



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής Κωνσταντίνος Ι. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ

Διδακτορική Διατριβή

**" Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΩΝ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ
ΠΝΕΥΜΟΝΑ "**

υπό

ΙΩΑΝΝΑΣ ΚΟΚΚΟΡΗ

Πνευμονολόγου-φυματιολόγου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων
για την απόκτηση του Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2022

© 2022 Ιωάννα Κόκκορη

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Φθάνοντας στο τέλος ενός επίπονου και συναρπαστικού ταξιδιού όπως είναι η εκπόνηση μιας διατριβής, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν και με στήριξαν.

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και ειδικά τους καθηγητές κ. Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη και τον κ. Νικόλαο Μπαλατσό που μου εμπιστεύθηκαν την ανάθεση της Διατριβής και τον κ. Σωτήριο Ζαρογιάννη για τη βοήθεια που μου πρόσφερε για την εκπόνησή της.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τα μέλη του Εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και ιδιαίτερα τον Παναγιώτη, το Διονύση και το Θάνο που μου πρόσφεραν την πολύτιμη συνεργασία τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον ιατρό Άντζελ Ιακώβ, τέως διευθυντή μου στην Πνευμονολογική-Ογκολογική κλινική του Θεαγενείου για την αμέριστη βοήθεια του και την πολύτιμη παρουσία του δίπλα μου, ως δασκάλου και ως επιστήμονα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης, την κ. Θεοδώρα Κερενίδη που μου συμπαραστάθηκε στα πρώτα μου βήματα στο δύσκολο αυτό έργο.

Φυσικά, ευχαριστώ την οικογένεια μου που ξεπέρασαν τις δυσκολίες και τις υποχρεώσεις που συνεπάγεται η εκπόνηση μιας διατριβής και στάθηκαν δίπλα μου με κατανόηση.

" Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΑΔΕΝΥΛΑΣΩΝ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ

ΠΝΕΥΜΟΝΑ

ΙΩΑΝΝΑ ΚΟΚΚΟΡΗ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Δρ. Νικόλαος Α.Α. Μπαλατσός**, *Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων)*
- 2. Δρ. Κωνσταντίνος Ι. Γουργουλιάνης**, *Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*
- 3. Δρ. Ζωή Δανιήλ**, *Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

- 1^{ος} Εξεταστής (Επιβλέπων)** Δρ. Νικόλαος Α.Α. Μπαλατσός
Επίκουρος Καθηγητής, Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2^{ος} Εξεταστής** Δρ. Ζωή Δανιήλ
Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3^{ος} Εξεταστής** Δρ. Κωνσταντίνος Ι. Γουργουλιάνης
Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 4^{ος} Εξεταστής** Δρ. Χρυσή Χατζόγλου
Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5^{ος} Εξεταστής** Δρ. Σωτήρης Ζαρογιάννης
Αν. Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6^{ος} Εξεταστής** Δρ. Αθανάσιος Κωτσάκης
Αν. Καθ. Παθολογίας-Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7^{ος} Εξεταστής** Δρ. Ιωάννης Πανταζόπουλος
Επ. Καθ.Επείγουσας Ιατρικής, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	9
ABSTRACT	24
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	25
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	26
Επιδημιολογία	26
Αιτιοπαθογένεια και μοριακές αλλαγές	28
Μοριακή βιολογία	29
Καρκινικοί δείκτες	32
Ρόλος του Ki-67	33
Κλινική εικόνα	33
Σταδιοποίηση	35
Προγνωστικοί παράγοντες	37
Θεραπεία	37
Θεραπεία περιορισμένης νόσου	37
Θεραπεία εκτεταμένου σταδίου	38
Στοχευμένη θεραπεία	38
Αναστολείς αγγειογένεσης	39
Ανοσοθεραπεία	39

Θεραπεία εξωπνευμονικού μικροκυτταρικού καρκίνου _____	39
Επιβίωση _____	39
Σύνθεση του RNA και μετάφραση του _____	40
Αποικοδόμηση του mRNA _____	43
Απαδενυλάσες _____	44
Δομή και λειτουργία του συμπλόκου CCR4-NOT _____	47
Το σύμπλοκο PAN2/PAN3 _____	49
Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN) _____	50
Απαδενυλάσες και παθήσεις του πνεύμονα _____	55
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ _____	56
Σκοπός της Διατριβής _____	56
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ _____	57
Ασθενείς _____	57
Αντιδραστήρια _____	58
Εκκινητές _____	60
Απομόνωση ολικού RNA _____	61
TRI Reagent (SIGMA) Protocol _____	62
Real Time PCR δύο βημάτων (two-step Real Time PCR, qRT-PCR) _____	62
Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά _____	65

Αποτελέσματα	<hr/>	66
Συζήτηση		83
Συμπεράσματα		94
Βιβλιογραφία		96

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

ΙΩΑΝΝΑ ΚΟΚΚΟΡΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ

ΤΗΛΕΦΩΝΟ ΟΙΚΙΑΣ

ΤΗΛΕΦΩΝΟ ΚΙΝΗΤΟ

ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ

ΥΠΗΚΟΟΤΗΤΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Από 21-08-2020 ως σήμερα

Υπηρετώ στην Α Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική του νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ ως ιατρός Διευθύντρια ΕΣΥ.

Υπηρετώ ως επιμελήτρια Α' σε θέση κλάδου ιατρών ΕΣΥ στην

Πνευμονολογική Ογκολογική Κλινική του Α.Ν.Θ Θεαγενείου .

Μονιμοποιήθηκα σε θέση κλάδου

ιατρών ΕΣΥ στις 23/06/2016 με την

αρ. 8836 απόφαση του υπουργείου

υγείας **μετά από αξιολόγηση και**

θετικές εισηγήσεις δύο (2)

εισηγητώνεκ των οποίων ο ένας

ήταν ο διευθυντής του τμήματος .

Από 25-06-14 έως 20-08 2020

Από 16-7-09 έως 15-07-10

Υπηρετήσα ως επιμελήτρια Β' σε θέση κλάδου ιατρών ΕΣΥ στην Πνευμονολογική Ογκολογική Κλινική του Α.Ν.Θ.ΘΕΑΓΕΝΕΙΟΥ και υπεύθυνη του αντικαπνιστικού ιατρείου του Α.Ν.Θ.ΘΕΑΓΕΝΕΙΟΥ.

Από 16-05-09 έως 15-07-09

Υπηρετήσα ως επικουρική ιατρός ειδικός πνευμονολόγος της Πνευμονολογικής Ογκολογικής Κλινικής και του Βρογχοσκοπικού τμήματος και υπεύθυνη του αντικαπνιστικού ιατρείου του Α.Ν.Θ. ΘΕΑΓΕΝΕΙΟ.

Από 05-05-08 έως 04-05-09

Υπηρετήσα ως επιστημονική συνεργάτης της Πνευμονολογικής-Ογκολογικής Κλινικής και του Βρογχοσκοπικού Τμήματος και υπεύθυνη του αντικαπνιστικού ιατρείου του Α.Ν.Θ. Θεαγένειο.

Υπηρετήσα ως επικουρική ιατρός ειδικός πνευμονολόγος της Πνευμονολογικής Ογκολογικής Κλινικής και του Βρογχοσκοπικού τμήματος και υπεύθυνη αντικαπνιστικού ιατρείου του Α.Ν.Θ. ΘΕΑΓΕΝΕΙΟ με έκθεση αξιολόγησης «Άριστα

	<p>Συνολική εμπειρία περίπου 13 έτη στην Πνευμονολογική – Ογκολογική Κλινική του Α.Ν.Θ Θεαγένειο. Σε όλο το προηγηθέν διάστημα οι ετήσιες εκθέσεις αξιολόγησης μου ήταν <u>άριστες από δύο(2) βαθμολογητές εκ των οποίων ο ένας ήταν ο διευθυντής.</u></p>
<p><i>Από 13-11-06 έως 12-11-07</i></p>	<p>Υπηρέτησα ως επικουρική ιατρός, ειδικός πνευμονολόγος του Νοσοκομείου Παπανικολάου. Με απόφαση της διοίκησης του νοσοκομείου, αριθμός πρωτ. 23640, <u>κάλυπτα και τις ανάγκες του αντιφυματικού ιατρείου.</u></p>
<p><i>01-01-07 ως 31-05-07</i></p>	<p>Ως επικουρική ιατρός, συμμετείχα στο πρόγραμμα δραστηριοτήτων της Α' Πνευμονολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου Παπανικολάου (ενεργείς εφημερίες, κλινικό έργο νοσηλευόμενων ασθενών).</p>
<p>24-07-06</p>	<p>Τίτλος ειδικότητας Πνευμονολογίας-Φυματιολογίας.</p>
<p><i>29-06-2002 έως 03-05-06</i></p>	<p>Ειδικευόμενη Α' Κλινικής Εντατικής Θεραπείας του νοσοκομείου «Ευαγγελισμός».</p>
<p><i>19-03-01 ως 28-06-02</i></p>	<p>Ειδικευόμενη Β' Προπαιδευτικής</p>

	Παθολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών.
01-05-00 ως 30-11-00	<u>Επιστημονικός συνεργάτης της</u> <u>Πνευμονολογικής Κλινικής</u> <u>Περιφερειακού Πανεπιστημιακού</u> <u>Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.</u>
19-2-1999 ως 18-2-00	Υπηρεσία Υπαιθρου
19-12-98 ως 18-2-99	Τρίμηνη άσκηση στο Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας.
13-08-1998	Άδεια ασκήσεως επαγγέλματος
20-07-1998	Πτυχίο ιατρικής σχολής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ) Βαθμός πτυχίου: Λίαν Καλώς -8-
<u>ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΕΡΓΟ</u>	
Ως εκπαιδευόμενη	Έχω παρακολουθήσει περί τα εβδομήντα (70) ιατρικά συνέδρια που αφορούν σε πνευμονολογικά νοσήματα με ιδιαίτερη έμφαση στην ογκολογία του πνεύμονα. 1.Ομιλήτρια με θέμα:Εισαγωγική θεραπεία στον τοπικά προχωρημένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα: ενδείξεις και σύγχρονες

κατευθυντήριες οδηγίες που πραγματοποιήθηκε στην Κατερίνη στις 29-09-2018

2.Ομιλήτρια με θέμα σεμινάριο εξειδικευμένης θωρακοχειρουργικής χειρουργικοί προβληματισμοί και δύσκολες αποφάσεις στη χειρουργική του καρκίνου του πνεύμονα στις 15 Δεκεμβρίου 2017 στη Θεσσαλονίκη

3.Ομιλήτρια στο συνέδριο με θέμα Καρκίνος πνεύμονα-πρόληψη συνοσηρότητα-θεραπευτικές προσεγγίσεις που διεξήχθη στις 27-28 Μαΐου 2016 στην Έδεσσα.

4.Ομιλήτρια στο συνέδριο Πρόληψη και θεραπευτικές προσεγγίσεις στον καρκίνο πνεύμονα που διεξήχθη στις 22-23 Απριλίου 2016 στα Τρίκαλα.

5. Ομιλήτρια στην επιστημονική εκδήλωση «Πρόληψη και θεραπευτικές προσεγγίσεις του καρκίνου πνεύμονα στην Καστοριά» στις 19 Δεκεμβρίου 2015.

6.Ομιλήτρια στην επιστημονική εκδήλωση «Πρόληψη και θεραπεία του καρκίνου πνεύμονα» που διεξήχθη στην Κατερίνη στις 2-3 Οκτωβρίου 2015

7.Ομιλήτρια στην επιστημονική εκδήλωση με θέμα :Πρόληψη και θεραπεία καρκίνου πνεύμονα στις 27-28 Μαρτίου 2015 στο Κιλκίς.

8.Ομιλήτρια στις εργασίες της

Ως εκπαιδευτής

ημερίδας «Τα απαραίτητα για τον καρκίνο του πνεύμονα για τον ειδικό και μη ειδικό ιατρό» που διεξήχθη στις 12 Δεκεμβρίου 2014 στη Θεσσαλονίκη.

9. Ομιλήτρια στο 22ο πανελλήνιο πνευμονολογικό συνέδριο στις 6 Δεκεμβρίου 2013 στην Αθήνα με θέμα "Η έκφραση των απαδενυλασών στο μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα.

10. Ομιλήτρια στο συνέδριο Περιβάλλον, Κάπνισμα και καρκίνος πνεύμονα' στις 31 Μαρτίου 2013 στη Δράμα.

11. Ομιλήτρια στο 1ο πανελλήνιο συνέδριο Ελληνικής και Διεθνούς Εταιρίας Μοριακής και Γονιδιακής Ιατρικής και Έρευνας στις 12 Οκτωβρίου 2012 με θέμα Διαγνωστική Προσπέλαση - Σταδιοποίηση καρκίνου πνεύμονα.

12. Ομιλήτρια στο 20 ΓΕΛ Σταυρούπολης για την καπνιστική συνήθεια και την παρουσίαση των συνεπειών της.

13. Ομιλήτρια στις εργασίες της Δημερίδας Περιβάλλον Κάπνισμα και Καρκίνος Πνεύμονα στις 21-22 Μαΐου 2011 με θέμα Μεσοθηλίωμα. Ομιλήτρια στην Ογκολογική Δημερίδα με θέμα Νευροενδοκρινή Νεοπλασμάτα

στις 28-28 Ιανουαρίου 2011.

14. Ομιλήτρια στη Δημερίδα
Περιβάλλον Κάπνισμα και
Καρκίνος Πνεύμονα στις 25-26
Σεπτεμβρίου 2010.

15. Ομιλήτρια στο Θεαγένειο με
θέμα Οξεία Αναπνευστική
Ανεπάρκεια στις 17-9-2010.

16. Συμμετείχα ως ομιλήτρια στις
εργασίες της Δημερίδας «Περιβάλλον
Κάπνισμα και Καρκίνος Πνεύμονα»
της Πνευμονολογικής – Ογκολογικής
Κλινικής του Α.Ν.Θ. ΘΕΑΓΕΝΕΙΟΥ
με θέμα «Σπάνιοι όγκοι πνεύμονα-
θώρακα».

17. Ομιλήτρια στις εργασίες του
Συμποσίου Φυματίωσης που
διεξήχθη στις 24 Μαρτίου 2007 στη
Θεσσαλονίκη, με θέμα:
«Αντιμετώπιση ατόμων στενής επαφής
με ανθεκτική φυματίωση»
Εμπειρία στις βρογχοσκοπήσεις
όπως πιστοποιείται από τα κάτωθι
πιστοποιητικά:

A) Από τον καθηγητή Χαρ. Ρούσο,
Διευθυντή της Α' Κλινικής Εντατικής
Θεραπείας.

B) Από τον καθηγητή και πρύτανη
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Κων/νο
Γουργουλιάνη.

Γ) Από το Διευθυντή
Πνευμονολογικής και Ογκολογικής
Κλινικής – βρογχοσκοπικού

τμήματος Α.Ν.Θ. Θεαγενείου Αντζέλ Ιακώβ. Όπως πιστοποιείται από τα πρακτικά του βρογχοσκοπικού τμήματος, συμμετείχα σε εκατοντάδες βρογχοσκοπήσεις με συνεχή παρουσία σε ετήσια βάση. Προγράμματα ενημέρωσης κοινού και ελέγχου φυματίωσης σε σχολείο και σχολές (Οδοντιατρική Σχολή Α.Π.Θ.) στα πλαίσια υπηρεσίας μου ως επικουρική ιατρός, ειδικός πνευμονολόγος στο Αντιφυματικό ιατρείο.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ

Εκπονώ **διδακτορική διατριβή** στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Θεσσαλίας με υπεύθυνο καθηγητή τον κ.Κ.Γουργουλιάνη με τίτλο **‘Η έκφραση των απαδενυλασών στο μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα’** της οποίας τα πρώτα αποτελέσματα ανακοινώθηκαν στο 22ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο που διεξήχθη στην Αθήνα στις 5-7 Δεκεμβρίου 2013.

Δημοσίευση στο διεθνές περιοδικό **Molecular Cancer** στις 5 Νοεμβρίου 2015 με θέμα: Poly(A) – specific ribonuclease and Nocturnin in squamous cell lung cancer prognostic value and impact on gene expression.

Η εργασία βραβεύθηκε στο 25^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο με το 2^ο Βραβείο Καλύτερης Εργασίας που δημοσιεύθηκε σε διεθνές περιοδικό κατά την περίοδο 1^η Νοεμβρίου 2015 έως 31^η Μαΐου 2016.

Συμμετείχα στο 22 Πανελλήνιο πνευμονολογικό συνέδριο με προφορική ανακοίνωση με θέμα: Η ανάγκη-ως πρωτόκολλο-διενέργειας βρογχοσκοπικού ελέγχου πριν από κάθε θωρακοχειρουργική επέμβαση, που διεξήχθη στις 5-7 Δεκεμβρίου 2013 στην Αθήνα.

Δημοσίευση στο περιοδικό **Journal of Thoracic Diseases** στις 08-11-2012 με θέματα:

1. Unusual intrabronchial location, large in size, of hamartoma in a patient with a mass in the left lung.
2. Diagnostic value of urine cytology in differential diagnosis in relapsed lung cancer to renal cell carcinoma.
3. Rare case of granular cell tumor of the lung in a patient with multiple endocrine neoplasia syndrome and mass of the left lung.
4. Metastatic formation of scalp as a first symptom in a patient with squamous cell lung cancer.

Συμμετείχα στο 20 Πανελλήνιο Συνέδριο Θώρακος που έγινε στην

Αθήνα στις 24-27 Νοεμβρίου 2011
με θέματα:

1 Στοματική μετάσταση γλώσσας σε
καρκίνο πνεύμονα

2 Ασυνήθης μακρά επιβίωση
ασθενούς με κακοήγη περικαρδιακή
συλλογή από Ca πνεύμονα.

3 Καρκίνος πνεύμονα και
ενδομυελικές μεταστάσεις νωτιαίου
μυελού.

4 Αμφοτερόπλευρες μασχάλιαιες
λεμφαδενικές μεταστάσεις κατά την
πρώτη διάγνωση του καρκίνου
πνεύμονα.

Συμμετείχα στο Πανελλήνιο
Ογκολογικό Συνέδριο που έγινε στην
Αθήνα τον Οκτώβριο του 2011 με
θέμα Καπνιστική Συνήθεια σε
καπνιστές με καρκίνο πνεύμονα μετα
τη διάγνωση της νόσου.

Συμμετείχα στο 9 πανελλήνιο
συνέδριο κλινικής κυτταρολογίας
που έγινε στις 27-29 Μάη 2011 στην
Αθήνα με θέμα Μεταστατικά Οζίδια
Κεφαλής από Αδενοκαρκίνωμα
Ενδομητρίου-Ενδιαφέρον
Περιστατικό.

Συμμετείχα στο 3 Συμπόσιο Ομάδας
Εργασίας Εταιρίας Χειρουργών
Θώρακος που έγινε στις 8-10
Απριλίου 2011 με θέμα Χειρουργική
αντιμετώπιση **Ογκων Pancoast που
έλαβε έπαινο.**

Δημοσίευση στο **Journal of**

Cardiothoracic Surgery με θέμα Πρωτοπαθές γλομαγγειοσάρκωμα πνεύμονα A case report. Vol 5 page 76 ,2010.

