποτελεί το 10% των καρκίνων του πνεύμονα και αναπτύσσεται συχνά στην περιφέρεια του πνεύμονα, όπως το αδενοκαρκίνωμα. Ιστολογικώς μοιάζει με το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα. Το νεόπλασμα αναπτύσσεται γρήγορα και μεθίσταται λεμφογενώς και αιματογενώς.

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 : Το μέγεθος των όγκων δε ξεπερνά τα 3cm και δεν διηθούν τους λεμφαδένες ή τους κύριους βρόγχους

Στάδιο II: Οι όγκοι εμφανίζουν μέγεθος μεγαλύτερο από 3cm, περιλαμβάνουν τους κύριους βρόγχους ή διηθούν τον περισπλάχνιο υπεζωκότα.

Στάδιο III : Οι όγκοι δεν έχουν συγκεκριμένο μέγεθος, διηθούν το θωρακικό τοίχωμα, το διάφραγμα, το μεσοπνευμόνιο υπεζωκότα, το περίτονο περικάρδιο και τους λεμφαδένες.

Στάδιο IV: Οι όγκοι μεθίστανται σε άλλα όργανα. (Πατακας 2006)

Πιο αναλυτική ταξινόμηση των κακοηθών όγκων γίνεται με βάση το σύστημα **TNM** που περιγράφεται στους παρακάτω πίνακες:

Σταδιοποίηση βρογχογενούς καρκίνου*

Πρωτοπαθής νεοπλασία (T)

Tx	Αν έχουν διαπιστωθεί καρκινικά κύτταρα στις βρογχοπνευμονικές εκκρίσεις χωρίς όμως να έχει γίνει ορατός ο καρκίνος στην ακτινογραφία θώρακος ή στη βρογχοσκόπηση.
T0	χωρίς σημεία πρωτοπαθούς εστίας καρκίνου
T1	καρκίνος διαστάσεων έως το πολύ 3 εκατ. και που περιβάλλεται από πνευμονικό παρέγχυμα ή παρεγχυματικό υπεζωκότα χωρίς να διηθεί κανένα κύριο βρόγχο (λοβού) από τη βρογχοσκόπηση
T2	όγκος με διαστάσεις έως το πολύ 3 εκατ. ή οποιασδήποτε διάστασης αλλά που διηθεί τον παρεγχυματικό υπεζωκότα ή έχει δημιουργήσει ατελεκτασία ή αποφρακτική πνευμονία ή όγκος που εκτείνεται προς την πνευμονική πύλη. Προϋπόθεση να διαπιστώνεται από τη βρογχοσκόπηση η επέκταση του καρκίνου σε ένα κεντρικό βρόγχο ή αυτός να απέχει το πολύ 2 εκατ. από στέρνο. Εάν έχει δε δημιουργήσει ατελεκτασία ή αποφρακτική πνευμονία, αυτές δεν θα πρέπει να καταλαμβάνουν ολόκληρο πνευμονικό λοβό.(αν ναι περνάμε στο επόμενο στάδιο)
T3	καρκίνος οποιασδήποτε διάστασης με διήθηση στο θωρακικό τοίχωμα (συμπεριλαμβάνονται και οι καρκίνοι της πνευμονικής κορυφής), ή διηθεί το διάφραγμα, τον υπεζωκότα του μεσοθωρακίου, το περικάρδιο. Δεν πρέπει να διηθεί την καρδιά, τα μεγάλα αγγεία αυτής, την τραχεία, τον οισοφάγο, ή τους σπονδύλους.(αν ναι κατατάσσεται στο επόμενο στάδιο).Εδώ στο στάδιο αυτό καταχωρούνται οι καρκίνοι που απέχουν κάτω από 2 εκατ. από το στέρνο αλλά που δεν το διηθούν.
T4	καρκίνος οποιασδήποτε διάστασης που διηθεί το μεσοθωράκιο, την καρδιά, τον οισοφάγο, τα μεγάλα αγγεία, τους σπονδύλους, το στέρνο, ή που έχει δημιουργήσει πλευριτικό υγρό που περιέχει σε κυτταρολογική εξέταση καρκινικά κύτταρα.

Προσβολή λεμφαδένων (N)

Nx	οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν είναι δυνατόν να εκτιμηθούν
N0	χωρίς μεταστάσεις σε τοπικούς λεμφαδένες
N1	με μεταστάσεις σε λεμφαδένες περιβρογχικούς, ή/και, της ομόπλευρης πνευμονικής πύλης συμπεριλαμβανομένης και της άμεσης διήθησης
N2	με μεταστάσεις σε λεμφαδένες του μεσοθωρακίου (απ'την ίδια μεριά με την εμφάνιση του καρκίνου), ή σε λεμφαδένες μεταξύ τραχείας και βρόγχων.
N3	με μεταστάσεις σε λεμφαδένες του μεσοθωρακίου ετερόπλευρα, ή της ετερόπλευρης πνευμονικής πύλης, ή σε ομόπλευρους και/ ή ετερόπλευρους λεμφαδένες υπερκλείδιους και του σκαληνού

Απομακρυσμένες μεταστάσεις (M)

M0	χωρίς μεταστάσεις σε απομακρυσμένα όργανα
M1	με παρουσία μεταστάσεων σε άλλα απομακρυσμένα όργανα

*** βάσει American Joint Committee on Cancer, 1986**

1.3 Αιτιοπαθογένεια καρκίνου του πνεύμονα

Η ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα είναι μία πολυσχιδής διαδικασία πρόκλησης γενετικών κυτταρικών βλαβών από διάφορους αιτιολογικούς παράγοντες, σημαντικότερος από τους οποίους είναι το κάπνισμα. Ο καπνός περιέχει εκατοντάδες από τις γνωστές καρκινογόνες ουσίες, μεταξύ των οποίων οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες που προκαλούν βλάβες στο DNA. Ωστόσο ένας αριθμός περιπτώσεων της νόσου μπορεί να οφείλεται σε άλλα περιβαλλοντικά αίτια που επιδρούν είτε ανεξάρτητα είτε συνεργικά με το κάπνισμα. Η επίδραση περιβαλλοντικών καρκινογόνων όπως το ραδόνιο, ο αμίαντος ή το αρσενικό είναι περισσότερο εμφανής σε εργασιακούς χώρους, όπου η υπεύθυνη ουσία βρίσκεται σε σχετικά μεγάλες συγκεντρώσεις. Εκτιμάται ότι η κακοήθης εξαλλαγή ενός φυσιολογικού κυττάρου του πνεύμονα προϋποθέτει μία πολυσταδιακή σειρά γονιδιακών μεταλλάξεων, οι οποίες συντελούν στην ενεργοποίηση ογκογονιδίων και στην απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Οι γενετικές τροποποιήσεις προκαλούν παθολογοανατομικές βλάβες. Αρχικά εμφανίζεται μεταπλασία των βρόγχων η οποία εξελίσσεται σταδιακά σε δυσπλασία, καρκίνωμα *in situ*, διηθητικό καρκίνωμα και μεταστατικό καρκίνο. Στην εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα συμβάλουν διαταραχές στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση).

1.4 Μοριακή βιολογία καρκίνου του πνεύμονα

Τα κύτταρα του καρκίνου του πνεύμονα συσσωρεύουν αρκετές μοριακές, γενετικές και επιγενετικές βλάβες, με αποτέλεσμα να αποκτούν νέες ιδιότητες, υπεύθυνες για την εξαλλαγή του φυσιολογικού βρογχικού επιθηλίου σε βρογχογενή καρκίνο. 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), λόγω της υπερέκφρασης αντιαποπτωτικών μορίων ή της χαμηλής έκφρασης προαποπτωτικών μορίων
- ✧ απεριόριστη δυνατότητα αντιγραφής, εξαιτίας της δράσης της τελομεράσης
- ✧ διατήρηση της αγγειογένεσης
- ✧ προσβολή του ιστού και μετάσταση

Οι παραπάνω μοριακές αλλαγές μπορούν να συμβούν είτε σε επίπεδο υπερέκφρασης είτε χαμηλής έκφρασης γονιδίου, ενώ είναι δυνατό να συμβάλλουν σε αυτές η πρόκληση σημειακών

μεταλλάξεων, η απώλεια ετεροζυγωτίας, χρωμοσωμικές ατυπίες που συνοδεύονται από απώλεια ή περίσσεια αλληλών, η μικροδορυφορική αστάθεια καθώς και η παρεκκλίνουσα μεθυλίωση του DNA. Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται συχνές κυτταρογενετικές και μοριακές αλλαγές στον καρκίνο του πνεύμονα. (*Panov, 2005*)

Πίνακας 1: Συχνές κυτταρογενετικές αλλαγές σε καρκίνο πνεύμονα

Γονίδια	Μικροκυτταρικός καρκίνος	Μη-μικροκυτταρικός καρκίνος
Αδρανοποίηση του FHIT	~75%	~50 - 75%
Σημειακές μεταλλάξεις του Ras	< 1%	15 - 20%
Υπερέκφραση της οικογένειας MYC	15 - 30%	5 - 10%
Υπερέκφραση του BCL-2	75 - 95%	10 - 35%
Υπερέκφραση ERB1/EGFR	~ 60%	-
Υπερέκφραση ERB2/HER/NEU	~ 20%	-
Αδρανοποίηση του p53	~ 90%	~ 50%
Αδρανοποίηση του Rb	~ 90%	~ 15-30%
Αδρανοποίηση του p16ink4	~ 0-10%	~ 30-70%
Δραστηριότητα τελομεράσης	~ 100%	~ 80 - 85%

(*Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 2004*)

Πίνακας 2: Συχνές χρωμοσωμικές ατυπίες σε καρκίνο πνεύμονα

Τροποποιήσεις	Μικροκυτταρικός καρκίνος	Μη – μικροκυτταρικός καρκίνος
Προσθήκες	3p,6q,8p,9p,9q,13q,17p, 18q,19p,21q, 22q	3p,4p,4q,5q,8p,10q,13q,17q
Ελλείψεις	1p,1q,3q,5p,7p,7q,8q,11q,12q	3q,5p,8q,19q,Xq

(*Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 2004*)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Ένζυμα μεταβολισμού ως μοριακοί δείκτες καρκίνου

2.1.1 Καρκινικοί δείκτες

Καρκινικός δείκτης (tumor marker) θεωρείται κάθε βιολογική ουσία που παράγεται και εκκρίνεται από κακοήγη κύτταρα στο αίμα ή σε άλλα βιολογικά υγρά ασθενών με καρκίνο. Ένας καρκινικός δείκτης μπορεί να μετρηθεί ποσοτικά ή να εκτιμηθεί ποιοτικά και η μέτρησή του ή η παρουσία του, μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την ύπαρξη, τη φύση, το μέγεθος, την υποτροπή και τη μεταστατική εξάπλωση μιας κακοήθους διεργασίας στον οργανισμό. Μία συνεχής αύξηση στα επίπεδα των καρκινικών δεικτών συχνά υποδηλώνει υποτροπή, μετάσταση και μικρή ανταπόκριση στη θεραπεία, ενώ μειωμένα επίπεδα υποδεικνύουν θετική ανταπόκριση στη θεραπεία και συνεπώς καλή πρόγνωση. Ωστόσο είναι δυνατόν να παρατηρηθούν μεταβολές στα επίπεδα καρκινικών δεικτών (π.χ μία πρόσκαιρη αύξηση) και σε μη κακοήθεις καταστάσεις. Οι καρκινικοί δείκτες θα πρέπει να πληρούν τα παρακάτω κριτήρια :

- Υψηλή ειδικότητα
- Υψηλή ευαισθησία
- Ειδικότητα για το όργανο
- Σχέση με το στάδιο ή τη μάζα του όγκου
- Σχέση με την πρόγνωση
- Αξιόπιστη δυνατότητα πρόβλεψης

Έχουν προταθεί και μετρώνται ως καρκινικοί δείκτες, διάφορες ουσίες όπως ορμόνες, αντιγόνα, ένζυμα, πρωτεΐνες κλπ, οι οποίες εκπληρώνουν σε πολύ μεγάλο βαθμό τις παραπάνω προϋποθέσεις (*American Cancer Society Tumor Markers, 2009*).

2.1.2 Η σημασία της αξιολόγησης των καρκινικών δεικτών στην κλινική πράξη

Η μέτρηση της συγκέντρωσης των καρκινικών δεικτών στα βιολογικά υγρά του οργανισμού συνεισφέρει στα εξής:

- ♣ Έγκαιρη διάγνωση με την πρώιμη ανεύρεση του όγκου σε αρχικά στάδια που θα οδηγήσει στην πλήρη θεραπεία του, με τον προληπτικό ή προσυμπτωματικό έλεγχο και που σκοπό έχει να ανιχνεύσει την παρουσία του όγκου σε ασυμπτωματικά, φυσιολογικά και υγιή άτομα από τον γενικό πληθυσμό ή από ομάδες υψηλού κινδύνου πριν από την εμφάνιση συμπτωμάτων.