Συμμετείχα στο συνέδριο με θέμα Καρκίνος Πνευμονα που έγινε στο συνέδριο Καρκίνος πνεύμονα στην Κέρκυρα στις 10-13 Ιουνίου 2010 με θέματα ως αναρτημένη ανακοίνωση

1 Πρωτοπαθής φυματιώδης οστεομυελιτιδα στέρνου

Εντυπωσιακά καλή ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία ασθενούς με οξεία ηπατική ανεπάρκεια από μεταστατικό καρκίνο πνεύμονα.

Πρόδρομα αποτελέσματα μελέτης μέσης επιβίωσης ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα και σύγχρονες εγκεφαλικές μεταστάσεις.

Συμμετείχα στο 18^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος στις 26 – 29 Νοεμβρίου 2009 και στο 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ογκολογίας με θέμα :« Στοχεύοντας την εξατομικευμένη, πολύπλευρη αντιμετώπιση του ογκολογικού ασθενή» που διεξήχθη στις 13 – 15 Νοεμβρίου 2009 στην Αθήνα με 6 εργασίες (αναρτημένες ανακοινώσεις) με τα εξής θέματα:

1η:« Καλόηθες γλομαγγείωμα πνεύμονος – μία εξαιρετικά σπάνια νοσολογική οντότητα»

2η:« Ασυνήθης (νεοπλασματική;) διόγκωση παρωτίδας»

3η:« Ενδοπερικαρδιακή πνευμονεκτομή και καρδιαγγειακές επιπλοκές»

4η:« Ασυνήθης πολλαπλή αμφοτερόπλευρη αντιμετώπιση περιφερικού άτυπου καρκινοειδούς πνεύμονα»

5η:« Πρωτοπαθής καρκίνος πνεύμονα σε μη καπνιστές – Πρόδρομα αποτελέσματα τρέχουσας επιδημιολογικής μελέτης»

6η:« Κακόηθες μεσοθηλίωμα υπεζωκότα – Περιγραφή περιστατικών με ασυνήθιστα μεγάλο χρόνο επιβίωσης»

7. Ελεύθερη ανακοίνωση με θέμα: «Πολλαπλή αμφοτερόπλευρη εντόπιση περιφερικού καρκινοειδούς πνεύμονα: Αναφορά μιας περίπτωσης στο 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροενδοκρινών όγκων που διεξήχθη στο Λουτράκι, στις 18-20 Σεπτεμβρίου 2009.

8. Συμμετοχή στο **ERS Vienna 2009** που διεξήχθη στην Αυστρία, στις 12-16 Σεπτεμβρίου 2009 με θέμα: Pulmonary metastatic ameloblastoma 45 years after primary resection. A case report.

9. Συμμετοχή στο **22^ο European Congress of Pathology** στις 4-9 Σεπτεμβρίου 2009 στην Ιταλία με

θέμα: «Metastatic small cell lung carcinoma of the breast diagnosed in fna material».

10. Εργασία στο **Can. Respir J.** **2001 Jul- Aug;** 8 (4) με τίτλο «Eighteen month follow up of arterial blood gases in patients with chronic obstructive pulmonary disease.

11. Συμμετοχή με 2 ανακοινώσεις στο 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος στις 6-9 Δεκεμβρίου 2007 με θέμα:

α) Μελέτη ασθενών με QUANTIFERON –TB GOLD (IN-TUBE METHOD), και με τη γενετική τεχνική ANTOGEN- PROBE του κέντρου αναφοράς των μυκοβακτηριδίων φυματίωσης της πνευμονολογικής κλινικής του Α.Π.Θ. του Γ.Π.Ν. «Γ. Παπανικολάου».

β) Έλεγχος ασθενών το Α' εξάμηνο του 2007, του κέντρου αναφοράς των μυκοβακτηριδίων φυματίωσης της Πνευμονολογικής Κλινικής του Α.Π.Θ. του Γ.Π.Ν. «Γ. Παπανικολάου».

Συμμετοχή σε ερευνητικό πρωτόκολλο (ως υπο-ερευνήτρια) για την κλινική μελέτη LipoGew-Pill-IL που αφορούν στην επιλογή των ασθενών και την παρακολούθηση

τους κατά τη διάρκεια της μελέτης και μετά το πέρας της συμμετοχής τους σε αυτήν.

Συμμετοχή σε ερευνητικό πρόγραμμα για οργάνωση σχολείου άσθματος.

ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Μητρική γλώσσα: Ελληνικά.

Αγγλικά (επίπεδο Lower)

Γαλλικά (Sorbonne 1).

ΣΥΣΤΑΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΟΛΕΣ

1. Από τον καθηγητή Κ.Γουργουλιάνη, Δ/ντή Πνευμονολογικής Κλινικής και Πρύτανη Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

2. Από τον καθηγητή, Χαράλαμπο Ρούσο, τέως Διευθυντή της Α Κλινικής Εντατικής Θεραπείας του Πανεπιστημίου Αθηνών.

3. Από τον καθηγητή, Σωτήριο Ράπτη, τέως Διευθυντή της Β Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

4. Από το Συντονιστή Διευθυντή, Αντζελ Ιακώβ, του Πνευμονολογικού Ογκολογικού Τμήματος του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης Θεαγένειο.

5. Από τον τέως Διευθυντή, Γαλάνη Νικόλαο, της Α Πνευμονολογικής Κλινικής του Παπανικολάου

Θεσσαλονίκης.

6. Από τον Επίκουρο Καθηγητή
Χριστόφορο Φορούλη,
Θωρακοχειρουργικής Α.Π.Θ.

7. Από τον τέως Διευθυντή Α
Χημ/κού Τμήματος
Παρασκευόπουλο Παναγιώτη, του
Α.Ν.Θ.

8. Από τη Διευθύντρια του
Κυτταρολογικού Τμήματος του
Α.Ν.Θ. Δεστούνη Χαρίκλεια.

Molecules **2022**, *27*(10), 3102.

ABSTRACT

Integrated Deadenylase Genetic Association Network and Transcriptome Analysis in Thoracic Carcinomas

The poly(A) tail at the 3' end of mRNAs determines their stability, translational efficiency, and fate. The shortening of the poly(A) tail, and its efficient removal, triggers the degradation of mRNAs, thus, regulating gene expression. The process is catalyzed by a family of enzymes, known as deadenylases. As the dysregulation of gene expression is a hallmark of cancer, understanding the role of deadenylases has gained additional interest. Herein, the genetic association network shows that CNOT6 and CNOT7 are the most prevalent and most interconnected nodes in the equilibrated diagram. Subsequent silencing and transcriptomic analysis identifies transcripts possibly regulated by specific deadenylases. Furthermore, several gene ontologies are enriched by common deregulated genes. Given the potential concerted action and overlapping functions of deadenylases, we examined the effect of silencing a deadenylase on the remaining ones. Our results suggest that specific deadenylases target unique subsets of mRNAs, whilst at the same time, multiple deadenylases may affect the same mRNAs with overlapping functions.

Keywords: deadenylases; lung cancer; association network; transcriptomics; mRNA degradation

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Καρκίνος του πνεύμονα

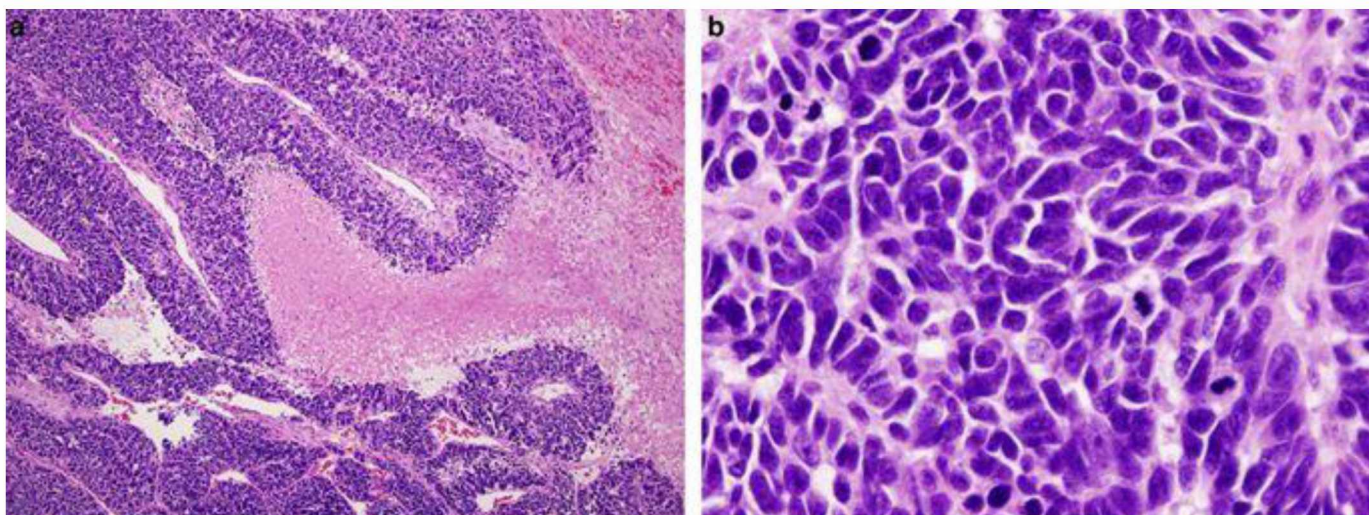
Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, ο καρκίνος του πνεύμονα ήταν μία σπάνια νόσος, όμως, τα ποσοστά έχουν αυξηθεί τόσο σημαντικά που δικαίως στις μέρες μας, θεωρείται μία από τις κύριες επιδημίες με 30.000-35.000 νέες περιπτώσεις ετησίως στις ΗΠΑ (Oronsky B et al. 2017). Επιπλέον είναι η πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο σε άνδρες και γυναίκες παγκοσμίως. Σύμφωνα με τον WHO ο καρκίνος του πνεύμονα ταξινομείται σε δύο ιστολογικούς υπότυπους: το μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (SCLC) και το μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (NSCLC) που περαιτέρω διαιρείται σε αδenoκαρκίνωμα, πλακώδες και μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (Travis WD. 2015).

Ο μικροκυτταρικός τύπος ταξινομείται στους νευροενδοκρινείς όγκους του πνεύμονα, όπου εντάσσονται όγκοι με ετερογενή μορφολογικά, ανοσοϊστοχημικά και μοριακά χαρακτηριστικά καθώς τα κύτταρα τους χαρακτηρίζονται από νευροενδοκρινή μορφολογία και θετικές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για δείκτες όπως η χρωμογρανίνη Α και η συναπτοφυσίνη (Schnabel PA et al. 2015).

Επιδημιολογία

Η συχνότητα του μικροκυτταρικού τύπου μειώνεται και ενώ έφθανε το 17-20% τη δεκαετία του 1980 , μειώθηκε στο 13-15% ως το 2002, ακολουθώντας παράλληλα τη μειωμένη συχνότητα της καπνιστικής συνήθειας του πληθυσμού (Koivus F et al. 2016). Επιπλέον, οι αλλαγές στις καπνιστικές συνήθειες και η αυξανόμενη χρήση τσιγάρων με φίλτρο, χαμηλής περιεκτικότητας σε πίσσα και «ελαφριών» τσιγάρων επέφερε την αύξηση της έκθεσης των περιφερικών βρόγχων στην καρκινογόνο δράση του τσιγάρου και την αύξηση της συχνότητας του αδενοκαρκινώματος (Dela Cruz S. Charles et al. 2011). Επίσης, η αναλογία ανδρών:γυναικών αλλάζει και ενώ το 1973 ήταν 2,6:1, το 2002 έγινε 1:1 (Govindar R et al. 2006).

Δύο παράμετροι είναι καθοριστικοί για τη διαφορική διάγνωση των νευροενδοκρινών όγκων: η παρουσία ή απουσία νέκρωσης και ο μιτωτικός δείκτης ανά 2mm^2 . Φτωχά διαφοροποιημένα καρκινώματα πρέπει να έχουν >10 μιτώσεις ανά 2mm^2 και εκτεταμένες νεκρωτικές περιοχές. Για τη διάγνωση ενός NET απαιτούνται δείκτες ανοσοιστοχημείας , όπως χρωμογρανίνη Α και συναπτοφυσίνη (Hendifar et al. 2017). Στο SCLC τα κύτταρα είναι κλασικά μικρά, στρογγυλά και με απουσία ή ελάχιστα πυρήνια όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1**.



Εικόνα 1. Μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα (α) Ο όγκος αποτελείται από μικρά κακοήγη κύτταρα. Εκτεταμένη νέκρωση είναι παρούσα. (b) Παρουσία μικρών κυττάρων με χρωματίνη και απουσία πυρηνίων. William D Travis, 2012. |

Σε συχνότητα που ανέρχεται σε 2-5% όλων των τύπων καρκίνου πνεύμονα συναντάμε το μικτό SCLC στο οποίο συνυπάρχει συνδυασμός αδενοκαρκινώματος ή πλακώδους ή μεγαλοκυτταρικού νευροενδοκρινικού καρκινώματος (LCNLC) (Xiaoliang Z et al. 2018). Οι όγκοι αυτοί θεωρούνται από τον WHO υπότυπος του SCLC και απαντούν σε συχνότητα >30% του όγκου. Η επιβίωση θεωρείται παρόμοια με του SCLC, αν και οι μικτοί τύποι ανταποκρίνονται λιγότερο στη χημειοθεραπεία (Wagner PL et al. 2009).

Αιτιοπαθογένεια και μοριακές αλλαγές

Η αιτιολογία του SCLC είναι στενά συνδεδεμένη με την καπνιστική συνήθεια, με τη νόσο να εμφανίζεται σε συχνότητα 98% των καπνιστών. Επίσης, ενοχοποιείται η έκθεση σε εργάτες ορυχείων ουρανίου και η έκθεση σε ραδόνιο (Koinis F et al. 2016). Το τελευταίο είναι ένα ανενεργό αέριο, προϊόν της σήψης του ουρανίου και αποτελεί την κύρια αιτία εμφάνισης του όγκου σε μη καπνιστές. Η έκθεση στο ραδόνιο είναι μεγάλη όταν το ραδόνιο του εδάφους ή των βράχων διασπάται. Στο εξωτερικό περιβάλλον η έκθεση είναι ελάχιστη ενώ αυξημένη εμφανίζεται στα σπίτια και στα κτίρια (Winston W Tan et al. 2016).

Η έκθεση, επίσης, σε αμίαντο ενοχοποιείται, κυρίως, όμως για το μεσοθηλίωμα (Curtis W. Noonan et al. 2017). Η περιβαλλοντική μόλυνση ευθύνεται για το 5% όλων των

θανάτων από καρκίνο πνεύμονα. Σημαντική φαίνεται να είναι η εμφάνιση της νόσου σε άτομα με θετικό οικογενειακό ιστορικό. Ο πιο σημαντικός αιτιολογικός παράγων παραμένει το κάπνισμα με τον κίνδυνο να 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. Επίσης το παθητικό κάπνισμα αυξάνει τον κίνδυνο του καρκίνου του πνεύμονα περίπου δύο φορές σε σχέση με τους μη καπνιστές (Trichopoulos D et al. 1981, και 1992).

Μοριακή βιολογία

Υπάρχει μια σειρά μοριακών αλλαγών που σχετίζονται με την παθογένεια της νόσου. Αυξητικοί παράγοντες, όπως νευροενδοκρινή ρυθμιστικά πεπτίδια (μπομπεσίνη/γαστρίνη) είναι κυρίαρχα στο SCLC. Ογκογόνα γονίδια της οικογένειας Μγc συχνά υπερεκφράζονται στο SCLC και στο NSCLC ενώ το K-ras ογκογονίδιο, σπανίως, <1% είναι μεταλλαγμένο στο SCLC, και εμφανίζεται σχετικά αργά. Συναντάται, όμως, μεταλλαγμένο στο 30% των ασθενών με NSCLC.

Οι πιο συχνές γενετικές ανωμαλίες αφορούν σε ογκοκατασταλτικά γονίδια. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 είναι μεταλλαγμένο σε περισσότερο από 90% των ασθενών με SCLC αλλά μόνο σε 50% των NSCLC. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο του ρετινοβλαστώματος είναι αδρανές σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90% στο SCLC αλλά μόνο σε 15% των ασθενών με NSCLC. Η αδρανοποίηση του RB1 σε μελέτες σε ποντίκια έδειξε ότι είναι απαραίτητη αλλά όχι επαρκής από μόνη της για την ανάπτυξη του όγκου (Matthew G. Oser et al. 2015). Η αδρανοποίηση του RB1 παρατηρείται σε 3 τύπους καρκίνου: στο SCLC, στον καρκίνο προστάτη και της χοληδόχου κύστεως (Gao J et al. 2013). Μελέτη του

ανθρώπινου γονιδιώματος στο SCLC και NSCLC ανέδειξε 17 σημεία με απώλεια ετεροζυγωτίας στο SCLC και 22 για NSCLC με μόνο 2 σημεία κοινά, όπως φαίνεται στον πίνακα 1.1 (Burstein and Schwartz. 2008). Οι δύο αυτοί τύποι (SCLC) και (NSCLC) διαφέρουν σημαντικά, γεγονός που σχετίζεται με την παθογένεια τους όπως φαίνεται στον πίνακα 1.2 (Kumar et al. 2003). Αν και ο SCLC διακρίνεται από περισσότερες αριθμητικά μεταλλάξεις από τον NSCLC, δε χαρακτηρίζεται από την παρουσία συγκεκριμένης οδηγού μετάλλαξης (driver mutation) όπως παρατηρείται στον NSCLC.

Μελέτες στο βρογχικό επιθήλιο ασθενών με NSCLC έδειξαν μοριακές ανωμαλίες σε προκαρκινωματώδεις καταστάσεις όπως carcinoma in situ, δυσπλασία, υπερπλασία και μερικές φορές σε φυσιολογικό επιθήλιο νυν και πρώην καπνιστών.

Στο βρογχικό επιθήλιο του SCLC αυτές οι προκαρκινωματώδεις βλάβες είναι σπάνιες. Εντούτοις, φαίνεται ότι το βρογχικό επιθήλιο των καπνιστών έχει υποστεί μεγαλύτερη καταστροφή από εκείνο των NSCLC (Wistuba II et al, 2001).

Συμπερασματικά, SCLC και NSCLC διαφέρουν τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά στις ειδικές γενετικές τροποποιήσεις που τα χαρακτηρίζουν. Περαιτέρω, όμως, μελέτες απαιτούνται για να εντοπιστούν τα ειδικά γονίδια που εμπλέκονται στην καλύτερη κατανόηση της παθογένειας της νόσου.

Πίνακας 1.1 Συχνές χρωμοσωμικές ατυπίες σε καρκίνο πνεύμονα ανάμεσα στους δύο τύπους καρκίνου SCLC και NSCLC.

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, 12 q

(Burstein and Schwartz 2008)

Πίνακας 1.2 Σύγκριση κυτταρογενετικών αλλαγών στο μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (SCLC) και στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC).

Μοριακές αλλαγές	SCLC	NSCLC
Αδρανοποίηση του FHIT	~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%	-
Δραστικότητα τελομεράσης	~ 100%	~ 80-85%
<i>Ανωμαλίες ογκοκατασταλτικών γονιδίων</i>		
Ελλείψεις 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%

(Kumar et al. 2003)

Καρκινικοί δείκτες

Με τον όρο καρκινικοί δείκτες, ονομάζονται μόρια που κυκλοφορούν στο αίμα ή σε ιστούς προερχόμενα από τα κύτταρα του όγκου. Η ιδέα της ανίχνευσης τους για τη διάγνωση, παρακολούθηση ή ανταπόκριση στη θεραπεία υπάρχει εδώ και δεκαετίες. Στο SCLC δε χρησιμοποιούνται γενικά για τη διάγνωση της νόσου, όμως, μπορεί να είναι χρήσιμοι για την ανταπόκριση στη θεραπεία ή και την πρόωπη διάγνωση υποτροπών (Wojcik Ewa et al. 2017). Η ειδική νευρωνική ενολάση (neuron specific enolase, NSE) είναι ένα διαλυτό γλυκολυτικό μεταλλοένζυμο, χρήσιμη στην αερόβια γλυκόλυση με αυξημένη έκφραση στο SCLC αλλά και σε καλοήθεις παθήσεις όπως ισχαιμικό AEE, εγκεφαλική αιμορραγία και τραυματισμό εγκεφάλου καθώς και σε άλλες κακοήθειες όπως μελάνωμα, σεμίνωμα, καρκίνο νεφρού, καρκινοειδή και τεράτωμα (Isgro MA et al.2015). Η ευαισθησία και η ειδικότητα του ποικίλλει μεταξύ 43,8%-70% και 4,7-93,8% (Huang L et al. 2017).

Η απελευθέρωση του νευροπεπτιδίου της γαστρίνης (GRP) παρουσιάζεται και σε κύτταρα άλλα πλην του πεπτικού και παρατηρείται σε καλοήθεις και κακοήθεις νόσους. Στο SCLC εκφράζεται σε συχνότητα 74% ενώ συναντάται και σε καρκίνο εντέρου, παγκρέατος, προστάτη και μαστού. Λόγω του μικρού χρόνου ημίσειας ζωής της, διάρκειας μόλις 1,5 λεπτού, τα επίπεδα της στον ορό δεν είναι εύκολο να ανιχνευθούν. Η ανίχνευση της πρόδρομης μορφής του (ProGRP) ανευρίσκεται σε συχνότητα 74% στο SCLC, σε μικρότερη στο NSCLC (7-13%) καθώς και σε καρκίνο μαστού, παγκρέατος, λευχαιμίες, καρκίνους καθώς και σε ΧΝΑ. Η χρήση των δύο παραπάνω δεικτών αποτελεί αντικείμενο διαφωνιών γεγονός που καθιστά απαραίτητη την περαιτέρω έρευνα προς αυτή την κατεύθυνση.

Δείκτες όπως το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (carcinoembryogenic antigen, CEA), γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, το καρκινικό αντιγόνο 15-3 (CA 15-3) και το καρκινικό αντιγόνο (CA 125) έχουν, επίσης, μελετηθεί σε κακοήθειες.

Το CEA πρωτομελετήθηκε στον καρκίνο εντέρου αλλά παρουσιάζεται και σε καρκίνο πνεύμονα, παγκρέατος, στομάχου και μαστού καθώς και σε κίρρωση, φλεγμονώδη νόσο εντέρου, χρόνια πνευμονοπάθεια και παγκρεατίτιδα. Το CA-125 αυξάνεται σε καρκίνο ωοθηκών αλλά και σε άλλες κακοήθειες ενώ το C15-3 στον καρκίνο μαστού αλλά και σε άλλου τύπου κακοήθειες (Indranath Ghosh et al.2012).

Έχει μελετηθεί, επίσης, ο μεταβολισμός των mRNAs στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (Leclerc et al. 2011), η αποικοδόμηση των RNAs στο αδenoκαρκίνωμα (Valk et al. 2010) και η πρόγνωση ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα σε σχέση με το μεταβολισμό του RNA (Valles et al. 2012).

Ρόλος του Ki-67

Η ανίχνευση του αντιγόνου Ki-67 έχει ευρέως μελετηθεί στους νευροενδοκρινείς όγκους του πνεύμονα (Pelosi G et al. 2017). Σύμφωνα με τον WHO, ο μόνος διαγνωστικός του ρόλος είναι η διάκριση των καρκινοειδών από τα υψηλού βαθμού κακοήθειας νευροενδοκρινή καρκινώματα, ως επιπλέον παράμετρος μαζί με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά (αριθμός μιτώσεων και νεκρώσεις) του όγκου. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι ο προσδιορισμός του παρέχει συμβατά αποτελέσματα και σε δείγματα βιοψιών και σε χειρουργικά δείγματα, γεγονός που δεν παρατηρείται στην εξέταση των μορφολογικών χαρακτηριστικών. Συμπερασματικά, ο προσδιορισμός του Ki-67 δεν είναι υποχρεωτικός για τη διάγνωση και ο ρόλος του παραμένει αμφιλεγόμενος (Luisella R et al. 2017).

Κλινική εικόνα

Οι ασθενείς με SCLC συνήθως προσέρχονται με βραχείας έναρξης συμπτωμάτων που εξελίσσονται ταχέως.

Τα συμπτώματα μπορούν να ταξινομηθούν σε:

- 1) Τοπική επέκταση του όγκου
- 2) Μεταστάσεις

3) Παρανεοπλασματικά σύνδρομα

Οι ενδοβρογχικοί όγκοι εκδηλώνονται συνήθως με βήχα, συριγμό, δύσπνοια, βράγχος φωνής, θωρακαλγία, σύνδρομο άνω κοίλης φλέβας. Οι ασθενείς με μεταστατική νόσο μπορεί να παρουσιάζουν κοιλιακό άλγος, ναυτία και εμέτους, εύκολη κόπωση, ανορεξία, κεφαλαλγία (Bernhardt E et al.2016).

Επίσης ο όγκος σχετίζεται με την εκδήλωση παρανεοπλασματικών συνδρόμων, που διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τα ενδοκρινολογικά και τα νευρολογικά παρανεοπλασματικά σύνδρομα (Zhou L et al. 2015).

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν η υπονατρίαμια σχετιζόμενη με σύνδρομο απρόσφορης έκκρισης αντιδιουρητικής ορμόνης (SIADH), το σύνδρομο Cushing σχετιζόμενο με την έκκριση (ACTH) και η ακρομεγαλία που σχετίζεται με έκκριση αυξητικής ορμόνης από τα κακοήθη κύτταρα. Τα συμπτώματα από τις παραπάνω διαταραχές μπορεί να προηγούνται της εμφάνισης της νόσου ή να είναι η εκδήλωση υποτροπής της νόσου. Συνήθως υποχωρούν με τη θεραπευτική αντιμετώπιση της κακοήθειας.

Το πιο συχνό νευρολογικό παρανεοπλασματικό σύνδρομο είναι η υποξεία αισθητήριο νευροπάθεια με ή χωρίς παρανεοπλασματική εγκεφαλομυελίτιδα. Πρόκειται για μια αυτοάνοση διαταραχή με παρουσία αντισωμάτων αντι-Hu. Η εγκεφαλοπάθεια παρουσιάζεται με θορυβώδη συμπτώματα του τύπου απώλεια μνήμης, σύγχυση, δυσαρθρία, αφασικές διαταραχές ή ψυχιατρικές εκδηλώσεις όπως άγχος και κατάθλιψη. Η υποξεία νευροπάθεια εκδηλώνεται με αιμωδίες στα περιφερικά άκρα, χέρια και πατούσες. Το σύνδρομο Lambert-Eaton είναι μια λιγότερη συχνή διαταραχή που σχετίζεται με αυτοαντισώματα και εκδηλώνεται με μυική αδυναμία των εγγύς άκρων. Διαγνωστικά των παρανεοπλασματικών συνδρόμων είναι η ανεύρεση των αυτοαντισωμάτων στον ορό ή στο ENY. Τα νευρολογικά σύνδρομα σε αντίθεση με τα ενδοκρινολογικά δεν είναι συνήθως αναστρέψιμα (Moon Ho Kim et al.2015).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι εκτός από το πνευμονικό SCLC, υπάρχει και το εξωπνευμονικό μικροκυτταρικό καρκίνωμα πιο συχνά στο πεπτικό και στο ουρογεννητικό

σύστημα, με συνολική συχνότητα μεγαλύτερη του 5% των μικροκυτταρικών καρκινωμάτων (Brennan SM et al, 2010).

Σταδιοποίηση

Από τα τέλη του 1950, ο SCLC σταδιοποιήθηκε σε περιορισμένο (Limited stage) και εκτεταμένο (Extensive stage) σύμφωνα με τις οδηγίες της VALSG ομάδας μελέτης. Πρόκειται βασικά για μια κλινική σταδιοποίηση όπου η νόσος ορίζεται ως περιορισμένη όταν αφορά στο ένα ημιθωράκιο ή δεν υπάρχουν εξωθωρακικές μεταστάσεις εκτός από ομόπλευρους υπερκλείδιους λεμφαδένες αν αυτοί μπορούν να συμπεριληφθούν στο πεδίο ακτινοβολίας με τον πρωτοπαθή όγκο. Αν συμβαίνει αυτό ή αν υπάρχει κακοήθης υπεζωκοτική συλλογή ή περικαρδιακή ή απομακρυσμένες μεταστάσεις, πρόκειται για εκτεταμένο στάδιο. Ακολούθησε το 1989 μια τροποποίηση του παραπάνω συστήματος, στο οποίο η περιορισμένη νόσος αφορούσε και σε ετερόπλευρους μεσοθωρακικούς και υπερκλείδιους λεμφαδένες και σε ομόπλευρες υπεζωκοτικές συλλογές ανεξαρτήτως κυτταρολογικών ευρημάτων (Stahel R et al. 1989). Στην πράξη, οι μεταστάσεις σε ετερόπλευρους λεμφαδένες είναι αντικείμενο διαμάχης καθώς το βασικό είναι να δύναται να ακτινοβοληθούν οι προσβεβλημένες εστίες.

Σήμερα, χρησιμοποιείται και για το SCLC η σταδιοποίηση κατά TNM όπως ισχύει και για το μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα, όπου T περιγράφει το μέγεθος του όγκου, N τη λεμφαδενική προσβολή και M την παρουσία μεταστάσεων.

Από το 2017 ισχύει η 8^η ταξινόμηση κατά TNM όπως φαίνεται στον πίνακα 2.

T/M	Label	N0	N1	N2	N3
T1	T1a ≤ 1	IA1	II B	III A	III B
	T1b $> 1-2$	IA2	II B	III A	III B
	T1c $> 2-3$	IA3	II B	III A	III B
T2	T2a <i>Cent, Yisc Pl</i>	IB	II B	III A	III B
	T2a $> 3-4$	IB	II B	III A	III B
	T2b $> 4-5$	II A	II B	III A	III B
T3	T3 $> 5-7$	II B	III A	III B	III C
	T3 <i>Inv</i>	II B	III A	III B	III C
	T3 <i>Satell</i>	II B	III A	III B	III C
T4	T4 > 7	III A	III A	III B	III C
	T4 <i>Inv</i>	III A	III A	III B	III C
	T4 <i>Ipsi Nod</i>	III A	III A	III B	III C
M1	M1a <i>Contr Nod</i>	IV A	IV A	IV A	IV A
	M1a <i>Pl Dissem</i>	IV A	IV A	IV A	IV A
	M1b <i>Single</i>	IV A	IV A	IV A	IV A
	M1c <i>Multi</i>	IV B	IV B	IV B	IV B

Πίνακας 2

8^η ταξινόμηση κατά TNM (Detterbeck FC et al, 2017).

Η ταξινόμηση αυτή θεωρείται ότι δίνει πιο ακριβείς διαγνωστικές πληροφορίες σε σύγκριση με την παλαιότερη ταξινόμηση (Tendler S et al. 2018). Υπολογίζεται ότι 30-40% των ασθενών με SCLC έχουν περιορισμένη νόσο δηλαδή στάδιο I-III κατά TNM (Govindan R et al. 2006). Η συχνότητα των εγκεφαλικών μεταστάσεων ποικίλλει από 20-30% στην περιορισμένη νόσο και πάνω από 40% στην εκτεταμένη νόσο (Auperin A et al. 1999 , Slotman B et al. 2007).

Για τη σταδιοποίηση του όγκου εκτός από τις γνωστές απεικονιστικές εξετάσεις με αξονική και μαγνητική τομογραφία, χρήσιμη είναι και η τομογραφία έκθεσης ποζιτρονίων (PET), ειδικά στη μελέτη του μεσοθωρακίου. Καθώς αυξάνει την ακρίβεια της αρχικής σταδιοποίησης και του σχεδιασμού της ακτινοθεραπείας, συστήνεται στις διεθνείς οδηγίες (NCCN 2016).

Προγνωστικοί παράγοντες

Η πρόγνωση των ασθενών με SCLC είναι φτωχή. Κακοί προγνωστικοί παράγοντες είναι οι:

Πολλαπλές μεταστατικές εστίες (εκτεταμένη νόσος)

Γενική κατάσταση (performance status, 3-4)

Καχεξία

Προχωρημένη ηλικία

Αυξημένα επίπεδα γαλακτικής δευδρογονάσης (LDH) του ορού

Αντιθέτως, στους ευνοϊκούς προγνωστικούς παράγοντες ανήκουν οι:

Μονήρης μεταστατική εστία

PS: 0-2

Νεότερη ηλικία

Φυσιολογικά επίπεδα LDH στον ορό

Θεραπεία

Θεραπεία περιορισμένης νόσου

Η θεραπευτική προσέγγιση για το περιορισμένο SCLC συνίσταται στη χορήγηση χημειοθεραπείας (4-6 κύκλοι) με σισπλατίνη (ή καρβοπλατίνη) και ετοποσίδη και πρώιμη έναρξη σύγχρονης ακτινοθεραπείας.

Η προφυλακτική ακτινοθεραπεία εγκεφάλου συστήνεται για τους ασθενείς με καλό PS και έχουν επιτύχει ανταπόκριση στην αρχική θεραπεία. Με την αναφερθείσα θεραπεία, επιτυγχάνεται ανταπόκριση της τάξης 90% των ασθενών και μακρόχρονη επιβίωση που πλησιάζει το 25% (Kalemkerian GP. 2016).

Η χειρουργική αντιμετώπιση της νόσου από μόνη της δεν αποτελεί θεραπεία επιλογής καθώς η νόσος χαρακτηρίζεται από πρώιμη αιματογενή διασπορά.

Η χορήγηση χημειοθεραπείας ξεκίνησε τη δεκαετία του 1980 με ταυτόχρονη χορήγηση κυκλοφωσφαμίδης, ανθρακυκλίνης και βινκριστίνης(CAV). Οι μελέτες που ακολούθησαν

(Sundstrom S et al. 2002, Mascaux C et al. 2000) καθιέρωσαν ως σχήμα επιλογής τη σισπλατίνη με ετοποσίδη που χαρακτηρίζεται από μικρότερη τοξικότητα.

Η χορήγηση ακτινοθεραπείας στοχεύει να ελέγξει την ογκώδη νόσο στο θώρακα και επίσης αυξάνει τη χημειοευαισθησία του πρωτοπαθούς όγκου. Δύο μετααναλύσεις ανέδειξαν το όφελος της ακτινοθεραπείας (Dignon JP. 1992, Warde P. 1992). Η εφαρμογή της σύγχρονης ακτινοθεραπείας απέδωσε ένα όφελος της τάξης του 5% στην πενταετή επιβίωση, με σύσταση να γίνεται νωρίς με την έναρξη της χημειοθεραπείας (Fried DB. 2004).

Θεραπεία εκτεταμένου σταδίου

Στο στάδιο αυτό χορηγείται χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με πλατίνη και ετοποσίδη όπως και στο περιορισμένο στάδιο. Πρόσφατα, άρχισε να συνηγορείται η χημειοθεραπεία με ανοσοθεραπεία (Horn L et al. 2018). Η προσθήκη ακτινοθεραπείας μπορεί να βοηθήσει επιλεγμένες περιπτώσεις ενώ η PCI δε συστήνεται.

Παρά την ενθαρρυντική, αρχικά, ανταπόκριση η νόσος συχνά υποτροπιάζει. Η υποτροπή διακρίνεται σε δύο κατηγορίες: το ανθεκτικό SCLC που εμφανίζει εξαρχής πρόοδο νόσου ή υποτροπή σε λιγότερο από 3 μήνες από την έναρξη της αρχικής θεραπείας και το ευαίσθητο SCLC που εμφανίζει υποτροπή πάνω από 3 μήνες. Η χορήγηση 2^{ης} γραμμής χημειοθεραπείας με τοποτεκάνη (αναστολέα τοποισομεράσης) είναι η ενδεικτική θεραπεία με ποσοστά ανταπόκρισης ιδίως στο ανθεκτικό λιγότερο από 10% και στο ευαίσθητο με ποσοστά ανταπόκρισης περίπου 25% (Kalemberian GP et al. 2013).

Στοχευμένη θεραπεία

Ο SCLC έχει διαφορετική βιολογική συμπεριφορά από το NSCLC και ως εκτούτου η χορήγηση στοχευμένης θεραπείας δεν έχει παρόμοια αποτελέσματα. Απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να υποστηριχθούν τέτοιου είδους θεραπείες.

Αναστολείς αγγειογένεσης

Ο SCLC είναι ένας ιδιαίτερα αγγειοβριθής όγκος και τα επίπεδα του παράγοντα VEGF (Vascular endothelial growth factor) είναι αυξημένα στον ορό των περισσότερων ασθενών, η χορήγηση αναστολέα VEGF (bevacizumab) με χημειοθεραπεία είχε απογοητευτικά αποτελέσματα.

Ανοσοθεραπεία

Σε αντίθεση με τη χορήγηση της στο NSCLC, η εφαρμογή της στο εκτεταμένο SCLC προσφάτως έλαβε έγκριση μαζί με χημειοθεραπεία και προσδοκώντας βελτίωση στην επιβίωση και πορεία της νόσου που επί δεκαετίες ήταν στάσιμη (Pousic Manca et al.2019). Σε όλες τις περιπτώσεις πρέπει να συστήνεται μετά τη διάγνωση η διακοπή καπνίσματος, καθώς η νικοτίνη προάγει την ανάπτυξη της αγγειογένεσης και της χημειοαντίστασης που είναι αναστρέψιμα με τη διακοπή λήψης νικοτίνης (Martinez-Garcia E et al. 2010).

Θεραπεία εξωπνευμονικού μικροκυτταρικού καρκίνου

Η οντότητα αυτή είναι μια σπάνια, επιθετική νόσος που αντιπροσωπεύει πάνω από 5% όλων των περιπτώσεων μικροκυτταρικού καρκίνου (Richardson RL et al. 1982). Η πιο συχνή εντόπιση είναι στο πεπτικό σύστημα και το ουρογεννητικό. Δεν υπάρχουν επαρκείς μελέτες για το ποια είναι η βέλτιστη αντιμετώπιση της νόσου, φαίνεται πάντως από την υπάρχουσα βιβλιογραφία λογικό ότι η αντιμετώπιση της ακολουθεί εκείνη που αφορά και στο SCLC. Επειδή σε αυτήν τη μορφή είναι λιγότερο συχνές οι μεταστάσεις του εγκεφάλου, δε συστήνεται η προφυλακτική ακτινοθεραπεία εγκεφάλου (Viswanathan AN et al. 2004).