- ✧ Διαφορική διάγνωση από άλλες παθήσεις και καλοήθεις νόσους με παρόμοια συμπτώματα, με σκοπό την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας.
- ✧ Εκτίμηση της φύσης, της παθοφυσιολογίας και του μεγέθους του όγκου.
- ✧ Πρόγνωση της σοβαρότητας και της εξέλιξης του όγκου.
- ✧ Εκτίμηση της κλινικής σταδιοποίησης και ταξινόμηση του όγκου, δηλαδή εκτίμηση της έκτασης, της εξάπλωσης και του σταδίου.
- ✧ Πρόγνωση της σοβαρότητας και της εξέλιξης της νεοπλασίας.
- ✧ Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της θεραπευτικής αγωγής που θα αντικατοπτρίζεται στη μείωση της τιμής των καρκινικών δεικτών.
- ✧ Παρακολούθηση του αποτελέσματος της θεραπείας με σκοπό την έγκαιρη ανίχνευση υποτροπής της νόσου.
- ✧ Έλεγχος μεταστάσεων προτού ακόμα εμφανιστούν τα κλινικά συμπτώματα (*American Cancer Society Tumor Markers, 2009*).

2.1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των καρκινικών δεικτών στα βιολογικά υγρά

Η παρουσία και η συγκέντρωση ενός καρκινικού δείκτη στην αιματική κυκλοφορία σε δεδομένη χρονική στιγμή εξαρτάται από:

1. το συνολικό αριθμό των κακοήθων κυττάρων, τα οποία παράγουν το συγκεκριμένο καρκινικό δείκτη καθώς και από το ρυθμό παραγωγής του δείκτη από τα κύτταρα αυτά. Οι κακοήθεις όγκοι χαρακτηρίζονται συνήθως από ετερογένεια, αποτελούμενοι από υποπληθυσμούς οι οποίοι δεν έχουν τα ίδια χαρακτηριστικά. Για τον λόγο αυτό η ανταπόκριση του κακοήθους νεοπλασματος ενός ασθενούς στη θεραπεία δεν συνοδεύεται πάντοτε από αντίστοιχη μείωση της συγκέντρωσης των καρκινικών δεικτών. Σε όλες τις περιπτώσεις εκτιμήσεως των καρκινικών δεικτών και συσχετίσεών των με την εξέλιξη της νόσου θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψη ο χρόνος ημιζωής ($t_{1/2}$) των καρκινικών δεικτών και ο χρόνος διπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων (DT). Ο χρόνος ημιζωής του καρκινικού δείκτη εξαρτάται από το μέγεθος του μορίου, τα βιοχημικά του χαρακτηριστικά, τον τρόπο μεταβολισμού του και τις μεταβολές στην έκφρασή του και είναι χαρακτηριστικός για κάθε δείκτη.
2. τον εντοπισμό του καρκινικού δείκτη στα κύτταρα. Τα αντιγόνα επιφανείας της μεμβράνης ή τα μόρια τα οποία αποτελούν προϊόντα κυτταρικής εκκρίσεως ελευθερώνονται ευκολότερα στον

εξωκυττάριο χώρο και τα βιολογικά υγρά, ενώ όσα μόρια συνδέονται με ενδοκυττάρια δομές εμφανίζονται στον ορό μόνο μετά από κυτταρική νέκρωση.

3. τη μεταβολή διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης η οποία επηρεάζει τον ρυθμό εκκρίσεως του καρκινικού δείκτη από τα κύτταρα.

4. την διαδικασία μεταβολισμού του καρκινικού δείκτη, τον τρόπο και το ρυθμό καθάρσεως και τελικής απομακρύνσεώς του από την κυκλοφορία.

5. την έκταση νεκρώσεως του καρκινικού ιστού. Η κυτταρική λύση είναι δυνατόν να προκαλέσει δυσανάλογα επίπεδα συγκέντρωσης ενός καρκινικού δείκτη σε σχέση με το μέγεθος του υπάρχοντος όγκου, όταν αυτός εμφανίζει μεγάλη ενδοκυττάρια συγκέντρωση. Νέκρωση καρκινικών κυττάρων είναι δυνατόν να συμβεί λόγω αύξησης του ρυθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αλλά κυρίως μετά από ακτινοθεραπεία ή κυτταροτοξική θεραπεία.

6. τα βιολογικά δεδομένα κάθε ασθενή, στα οποία περιλαμβάνονται γενετικά χαρακτηριστικά, το φύλο, η ηλικία (γήρανση), οι τρόποι διατροφής, οι συνήθειές του κλπ. (*Βυλλιώτου - Ballesta, et al., 1993*).

2.1.4 Χρησιμοποιούμενοι καρκινικοί δείκτες στον καρκίνο του πνεύμονα

Η ανάπτυξη καινοτόμων δαγνοστικών τεχνικών στην ταυτοποίηση καρκίνου του πνεύμονα είναι αναγκαία, καθώς διευκολύνει την ανίχνευση της νόσου σε αρχικά στάδια συμβάλλοντας έτσι στην αποτελεσματικότερη θεραπεία του και κατ' επέκταση σε καλύτερη πρόγνωση. Μερικοί από τους προγνωστικούς δείκτες που έχουν ερευνηθεί έως σήμερα στον καρκίνο του πνεύμονα είναι οι εξής:

CEA (carcinoembryogenic antigen): πρόκειται για μία γλυκοπρωτεΐνη μεγάλου μοριακού βάρους, που παράγεται κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης, ενώ μετά τη γέννηση παράγεται κυρίως σε καρκινώματα και κυκλοφορεί στο αίμα όπου ανιχνεύεται και μετράται με ραδιοαναστολογικές μεθόδους (*Primack 1974 - Laurence και Neville, 1972*). Σε ασθενείς με πρωτοπαθή καρκινώματα πνεύμονα έχουν αναφερθεί αυξημένα επίπεδα CEA στον ορό σε ποσοστό 56 – 86%, ενώ σε εκείνους που ανευρέθηκαν μεταστάσεις (οστά, ήπαρ) τα επίπεδα CEA ήταν ακόμη υψηλότερα (*Knoo και Mackay, 1973 - Lurie et al., 1974*). Πρέπει να τονιστεί όμως ότι η ανεύρεση φυσιολογικών τιμών CEA, δεν αποκλείει την παρουσία καρκινώματος ή μεταστάσεων, γεγονός το οποίο αποκλείει τη χρησιμοποίηση, αυτού, ως ειδικού δείκτη ανίχνευσης καρκινώματος κατά την προληπτική εξέταση του πληθυσμού. Επίσης η αυξημένη συγκέντρωση του συγκεκριμένου δείκτη στον ορό έχει συσχετιστεί με το κάπνισμα καθώς και με μη νεοπλασματικές διαταραχές όπως η παγκρεατίτιδα, η κίρρωση του ήπατος, οι πολύποδες του παχέος εντέρου κ.ά. (*Buccheri και Ferrigno 1988 - Hensen, 1991*).

NSE (neuron specific enolase): πρόκειται για διαλυτό γλυκολυτικό μεταλλοένζυμο που παρέχει

απαραίτητα συστατικά για την αερόβια γλυκόλυση. Η ειδική νευρωνική ενολάση (NSE) αποτελεί χρήσιμο καρκινικό δείκτη για τη διάγνωση και την παρακολούθηση του μικροκυτταρικού καρκίνου των πνευμόνων. Σε άτομα με μικροκυτταρικό καρκίνο των πνευμόνων η ευαισθησία είναι 80% και η ειδικότητα 80 – 90%. Οι τιμές NSE του ορού πριν την έναρξη θεραπευτικής αγωγής έχουν προγνωστική αξία για το προσδόκιμο επιβίωσης. Ωστόσο δεν είναι αρκετά ευαίσθητος και ειδικός δείκτης για τη διαφορική διάγνωση μικροκυτταρικού από μη μικροκυτταρικού καρκίνου των πνευμόνων και δεν μπορεί να αντικαταστήσει την ιστολογική εξέταση.

SCC – Ag (squamous cell carcinoma antigen): Το αντιγόνο που σχετίζεται με το πλακώδες επιθήλιο αποτελεί ένα από τα 14 κλάσματα του καρκινικού αντιγόνου TA-4 (*Hensen, 1991 - Kto, Torigoe, 1977*). Ο προσδιορισμός του SCC-Ag στον ορό των ασθενών με καρκινώματα πνεύμονα φαίνεται να χρησιμεύει στην μεταθεραπευτική παρακολούθηση των ασθενών (εφόσον μειωθεί το μέγεθος του όγκου), στην παρακολούθηση των υποτροπών του όγκου, και στην πρωτογενή διάγνωση του πλακώδους καρκινώματος του πνεύμονα (*Mino, et al. 1988 - Ebert, et al., 1988*).

CYFRA 21- 1 (cytokeratin 19 fragment): Η κυττοκερατίνη 19 είναι μία πρωτεΐνη κυτταροσκελετού των επιθηλιακών κυττάρων. Βρίσκεται στο επιθήλιο των βρόγχων και σε καρκίνο των πνευμόνων απελευθερώνονται μεγάλες ποσότητες της κυττοκερατίνης 19 στον ορό. Το CYFRA 21 –1 αποτελεί τμήμα της κυττοκερατίνης 19 και προσδιορίζεται στον ορό με μονοκλωνικά αντισώματα. Το CYFRA 21 – 1 είναι ο πιο ευαίσθητος καρκινικός δείκτης για μη μικροκυτταρικό καρκίνο των πνευμόνων. Η ευαισθησία του δείκτη για μικροκυτταρικό καρκίνο κυμαίνεται μεταξύ 33 – 46%, 33% σε περιορισμένη νόσο και μέχρι 84% σε προχωρημένη νόσο. Υψηλές τιμές CFRA 21-1 υποδηλώνουν κακή πρόγνωση ενώ χαμηλές τιμές ή ελάχιστα αυξημένες τιμές δεν αποκλείουν κακοήθεια.

Άλλοι καρκινικοί δείκτες που αναζητούνται στον καρκίνο του πνεύμονα είναι το ιστικό πουλπεπτιδικό αντιγόνο (TPA), το ειδικό ιστικό πολυπεπτιδικό αντιγόνο (TPS), το καρκινικό αντιγόνο 15 – (CA 15-3), ενώ νεότεροι δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι οι υποδοχείς στεροειδικών ορμονών, καθώς και μοριακοί και γενετικοί δείκτες όπως ογκογονίδια και ογκοπρωτεΐνες, ογκοκατασταλτικά γονίδια και πρωτεΐνες, αυξητικοί παράγοντες του όγκου, παραγωγή χιμαιρικών πρωτεϊνών, απώλεια ετεροζυγωτίας και μικροδορυφορικό DNA, προσδιορισμός τελομεράσης (*Stieber et al. 1999 - Stieber, et al.1993*).

2.2 Σταθερότητα mRNA

2.2.1 Ωρίμανση mRNA

Το mRNA των ευκαρυωτικών οργανισμών που προκύπτει με τη μεταγραφή υφίσταται εκτεταμένη μετα-μεταγραφική τροποποίηση ώστε να καταστεί λειτουργικό στο κυτταρόπλασμα, όπου επιτελείται η μετάφραση. Η μετατροπή του πρώιμου μεταγράφου σε ώριμο mRNA περιλαμβάνει την τροποποίηση του 5' άκρου με την προσθήκη της καλύπτρας (capping), την αποκοπή των ιντρονίων (μάτισμα, splicing) και την προσθήκη poly(A) ουράς στο 3' άκρο (πολυαδενυλίωση, polyadenylation) (Εικόνα 1).

Προσθήκη καλύπτρας (capping): μετά την έναρξη της μεταγραφής ή κατά τη διάρκειά της, τοποθετείται στο 5' άκρο του μεταγράφου ένα κάλυμμα 7-μεθυλογουανυλικού με 5'-5' τριφωσφορικό δεσμό. Στην προσθήκη αυτή συμμετέχουν τρία ένζυμα, μία φωσφατάση, μία γουανυλοτρανσφεράση, και μία μεθυλάση. Διακρίνονται τρία είδη καλύμματος ανάλογα με το πλήθος μεθυλίσεων που φέρουν: κάλυμμα 0 (όταν δεν υπάρχει επιπρόσθετη μεθυλίωση), κάλυμμα 1 (όταν το πρώτο σάκχαρο της ριβόζης είναι καθοδικά μεθυλιωμένο), κάλυμμα 2 (όταν και τα δύο σάκχαρα της ριβόζης είναι καθοδικά μεθυλιωμένα). Η προσθήκη της καλύπτρας σταθεροποιεί το mRNA, προστατεύοντάς το από τη δράση των 5'-3' εξωνουκλεασών (Cho *et al*, 1997).

Μάτισμα (splicing): Το πρώιμο mRNA υφίσταται τη διαδικασία ματίσματος ώστε να αφαιρεθούν τα ιντρόνια (introns) και να παραχθεί ένα μικρότερο σε μήκος μόριο mRNA με άθικτη κωδική αλληλουχία. Το μάτισμα καταλύεται από τη συγκρότηση ειδικών σωματιδίων ματίσματος (spliceosomes) στα όρια εξονίων- ιντρονίων, σε συντηρημένες φυλογενετικές αλληλουχίες. Τα spliceosomes αποτελούνται από μικρά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (U1, U2, U4, U5, U6), και άλλες ειδικές πρωτεΐνες, όπως οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες ματίσματος (splicing regulator proteins, SRs) (Lewin, 2004).