Επιβίωση

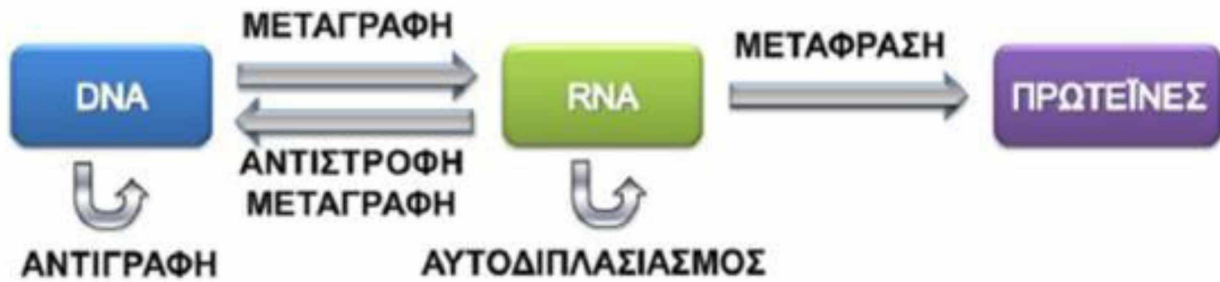
Σε αντίθεση με τη ραγδαία εξέλιξη που διαπιστώνεται στο NSCLC με τη χρήση νεότερων θεραπειών και την επακόλουθη βελτίωση στην επιβίωση αυτών των ασθενών, στο SCLC δεν έχει επιτευχθεί μεγάλη πρόοδος. Η επιβίωση παραμένει στάσιμη και εξαιρετικά χαμηλή,

περί τους 7 μήνες (Shuncong Wang et al. 2017). Η συχνότητα της ετήσιας επιβίωσης ανέρχεται σε 32,9%, 33,2% και 33,2% κατά τη διάρκεια κάθε δεκαετίας από το 1983 ως το 2012 αντιστοίχως. Η πενταετής επιβίωση παραμένει εξαιρετικά χαμηλή (4,9%) και για κάθε δεκαετία που ακολουθεί είναι 5,9% και 6,4% αντίστοιχα. Τα παραπάνω χαμηλά ποσοστά και η έλλειψη προόδου καθιστούν επείγουσα την ανάπτυξη νέων θεραπειών και την εύρεση νέων δεικτών για πρώιμη διάγνωση της νόσου. Η πρόσφατη έγκριση χορήγησης ανοσοθεραπείας με χημειοθεραπεία στην εκτεταμένη μορφή αποτελεί μια νέα ελπιδοφόρα προοπτική που αναμένεται να δείξει τα αποτελέσματα της και στην κλινική πράξη.

Συμπερασματικά, το ενδιαφέρον των ερευνητών για αυτή τη σχετικά άγνωστη για δεκαετίες νόσο έχει στραφεί στη διερεύνηση της μοριακής βιολογίας του όγκου και τη σύγκριση με τις γνώσεις και την εξέλιξη που έχει επιτευχθεί στο NSCLC. Έκπληξη αποτελεί η σπάνια αλλά ενδιαφέρουσα παρατήρηση της ιστολογικής μετατροπής από αδενοκαρκίνωμα σε SCLC σε ασθενείς με μετάλλαξη EGFR, γεγονός που έστρεψε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στο ενδεχόμενο κοινής προέλευσης των δύο αυτών όγκων (Matthew G Oser et al.2015). Έχουν περιγραφεί υποθετικά μοντέλα κοινής προέλευσης από τα τύπου II κυψελιδικά κύτταρα με περισσότερες μελέτες να επιβεβαιώνουν τα παραπάνω. Μελετώντας και κατανοώντας καλύτερα τη βιολογική συμπεριφορά του όγκου, διαφαίνεται μια πιο αισιόδοξη προοπτική για το μέλλον στη θεραπευτική προσέγγιση του SCLC.

Σύνθεση του RNA και μετάφραση του

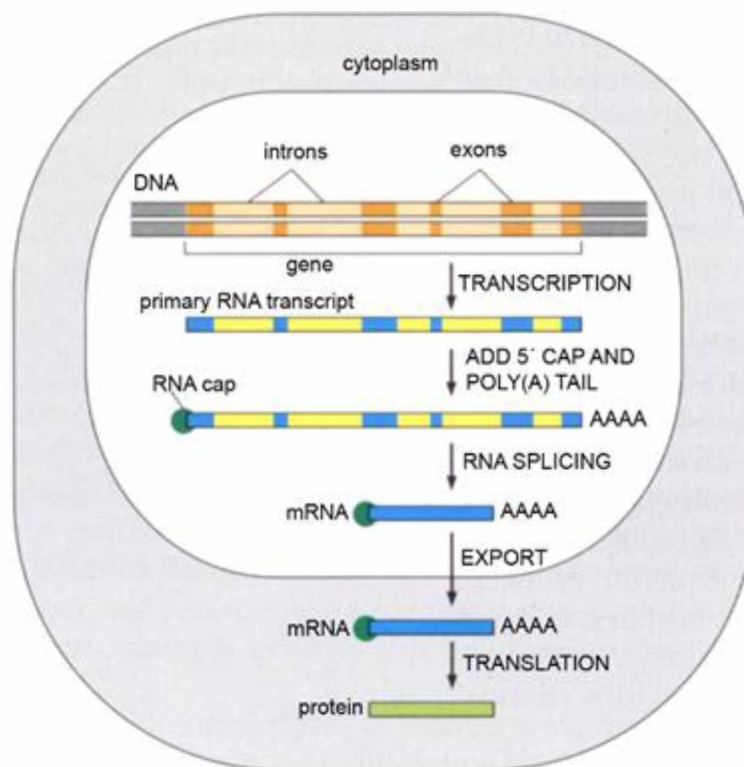
Οι γενετικές πληροφορίες αποθηκευμένες στο DNA μεταφέρονται στο RNA και στις πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα επιτελείται η αντιγραφή του DNA, η μεταγραφή του σε μόρια αγγελιοφόρου RNA (messenger RNA, mRNA) και η μετάφραση των τελευταίων σε αμινοξέα για τη δημιουργία πρωτεϊνών καθώς και η αντίστροφη μεταγραφή και ο αυτοδιπλασιασμός του RNA (**Εικόνα 2**). Το γενετικό υλικό των κυττάρων ενός οργανισμού είναι ίδιο, όμως, αυτά δεν επιτελούν τις ίδιες βιολογικές λειτουργίες καθώς υπάρχουν διαφορές στην έκφραση των γονιδίων τους. Οι τρεις κύριες τάξεις RNA που σχετίζονται με την παραγωγή πρωτεϊνών είναι το αγγελιοφόρο RNA (mRNA), το μεταφορικό RNA (tRNA) και το ριβοσωμικό RNA (rRNA). Η σύνθεση του RNA γίνεται από το ένζυμο RNA πολυμεράση. Μετά τη σύνθεση τους τα ευκαρυωτικά mRNA υφίστανται ωρίμανση και μπορούν να εξέλθουν από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα για να ακολουθήσει η αναγνώριση τους από τα ριβοσώματα και η μετάφραση τους.



Εικόνα 2. Πορεία της γενετικής πληροφορίας από το DNA στις πρωτεΐνες. Επιτελείται αντιγραφή του DNA, μεταγραφή και μετάφραση. Επίσης, αντίστροφη μεταγραφή και αυτοδιπλασιασμός του RNA (Crick F.H et al, 1958).

Η διαδικασία της ωρίμανσης του πρόδρομου ευκαρυωτικού mRNA περιλαμβάνει τρία στάδια: την προσθήκη καλύπτρας στο 5' άκρο (cap), του ματίσματος, (splicing) και της προσθήκης της πολυαδενυλικής ουράς στο 3' άκρο (polyadenylation), όπως φαίνεται στην **(Εικόνα 3)**.

Με την προσθήκη της καλύπτρας τα mRNAs μεταφράζονται πιο αποδοτικά διότι αναγνωρίζονται από το ριβόσωμα για το σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης και σταθεροποιούνται καθώς προστατεύονται από ριβονουκλεάσες που δρουν στο 5' άκρο (5' εξωριβονουκλεάσες). Με το *μάτισμα* επιτελείται η αποκοπή των εσονίων και τη συρραφή των εξονίων, με στόχο να παραμείνει στο μετάγραφο, το κωδικεύον τμήμα του γονιδίου.

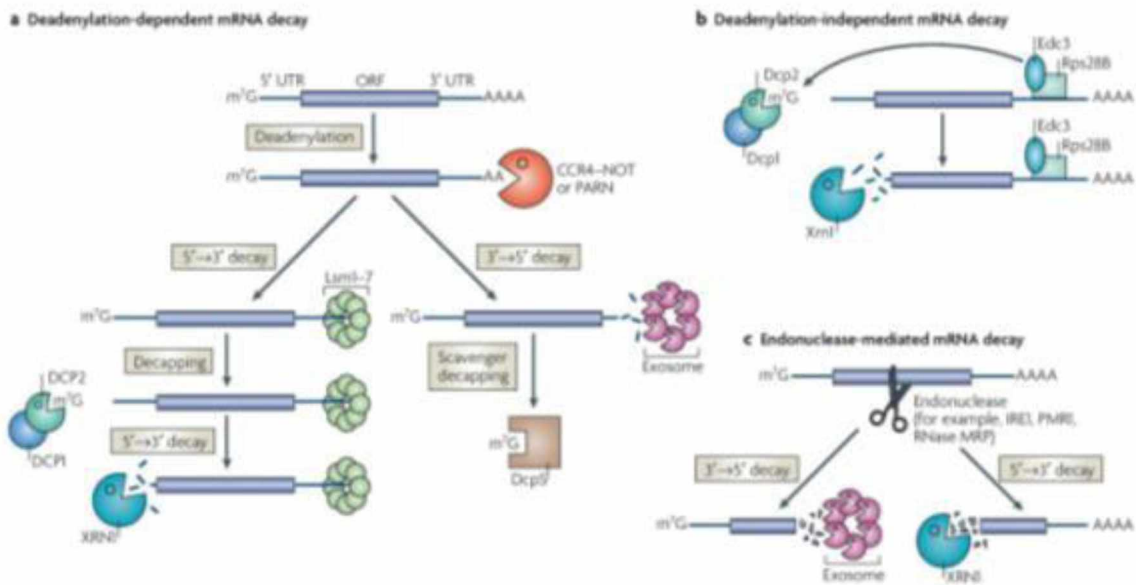


Εικόνα 3. Ωρίμανση ευκαρυωτικού mRNA. Επιτελείται με τη διαδικασία της προσθήκης καλύπτρας στο 5' άκρο (*cap*), του ματίσματος (*splicing*) και της προσθήκης της πολυαδενυλικής ουράς στο 3' άκρο (*polyadenylation*). (Lewin 2004)

Η ωρίμανση ολοκληρώνεται με την πολυαδενυλίωση κατά την οποία προστίθενται 200-300 νουκλεοτίδια αδενοσίνης στο 3' άκρο τους σχηματίζοντας την πολύ (A) ουρά. Η πολύ (A) ουρά έχει τρεις σπουδαίους ρόλους: α) Προστασία του mRNA από εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση β) Έξοδος στο κυτταρόπλασμα γ) Έναρξη στο κύριο μονοπάτι αποικοδόμησης του mRNA.

Αποικοδόμηση του mRNA

Η γονιδιακή έκφραση εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το ρυθμό μεταγραφής, τη σταθερότητα του mRNA, το ρυθμό μετάφρασης και τη σταθερότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης. Η σταθερότητα του mRNA καθορίζεται από το ρυθμό αποικοδόμησης του που γίνεται με τρεις μηχανισμούς όπως φαίνεται στην **(Εικόνα 4)**. Η κύρια διαδικασία με την οποία αποικοδομείται στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το mRNA είναι το μονοπάτι αποικοδόμησης που εξαρτάται από απαδενυλίωση **(4a)**. Η απαδενυλίωση ξεκινά με τη βράχυνση της πολύ(A)ουράς και επιτελείται από τις απαδενυλάσες. Επιτελείται τόσο στον πυρήνα του κυττάρου για να τερματισθεί η προσθήκη νέων πολύ(A) ουρών και να εξέλθει το mRNA, όσο και στο κυτταρόπλασμα. Μετά την απαδενυλίωση ακολουθεί ή η αφαίρεση της καλύπτρας και αποικοδόμηση με κατεύθυνση 5'→3', ή αποικοδόμηση 3'-5'. Υπάρχουν δύο ακόμη μηχανισμοί αποικοδόμησης του mRNA, το μονοπάτι που δεν εξαρτάται από την απαδενυλίωση στον *Saccharomyces cerevisiae*, στο οποίο αφαιρείται το κάλυμμα και το μονοπάτι αποικοδόμησης που γίνεται από τις ενδονουκλεάσες. Αυτές διασπούν εσωτερικά το mRNA οπότε τα άκρα του είναι απροστάτευτα και αποικοδομούνται από το εξώσωμα και τη XRN1 **(4b, 4c)** (Balagopal et al. 2012; Garneau et al. 2007).



Εικόνα 4. Μηχανισμοί αποικοδόμησης φυσιολογικών mRNAs. **a** Μονοπάτι αποικοδόμησης που εξαρτάται από απαδενυλίωση. **b** μονοπάτι αποικοδόμησης το οποίο είναι ανεξάρτητο από την απαδενυλίωση στον *Saccharomyces cerevisiae*. **c** Μονοπάτι αποικοδόμησης διαμεσολαβούμενο από ενδονουκλεάσες. (Garneau et al. 2007)

Τα κύτταρα διαθέτουν, επίσης, παρόμοιους μηχανισμούς για την αποικοδόμηση των ελαττωματικών mRNA ώστε να αποφεύγεται η παραγωγή τοξικών ουσιών.

Ιδιαίτερης σπουδαιότητας αποτελούν συγκεκριμένες περιοχές των mRNA πλούσιες σε αλληλουχίες AU (πενταμερές AUUUA), οι γνωστές αλληλουχίες ARE. Υπάρχουν παράγοντες που προσδένονται σε αυτές τις περιοχές και στρατολογούν τις απαδενυλάσες για να αρχίσει η αποικοδόμηση του mRNA όπως οι AUF1, CUG-PB, KHSRP, Tristetraprolin και αποκαλούνται αποσταθεροποιητικοί παράγοντες. Από την άλλη μεριά υπάρχουν πρωτεΐνες που σταθεροποιούν τα mRNA όπως οι HuR και HuD.

Οι παραπάνω μηχανισμοί αποικοδόμησης του mRNA παίζουν βασικό ρόλο στη ρύθμιση της σταθερότητας του, η οποία με τη σειρά της καθορίζει τις λειτουργίες του κυττάρου και επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση. Στα ζωικά κύτταρα ποικίλλει ο χρόνος ζωής του mRNA, όμως, παραμένει σχετικά σταθερός και αυτό επιτυγχάνεται με τις τροποποιήσεις που φέρει στα δύο άκρα του (Lewin et al. 2004).

Απαδενυλάσες

Οι απαδενυλάσες ανήκουν στις εξωριβονουκλεάσες και δρουν στις πολύ(A) ουρές υδρολύοντας τα μόρια RNA με κατεύθυνση 3'→5' με αποτέλεσμα την απελευθέρωση 5'-AMP με παρουσία ιόντων μαγνησίου. Αποικοδομούν λιγότερο αποτελεσματικά και μη-αδενοσινικά ομοπολυμερή .

Ταξινομούνται σε δύο μεγάλες υπερ-οικογένειες νουκλεασών: αυτή των DEDD και των EEP νουκλεασών. Η DEDD υπερ-οικογένεια έχει τα αμινοξέα ασπαρτικό (Asp, D) και γλουταμινικό (Glu, E) στο καταλυτικό κέντρο και περιλαμβάνονται οι απαδενυλάσες POP2/ CAF1 (CNOT7 & CNOT8), η CAF1Z, η πολύ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση [poly(A)-specific ribonuclease, PARN], καθώς και οι οικογένειες των PAN2 απαδενυλασών. Η υπερ-οικογένεια EEP των εξωνουκλεασών-ενδονουκλεασών-φωσφατασών (*exonuclease-endonuclease-phosphatase, EEP*), περιλαμβάνει απαδενυλάσες που κατάλοιπα ασπαρτικού (Asp) και ιστιδίνης (His) στις δομικές περιοχές νουκλεάσης τους. Μέλη της οικογένειας αποτελούν οι απαδενυλάσες Nocturnin (Ccrn4l, NOC), CCR4 (CCR4a/ CNOT6 & CCR4b/ CNOT6L), Angel και 2' PDE (**Πίνακας 3**). Βάσει των τελευταίων δεδομένων, η Nocturnin δεν ανήκει στις απαδενυλάσες, όπως θα αναλύσουμε παρακάτω.

Πιθανώς ειδικές απαδενυλάσες στοχεύουν συγκεκριμένες ομάδες mRNAs ή δρουν στο ίδιο mRNA με επικαλυπτόμενες λειτουργίες (Goldstrohm and Wickens 2008; Meyer et al. 2004; Parker and Song 2004). Ο μεγάλος αριθμός τους, ίσως, επιτελεί τον παραπάνω στόχο. Στον άνθρωπο έχουν αναγνωρισθεί εννέα απαδενυλάσες. Οι βιολογικές τους διεργασίες είναι ποικίλλες, όπως πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, γονιμότητα, μεταβολική ομοιόσταση, ανάπτυξη και κυτταρικό κύκλο (στα θηλαστικά, υπερέκφραση της CNOT7 ή της CAF1Z, καθώς και αποσιώπηση της CNOT6L, εμποδίζει την κυτταρική αύξηση (Morita et al. 2007). Η απαδενυλίωση αποτελεί μια διαδικασία που δε γίνεται ανεξέλεγκτα καθώς αυτό θα σήμανε το θάνατο του κυττάρου. Με την απαδενυλίωση πρέπει να αποικοδομούνται τα ασταθή και μη φυσιολογικά mRNAs (Goldstrohm and Wickens 2008; Parker and Song 2004).

Πίνακας 3. Απαδενυλάσες

Group	Name	SC	CE	DM	XL	MM	HS
-------	------	----	----	----	----	----	----

<i>DEDD nucleases</i>	CNOT7/Caf1a	+	+	+	+	+	+
	CNOT8/Caf1b	-	-	-	+	+	+
	PAN2	+	+	+	+	+	+
	PARN	-	+	-	+	+	+
	CAF1Z	-	+	-	+	+	+
<i>EEP nucleases</i>	CNOT6/CCR4a	+	+	+	+	+	+
	CNOT6L/CCR4b	-	-	-	-	+	+
	NOC/CCR4C	-	-	+	+	+	+
	2'PDE	-	+	+	+	+	+

SC: *S.cerevisiae*, CE: *C. elegans*, DM: *D.melanogaster*, XL: *X.laevis*, MM: *M. musculus*, HS: *H.sapiens*,

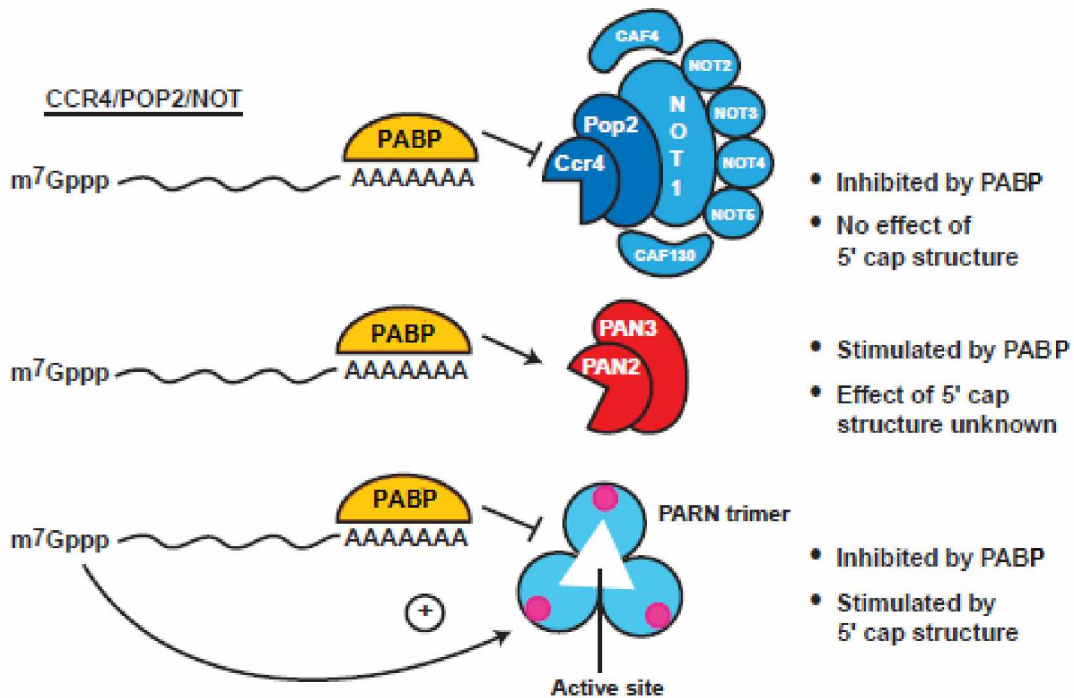
(+): είναι παρούσα στον οργανισμό, (-): δεν είναι παρούσα στον οργανισμό.

(Goldstrohm and Wickens 2008)

Η απαδενυλίωση ρυθμίζεται από παράγοντες - ρυθμιστές όπως οι CUG-BP, miRNAs, PUF και CPEB (Goldstrohm and Wickens 2008, Hook et al. 2007), η PABP, η οποία στρατολογεί το σύμπλοκο PAN2-PAN3 στο mRNA στόχο και στα θηλαστικά μπορεί να στρατολογεί το σύμπλοκο απαδενυλίωσης CCR4-CAF1-NOT, μέσω αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες TOB και συνδέεται το σύμπλοκο με την PABP (Ezzeddine et al. 2007, Funakoshi et al. 2007). Επίσης, το 5' κάλυμμα του mRNA μπορεί να επηρεάσει θετικά την απαδενυλίωση διεγείροντας την πρόσδεση και τη δραστικότητα απαδενυλασών και συγκεκριμένα της PARN (Balatsos et al. 2006).

Η Nocturnin έχει χαρακτηριστικά ρυθμική έκφραση που ελέγχεται από τον κirkάδιο ρυθμό. Η απαδενυλίωση αναστέλλεται σε διάφορες μορφές stress, όπως ακτινοβολία UV, οξείδωση, οσμωτική πίεση ή έλλειψη γλυκόζης (Gowrishankar et al. 2005, Prieto et al. 2000).

Οι απαδενυλάσες σχηματίζουν σύμπλοκα με πολλές υπομονάδες. Στον άνθρωπο παρατηρούνται τρία σύμπλοκα απαδενυλασών (**Εικόνα 5**): το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο CCR4-NOT, το ετεροδιμερές PAN2-PAN3 στο οποίο καταλυτικά ενεργή υπομονάδα είναι η PAN2 και η PARN που σχηματίζει ένα ομοδιμερές (Parker and Song 2004) . Παρακάτω φαίνονται τα τρία αυτά σύμπλοκα.



Εικόνα 5. Σύμπλοκα ευκαρυωτικών απαδενυλασών. Το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο CCR4-NOT, το ετεροδιμερές PAN2-PAN3 και η PARN. (Parker and Song 2004)

Δομή και λειτουργία του συμπλόκου CCR4-NOT

Το σύμπλοκο αυτό είναι μία από τις κύριες απαδενυλάσες στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αρχικά χαρακτηρίστηκε στο ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (Denis C.L. et al. 1984) στον οποίο συμμετέχει στην κυτταρική ανάπτυξη, στην επιδιόρθωση του DNA και στον ποιοτικό έλεγχο πρωτεϊνών. Σε καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών και σε ποντίκια φάνηκαν οι διακριτοί ρόλοι κάθε υπομονάδας.

Η CNOT1 είναι η μεγαλύτερη υπομονάδα σε μέγεθος που σταθεροποιεί το σύμπλοκο. Αλληλεπιδρά άμεσα με την πρωτεΐνη τριστετραπρόλίνη με επακόλουθο τη στρατολόγηση της CNOT7 ώστε να προχωρήσει η απαδενυλίωση mRNAs όπως του TNF- α (Sandler H et al. 2011, Fabian M.R. et al. 2013). Επίσης συμμετέχει σε καρκινικά ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα στην μεταμεταγραφική καταστολή του μη κωδικεύοντα RNA (HULC) με τον οποίο

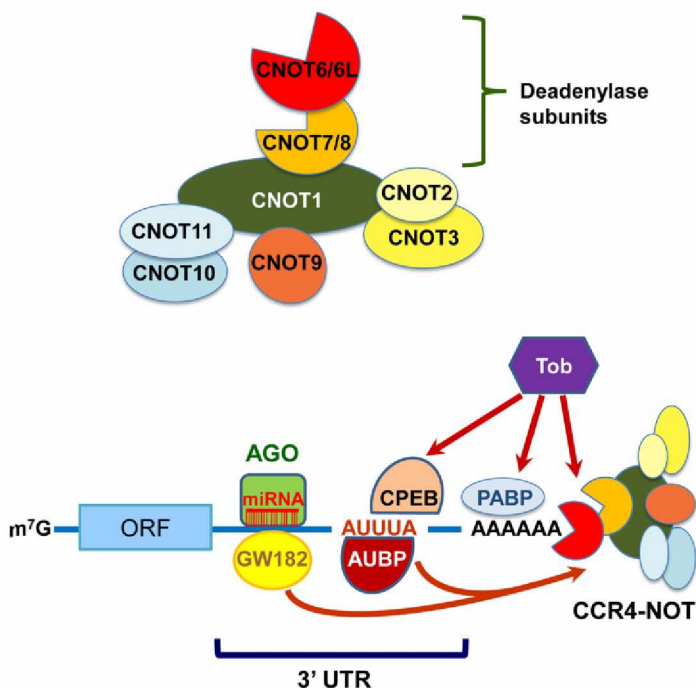
η πρωτεΐνη IGF2BPs συνδέεται (Hammerle M et al. 2013). Επιπλέον διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην απαδενυλίωση μέσω miRNA με την πρωτεΐνη GUI82. Σε καρκινική σειρά μαστού (MCF-7) που είναι θετική για τον υποδοχέα οιστρογόνων (ERα) η CNOT1 αλληλεπιδρά με τον ERα και καταστέλλει την ενεργοποίηση του (Winkler G.S et al. 2006). Υπεισέρχεται σε λειτουργίες του καρδιαγγειακού, αιμοποιητικού και ανοσοποιητικού συστήματος στον άνθρωπο (Newton-Chen C et al. 2009, Moura R et al. 2014).

Η CNOT2 υπομονάδα αναφέρθηκε να σχετίζεται με μεταστάσεις σε καρκίνο μαστού (Farazi F et al. 2014) και διαπιστώθηκε μειωμένη έκφραση της στο θυμικό καρκίνωμα μαζί με την υπομονάδα CNOT9 (Xin Ku et al, 2020) ενώ η CNOT3 φαίνεται να έχει κατασταλτική δράση σε T-ALL σε ενήλικες.

Μία από τις δύο υπομονάδες του συμπλόκου που ανήκει στην οικογένεια EEP απαδενυλασών είναι η CCR4. Στα θηλαστικά έχουν μελετηθεί δύο ορθόλογα της, η CNOT6 και η CNOT6L με τη CNOT6L να λειτουργεί κυρίως ως απαδενυλάση των mRNAs (Wang H et al. 2010) αν και φαίνεται να έχουν συμπληρωματικό ρόλο στην απαδενυλίωση (Lau N.C et al. 2009). Η κατανομή στους ιστούς της CNOT6 και CNOT6L στα ποντίκια είναι διαφορετική. Η CNOT6L είναι ευρέως διαδεδομένη σε ποικίλους ιστούς, ενώ η CNOT6 εκφράζεται κυρίως στους όρχεις, ωοθήκες, θύμο αδένες και σπλήνα (Chen J et al, 2011). Επιπλέον η CNOT6L αλλά όχι η CNOT6 επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε ινοβλάστες (NIH3T3 cells) (Morita et al, 2007). Η CNOT6 έχει επίσης, μικρή επίδραση στα επίπεδα mRNA σε σύγκριση με τη CNOT6L στα MCF-7 ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού (Mittal S et al. 2011). Στον καρκίνο εντέρου φάνηκε ότι υπάρχει απώλεια αντιγράφων CNOT6L (Tay Y et al. 2011) και στις οξείες λευχαιμίες η έκφραση της CNOT6L ήταν αυξημένη ενώ της CNOT6 ήταν μειωμένη (Maragozidis P et al. 2012).

Η δεύτερη υπομονάδα του συμπλόκου που ανήκει στην οικογένεια DEDD των απαδενυλασών είναι η CAF1. Στα θηλαστικά υπάρχουν δύο ορθόλογα της CAF1: η CNOT7 και CNOT8. Και τα δύο εκφράζονται ιδιαίτερα σε ιστούς όπως ο θύμος αδένας, ο σπλήνας, οι ωοθήκες και οι όρχεις (Chen J et al. 2011). Απαιτούνται για τον πολλαπλασιασμό των MCF7 ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μαστού και καταστέλλουν το αντιπολλαπλασιαστικό γονίδιο PMP22 δρώντας σαν απαδενυλάσες (Aslam A et al. 2009). Επίσης, αλληλεπιδρούν στα θηλαστικά με την αντιπολλαπλασιαστική πρωτεΐνη TOB (Doidge R et al. 2012). Η έκφραση της CNOT7 είναι μειωμένη σε οξείες λευχαιμίες (Maragozidis P et al. 2012) ενώ της CNOT8 είναι αυξημένη σε πρωτοπαθές ορθοκολικό καρκίνο (Seiden-Long et al. 2006).

Συμπερασματικά, το σύμπλοκο CCR4-NOT διαθέτει υπομονάδες με διακριτούς ρόλους που αλληλεπιδρούν με ποικίλα μόρια. Οι υπομονάδες CNOT6/CNOT6L και οι CNOT7/CNOT8 έχουν αλληλοεπικαλυπτόμενες λειτουργίες. Πρόκειται για ένα σύμπλοκο με πολλαπλές χρήσεις του οποίου η πολυπλοκότητα το καθιστά ιδιαίτερα ενδιαφέρον όπως φαίνεται παρακάτω στην **Εικόνα 6**.

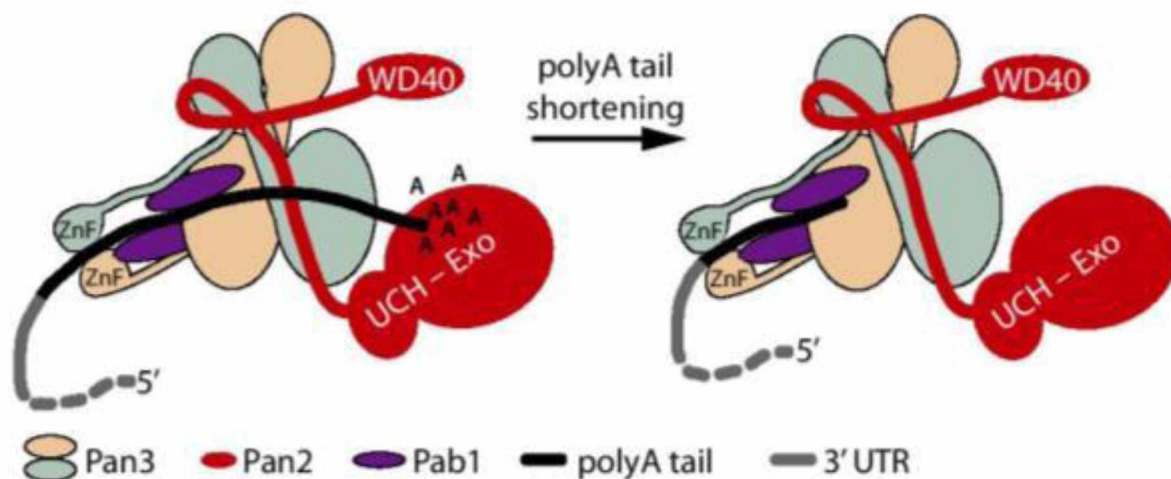


Εικόνα 6. Σχηματική δομική οργάνωση του συμπλέγματος CCR4-NOT των θηλαστικών. Περιλαμβάνει CNOT6 / 6L και CNOT7 / 8 ως υπομονάδες. Το σύμπλοκο CCR4-NOT προσλαμβάνεται στο 3' UTR ειδικών mRNAs μέσω αλληλεπίδρασης με πλούσιες σε AU πρωτεΐνες δέσμευσης RNA (AUBP) συμπεριλαμβανομένου του TTP. Το GW182 είναι ένα συστατικό του miRISC μαζί με το miRNA και το AGO. Το σύμπλεγμα CCR4-NOT εμπλέκεται στην προκαλούμενη από το miRNA απελευθέρωση μέσω μιας σύνδεσης με το GW182. Το Tob αλληλεπιδρά επίσης με την πρωτεΐνη που δεσμεύει πολυ (A) (PABP) και την πρωτεΐνη (CPEB) και προσλαμβάνει το σύμπλεγμα CCR4-NOT για να ξεκινήσει την απαδενυλίωση. (Yo-Taro Shirai Aug 2014)

Το σύμπλοκο PAN2/PAN3

Το ενζυμικό σύμπλοκο PAN2/PAN3 αποτελείται από δύο πρωτεΐνες, την Pan2p και Pan3p. Σε στελέχη ζύμης Ccr4Δ γνωρίζουμε ότι η απαδενυλίωση εξαρτάται από την Pan2p. Το σύμπλοκο αποτελείται από τις υπομονάδες Pan2p (127 kDa) και Pan3p (76kDa) σε αναλογία 1:1. Στη ζύμη και πιθανόν σε άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η PAN εμπλέκεται σε ένα πρώιμο στάδιο της ζωής του mRNA, όπου μία αρκετά μακριά πολυ(A) ουρά βραχύνεται μέχρι να φτάσει τα 55-75 νουκλεοτίδια, αριθμός που κάθε φορά

εξαρτάται από το συγκεκριμένο mRNA (Brown and Sachs 1998). Ο πιθανός ρόλος της Pan3p είναι η διέγερση της Pan2p. Παρακάτω φαίνεται η δομή του συμπλόκου στη ζύμη.

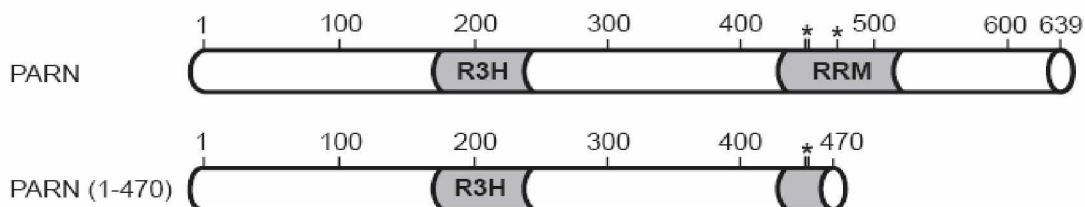


Εικόνα 7. Μοντέλο του συμπλόκου PAN2/PAN3 στη ζύμη *S.cerevisiae*. (Wolf et al. 2014)

Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN)

Η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (poly(A) specific ribonuclease, PARN) είναι η καλύτερα μελετημένη απαδενυλάση στα θηλαστικά. Ανήκει στην οικογένεια των DEDD εξωνουκλεασών και απαντά στον άνθρωπο σε δύο ισομορφές, μία πυρηνική 74 kDa και μία κυτταροπλασματική 54 kDa. Στον άνθρωπο αποτελείται από 639 αμινοξέα ενώ ομόλογα της δεν βρέθηκαν στο αρθρόποδο *Drosophila melanogaster* και στο μύκητα *S.Cerevisiae*. Αναλύσεις αλληλουχιών δείχνουν ότι η PARN όπως και η Pan2p και Pop2p ανήκει στην οικογένεια των RNaseD νουκλεασών που φέρει το χαρακτηριστικό μοτίβο DEDD. Έχει ένα γλουταμικό και τρία ασπαρτικά οξέα στο ενεργό κέντρο. Οποιαδήποτε μετάλλαξη σε ένα από αυτά μειώνει τη δραστηριότητα της PARN. Επίσης, πολύ σημαντικό ρόλο στη δομική σταθερότητα της παίζει το Mg^{2+} καθώς και για την ενζυμική της δραστηριότητα. Έχει διμερή μορφή που φαίνεται με κρυσταλλογραφία. Η PARN αποικοδομεί αποκλειστικά

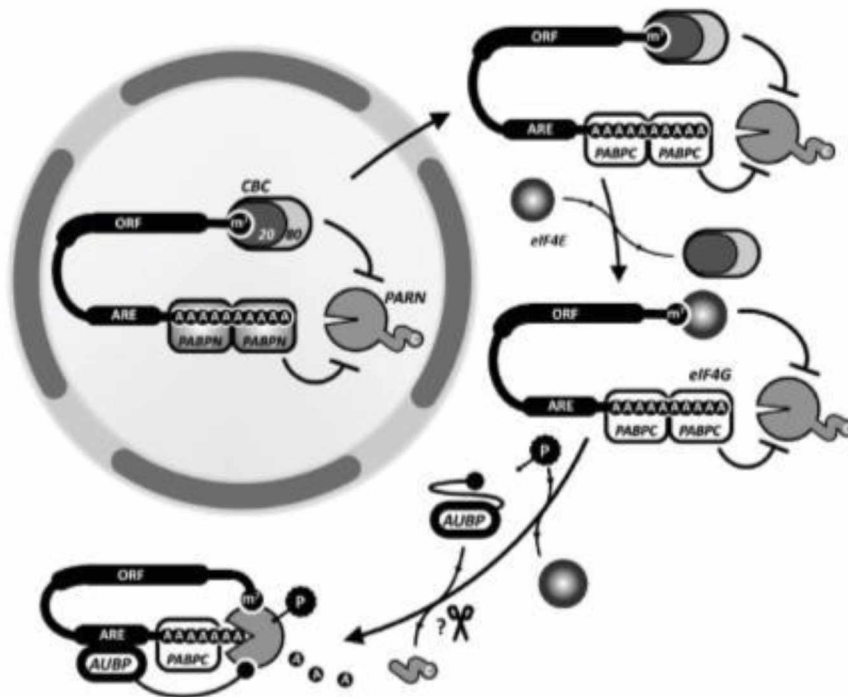
πολύ(Α) ουρές ευκαρυωτικών κυττάρων. Η PARN, επίσης, περιέχει δύο μοτίβα αναγνώρισης RNA: Το μοτίβο αναγνώρισης RNA (*RNA recognition motif, RRM*), που προσδένει το πολυ(Α) αλλά και το κάλυμμα (Nilsson et al. 2007). Το RRM απουσιάζει από την κρυσταλλική δομή της. Το δεύτερο μοτίβο είναι μια συντηρημένη περιοχή R3H που φαίνεται να έχει δομή όμοια με αυτήν της καρβοξυτελικής περιοχής ενός παράγοντα έναρξης της μετάφρασης (*Initiation Factor 3, IF3*) (Wu et al. 2005). Η R3H περιοχή προσδέεται σε μονόκλιωνα νουκλεϊκά οξέα και πιθανόν κατευθύνει την PARN στο πολυαδενυλιωμένο mRNA (**Εικόνα 8**).