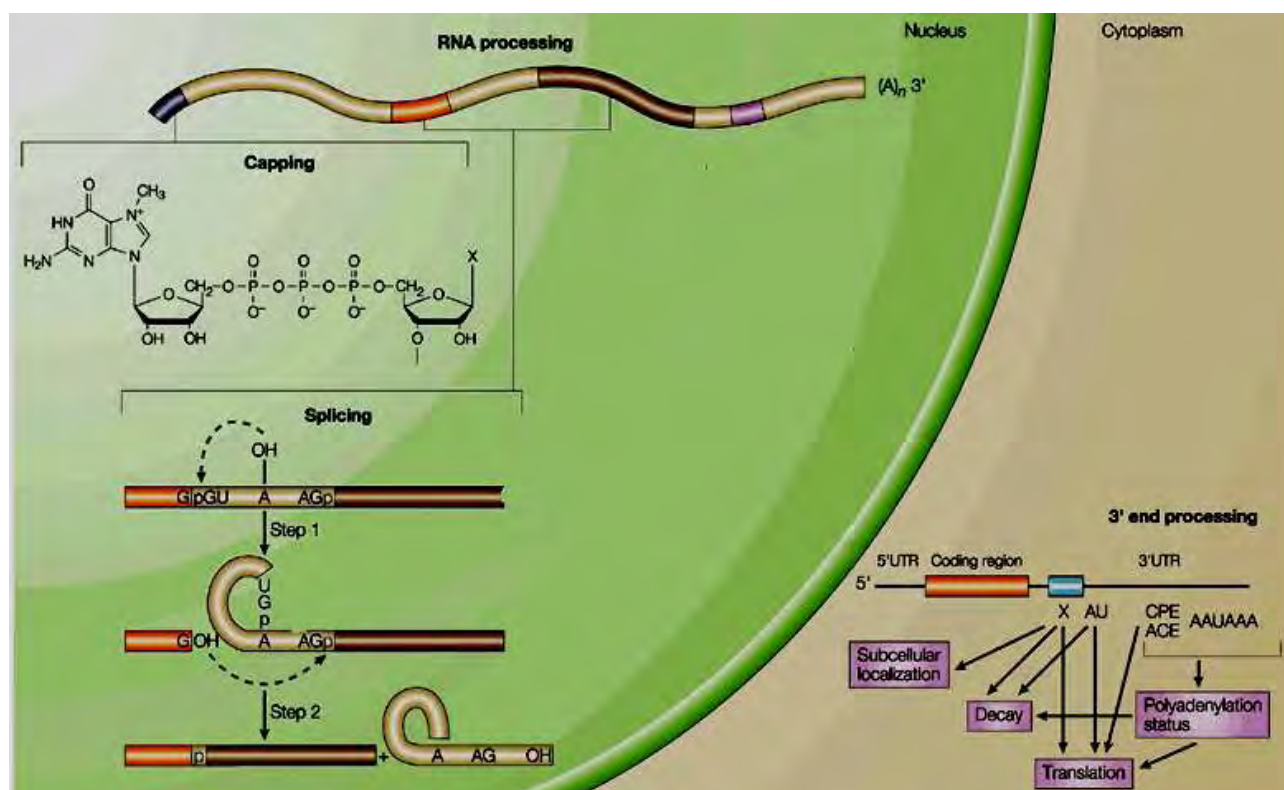
Πολυαδενυλίωση (polyadenylation): Το τελευταίο στάδιο στη μετα-μεταγραφική επεξεργασία του mRNA είναι η ωρίμανση του 3' άκρου του, η οποία περιλαμβάνει την αποκοπή του μεταγράφου από το DNA και πολυαδενυλίωσή του. Το πρώιμο μετάγραφο υφίσταται μία ενδονουκλεολυτική απομάκρυνση από το σημείο μεταγραφής του, και στο 3' άκρο του προστίθεται μία poly(A) ουρά μήκους 250-300 νουκλεοτιδίων αδενοσίνης. Το σήμα για την πολυαδενυλίωση είναι ένα συντηρημένο εξανουκλεοτίδιο AAUAAA το οποίο απαντάται στα ευκαρυωτικά γονίδια 10 – 30 ανοδικά της θέσης που προστίθεται η poly(A) ουρά. Το σύμπλοκο που διεκπεραιώνει την αποκοπή και την πολυαδενυλίωση απαρτίζεται από μία σειρά ειδικών παραγόντων.

- Μία ενδονουκλεάση που αποτελείται από τους παράγοντες αποκοπής CFI, CFII (cleavage Factors I,II), για την αποκοπή του mRNA.

- Μία πολυ(A) πολυμεράση (poly(A) polymerase, PAP), που καταλύει τη σύνθεση της πολυ(A) ουράς
- Τον παράγοντα ειδικότητας CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor), ο οποίος αναγνωρίζει τη συντηρημένη αλληλουχία AAUAAA.
- Ένα παράγοντα ενίσχυσης (CstF, Cleavage Stimulatory Factor), που προσδένεται σε μία αλληλουχία πλούσια σε G-U καθοδικά της περιοχής της αποκοπής.

Ο ρόλος της πολυ(A) ουράς είναι κεντρικής σημασίας καθώς σταθεροποιεί το mRNA προστατεύοντας το 3' άκρο του από εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση, συμμετέχει σε διεργασίες όπως η έξοδος του mRNA από το κυτταρόπλασμα, ενώ από αυτή ξεκινά το κύριο μονοπάτι αποικοδόμησης του mRNA (Tian *et al.*, 2005).

Εικόνα 1: Τα στάδια ωρίμανσης του ευκαρυωτικού mRNA (από Keegan, *et al.* 2001).

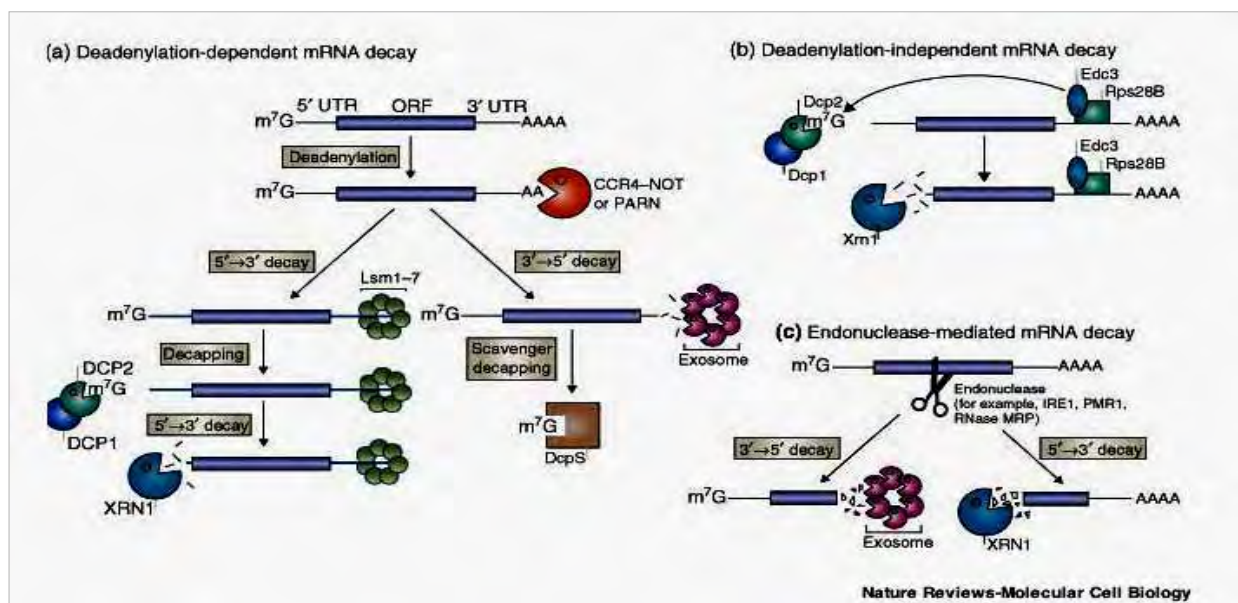


2.2.2 Μονοπάτια αποικοδόμησης mRNA

Η αποικοδόμηση των mRNAs, παίζει σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή έκφραση, στον ποιοτικό έλεγχο της βιοσύνθεσης του mRNA, και στην αντιϊκή προστασία. Η αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών μεταγράφων γίνεται στο κυτταρόπλασμα και περιλαμβάνει την απομάκρυνση της πολυ(A) ουράς (αποαδενυλίωση) και την αποδόμηση του νουκλεοτιδικού “σώματος” του mRNA.

Οι οδοί της αποδόμησης των ευκαρυωτικών mRNAs διαφοροποιούνται ανάλογα με το αν η αποδόμηση του “σώματος” του mRNA συμβαίνει με κατεύθυνση 5'→3' ή 3'→5', και αν η αποαδενυλίωση προηγείται ή όχι της αποδόμησης αυτής.

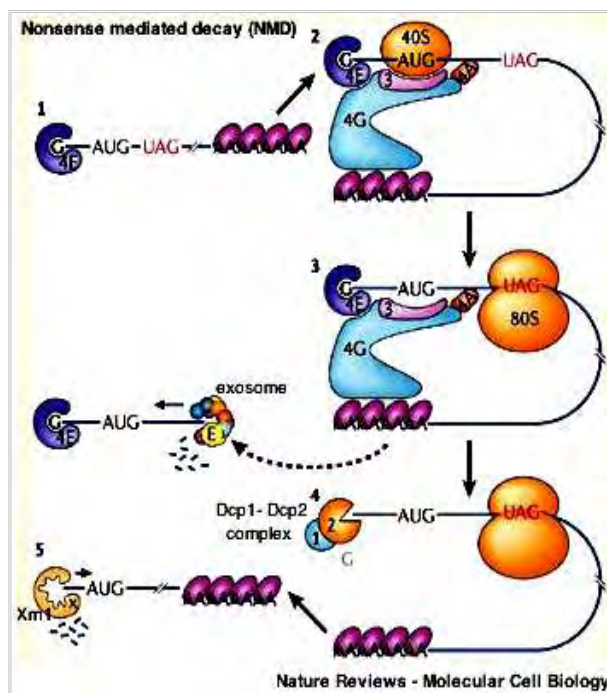
Στα θηλαστικά η αποδόμηση των περισσότερων mRNAs πυροδοτείται με τη βράχυνση της πολυ(A) ουράς από ειδικά ένζυμα, τις αποαδενυλάσες. Ακολουθώντας την αποαδενυλίωση ένα ειδικό ένζυμο αποτελούμενο από δύο υπομονάδες (Dcp1p και Dcp2p) αφαιρεί το κάλυμμα, εκθέτοντας το μετάγραφο σε αποικοδόμηση από μια 5'→3' εξωνουκλεάση την Xrn1p. Εναλλακτικά, μετά την αποαδενυλίωση, το mRNA μπορεί να αποικοδομηθεί με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα, ένα σύμπλοκο εξωνουκλεασών. Στην περίπτωση αυτή το κάλυμμα υδρολύεται από το ένζυμο DcpS. Ωστόσο η αποικοδόμηση ορισμένων μορίων mRNA μπορεί να ξεκινήσει με ενδονουκλεοτιδική διάσπαση είτε από ειδικές ενδονουκλεάσες είτε από το μηχανισμό του RNAi (Μονοπάτι αποικοδόμησης διαμεσολαβούμενο από ενδονουκλεάσες). Στο μονοπάτι αυτό μετά τη δράση των ενδονουκλεασών παράγονται δύο θραύσματα με απροστάτευτα άκρα, τα οποία και αποικοδομούνται στη συνέχεια με τη δράση του εξωσώματος και της Xrn1p (Εικόνα 2).