Εικόνα 8. Οι δύο ισομορφές της ανθρώπινης PARN. Ο αστερίσκος αφορά σε σημαντικά αμινοξέα που συμμετέχουν στην πρόσδεση του καλύμματος. Wu et al.2005.

Πρόκειται για μία απαδενυλάση που υπόκειται σε πλήθος ρυθμιστικών μηχανισμών. Διακρίνονται σε εκείνους που δρουν θετικά στην ενεργότητα της και σε εκείνους που αναστέλλουν τη δράση της. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν η άμεση αλληλεπίδρασή της με το κάλυμμα στο 5' άκρο (Dehlin et al. 2000; Gao et al. 2000; Martinez et al. 2000; Martinez et al. 2001), η διέγερση της από την CUG-BP mRNA-προσδεδόμενη πρωτεΐνη, η οποία είναι το ανθρώπινο ανάλογο της πρωτεΐνης του *Xenopus* EDEN-BP (Gao et al. 2001), η διέγερση της από την KSRP προσδεδόμενη πρωτεΐνη (Gherzi R et al. 2010) και η διέγερση της από πρωτεΐνες που προσδέονται σε περιοχές γνωστές ως ARE (Lai et al. 2003). Η λειτουργία της αναστέλλεται από μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια πουρινών, ένα ανάλογο του καλύμματος, καθώς και συνθετικά νουκλεοσίδια (fluoro-pyranosyl nucleosides) (Balatsos et al. 2009; Martinez et al. 2000), από αναστολή από την κυτταρο-πλασματική πολυ(Α)-προσδεδόμενη πρωτεΐνη C (*PABPC*), πιθανόν λόγω της πρόσδεσης και αλληλεπίδρασης της τελευταίας με την πολυ(Α) ουρά (Gao et al. 2000; Korner and Wahle 1997) και από

συναγωνισμό μεταξύ της PARN και του eIF4E για την πρόσδεση του καλύμματος. Επίσης, η δράση της αναστέλλεται από τα αντιβιοτικά της κατηγορίας των αμινογλυκοσιδών, όπως η νεομυκίνη Β.(Chiba Y et al, 2004). Η ικανότητα αυτή των αμινογλυκοσιδών φαίνεται να επηρεάζεται από τις συγκεντρώσεις Mg^{2+} .



Εικόνα 9. Ρύθμιση της δράσης της PARN. Η δράση της PARN αναστέλλεται από το σύμπλοκο πρόσδεσης του καλύμματος (*Cap Binding Complex, CBC*), την πολύ(A) προσδεσόμενη πρωτεΐνη (*Poly(A) Binding Protein Nuclear/cytoplasm, PABPN/C*) και τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης *eIF4E*. Η διέγερση της PARN πραγματοποιείται από πρωτεΐνες που προσδέονται σε περιοχές ARE (*AUBP*). (Balatsos et al. 2012)

Nocturnin (NOC)

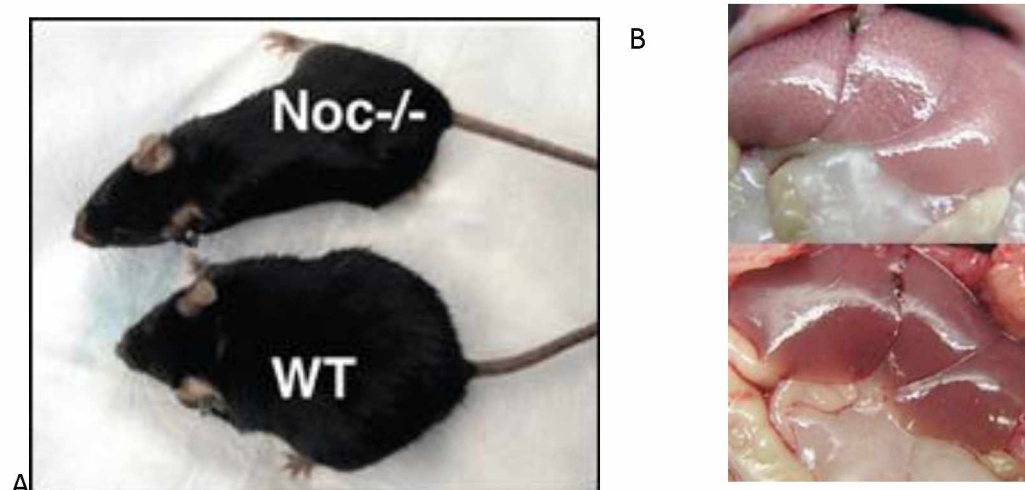
Η Nocturnin (NOC) αποτελούσε μέχρι πρόσφατα μέρος της οικογένειας EEP των

απαδενυλασών. Σε πρόσφατες, όμως, μελέτες αμφισβητείται η δράση της ως απαδενυλάση και ενισχύεται ο ρόλος της ως φωσφατάση που μετατρέπει τη NADP+ και NADPH σε NAD+ και NADH αντίστοιχα (Estrella M et al, 2019· Laothamatas I et al, 2020). Εκφράζεται περισσότερο τη νύχτα (nocturnal), με τη μέγιστη έκφρασή της να εκδηλώνεται 2-4 ώρες μετά την έναρξη του σκότους. Η έκφραση του γονιδίου της NOC παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στα ραβδοειδή κύτταρα και στους κωνοειδείς φωτουποδοχείς του αμφιβληστροειδή χιτώνα στον *Xenopus laevis* (Baggs and Green 2003)

Είναι ευρέως διαδεδομένη σε διάφορους ιστούς σε ποικίλους οργανισμούς (Wang Y et al. 2001, Curran KL et al. 2008, Gronke S et al. 2009). Στα θηλαστικά, εκτός από τον αμφιβληστροειδή έχει βρεθεί σε πολλά μέρη του εγκεφάλου και σε ιστούς που σχετίζονται με το μεταβολισμό όπως συκώτι, πνεύμονας, πάγκρεας, έντερο, μυς, νεφροί και μυελό των οστών (Barbot W et al. 2002, Gilbert MR et al. 2011, Kawai M et al. 2010). Η NOC χαρακτηρίζεται από άμεση ενεργοποίηση σε ερεθίσματα, πριν συντεθούν νέες πρωτεΐνες, ιδιότητα που χαρακτηρίζει τα γονίδια άμεσης απόκρισης. Συγκεκριμένα σε πείραμα που έγινε σε κύτταρα NIH3T3 από ινοβλάστες ποντικού, φάνηκε ότι υπήρχε άμεση απόκριση της NOC σε δύο εξωκυτταρικές διεγέρσεις, η καλλιέργεια των κυττάρων απουσία ορού (FBS) ή παρουσία φορβολικού εστέρα (TPA), ο οποίος προάγει την ανάπτυξη όγκων, προκάλεσε άμεση επαγωγή της έκφρασης της NOC, αφού τα επίπεδα του mRNA της αυξήθηκαν κατά πολύ. Αξιοσημείωτα, αυτές οι ισχυρές επιδράσεις είναι εξειδικευμένες για τη NOC, καθώς άλλες απαδενυλάσες όπως η CCR4, CAF1, PAN2 και PARN δεν επάχθηκαν από τους παράγοντες αυτούς. Η NOC λοιπόν ως γονίδιο άμεσης απόκρισης μπορεί και δρα με την ιδιότητα απαδενυλάσης καταστέλλοντας την έκφραση γονιδίων ως απόκριση σε αυτά τα εξωκυτταρικά σήματα (Garbarino-Pico et al. 2007). Επίσης, άλλη ιδιότητα χαρακτηριστική της NOC είναι ότι εμπλέκεται στον μεταβολισμό λιπιδίων και υδατανθράκων. Σε μελέτη στην οποία έγινε αδρανοποίηση του γονιδίου της NOC στα ποντίκια, φάνηκε ότι αναπτύχθηκε αντίσταση στην παχυσαρκία και στην ηπατική στεάτωση (**Εικόνα 10Α**). Τα NOC απογονιδιακά (knock out) ποντίκια παραμένουν αδύνατα σε διατροφές με πολλά λιπαρά, με χαμηλότερο σωματικό βάρος και μειωμένο κοιλιακό λίπος σε σχέση με τα φυσικού τύπου (**Εικόνα 10B**).

Η αδρανοποίηση της NOC έχει συσχετιστεί με μειωμένη έκφραση λιπογενών γονιδίων,

μειωμένη αποθήκευση λιπιδίων στον λιπώδη ιστό, μειωμένη συσσώρευση λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα, αυξημένη οξειδωση λιπιδίων σε σχέση με ποντίκια φυσικού τύπου αλλά και με μεταβολές στην ομοιόσταση της γλυκόζης (Green et al. 2007).



Εικόνα 10. (A) Η NOC εμπλέκεται στον μεταβολισμό λιπιδίων και υδατανθράκων. Τα ποντίκια από τα οποία έχει διαγραφεί το γονίδιο της NOC είναι αδύνατα. Παρόλο που τρέφονται με διατροφή με πολλά λιπαρά, έχουν χαμηλότερο σωματικό βάρος και μειωμένο κοιλιακό λίπος. **(B)** Το ήπαρ στο πάνω μέρος της εικόνας προέρχεται από φυσιολογικό ποντίκι και περιέχει μεγάλες ποσότητες λίπους μετά από διατροφή υψηλή σε λιπαρά. Αντίθετα, το ήπαρ στο κάτω μέρος προέρχεται από ένα NOC-/- ποντίκι, περιέχει φυσιολογικές ποσότητες λίπους και παραμένει υγιές μετά από διατροφή υψηλή σε λιπαρά. (Green et al. 2007)

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η δράση της NOC στα βλαστοκύτταρα του νωτιαίου μυελού (BMSC) όπου αναστέλλει την οστεοβλαστογένεση. Όταν τα βλαστοκύτταρα νωτιαίου μυελού (BMSC) εκτέθηκαν στον rosiglitazone, έναν αγωνιστή του PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ), έδειξαν ότι η έκφραση της NOC αυξήθηκε κατά 30 φορές. Ο PPAR- γ αποτελεί κρίσιμο μεταγραφικό παράγοντα για τη λιπογένεση αλλά και τον μεταβολισμό της γλυκόζης. Η NOC φαίνεται να προσδένεται στον PPAR- γ και να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη λιπογένεση, το μεταβολισμό της γλυκόζης και την οστεογένεση.

Επίσης, η NOC παίζει ρόλο στην ανάπτυξη της *Drosophila* και συγκεκριμένα στην κατάλληλη μορφογένεση των φτερών της.

Η έκφραση της NOC επηρεάζεται από το microRNA-122 που είναι ένα εξειδικευμένο microRNA των κυττάρων του ήπατος του ποντικού. Η πρόσδεση του miR-122 πάνω στο mRNA της NOC προκαλεί την άμεση αποσιώπησή της και τη μειωμένη έκφραση της κατά τη διάρκεια της νύχτας.

Απαδενυλάσες και παθήσεις του πνεύμονα

Οι απαδενυλάσες ρυθμίζοντας τη σταθερότητα του mRNA επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση και συμμετέχουν στην καρκινογένεση τροποποιώντας την έκφραση ογκογόνων ή ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Ανήκουν στους trans δραστικούς παράγοντες μαζί με τα μη κωδικοποιητικά RNAs (ncRNAs) και με πρωτεΐνες που συνδέονται με το RNA (RNA binding proteins, RBPs) (Kim and Lee 2009) σε αντίθεση με τα *cis*-ρυθμιστικά στοιχεία όπως η ουρά πολύ(A) και τα στοιχεία ARES (αλληλουχίες πλούσιες σε AU).

Σε περίπτωση που συμβεί μειωμένη αποικοδόμηση των ογκογόνων mRNA ή αυξημένη αποικοδόμηση των ογκοκατασταλτικών, τότε μπορεί να εμφανιστεί κακοήθεια και ως εκτούτου οι ριβονουκλεάσες μπορούν να δράσουν ως ογκοπρωτεΐνες ή καταστολείς όγκων (Kim and Lee 2009).

Επίσης, οι απαδενυλάσες συσχετίζονται και με καλοήθη νοσήματα του πνεύμονα και συγκεκριμένα μεταλλάξεις στο γονίδιο της PARN έχουν συνδεθεί με ασθένειες των τελομερών, όπως η οικογενής ιδιοπαθής κυστική ίνωση (familial idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) και η συγγενής δυσκεράτωση (dyskeratosis congenita) (Dhanraj et al. 2015, Moon et al. 2015, Stuart et al. 2015, Tummala et al. 2015).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός της Διατριβής

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι να μελετήσουμε τη βιολογική σημασία των απαδενυλασών σε στον καρκίνο του πνεύμονα. Γνωρίζουμε πως η γονιδιακή έκφραση είναι διαταραγμένη στον καρκίνο, ότι οι απαδενυλάσες παίζουν ρυθμιστικό ρόλο σε αυτήν, ενώ προηγούμενες μελέτες μας πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα (squamous cell carcinoma of the lung, SCC) αποτελούν πρώτα βήματα στην κατανόηση του ρόλου των απαδενυλασών στον καρκίνο του πνεύμονα. Το ερευνητικό μας ενδιαφέρον ενισχύθηκε από τα αποτελέσματα της υπολογιστικής μεταγραφωματικής ανάλυσης της έκφρασης των απαδενυλασών σε βάση δεδομένων Oncomine για τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (small cell lung carcinoma, SCLC) και με εμβάθυνση της ανάλυσης δεδομένων μας μικροσυστοιχιών στον SCC. Οι πρόσφατες γνώσεις από τη μελέτη της έκφρασης των απαδενυλασών στο πλακώδες καρκίνο του πνεύμονα ενίσχυσαν το ερευνητικό μας ενδιαφέρον για τους μηχανισμούς παθογένειας στον ιδιαίτερα επιθετικό αυτό τύπο καρκίνου πνεύμονα (SCLC). Παράλληλα, οι γνώσεις από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο αυτών υποτύπων καρκίνου πνεύμονα αποτελούν ιδιαίτερα ελκυστικό από ερευνητική άποψη αντικείμενο. Η απουσία ιδιαίτερης προόδου στον μικροκυτταρικό τύπο τόσο στην παθογένεια όσο και στην θεραπεία του επαυξάνει το ενδιαφέρον στην μελέτη μας.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς

Στην παρούσα μελέτη εντάχθηκαν 19 ασθενείς που διαγνώστηκαν με μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (small cell lung cancer, SCLC) στην Πνευμονολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας και στο Θεαγένειο Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης κατά τα έτη 2010-2012. Ελήφθη παθολογικός και παρακείμενος φυσιολογικός ιστός από κάθε ασθενή, όπου ο φυσιολογικός ιστός ήταν τουλάχιστον 5 cm μακριά από το τέλος του όγκου των αντίστοιχων δειγμάτων. Σε όλες τις περιπτώσεις, πραγματοποιήθηκε ιστολογική αξιολόγηση των τμημάτων του ιστού. Τα δείγματα που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη είχαν >70% περιεκτικότητα σε κακοήγη κύτταρα. Χαρακτηριστικά των ασθενών, όπως το φύλο, η ηλικία κατά τη διάγνωση, η ιστολογία του όγκου, το κλινικό στάδιο, και το ιστορικό καπνίσματος, συλλέχθηκαν από τα ιατρικά αρχεία τους και έγινε συσχέτιση με τα επίπεδα έκφρασης των απαδενυλασών.

Οι ασθενείς ήταν άνω των 18 ετών, ανήκαν και στα δύο φύλα και δεν είχαν λάβει καμία θεραπεία ως την ώρα της διάγνωσης (χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία ή στοχευμένη θεραπεία). Δεν έπασχαν από άλλη κακοήθεια εκτός από εντοπισμένο καρκίνο λάρυγγα ή καρκίνο δέρματος. Μετά τη λήψη των δειγμάτων, οι ασθενείς έλαβαν χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία ή και τα δύο και η απάντηση τους στη θεραπεία εκτιμήθηκε σύμφωνα με τα RECIST κριτήρια. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών φαίνονται στον **πίνακα 4**.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Χαρακτηριστικά ασθενών

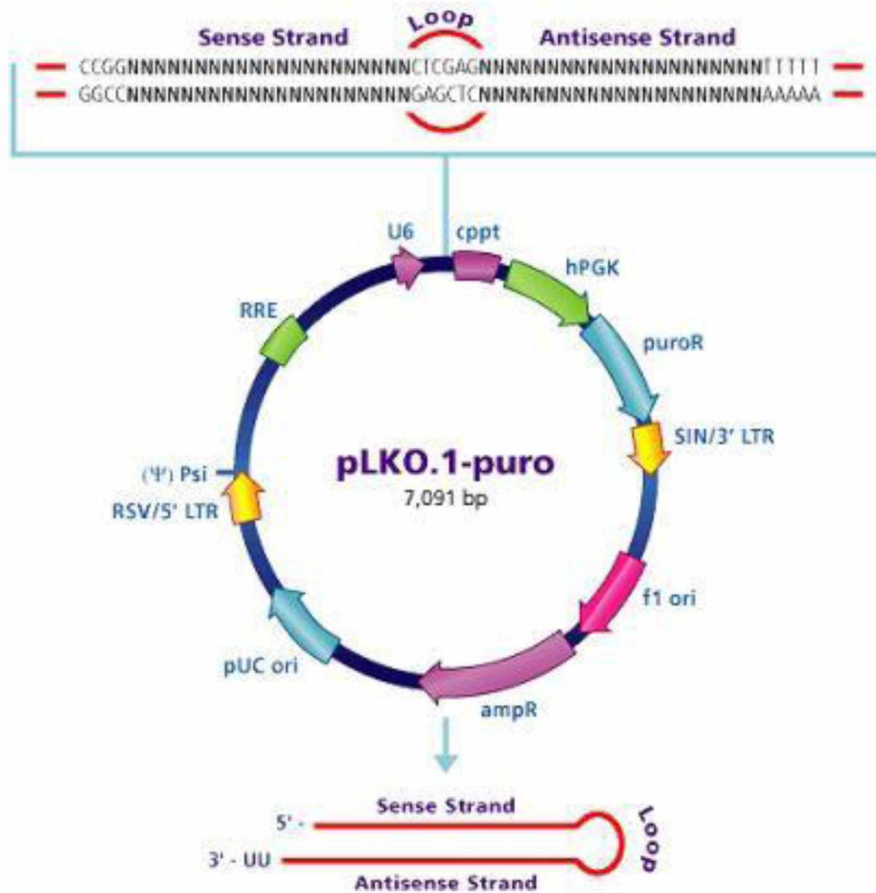
Άτομα (αριθμός)	19
Ηλικία (μέσος όρος)	65,73
Φύλο (άρρεν/θήλυ)	18 / 1
Pys (μέσος όρος)	68
Καπνιστές/πρώην καπνιστές	17 / 2
Στάδιο (εκτεταμένο/περιορισμένο)	16 / 3

Επιβίωση (μέσος όρος)	9,8 μήνες
-----------------------	-----------

Η Επιτροπή Ηθικών ζητημάτων του νοσοκομείου έλαβε γνώση και ενέκρινε τη μελέτη, ενώ όλοι οι συμμετέχοντες, υγιείς και ασθενείς ενημερώθηκαν για τη μελέτη και κατόπιν συμπλήρωσαν έντυπο συγκατάθεσης.