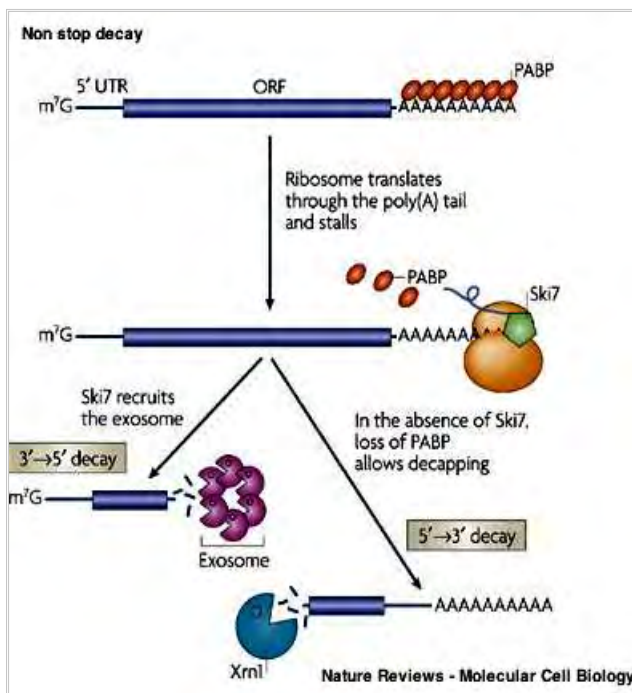
Εικόνα 2: Μονοπάτια αποικοδόμησης ευκαρυωτικού mRNA (από Garneau et al. 2007)

Επίσης, τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν ειδικά μονοπάτια αποικοδόμησης που αναγνωρίζουν και αποικοδομούν ταχύτατα ανώμαλα mRNAs χρησιμοποιώντας τα ίδια ένζυμα που αποικοδομούν φυσιολογικά mRNAs. Για παράδειγμα, πρόδρομα mRNAs τα οποία αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν την διαδικασία ωρίμανσης, είναι δυνατόν να παραμείνουν στον πυρήνα, είτε να αποδομηθούν μέσω μίας διαδικασίας που εξαρτάται από το εξώσωμα. Εναλλακτικά, mRNAs που

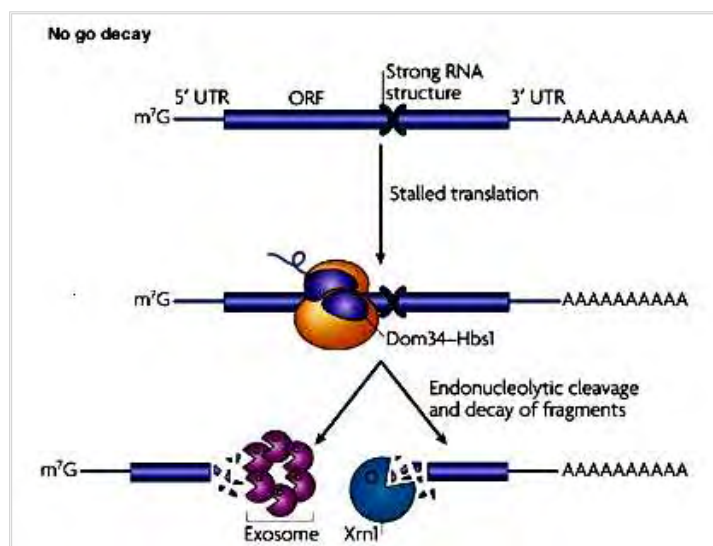
διαθέτουν μία πρόωρη αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται μέσω μίας πορείας που ονομάζεται “μη-νοηματικά διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση” (*nonsense-mediated decay, NMD*) (Εικόνα 3α). Τέτοια μετάγραφα αποικοδομούνται είτε μετά από αφαίρεση του καλύμματος μέσω μίας διαδικασίας η οποία είναι ανεξάρτητη από την αποαδενυλίωση, είτε από επιτάχυνση της αποαδενυλίωσης και της 3'→5' αποικοδόμησης από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα. Ομοίως, σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως αποικοδόμηση μη-τερματισμού (*nonstop decay, NSD*) τα mRNAs στα οποία δεν υπάρχει αλληλουχία τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται ταχύτατα με κατεύθυνση 3'→5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα (Εικόνα 3β). Τέλος, στη ζύμη ανακαλύφθηκε και η No-Go αποικοδόμηση (*no-go decay, NGD*) κατά την οποία το ριβόσωμα ακινητοποιείται στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης λόγω σχηματισμού δευτεροταγούς δομής στο ελαττωματικό mRNA. Κατά συνέπεια πυροδοτείται η διαμεσολαβούμενη από ενδονουκλεάσες αποικοδόμηση του mRNA και απελευθερώνεται το ριβόσωμα, (Εικόνα 3γ) (*Parker και Song, 2004*).



Εικόνα 3α: Nonsense-mediated decay (NMD)



Εικόνα 3β: Non stop decay (NSD)



Εικόνα 3γ: No go decay

2.3 Αποαδενυλάσες – Κατάταξη, βιολογικές λειτουργίες και έλεγχος της δραστητικότητάς τους

Οι αποαδενυλάσες είναι Mg^{2+} εξαρτώμενες εξωριβονουκλεάσες, οι οποίες υδρολύουν το mRNA σε 3'→5' κατεύθυνση, απελευθερώνοντας 5' – AMP. Κύριο υπόστρωμα των αποαδενυλασών αποτελεί η πολυ(A) ουρά και στη συνέχεια το mRNA υφιστάμενο τη δράση άλλων ενζύμων αποδομείται. Οι αποαδενυλάσες με βάση την παρουσία συγκεκριμένων συντηρημένων καταλοίπων στο καταλυτικό τους κέντρο ταξινομούνται σε δύο μεγάλες υπερ-οικογένειες.

- *H DEDD υπερ-οικογένεια*, η ονομασία της οποίας προέρχεται από τα καταλυτικά αμινοξέα Asp και Glu που βρίσκονται διάσπαρτα μεταξύ των τριών μοτίβων εξωνουκλεάσης και συντονίζουν τα ιόντα Mg^{2+} . Στην ομάδα αυτή ανήκουν η αποαδενυλάση POP2 (γνωστή και ως CAF1), η CAF1Z, η πολύ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (*PARN*), καθώς και οι οικογένειες των PAN2 αποαδενυλασών.
- *H EEP υπερ-οικογένεια*, ονομάζεται η υπερ-οικογένεια των εξωνουκλεασών – ενδονουκλεασών – φωσφατασών (exonuclease-endonuclease-phosphatase, EEP), περιλαμβάνει αποαδενυλάσες που φέρουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στις δομικές περιοχές νουκλεάσης τους. Παραδείγματα EEP ενζύμων αποτελούν οι αποαδενυλάσες Nocturnin, CCR4 και Angel.

Οι αποαδενυλάσες χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλομορφία (πίνακας 3), επειδή πιθανότατα συγκεκριμένες αποαδενυλάσες δρουν σε συγκεκριμένα mRNAs, ωστόσο είναι δυνατή η δράση διαφορετικών αποαδενυλασών στο ίδιο mRNA με διακριτές αλλά επικαλυπτόμενες λειτουργίες.

Το μήκος της πολυ(A) ουράς μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ζωής ενός mRNA. Στον πυρήνα η αποαδενυλίωση των νεοσυντιθέμενων mRNAs, περιορίζει τις πολυ(A) ουρές στα κατάλληλα μήκη

τους, ενώ στο κυτταρόπλασμα η εκτεταμένη αποαδενυλίωση των mRNAs σηματοδοτεί την αποικοδόμησή τους ή τη μεταφραστική καταστολή τους. Η ρύθμιση της αποαδενυλιωτικής δραστηριότητας είναι ζωτικής σημασίας καθώς η ανεξέλεγκτη αποαδενυλίωση θα οδηγούσε στην καταστροφή του mRNA. Τα μη σταθερά και ανώμαλα mRNAs πρέπει να αποικοδομηθούν ενώ τα σταθερά να προστατευθούν από την αποαδενυλίωση. (Goldstrohm & Wickens, 2008)

Πίνακας 3: Ποικιλομορφία των αποαδενυλίων (Goldstrohm and Wickens, 2008).

		SC	CE	DM	XL	MM	HS
DEDD nucleases	CAF1Z	-	+	-	+	+	+
	CNOT7/POP2	+	+	+	+	+	+
	CNOT8	-	-	-	+	+	+
	PAN2	+	+	+	+	+	+
	PARN	-	+	-	+	+	+
EEP nucleases	CNOT6/CCR4	+	+	+	+	+	+
	CNOT6L	-	-	-	-	+	+
	NOC	-	-	+	+	+	+
	2'PDE	-	+	+	+	+	+

SC, *S. cerevisiae*; CE, *C. Elegans*; DM, *D. Melanogaster*; XL, *X. Laevis*; MM, *M. Musculus*; HS, *H. Sapiens*

+, demonstrated enzymatic activity; +, predicted enzymatic activity; -, ND

modified from Goldstrohm and Wickens Nat Rev Mol Cell Biol, 2008; 9: 337

2.4 Ο ρόλος των ριβονουκλεασών στον καρκίνο

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 (Kim et al. 2009).

Τα *miRNAs* αποτελούνται από 20-25 νουκλεοτίδια που παράγονται από ενδονουκλεολυτική επεξεργασία με τον μηχανισμό της παρεμβολής του RNA. Συνδέονται στην 3' UTR (αμετάφραστη

περιοχή) των mRNAs είτε για να αναστείλουν την μετάφρασή του είτε για να πυροδοτήσουν την αποικοδόμησή του.

Οι *RBP*s (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.

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει ένας σημαντικός σύνδεσμος μεταξύ καρκινογένεσης και δυσλειτουργικών trans-acting παραγόντων στον μεταβολισμό του mRNA. Ορισμένα μέλη ριβονουκλεοπρωτεϊνών που συνδέονται με ένα σημαντικό αριθμό μεταγράφων ενοχοποιούνται ως ογκογονίδια ή καταστολείς ογκογονιδίων που μεσολαβούν στην αποικοδόμηση και στην σταθερότητα των μεταγράφων. Οι ριβονουκλεάσες εμπλέκονται στην καρκινογένεση και έχουν σημαντική επίδραση στον μετα-μεταγραφικό έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης. Οι ριβονουκλεάσες μπορούν να δράσουν ως ογκοπρωτεΐνες ή καταστολείς όγκων δίνοντας μία άλλη στροφή στην ρύθμιση της αφθονίας του mRNA και στους ρυθμούς μετάφρασης.

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 (*Kim, et al. 2009*).

Η μειωμένη αποικοδόμηση ογκογόνων mRNAs μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου. Παρόμοιες επιδράσεις έχουν η αυξημένη δραστηριότητα των σταθεροποιητικών πρωτεϊνών που συνδέονται με το mRNA ή η μειωμένη δραστηριότητα των αποσταθεροποιητικών (destabilizer RBP). Από την άλλη, αυξημένη αποικοδόμηση των ογκοκατασταλτικών mRNAs μπορεί επίσης να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου σε περίπτωση που έχουμε αυξημένη δραστηριότητα ριβονουκλεασών ή των miRNAs που αναστέλλουν την μετάφρασή τους (*Kim et al. 2009*).

Πίνακας 4: Ταξινόμηση Ριβονουκλεσών

Ενδοριβονουκλεάσες	Εξωριβονουκλεάσες
RNase A	Polynucleotide Phosphorylase (PNPase)
RNase H	RNase PH
RNase I	RNase II
RNase III	RNase R
RNase L	RNase D
RNase P	RNase T
RNase PhyM	Oligoribonuclease
RNase T1	Exoribonuclease I
RNase T2	Exoribonuclease II
RNase U2	-
RNase U1	-
RNase U	-

(Holzmann et al. 2008, D'Alessio et al, 1997, Gerdes et al., 2005)

ΜΕΡΟΣ Β'

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η ενεργοποίηση ογκογονιδίων και δυσλειτουργικών μεταγραφικών παραγόντων, καθώς και η καταστολή ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι μερικοί από τους σημαντικούς παράγοντες που συμβάλλουν στην καρκινογένεση. Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης απαιτεί τον ακριβή έλεγχο της σύνθεσης, της επεξεργασίας και αποικοδόμησης των μεταγράφων mRNAs. Η βράχυνση της πολυ(A) ουράς από τις αποαδενυλάσες είναι το πρώτο καθοριστικό βήμα στην αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs, συμμετέχοντας έτσι αποφασιστικά στο χρόνο ζωής τους και κατ' επέκταση τη ποσότητα τη παραγόμενης πρωτεΐνης.

Στην παρούσα εργασία ερευνάται η διαφοροποίηση της έκφρασης των αποαδενυλασών σε καρκινικούς ιστούς πνεύμονα, σε σχέση με φυσιολογικούς παρακείμενους ιστούς πνεύμονα. Παράλληλα εξετάζεται η έκφραση γενετικών προδιαθεσικών παραγόντων που σχετίζονται άμεσα με τον καρκίνο του πνεύμονα σύμφωνα με τα ήδη υπάρχοντα βιβλιογραφικά στοιχεία.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

Χημικά

Acrylamide	Sigma
APS (Ammonium Persulfate)	Sigma
Bioquant Protein	Merck
Bis-acrylamide	Sigma
Bromophenol Blue	Research Organics
Full Range Rainbow MW Markers	Amersham
HCl	Merck
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaCl	Panreac
NaOH	Merck
Ponceau Red	Sigma
PBS Tablets	TaKaRa
SDS	Sigma
Skimmed Milk	Scharlau
TCA	Fluka
Temed	Research Organics
Tween 20	Euroclone
Αιθανόλη	Merck
Ακετόνη	Merck
Αμμωνία	Merck
Γλυκερόλη	Panreac
Γλυκίνη	AppliChem
Ισοπροπανόλη	Scharlau
Μεθανόλη	Merck
2-μερκαπτοαιθανόλη	Riedel de Haen
Αναστολείς πρωτεασών (complete)	Roche

Πρωτεΐνες - ένζυμα – αντισώματα

Anti-PARN 74	Ευγενική προσφορά του Καθ. Α.Virtanen, Uppsala University, Uppsala, Σουηδία
Anti-CNOT7 (CCR4-NOT)	Aviva Systems Biology
Anti-β-Actin	Aviva Systems Biology
BSA Fraction V	Merck
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Chemicon
Protease Inhibitors	Roche

Διαλύματα

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

- 30% bis/acrylamide (29:1 / acrylamide:bis-acrylamide) σε ddH₂O
- 10% SDS
- Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris-HCl pH 8.8 1M
- Ρυθμιστικό Διάλυμα Tris-HCl pH 6.8 1M
- Ρυθμιστικό Διάλυμα 10x pH 8.3: Tris-base 1,5%, Γλυκίνη 7,2%, SDS 0,5%
- Loading Buffer (1M Tris pH 6.8, 10% glycerol, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% bromophenol blue)

Οι αναλογίες των παραπάνω διαλυμάτων καθορίζονται κάθε φορά από την επιθυμητή περιεκτικότητα σε πολυακρυλαμίδιο και την χωρητικότητα της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Στη συνέχεια προστίθενται και οι καταλύτες TEMED και 10% APS.