Αντιδραστήρια

Antibiotic-Antimycotic	(Biosera)
Αγαρόζη	(BIO-RAD)
Αιθανόλη	(Merck)
Αμπικιλίνη	(Sigma)
Bromophenol Blue	(Research Organics)
β-μερκαπτοαιθανόλη	(Riedel-de Haen)
GelRed Nuclein Acid Stain	(Biotium)
Γλυκερόλη	(Panreac)
D(+) Γλυκόζη	(Panreac)
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	(Sigma)
MEM	(Biosera)
DNA 1KB marker	(GenScript)
DNA marker 100 bp	(Invitrogen)
Fetal Bovine Serum (FBS)	(Gibco)
Ισοπροπανόλη	(Scharlau)
KH ₂ PO ₄	(Merck)
LB Agar	(Scharlau)
LB Broth	(Scharlau)
MEM	(Biosera)
Na ₂ HPO ₄	(Merck)
NaCl	(Panreac)
NaOH	(Merck)
Οξικό οξύ	(Merck)
Phosphate buffered saline (PBS Tablets)	(Calbiochem)
Protease Inhibitors	(Roche)
Puromycin	(Sigma)
Tris base	(Merck)
Trypan blue solution 0,4%	(Sigma)
Trypsin-EDTA 5% 10 ×	(Gibco)



Εικόνα 11. Φορέας pLKO.1-puro που χρησιμοποιήθηκε για τις αποσιωπήσεις στις σειρές NCI-H520 και HEp-2. Cppt, Central polypurine tract • Hpgk, Human phosphoglycerate kinase eukaryotic promoter • PuroR, Puromycin resistance gene for mammalian selection • SIN/LTR, 3' self-inactivating long terminal repeat • f1 ori, f1 origin of replication • AmpR, Ampicillin resistance gene for bacterial selection • pUC ori, pUC origin of replication • 5' LTR, 5' long terminal repeat • Psi, RNA packaging signal • RRE, Rev response element

Εκκινητές

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των απαδενυλασών και των υπολοίπων εξεταζόμενων παραγόντων με Real Time PCR, σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος PRIMER 3 εκκινητές (primers) ειδικοί για το mRNA (για την ακρίβεια cDNA) του κάθε υπό μελέτη παράγοντα. Ο κάθε εκκινητής ελέγχθηκε ως προς την εξειδίκευση του για το αντίστοιχο cDNA-στόχο με Blastn (**Πίνακας 5**).

Πίνακας 5. Αλληλουχίες των εκκινητών και τα αναμενόμενα μεγέθη των ενισχυμένων προϊόντων.

Target Gene	forward/ reverse	primer sequence	product size (bp)
PARN	Fwd	5'-CAGCAGAAACATGCCAAAGA-3'	211
	Rvs	5'-CCAAGAGTCTGGGGAAAACA-3'	
CNOT6	Fwd	5'-AGCTGTCATGGGAAGAATGG-3'	236
	Rvs	5'-GGGCAGCCACTGATGTTATT-3'	
CNOT6L	Fwd	5'-CGGCTCTCCAGCTACAAAC-3'	143
	Rvs	5'-GGAAGCTGCTCTGGATGAAC-3'	
CNOT7	Fwd	5'-GTCCTCTGTGAAGGGGTCAA-3'	411
	Rvs	5'-GACTGCTTGTGGCTTCCTC-3'	
NOC	Fwd	5'-GCCAAGACACTGAACAGCAG-3'	175
	Rvs	5'-GGCAATCTGTCCTCAGATCC-3'	
PTGIR	Fwd	5'-CTTCCAGCGACTCAAGCTCT-3'	239
	Rvs	5'-CTTCTGCTTTGGACGACGTT-3'	
FGFBP2	Fwd	5'-CAAGGCCACAGTGAAACTCA-3'	151

AATK	Rvs	5'-GGCCTTCTTCTTTGCTTCCT-3'	179
	Fwd	5'-CCTGGCTCACTGCAAGTACA-3'	
DPPA3	Rvs	5'-GCTCAAAGAGCTCCCAGATG-3'	182
	Fwd	5'-CACAAATGCTCACCGAAGAA-3'	
β-actin	Rvs	5'-TTCGATTTCCCTGAGGACTG-3'	234
	Fwd	5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'	
18S Rrna	Fwd	5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3'	253
	Rvs	5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'	

Απομόνωση ολικού RNA

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

TRI Reagent (SIGMA) Protocol

1. Φυγοκέντρηση κυττάρων 3000g, 3 min, 4°C.
Διατηρούμε το ίζημα και απορρίπτουμε το υπερκείμενο.
2. Προσθέτουμε **1V** TRI Reagent στο ίζημα (0,2 -1,0 mL).
Λύση κυττάρων με επαναλαμβανόμενο πιπεττάρισμα έως 5 min.
3. Προσθέτουμε **0,1V** 1-bromo-3-chloropropane.
Ανακατεύουμε έντονα για 15 sec. Αφήνουμε για 15 min.
Φυγοκέντρηση 12000g για 15 min, 4°C.
4. Μεταφορά υδατικής φάσης σε νέο σωληνάκι
Προσθέτουμε **0,5V** 2-propanol, ανακατεύουμε, RT 10 min.
Φυγοκέντρηση 12000g για 10 min, 4°C.
5. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο.

Πλύση ιζήματος RNA **1-2 V** EtOH75%, vortex.

Φυγοκέντρηση 12000g για 5 min, 4°C.

6. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο προσεκτικά. Στεγνώνουμε το ίζημα RNA.

Επαναδιάλυση σε ddH₂O πιπετάροντας στους 55°C.

Αποθήκευση στους -80°C

Real Time PCR δύο βημάτων (two-step Real Time PCR, qRT-PCR)

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 προκειμένου να ενισχυθεί στη συνέχεια με απλή RT-PCR χρησιμοποιήθηκε το Prime 1st Strand cDNA Synthesis Kit (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 μM)*	1.0 μl
dNTP Mixture (10 mM each)	1.0 μl
Template RNA	Ολικό RNA : < 5 μg*
RNase free dH ₂ O	μέχρι 10 μl

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 και ξεκινά η μετατροπή του ολικού RNA σε cDNA στους 42 °C για 60 min.

Αντιδραστήρια	Όγκος
Template RNA Primer Mixture	μέχρι 10.0μl
5X 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 ₂ O	μέχρι 20.0 μl

4. Τερματίζουμε την αντίδραση στους 70 °C για 15 min και τοποθετούμε το erpendorf στον πάγο.

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 green η οποία διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497nm και εκπέμπει στα 520nm. 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 δίκλινα 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. 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 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 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 **Πίνακας 5** και **Πίνακας 6** αντίστοιχα.

Πίνακας 6. Συστατικά αντίδρασης RT-PCR.

	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

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

Βήματα qPCR	Συνθήκες αντίδρασης
Αποδιάταξη (Denaturation, Hot Start)	95°C, 3min (1 κύκλος)
Ενίσχυση (Amplification)	95°C, 3sec 60°C, 30sec 72°C, 11sec (40 κύκλοι)
Διάσπαση (Dissociation)	95°C, 1min 55°C μέχρι 95°C (1 κύκλος)

Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά

Για την συσχέτιση της έκφρασης των απαδενυλασών με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και την πρόγνωση των ασθενών (καμπύλες επιβίωσης) χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GraphPad Prism 4.0 for Mac (GraphPad Software, San Diego, USA). Τα δείγματα μοιράστηκαν σε δυο ομάδες, όπου η έκφραση της κάθε απαδενυλάσης είναι αυξημένη ή μειωμένη στα παθολογικά δείγματα σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά και ακολούθησε η επιθυμητή στατιστική ανάλυση. Τα δείγματα που δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική μεταβολή δεν συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση.

Αποτελέσματα

Οι απαδενυλάσες έχουν περιορισμένο αριθμό συγκεκριμένων μεταγράφων-στόχων

Εξετάσαμε τη σχέση μεταξύ των απαδενυλασών CNOT και τον ρόλο στη γονιδιακή έκφραση σε δύο κυτταρικές σειρές διαφορετικής καρκινικής προέλευσης: την NCI-H20 από πλακώδες καρκινώμα πνεύμονα και την HEr-2, που αρχικά περιγράφηκε ότι προέρχεται από άνθρωπο επιδερμοειδές (HEp) καρκίνωμα του λάρυγγα ([Moore et al., 1955](#); [Toolan, 1951](#)). Ο συνδυασμός των παρατηρήσεων σχετικά με τις αλλαγές γονιδιακής έκφρασης στο SCC κατά τη σίγαση των απαδενυλασών του συμπλόκου CCR4-NOT με προηγούμενα αποτελέσματα αποσιώπησης της PARN ([Maragozidis et al., 2015](#)) αποκάλυψε μετάγραφα που εκφράστηκαν διαφορετικά. Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε ανάλυση έκφρασης σε όλο το γονιδίωμα για να εντοπίσουμε πιθανά μετάγραφα-στόχους των CNOT6, CNOT6L, CNOT7, PARN και NOC. Πρέπει να σημειωθεί πως η NOC είχε περιγραφεί αρχικά ως απαδενυλάση, ωστόσο πλέον θεωρείται φωσφατάση ([Laothamatas et al., 2020](#)). Παρόλα αυτά, συμπεριλάβαμε τη NOC στην ανάλυσή μας καθώς έχει μελετηθεί σε προηγούμενες μελέτες του καρκίνου του πνεύμονα ([Guntur et al., 2011](#); [Kawai et al., 2010](#); [Maragozidis et al., 2015](#)). Η έκφραση της CNOT8 δεν ήταν ανιχνεύσιμη σε κύτταρα NCI-H520 με RT-qPCR και δεν συμπεριλήφθηκε στην ανάλυσή μας.

Κατά τη αποσιώπηση των CNOT6, CNOT6L, CNOT7, PARN και NOC σε κύτταρα NCI-H520, εντοπίσαμε 583, 379, 361, 313 και 324 μετάγραφα, αντίστοιχα, τα επίπεδα των οποίων αυξήθηκαν περισσότερο από δύο φορές [Fold-change \geq FC2 (Εικόνα 12A)]. Επιπλέον, μόνο μερικά mRNAs έδειξαν μειωμένα επίπεδα στην αποσιώπηση της CNOT6, ενώ 114, 135, 172 και 85 mRNA μειώθηκαν σε κύτταρα CNOT6L, CNOT7, PARN και NOC στο NCI-H520, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τους αντίστοιχους μάρτυρες (Εικόνα 12B). Επίσης, ανιχνεύσαμε 23 αυξορυθμισμένα¹ και 33 μειωρυθμισμένα γονίδια που ήταν κοινά στις

¹ Ως αυξορυθμισμένο γονίδιο αποδίδεται ο όρος *upregulated gene*, ένα γονίδιο του οποίου τα επίπεδα μεταγράφων που κωδικοποιεί είναι αυξημένα. Αντίστοιχα, ως μειωρυθμισμένο γονίδιο αποδίδεται ο όρος *downregulated gene*. Ομοίως, ως αυξορυθμισμένο (μειωρυθμισμένο) μετάγραφο αποδίδεται ο *upregulated (downregulated) transcript*.

αποσιωπήσεις και των πέντε απαδενυλασών (Εικόνα 12). Τα μετάγραφα που απορρυθμίστηκαν με την αποσιώπηση μιας απαδενυλάσης αποτελούν πιθανούς αποκλειστικούς στόχους αυτής της απαδενυλάσης.

Για να αποκτήσουμε περισσότερες πληροφορίες για τις μοριακές λειτουργίες και τις βιολογικές διεργασίες των διαφοροποιημένων μεταγραφών που ανιχνεύθηκαν, πραγματοποιήσαμε Ανάλυση Over-Representation (Over-Representation Analysis, ORA) των κατηγοριών οντολογιών γονιδίων (Gene Ontology, GO) χρησιμοποιώντας το εργαλείο ConsensusPathDB-human (<http://consensuspathdb.org>) (Kamburov et al., 2013; Kamburov et al., 2009). Η ανάλυση των κοινών αυξορυθμισμένων μεταγραφών αποκάλυψε 30 εμπλουτισμένες GO, ενώ τα κοινά μετάγραφα με μειωμένα επίπεδα αποκάλυψαν 21 εμπλουτισμένες GO.

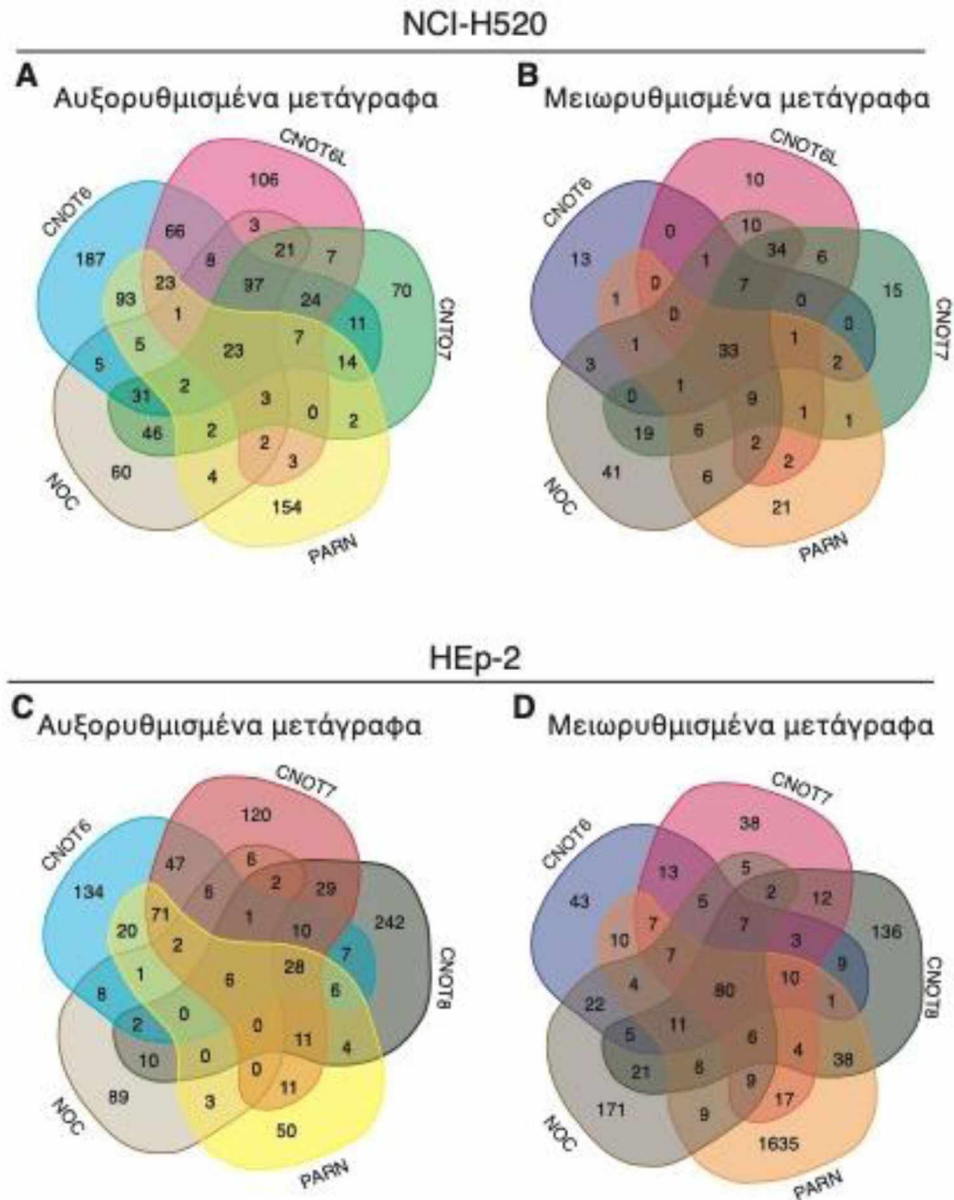
Σε προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου δείχθηκε ότι η PARN και η NOC επηρεάζουν ποικίλους πληθυσμούς mRNA σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές (Maragozidis et al., 2015). Η έκφραση των CNOT6, CNOT7, CNOT8, PARN και NOC αποσιωπήθηκε σε κύτταρα HEp-2 με κατάλληλα shRNAs. Η CNOT6L δεν αποσιωπήθηκε αποτελεσματικά στα κύτταρα HEp-2 και ο ρόλος του δεν εξετάστηκε περαιτέρω. Η ανάλυση μικροσυστοιχιών ανέδειξε 1406 μετάγραφα με αυξημένα επίπεδα με μόνο 6 κοινά μετάγραφα μεταξύ των απαδενυλάσεων. Περαιτέρω, μεταξύ 3037 μεταγράφων με μειωμένα επίπεδα, 80 ήταν κοινά (Εικόνα 12C και 12D). Η αποσιώπηση των επιλεγμένων απαδενυλασών έδωσε μόνο 3 GO εμπλουτισμένες από τα κοινά μετάγραφα με αυξημένα και 18 GO από κοινά μετάγραφα με μειωμένα επίπεδα.

Συνολικά, η αποσιώπηση των απαδενυλασών σε δύο κυτταρικές σειρές διαφορετικής καρκινικής προέλευσης, NCI-H520 και HEp-2, επηρέασε διαφορετικές ομάδες μεταγραφών με πολύ λίγα κοινά γονίδια, υποδεικνύοντας έναν διακριτό ρόλο για κάθε ένζυμο σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Φαίνεται ότι τα επίπεδα και η σταθερότητα της πλειοψηφίας των μεταγράφων ελέγχονται ειδικά και ενδεδειγμένα, καθώς πολύ λίγα μετάγραφα φαίνεται να ρυθμίζονται από μία μόνο απαδενυλάση.