1. 30% Acrylamide-Bis (100ml)

30gr acrylamide

1gr bis

100ml dH₂O

2. RUNNING BUFFER 10X (500ml)

72gr γλυκίνη 1,92M M.B= 75,0

15gr TRIS 0,25M M.B=121,1

5gr SDS 0,035M M.B=288,4

3. ΔΙΑΛΥΜΑ ΓΙΑ TRANSFER GEL ΠΟΛΥΑΚΡΙΑΜΙΔΙΟΥ ΣΕ PVDF ΜΕΜΒΡΑΝΗ, TRANSFER BUFFER

Tris 48m

Γλυκίνη 39m

SDS 1,3mM

Μεθανόλη 20%

4. PONCEAU RED

1) 0,1% ponceau w/v σε 5% οξικό οξύ ή

2) 2% ponceau w/v σε 30% TCA και 30% sulfosalicylic acid

5. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ DETECTION

Blotto Buffer (5% Skim Milk, 0,5 % Tween 20 σε PBS)

PBS-T (0,5% Tween 20 σε PBS)

ECL-plus : Solution A και B

Amersham

Developer Solution

Kodak

Fixer Solution

Kodak

6. ΔΙΑΛΥΜΑ ΓΙΑ ΑΠΟΣΥΝΔΕΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ PVDF ΜΕΜΒΡΑΝΗ , STRIPPING BUFFER

100mM β-μερκαπτοαιθανόλη

2% SDS

62.5mM Tris-HCl pH 6.7

Δείγματα

Τα δείγματα ελήφθησαν σε συνεργασία με το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας από ασθενείς με μικροκυτταρικό (SCLC) και μη μικροκυτταρικό καρκίνο (NSCLC) 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 66,6 ($\pm 6,0$) έτη για τον Μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (S.C.L.C) και 69,3 ($\pm 7,3$) έτη για τον μη-Μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (N.S.C.L.C), ενώ όλα τα περιστατικά αφορούσαν άνδρες καπνιστές ή πρώην καπνιστές. Στον **Πίνακα 5** παρατίθενται το φύλο, η ηλικία καθώς και το στάδιο της νόσου του κάθε ασθενή σύμφωνα με το σύστημα TNM που περιγράψαμε πιο πάνω.

Πίνακας 5: Αριθμός και προέλευση δειγμάτων

ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ	ΣΤΑΔΙΟ	TNM
ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ (SCLC)				
A	66	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	IV	T2bN2M1b
A	60	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	IV	
A	74	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ		
A	73	ΠΡΩΗΝ ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	IV	TxN2M1
A	60	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	IV	T4N2M1
ΠΛΑΚΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ - ΜΗ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ (NSCLC)				
A	66			
A	74	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ		
A	59	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ		
A	78	ΚΑΠΝΙΣΤΗΣ	IV	T2NXM1b

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση του RNA έγινε βάσει του πρωτοκόλλου Total RNA and Protein Isolation NucleoSpin® RNA/Protein, Macherey-Nagel.

2.2.2. 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^ο Βήμα: Σύνθεση του cDNA κλώνου

Για τη μετατροπή του ολικού RNA σε cDNA που η χρησιμοποιήθηκε προκειμένου στη συνέχεια να πολλαπλασιαστεί σε απλή PCR χρησιμοποιήθηκε το Prime 1st Strand Cdna Synthesis Kit της εταιρίας Takara. Η αντίστροφη μεταγραφάση 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:

Αντιδραστήρια	Όγκος
Oligo dT Primer (50 μ M)*	1.0 μ l
dNTP Mixture (10 mM each)	1.0 μ l
Template RNA	(Ολικό RNA : < 5 μ g*, πολυ(A) ⁺ RNA : < 1 μ g**)
RNase free dH ₂ O	μέχρι 10 μ l

Η συγκέντρωση του RNA έχει συγκέντρωση 400 ng/rxn.

2.Το μίγμα θερμαίνεται στους 65o 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 μ l.

Αντιδραστήρια	Όγκος
Template RNA Primer Mixture	μέχρι 10.0 μ l
5 X PrimeScript™ Buffer	4 μ l (1X)
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	0.5 μ l (20 units)
PrimeScript™ RTase (200 U/ μ l)	1.0 μ l (200 units)
RNase free dH ₂ O	μέχρι 20.0 μ l

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

κάποιας 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 δίκλωνα μόρια DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση ενίσχυσης., στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα πιθανά διμερή των εκκινητών καθώς και μη ειδικά προϊόντα που ενδέχεται να προκύπτουν. 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 ακριβής 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 αναστολείς 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 αποαδενυλασών και καρκινικών παραγόντων πραγματοποιήθηκε με την ποσοτική PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο της “ KAPATM 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. 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 6 και 7 αντίστοιχα.

Πίνακας 6: Συστατικά αντίδρασης qPCR

	Final concentration	20 µl rxn
KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Universal	1X	10.0µl
Forward Primer (10 µM)	200nM	0.4µl
Reverse Primer (10 µM)	200nM	0.4µl
Template DNA	(<20 ng/20 µl rxn)	Variable
ROX Low	50nM	0.4µl
PCR grade water up to 20 µl		As required

Πίνακας 7: Συνθήκες αντίδρασης qPCR για την ενίσχυση των επιλεγμένων παραγόντων

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

2.3 Εκκινητές

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης της των αποαδενυλασών καθώς και των υπόλοιπων παραγόντων που εξετάστηκαν χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που παρουσιάζονται στον Πίνακα 8. Ο κάθε εκκινητής ελέγχθηκε ως προς την εξειδίκευση του για το αντίστοιχο cDNA-στόχο, με το πρόγραμμα Blastn.

Πίνακας 8: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη REAL TIME PCR

ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	Primers (5'→3') - Αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
<u>CNOT6</u> (CCR4-NOT transcription complex, subunit 6)	Αποτελεί υπομονάδα του συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT (<i>Lau et al., 2009</i>)	Fwd AGCTGTCATGGGAAGAATGG Rev GGGCAGCCACTGATGTTATT 221bp
<u>CNOT8</u> (CCR4-NOT transcription complex, subunit 8)	Αποτελεί υπομονάδα του συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT (<i>Lau et al., 2009</i>)	Fwd GGATTTGCAGAGGATTGGAA Rev TCACTGCTGCATGTTGTTGA 232bp
<u>CNOT7</u>	Οι CNOT7 και PARN ανήκουν στην ίδια οικογένεια αποαδενυλασών DEDD, συμβάλλοντας στην αποαδενυλίωση του mRNA. Στους περισσότερους ευκαρυώτες εκτός από το αποαδενυλάσες των συμπλόκων CCR4-NOT και PAN2-PAN3 υπάρχει και ένα τρίτο ένζυμο αποαδενυλίωσης, η πολύ(Α)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση PARN.	Fwd GTCCTCTGTGAAGGGGTCAA Rev GACTGCTTGTTGGCTTCTC 419bp
<u>PARN</u>		Fwd CAGCAGAAACATGCCAAAGA Rev CCAAGAGTCTGGGGAAAAACA 211bp
<u>CNOT6L</u> (CCR4-NOT transcription complex, subunit 6-like)	Αποτελεί μεταβλητή υπομονάδα του συμπλόκου αποαδενυλίωσης CCR4-NOT (<i>Lau et al., 2009</i>)	Fwd CGGCTCTTCCAGCTACAAAC Rev GGAAGCTGCTCTGGATGAAC 143bp
<u>PAN2</u>	Ανήκει στην υπεροικογένεια αποαδενυλασών DEDD με συντηρημένα κατάλοιπα Asp και Glu στο καταλυτικό κέντρο. Αποικοδομεί το μισό μήκος της πολύ(Α) ουράς μέσα στον πυρήνα, ενώ το υπόλοιπο μέρος αποικοδομείται από τις αποαδενυλάσες CAF1 και CCR4 στο κυτταρόπλασμα (Goldstrohm A. and Wickens M., 2008)	Fwd CTCATCGGGGGACTCTGTTA Rev CCAGGCCTGTGTATTCTGGT 205bp
<u>PAPOLA</u>	Πολύ(Α) πολυμεράση Α. Αδενυλιώνει το 3' άκρο των mRNAs.	Fwd AATGACAGCAGCCTCGACTT Rev TGTACCCCCTGAGCTTTCAC 216bp

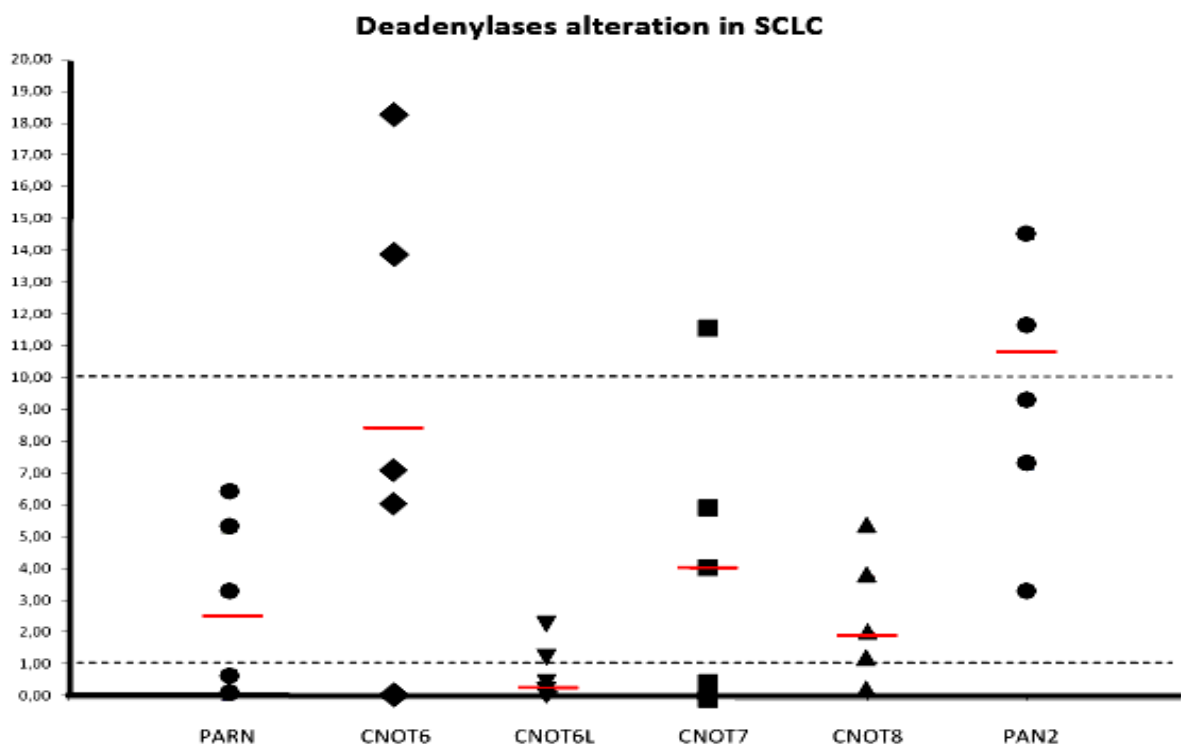
<u>BTG2</u>	Κύριο μέλος της οικογένειας των TOB αντιπολλαπλασιαστικών πρωτεϊνών. Εμπλέκεται στην κυτταρική ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την επιδιόρθωση του DNA. Έχει αντι- αποπτωτικό ρόλο στη νευρογένεση. Αλληλεπιδρά με τον παράγοντα CAF1a και τον CAF1b, που είναι τα κύρια συστατικά του CCR4-NOT συμπλόκου καταστέλλοντας την ενεργότητα αποαδενύλασης της CAF1 (Yang, 2009)	Fwd AGCGAGCAGAGGCTTAAGGT Rev TGGAGACTGCCATCACGTAG 477bp
<u>HIF1-a</u> (Hypoxia-inducible factor 1a)	Ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην αγγειογένεση, στην κυτταρική επιβίωση, στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην προσαρμοστική απόκριση των κυττάρων στη υποξία και σχετίζεται με την επιθετικότητα του καρκίνου. Υπερέκφραση του HIF1-a παρατηρήθηκε σε υπερπλασίες (61%) και καρκινώματα (87%) και αυξάνει το ρυθμό αγγειογένεσης (Horrée et al., 2007; Semenza, 2003)	Fwd CCCAATGGATGATGACTTCC Rev CCTTTTCCTGCTCTGTTTGG 327bp
<u>SLC2A1</u> (GLUT-1)	Οι μεταφορείς γλυκόζης (Glut) διευκολύνουν την πρόσληψη γλυκόζης και συνήθως υπερεκφράζονται σε διάφορα είδη καρκίνου, ειδικά ο Glut-1. Στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα, τα οποία έχουν χαμηλό ρυθμό διαφοροποίησης και πολλαπλασιάζονται γρήγορα, έχει παρατηρηθεί αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του μεταφορέα Glut-1 παρέχει ένα χρήσιμο προγνωστικό δείκτη για το καρκίνο του παγκρέατος (Pizzi S, 2009). Πειράματα επώασης καρκινικών κυττάρων από μαστό και πνεύμονα με αντισώματα anti-Glut-1, αποκαλύπτουν μείωση της κυτταρικής αύξησης (κατά 50% και 75% αντίστοιχα) και αύξηση του ρυθμού απόπτωσης (Rastogi et al., 2007).	Fwd GGGCAAGAGTGTGCTAAAG Rev ACAGCGACACGACAGTGAAG 309bp
<u>K-Ras</u>	Η k-ras είναι μια κυταροπλασματική (στην εσωτερική πλευρά) GTPάση που κωδικοποιείται στον άνθρωπο από το γονίδιο <i>KRAS</i> και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές πορείες μεταγωγής σήματος. Συσώρευση μεταλλάξεων στο <i>KRAS</i> , μπορεί να το μετατρέψει σε ογκογονίδιο. Το 30% περίπου των ανθρώπινων καρκίνων, εμφανίζουν μετάλλαξη στο γονίδιο αυτό. Η οικογένεια των πρωτεϊνών <i>ras</i> εμπλέκεται σε μια σειρά διεργασιών όπως ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η διαφοροποίηση, η απόπτωση, η μνήμη και η μάθηση (Kranenburg, 2005).	Fwd TGTGGTAGTTGGAGCTGGTG Rev AAAGAAAGCCCTCCCCAGT 221bp
<u>C-Myc</u>	Μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων <i>myc</i> , τα μέλη της οποίας πιστεύεται πως ελέγχουν την έκφραση του 15% του συνόλου των ανθρώπινων	Fwd CAGCGACTCTGAGGAGGAAC

	γονιδίων μέσω δέσμευσης σε E-boxes και επιστρατεύοντας ακετυλ-τρανσφεράσες των ιστονών. Επάγει την έκφραση αρκετών γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη, ενώ λειτουργεί και αντι-αποπτωτικά.	Rev TCGGTTGTTGCTGATCTGTC 274bp
<u><i>β-actin</i></u>	Η βήτα- 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 σε τεχνικές όπως Western Blotting (“Entrez Gene: ACTB actin, beta”)	Fwd GGACTTCGAGCAAGAGATGG Rev AGCACTGTGTTGGCGTACAG 234 bp

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επίπεδα έκφρασης mRNA αποαδενυλασών και γονιδίων που σχετίζονται με καρκίνο του πνεύμονα σε ασθενείς με SCLC με quantitative Real Time PCR (qRT-PCR).

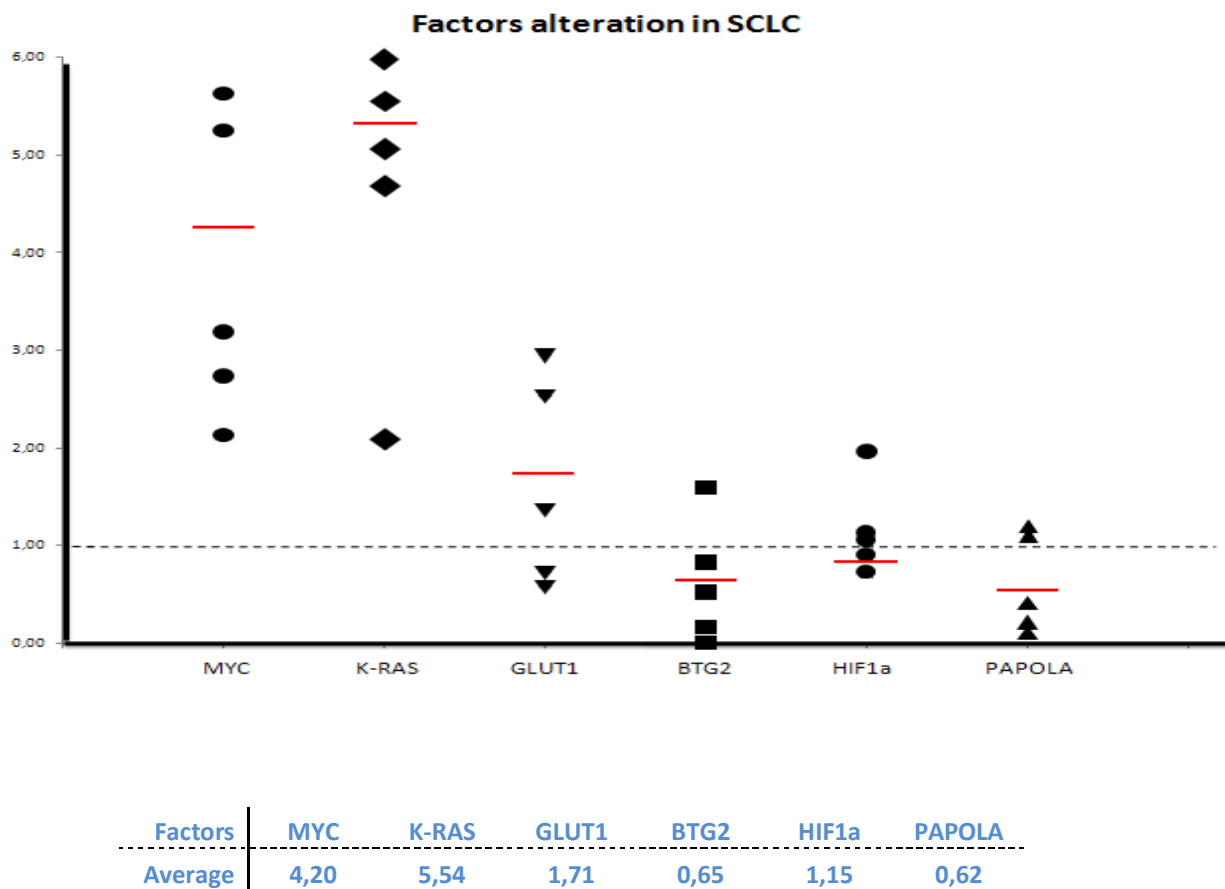
Επεξεργαστήκαμε ικανοποιητικό αριθμό δειγμάτων από τα οποία λάβαμε αξιόπιστα αποτελέσματα σε 5 δείγματα ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (SCLC). Από τους ασθενείς αυτούς λάβαμε παθολογικό και φυσιολογικό ιστό πνεύμονα με βρογχοσκόπηση όπως προαναφέρθηκε. Στην Εικόνα 4 παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης 6 αποαδενυλασών που βρέθηκαν σε δείγματα του πνεύμονα. Επίσης στην Εικόνα 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από μελέτες σε γονίδια που σχετίζονται με τις αποαδενυλάσες ή/και τον καρκίνο του πνεύμονα.



DeAs	PARN	CNOT6	CNOT6L	CNOT7	CNOT8	PAN2
Average	2,20	8,45	0,14	4,00	1,90	10,90

Εικόνα 4: Επίπεδα έκφρασης αποαδενυλασών (● PARN, ◆ CNOT6, ▼ CNOT6L, ■ CNOT7, ▲ CNOT8, ● PAN2) και ο μέσος όρος έκφρασης (—) σε δείγματα από 5 ασθενείς με SCLC. Τα σημεία που εμφανίζονται αντιστοιχούν στο ποσοστό % έκφρασης των αποαδενυλασών στον παθολογικό ιστό σε σχέση με την αντίστοιχη

επί του φυσιολογικού ιστού (Average). Τιμές μεγαλύτερες του 1 (100%) δείχνουν αύξηση της έκφρασης στον παθολογικό ιστό σε σχέση με το φυσιολογικό, ενώ τιμές μικρότερες τις μονάδας μείωση της έκφρασης.

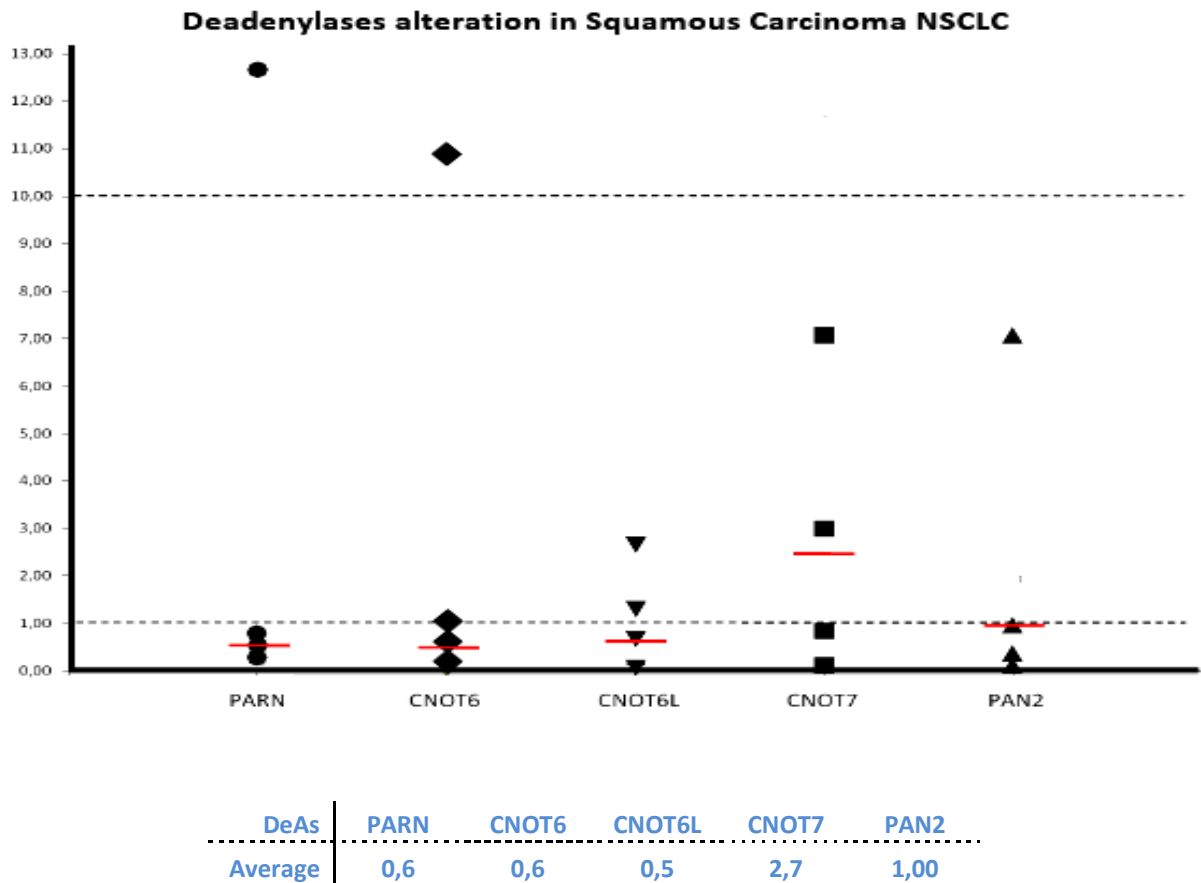


Εικόνα 5: Επίπεδα έκφρασης παραγόντων (● MYC, ◆ K-RAS, ▼ GLUT1, ■ BTG2, ▲ PAPOLA, ● HIF1a) και ο μέσος όρος έκφρασης (—) σε δείγματα από 5 ασθενείς με SCLC. Τα σημεία που εμφανίζονται αντιστοιχούν στην έκφραση των καρκινικών παραγόντων στο παθολογικό ιστό σε σχέση με την έκφρασή τους επί του φυσιολογικού ιστού. Τιμές μεγαλύτερες του 1 δείχνουν αύξηση της έκφρασης στον παθολογικό ιστό σε σχέση με το φυσιολογικό, ενώ τιμές μικρότερες τις μονάδας μείωση της έκφρασης.

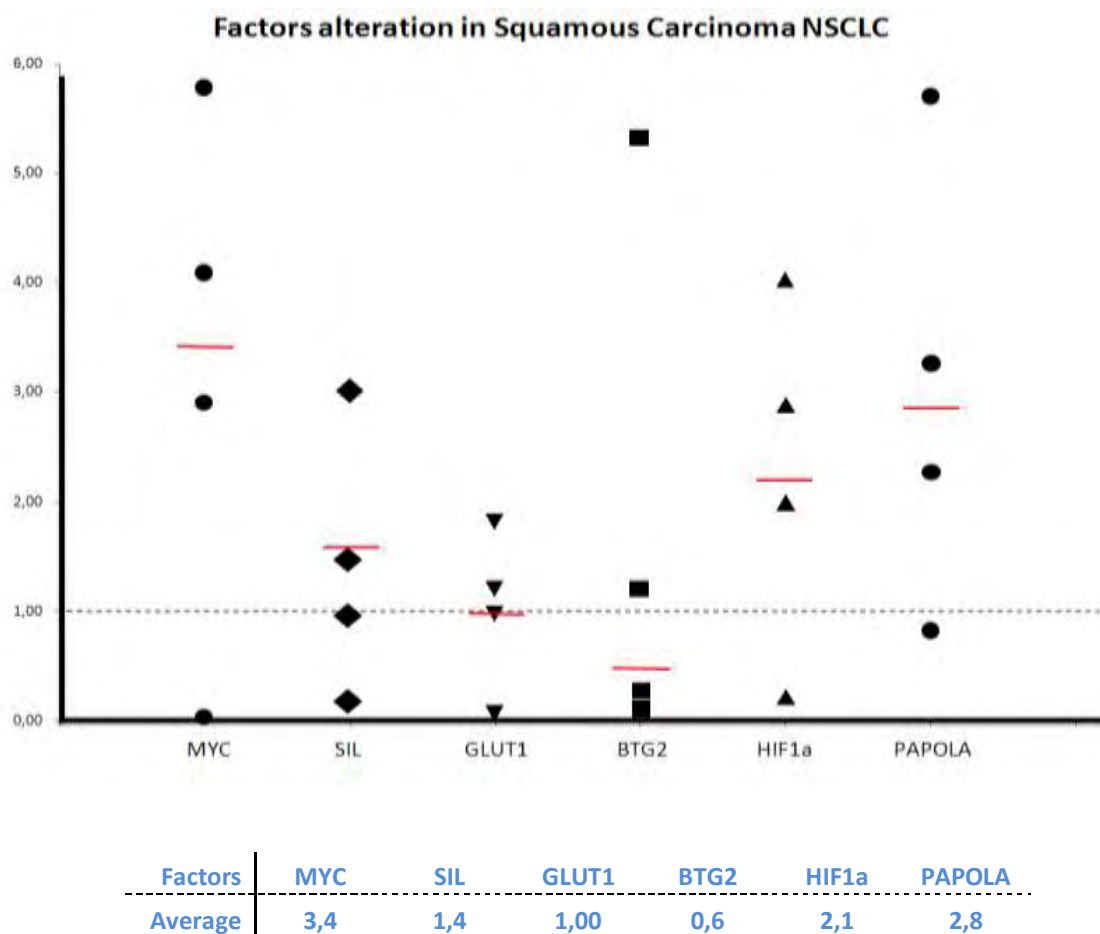
3.2 Επίπεδα έκφρασης mRNA αποαδενυλασών και γονιδίων που σχετίζονται με καρκίνο του πνεύμονα σε ασθενείς με (μη - Μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, N.S.C.L.C) με quantitative Real Time PCR (qRT-PCR).

Επεξεργαστήκαμε συνολικά 4 δείγματα ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα (Squamous cell carcinoma), μία μορφή μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα καθώς και τα δείγματα

παρακείμενου φυσιολογικού ιστού, με τη μέθοδο της Real Time PCR με σκοπό την διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης των αποαδενυλασών και γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα στον παθολογικό ιστό αναφορικά με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασής τους επί του φυσιολογικού ιστού. Τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας παρουσιάζονται στις εικόνες 6 και 7 που ακολουθούν.



Εικόνα 6: Επίπεδα έκφρασης αποαδενυλασών (● PARN, ◆ CNOT6, ▼ CNOT6L, ■ CNOT7, ● PAN2) και ο μέσος όρος έκφρασης (—) σε δείγματα από 4 ασθενείς με NSCLC. Τα σημεία που εμφανίζονται αντιστοιχούν στην έκφραση των αποαδενυλασών στο παθολογικό ιστό σε σχέση με την έκφρασή τους επί του φυσιολογικού ιστού. Τιμές μεγαλύτερες του 1 δείχνουν αύξηση της έκφρασης στον παθολογικό ιστό σε σχέση με το φυσιολογικό, ενώ τιμές μικρότερες τις μονάδας μείωση της έκφρασης.

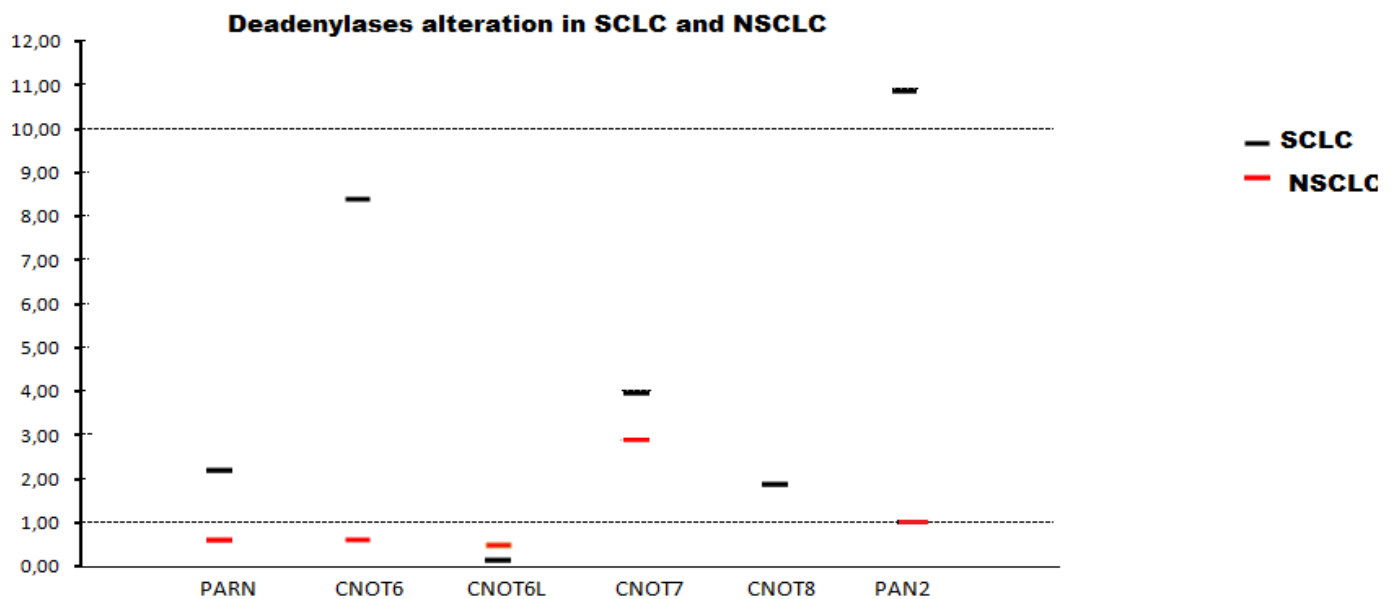


Εικόνα 7: Επίπεδα έκφρασης παραγόντων (● MYC, ◆ SIL, ▼ GLUT1, ■ BTG2, ▲ PAPOLA, ● HIF1a) και ο μέσος όρος έκφρασης (—) σε δείγματα από 4 ασθενείς με NSCLC. Τα σημεία που εμφανίζονται αντιστοιχούν στην έκφραση των αποαδενυλασών στο παθολογικό ιστό σε σχέση με την έκφρασή τους επί του φυσιολογικού ιστού. Τιμές μεγαλύτερες του 1 δείχνουν αύξηση της έκφρασης στον παθολογικό ιστό σε σχέση με το φυσιολογικό, ενώ τιμές μικρότερες τις μονάδας μείωση της έκφρασης.

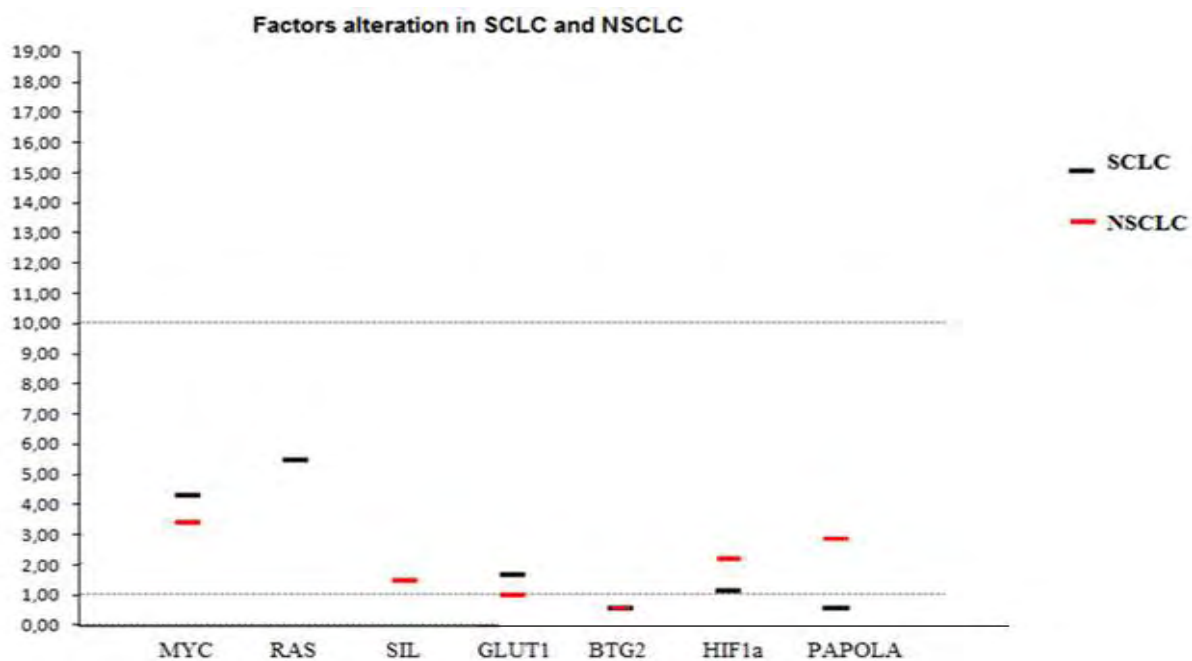
3.3 Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης αποαδενυλασών και γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα μεταξύ των δύο βασικών τύπων καρκίνου του πνεύμονα (S.C.L.C και N.S.C.LC)

Οι εικόνες 8 και 9 που ακολουθούν παρουσιάζουν συγκριτικά τις διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των αποαδενυλασών και καρκινικών παραγόντων, αντίστοιχα μεταξύ του Μικροκυτταρικού και του μη – Μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (squamous cell carcinoma). Οι δείκτες που

σημειώνονται με διαφορετικά χρώματα στις δύο εικόνες αντιστοιχούν στην κατα μέσο όρο έκφραση του εκάστοτε παράγοντα που εμφανίζεται σε κάθε ομάδα ασθενών.



Εικόνα 8: Συγκριτική απεικόνιση των αποτελεσμάτων που αφορούν τα επίπεδα έκφρασης των αποαδενυλασών για κάθε ομάδα ασθενών με Μικροκυτταρικό και μη- Μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.



Εικόνα 9: Συγκριτική απεικόνιση των αποτελεσμάτων που αφορούν τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα για κάθε ομάδα ασθενών με Μικροκυτταρικό (-) και μη- Μικροκυτταρικό καρκίνο (-) πνεύμονα.

4. Συζήτηση

Η απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης αποτελεί χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων. Η καρκινογένεση σχετίζεται με την υπερέκφραση ογκογονιδίων που προσδίδει στο κύτταρο αυτοεπάρκεια σε αυξητικά σήματα, και με την μειωμένη έκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων που οδηγεί στην απώλεια ευαισθησίας του κυττάρου σε αντι-αυξητικά σήματα. Μελέτες τα τελευταία δέκα χρόνια έχουν αποκαλύψει την σημαντικότητα του μετα-μεταγραφικού μηχανισμού ωρίμανσης του mRNA στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης και ειδικά στο αποφασιστικό πεδίο της αποικοδόμησης του mRNA. Το πρώτο και καθοριστικό βήμα στην αποικοδόμηση των ευκαρυωτικών mRNAs αποτελεί η απομάκρυνση της poly(A) ουράς από τις αποαδενυλάσεις. Η πολυ(A) ουρά προστίθεται κατ' αρχήν στον πυρήνα, και στα θηλαστικά έχει ένα αρχικό μήκος 250 – 300 νουκλεοτιδίων αδερίνης. Παρόλα αυτά, το μήκος της ουράς δεν μένει σταθερό, αλλά υπόκειται σε δυναμικές αλλαγές. Στον πυρήνα, η αποαδενυλίωση των νεοσυντιθέμενων mRNAs, περιορίζει τις πολυ(A) ουρές στα κατάλληλα μήκη τους (βράχυνση της ουράς), ενώ στο κυτταρόπλασμα η εκτεταμένη αποαδενυλίωση των mRNAs σηματοδοτεί την αποικοδόμησή τους ή τη μεταφραστική καταστολή τους. Η ρύθμιση της αποαδενυλιωτικής δραστηριότητας είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο, διότι τα ασταθή και ελαττωματικά mRNAs πρέπει να αποικοδομηθούν ενώ τα σταθερά να προστατευθούν από την αποαδενυλίωση. Τα ένζυμα που καταλύουν την βράχυνση/απομάκρυνση των ουρών είναι γνωστά ως αποαδενυλάσες.

Παλαιότερες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό μας σε ασθενείς με λευχαιμίες έδειξαν ότι η έκφραση ορισμένων αποαδενυλασών όπως της PARN και της CNOT7 μεταβάλλεται μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων, υπαινίσσοντας πως τα ένζυμα αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρωματικοί βιοδείκτες και πιθανόν ως χρήσιμα εργαλεία μελέτης της προόδου της θεραπείας (*Maragozidis et al., submitted*). Επιπλέον έχει αποδειχθεί σε δημοσιευμένες μελέτες ότι ο αντιπολλαπλασιαστικός παράγοντας BTG2 αλληλεπιδρά με τις αποαδενυλάσες CNOT7 (Caf1a) και CNOT8 (caf1b), προάγοντας την αποαδενυλιωτική δραστηριότητα (*Mittal et al., 2010*).

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε με τη μέθοδο της Real Time PCR, τα επίπεδα έκφρασης των αποαδενυλασών PARN, PARNL, CNOT6, CNOT6L, CNOT7, CNOT8 και PAN2 σε παθολογικά και φυσιολογικά δείγματα ασθενών με Μικροκυτταρικό (S.C.L.C) και μη-Μικροκυτταρικό (N.S.C.L.C) καρκίνο του πνεύμονα. Παράλληλα στα δείγματα αυτά διερευνήθηκε και η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τις δύο βασικές μορφές καρκίνου του πνεύμονα. Στις εικόνες 4 και 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν την έκφραση των αποαδενυλασών σε πέντε ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και σε τέσσερις ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό

καρκίνο του πνεύμονα (πλακώδες καρκίνωμα).

Στις εικόνες 8 και 9 απεικονίζονται συγκριτικά οι μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των αποαδενυλασών και καρκινικών παραγόντων ανάμεσα στους δύο τύπους καρκίνου του πνεύμονα (S.C.L.C) και (N.S.C.L.C). Η PARN παρουσιάζει αυξημένη έκφραση έως 2 φορές στα παθολογικά δείγματα ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνο ενώ η έκφρασή της μειώνεται στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα. Επίσης τα επίπεδα έκφρασης των CNOT6 και PAN2 διαφοροποιούνται σημαντικά ανάμεσα στους δύο τύπους καρκίνου, εμφανίζοντας αύξηση στο Μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και μείωση στο Πλακώδες καρκίνωμα. Η CNOT6L παρουσιάζει σχετικά χαμηλή έκφραση στους δύο τύπους καρκίνου, ενώ η CNOT7 εκφράζεται σημαντικά τόσο στο μικροκυτταρικό όσο και στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Τέλος η CNOT8 εμφανίζει ήπια αύξηση στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, ενώ δεν εκφράζεται καθόλου στο πλακώδες καρκίνωμα.

Επίσης μελετήσαμε την έκφραση επιλεγμένων παραγόντων που εμπλέκονται σε σημαντικά μονοπάτια στο κύτταρο, καθώς και σε ογκογονίδια και καταστολείς ογκογονιδίων. Το ογκογονίδιο MYC το οποίο ενεργοποιείται σε μία ποικιλία νεοπλασμάτων διεγείροντας την κυτταρική διαίρεση εκφράζεται σημαντικά και στις δύο μορφές καρκίνου του πνεύμονα, ωστόσο στον Μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα η έκφρασή του είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με το πλακώδες καρκίνωμα. Το ογκογονίδιο K-RAS ρυθμίζει πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση, αγγειογένεση, απόπτωση και σύμφωνα με βιβλιογραφικά στοιχεία εκφράζεται σε ποσοστό <1% στον S.C.L.C και 15-20% στον N.S.C.L.C. Στα αποτελέσματα που λάβαμε το συγκεκριμένο ογκογονίδιο εμφανίζει υψηλή έκφραση στον S.C.L.C, αλλά δεν εκφράζεται στον N.S.C.L.C. Το ογκογονίδιο SIL το οποίο έχει αναφερθεί σε δημοσιευμένες μελέτες ότι υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του πνεύμονα (*Ayelet et al. 2004*) με βάση τα αποτελέσματα που πήραμε εκφράζεται σημαντικά στο μόνο πλακώδες καρκίνωμα (N.S.C.L.C).

Τα επίπεδα έκφρασης του GLUT-1 που κωδικοποιεί μεταφορείς γλυκόζης και του HIF1a παράγοντα που εκφράζεται σε συνθήκες υποξίας έχουν βρεθεί αυξημένα σε πολλούς τύπους νεοπλασιών όπως στον καρκίνο του μαστού. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας ο παράγοντας GLUT-1 εμφανίζει σχετικά υψηλή έκφραση στον S.C.L.C, ενώ βρίσκεται σε σταθερά επίπεδα στον N.S.C.L.C. Αντίθετα ο παράγοντας HIF1a παρουσιάζει αυξημένη έκφραση στον N.S.C.L.C και σταθερή έκφραση στον S.C.L.C. Ο αντιπολλαπλασιαστικός παράγοντας BTG2 εμφανίζει χαμηλά επίπεδα έκφρασης και στις δύο μορφές, γεγονός που προκαλεί έκπληξη λόγω της αυξημένης έκφρασης των αποαδενυλασών CNOT7 και CNOT8, με τις οποίες αλληλεπιδρά.

Πολύ σημαντική είναι επίσης η μελέτη των επιπέδων έκφρασης της πολυ(Α) πολυμεράσης,

PAPOLA, που προσθέτει την πολύ(A) ουρά, και απαντά σε πολλαπλές μορφές σε καρκινικά κύτταρα. Η έκφρασή της εμφανίζει διαφορετικό προφίλ έκφρασης, με ήπια αύξηση στο πλακώδες καρκίνωμα και μείωση στο Μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν πως η έκφραση των αποαδενυλασών αλλάζουν στον καρκίνο του πνεύμονα. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι σημαντικές γιατί μπορεί να σχετίζονται άμεσα με τις αλλαγές που κάναμε στην έκφραση άλλων κρίσιμων παραγόντων, όπως ογκογονιδίων και βιοδεικτών στον καρκίνο του πνεύμονα. Σε συνδυασμό με προηγούμενες παρατηρήσεις του εργαστηρίου που είναι υπό κρίση για δημοσίευση, υποστηρίζουν την ιδέα ότι οι αποαδενυλάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου. Θα μπορούσαν λοιπόν τα ένζυμα αυτά να εξετασθούν περεταίρω για να χρησιμοποιηθούν ως βοηθητικοί βιοδείκτες, ή ακόμη και για την παρακολούθηση της εξέλιξης των θεραπευτικών σχημάτων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alberts, B. (1998), Essential cell biology and introduction to the molecular biology of cell (New York: Garland Pub).

American Cancer Society Tumor Markers. Available online at http://www.cancer.org/docroot/PED/content/PED_2_3X_Tumor_Markers.asp?sitearea=PED through <http://www.cancer.org>. Accessed Oct 15 2009.

Erez A, Perelman M, Hewitt SM, Cojacularu G, Goldberg I, et al. (2004). Sil overexpression in lung cancer characterizes tumors with increased mitotic activity. *Oncogene* 23: 5371–5377.

Ballesta AM, Torre GC, Bombardieri E, Gion M, Molina R. (1993). Up Dating of Tumor Markers in Tissues and in Biological Fluids”. Edizioni Minerva Medic

Buccheri G, Ferrigno D, (1988). Usefulness of tissue polypeptide antigen in staging, monitoring and prognosis of lung cancer, *Chest* 93 (3): 565 – 570.

Cho EJ, Takagi T, Moore CR and Buratowski S, (1997). mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* 11:3319–3326.

D'Alessio G and Riordan JF,(1997). Ribonucleases: Structures and Functions, Academic Press.

Ebert W, Kayser K, Buelzebruck H, Vogt-Moykopf I, (1988). Diagnostic validity of the SCC antigen assays in squamous cell carcinomas of the lung. *J Tumor Marker Oncol* 3(1): 35-44, 1988.

Fabienne Mauxion, Céline Faux and Bertrand Séraphin,(2008). The BTG2 protein is a general activator of mRNA deadenylation. *Nature*

Petra Stieber, H. Dienemann, Ute Hasholzner, C. Müller, Susanne Poley, Karin Hofmann and A. Fateh-Moghadam (1993). Comparison of cytokeratine fragment 19 (CYFRA 21-1), tissue polypeptide antigen (TPA) and tissue polypeptide specific antigen (TPS) as tumor markers in lung cancer. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*; 689-694

Garneau NL., Wilusz J, Wilusz CJ (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 113-126.

Goldstrohm A and Wickens M. (2008). Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nature Rev Mol Cell Biol.*; 9:337-344

Hensen M: (1991). Serum tumor markeres in lung cancer . *Scand J Clin Labor Invest* 206 (Suppl): 93 – 101.

<http://www.jamesdisabilitylaw.com/lung-disease.htm>

Holzmann J. Frank P., Löffler E., Bennett K., Gerner C. & Rossmanith W. (2008). RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell*, 135 : 462–474.

Knoo, SK, Mackay CV: Carcinoembryonic antigenic activity of tissue extracts. 1973.

A quantitative study of malignant and bening neoplasms, cirrhotic liver, normal abult and fetal organs. *Int J Cancer* 11: 681 – 687,

Kto H, Torigoe T. (1977). Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamus

cell carcinoma. Cancer 40: 1621 – 1628 ,

Laurence DJR, Neville AM (1972). Foetal antigens and their role on the diagnosis and clinical management of human neoplasms (review). Br J Cancer 26: 335 – 355.

Lewin, (2004) , Genes VIII, Pearson Education.

Lurie BB, Lowenstein MS, Zamcheck N (1974). Elevated carcinoembryonic antigen in benign biliary obstruction. Clin Res 22: 363A.

Maragozidis P., Karangeli M., Papaspyrou K., Labrou M., Dimoulou, G., Salataj E., Stathopoulos C, Pournaras S, Matsouka P., Gourgoulisanis KI., Balatsos NAA. Aberrant expression of deadenylases as a potential biomarker for acute leukemias. *Υποβλήθηκε προς κρίση.*

Mino N. , Lio A. Hamamoto K: (1988). Availability of tumor antigen 4 as a marker of squamous cell carcinoma of the lung and other organs. Cancer 62: 730 -734.

Parker & Haiwei Song (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. Nature Structural & Molecular Biology 11, 121 - 127

Primack A: (1974).The production of markers by bronchogenic carcinoma (review). Semin Oncol 1(3): 235-244, (abstract).

Sandaltzopoulos, R. Xatzaki, Aik (2004). Oncogenes and cancer. In Genes VIII, B. Lein, ed. (Upper Saddle river, NJ: Pearson Prentice Hall , pp. 1243-1309

Sasho Z. Panov, (2005;). Molecular biology of the lung cancer, Laboratory for Molecular Biology, Institute of Biology, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, “Ss. Cyril and Methodius” University, Skopje, Republic of Macedoni, Radiol Oncol 39(3): 197-210,(review)

Stieber P, Zimmermann A, Reinmiedl J, Muller C, Hoffmann H, Dienemann H. CYFRA 21-1 in the early diagnosis of recurrent disease in non-small cell lung carcinomas (NSCLC). Anticancer Res 1999; 19:2665-2668

Liam P. Keegan, Angela Gallo & Mary A. O'Connell (2001). The many roles of mRNA editor, Nature Reviews Genetics 2, 869-878

Tian B, Hu J, Zhang H, Lutz CS (2005). A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes, Nucleic Acids Res, 33:201-212

Wan-Cheol Kim, Chow H. Lee, (2009), The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer, Elsevier, Biochimica et Biophysica Acta 1796 : 99-113.

<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Endonucleolyticcleavage.jpg>

B. Βυλλιώτου «Δείκτες καρκίνου: Γενικά χαρακτηριστικά-Ταξινόμηση- Εργαστηριακή αξιολόγηση. Σελ.45-66

Κείμενο διάλεξης με τίτλο “ Γενετικοί προδιαθεσικοί παράγοντες στον καρκίνο του πνεύμονα” Συμπόσιο Κλινικής Ογκολογίας Δυτικής Ελλάδος (17 – 18 Απριλίου 2004) από το Διευθυντή Β' Τμήματος Παθολογικής Ογκολογίας του Ογκολογικού Νοσοκομείου Κηφισιάς “ Άγιοι Ανάργυροι”, Γεράσιμο Ηλία Πανάγο

Παπαδάκου Μ., Κλινική Ογκολογία, Τόμος Α', 1η έκδοση, Αθήνα – Μάρτιος 2007: 127 – 137

Πατακάς Δημήτρης Α., Ιστοπαθολογία καρκίνου του πνεύμονα και Σταδιοποίηση, Επίτομη Πνευμονολογία, εκδότης: University Studio Press (2006): 301 – 303