Αποσιώπηση απαδενυλασών - σύγκριση με κυτταρική σειρά MCF7

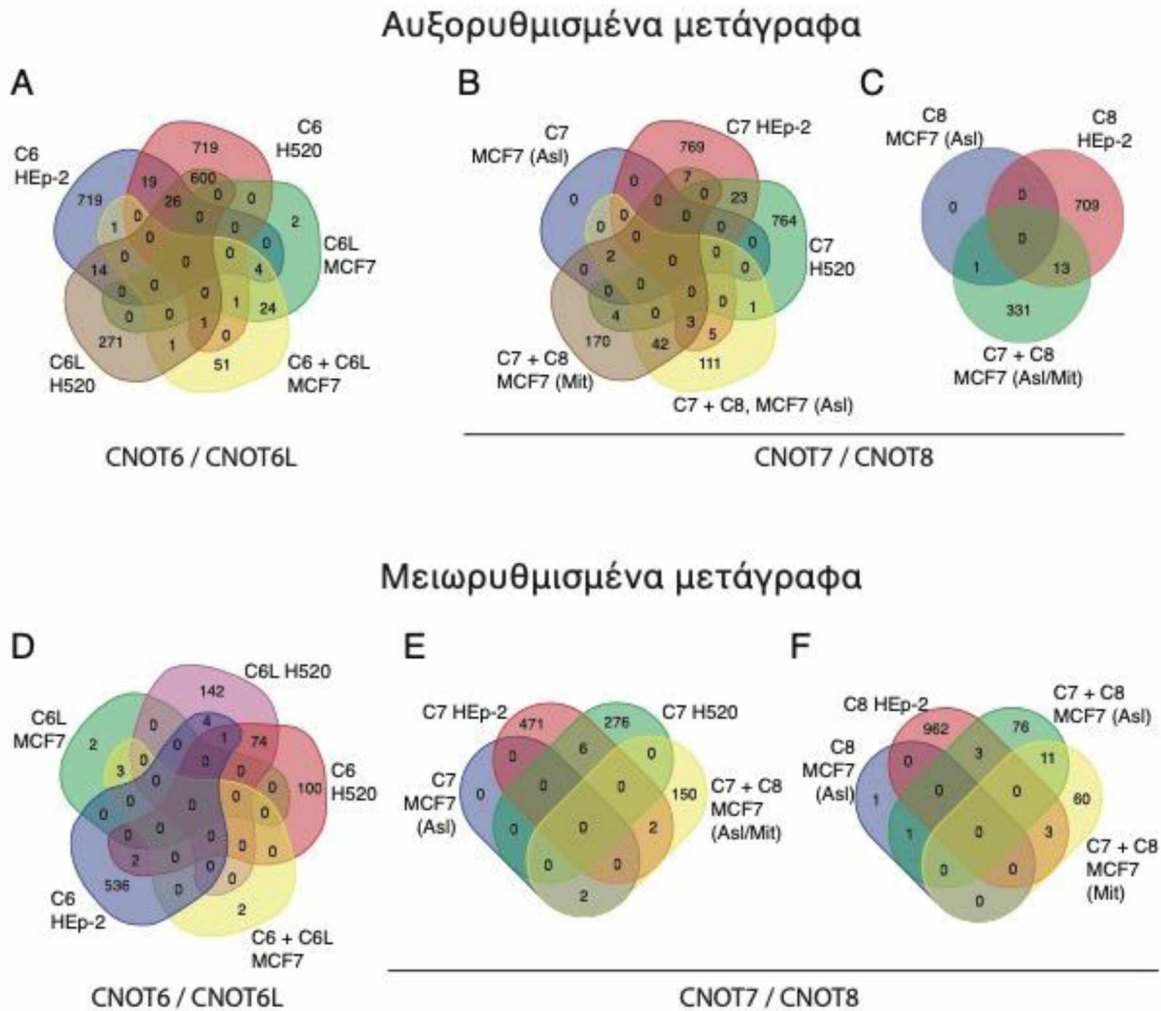
Για να επεκτείνουμε τα αποτελέσματα μας σε κύτταρα NCI-H520 και HEP-2 από καρκίνους του πνεύμονα και του λάρυγγα, αντίστοιχα, συμπεριλάβαμε στην ανάλυσή μας δεδομένα από την αποσιώπηση των CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8 από άλλη κυτταρική σειρά, συγκεκριμένα την MCF7 (προέρχεται από υπεζωκοτική συλλογή καρκίνου του μαστού) από προηγούμενες μελέτες ([Aslam et al., 2009](#); [Mittal et al., 2011](#)). Στις μελέτες του Aslam και συν., και του Mittal και συν., η ανάλυση βασίστηκε σε αλλαγές των επιπέδων των μεταγράφων κατά 1,5-φορά (FC1.5). Μετά την αποσιώπηση της CNOT6 σε NCI-H520, HEP-2 και τη σύγκριση με την αυτή των CNOT6/CNOT6L σε κύτταρα MCF-7, εντοπίσαμε 45 κοινά αυξορυθμισμένα γονίδια μεταξύ NCI-H520 και HEP-2, 2 μεταξύ CNOT6 KD² NCI-H520 και CNOT6/CNOT6L KD MCF7 (GPR81, DCLK1) και 5 μεταξύ κυττάρων HEP-2 και CNOT6/CNOT6L KD MCF7 (LMO3, MUCL1, SLITRK6, GALNT12, F7). Επίσης, βρήκαμε μόνο 3 κοινά μειωρυθμισμένα γονίδια στα κύτταρα NCI-H520 και HEP-2 (LYPD1, GPR153, RBM24). Η ανάλυση αποκάλυψε επίσης μόνο 2 κοινά μετάγραφα με αυξημένα επίπεδα σε κύτταρα CNOT6L KD NCI-H520 και CNOT6/CNOT6L KD MCF7 (CXCL17, GPR81), αλλά κανένα σε κύτταρα NCI-H520, HEP-2 και MCF7. Η CNOT7 KD στο HEP-2 είχε ως αποτέλεσμα 23 αυξορυθμισμένα κοινά μετάγραφα. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στην Εικόνα 13.

² Όπου KD είναι συντομογραφία του knock-down και δηλώνει αποσιώπηση ενός παράγοντα μέσω του μονοπατιού της παρεμβολής RNA (RNA interference, RNAi). Έτσι, NCI-H520 CNOT6 KD δηλώνει κύτταρα NCI-H520 όπου έχει αποσιωπηθεί η έκφραση της CNOT6.



Εικόνα 12. Μετάγραφα που έχουν επηρεαστεί από υπό εξέταση απαδενυλάσες. A, B. Διαγράμματα Venn που δείχνουν τα αυξορυθμισμένα μετάγραφα (A) και τα μειωρυθμισμένα μετάγραφα (B) μετά από αποσιώπηση των CNOT6, CNOT6L, CNOT7, PARN, και NOC σε κύτταρα NCI-H520. C, D. Διαγράμματα Venn που δείχνουν αυξορυθμισμένα μετάγραφα (C) και μειωρυθμισμένα μετάγραφα (D) μετά από αποσιώπηση των CNOT6, CNOT7, CNOT8, PARN, και NOC σε κύτταρα HEp-2. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε μετάγραφα

με διαφορετικά επίπεδα, τα οποία αλλάζουν κατά FC2 μετά από αποσιώπηση της κάθε απαδενυλάσης.



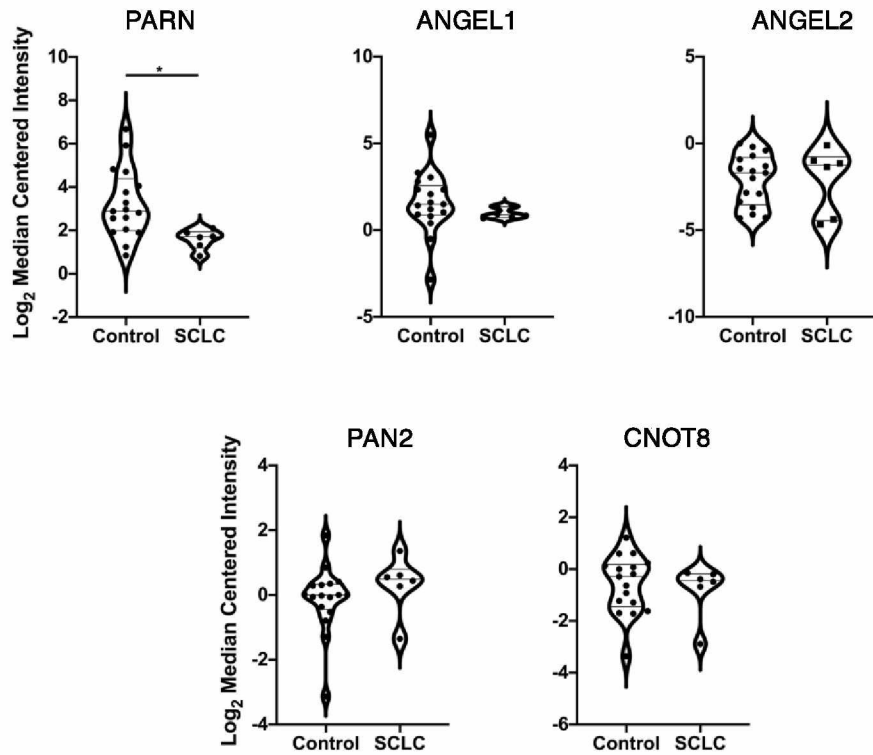
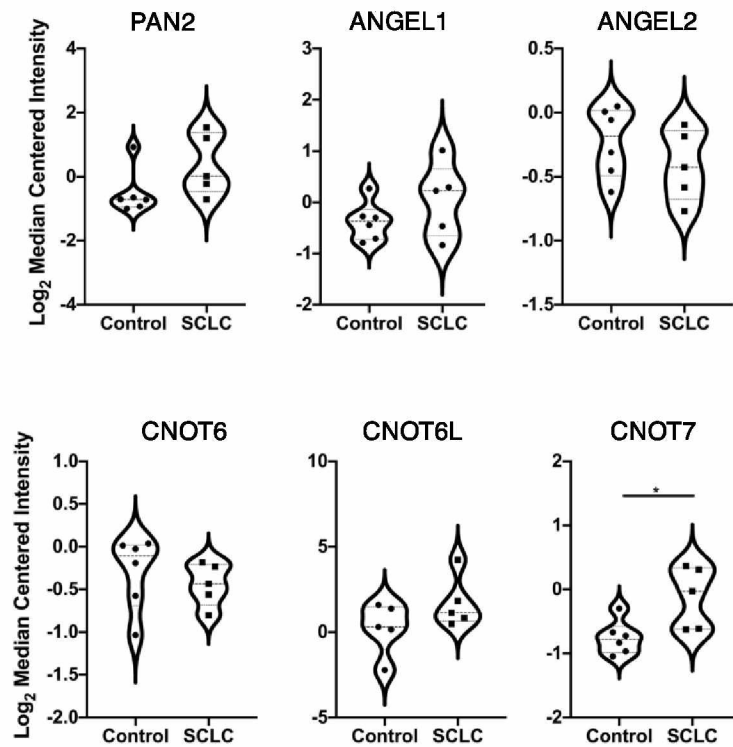
Εικόνα 13. Μετάγραφα με αυξημένα και μειωμένα επίπεδα μετά από αποσιώπηση σε κύτταρα NCI-H520, HEp-2 και MCF7.

A – C. Διαγράμματα Venn που δείχνουν τον αριθμό των αυξορυθμισμένων μεταγράφων μετά από αποσιώπηση των CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και CNOT8 σε κύτταρα NCI-H520, HEp-2 και MCF7. D – E. Διαγράμματα Venn που δείχνουν τον αριθμό των μειωρυθμισμένων μεταγράφων μετά από αποσιώπηση των CNOT6, CNOT6L, CNOT7 και

CNOT8 σε κύτταρα NCI-H520, HEP-2 και MCF7s. Τα δεδομένα για τα μετάγραφα από τα κύτταρα MCF7 είναι από τους Aslam και συνεργατών (σημειώνονται ως A) και των Mittal και συνεργατών (σημειώνονται ως M) (Aslam et al., 2009; Mittal et al., 2011). Όπου C6, CNOT6· C6L, CNOT6L· C7, CNOT7· C8, CNOT8.

Υπολογιστική μεταγραφωματική ανάλυση της έκφρασης των απαδενυλασών στο μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα

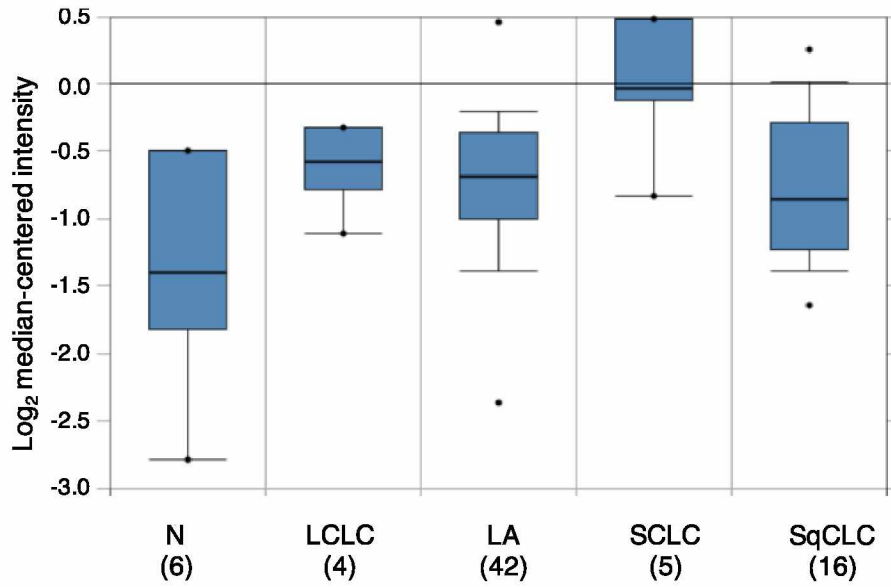
Η κατατομή έκφρασης των απαδενυλασών μελετήθηκε σε βάση Oncomine με δεδομένων μικροσυστοιχιών στο SCLC σε σύγκριση με μη παθολογικά δείγματα καθώς και με άλλους τύπους καρκίνου πνεύμονα. Διαπιστώσαμε ότι στη βάση δεδομένων από τη Battacharjee Lung study, η έκφραση της PARN ήταν σημαντικά μειωμένη ($p=5,00$) στο SCLC σε σύγκριση με μη παθολογικά δείγματα ενώ η έκφραση των ANGEL1 ($p=0,100$), ANGEL2 ($p=0,256$), PAN2 (0,164) και CNOT8 ($p=0,380$) δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά στις δύο ομάδες. Στην ανάλυση της μελέτης (Garber ME et al, 2001) η έκφραση της CNOT7 ήταν σημαντικά αυξημένη ($p=0,037$) σε σύγκριση με τα μη παθολογικά δείγματα ενώ η έκφραση των CNOT6 ($p=0,173$), CNOT6L ($p=0,096$), ANGEL1 ($p=0,126$), ANGEL2 ($p=0,156$) και PAN2 (0,146) δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά. Η διαφορετική έκφραση των απαδενυλασών PARN και CNOT7 που παρατηρήθηκε και στις δύο περιπτώσεις αφορά σε μικρό αριθμό δειγμάτων, η πρώτη έξι (6) με SCLC με δεκαεπτά (17) φυσιολογικά και η δεύτερη, πέντε (5) δείγματα με SCLC προς έξι (6) φυσιολογικά δείγματα, γεγονός που απαιτεί ανάλυση περισσότερων δειγμάτων για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων.

A Bhattacharjee και συν.

B Garber και συν.


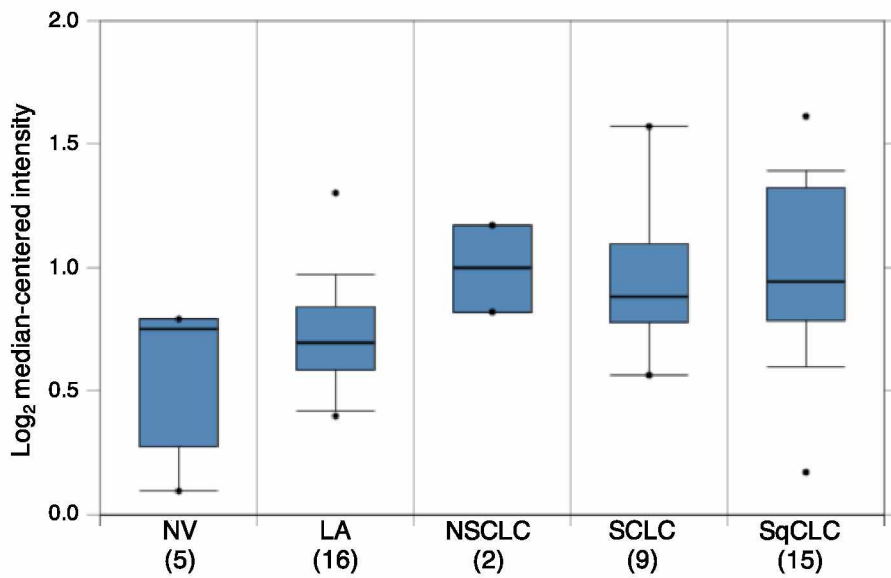
Εικόνα 14. Μεταγραφωματική ανάλυση των επιπέδων των απαδενυλασών στον SCLC από δεδομένα μικροσυστοιχιών όπως αντλήθηκαν από την τράπεζα δεδομένων Oncomine (Oncomine database). Τα επίπεδα των mRNA των απαδενυλασών στον SCLC βασίστηκαν στις εργασίες των Bhattacharjee (A) και Garber (B). Η PARN είναι σημαντικά μειωμένη στην εργασία των Bhattacharjee ($p=0.02$), ενώ η CNOT7 είναι σημαντικά αυξημένη στην εργασία των Garber ($p=0.02$). Σε όλα τα διαγράμματα ο άξονας ψ δίνει την Log_2 Median Centered Intensity.

Μελέτη της έκφρασης πρωτεϊνών που συνδέονται με το RNA (RNA-binding proteins) στον SCLC

Οι πρωτεΐνες που συνδέονται με το RNA (RNA-binding proteins) επηρεάζουν τη σταθερότητα του σε περιοχές πλούσιες σε AU (AU-Rich elements, AREs), πιθανώς μέσω του μηχανισμού απαδενυλίωσης. Η πρωτεΐνη KHSRP προάγει την αποδόμηση του mRNA μέσω απαδενυλίωσης, προσελκύοντας την PARN. Η μεταγραφωματική ανάλυση της έκφρασης της που έγινε μέσω μικροσυστοιχιών στο SCLC, έδειξε ότι είναι σημαντικά αυξημένη σε σχέση με υγιή δείγματα ή άλλους καρκίνους πνεύμονα όπως φαίνεται στην **Εικόνα 15**.



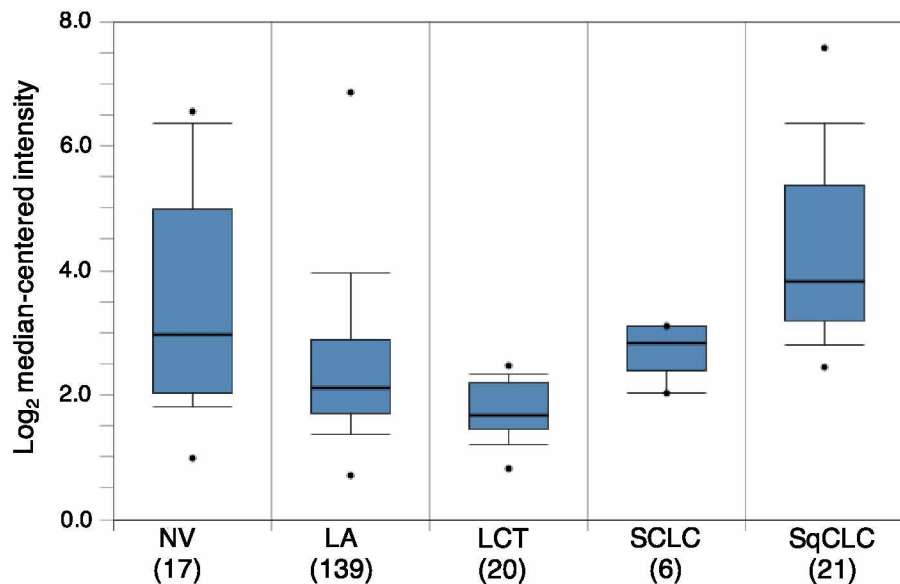
Εικόνα 15. Έκφραση KHRSP σε υπότυπους καρκίνου πνεύμονα: N, φυσιολογικός ιστός· LCLC, μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα· LA, αδenoκαρκίνωμα πνεύμονα· SCLC, μικροκυτταρικό καρκίνωμα· SqCLC, πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα



Εικόνα 16. Φυσιολογικός ιστός· LA, αδenoκαρκίνωμα πνεύμονα· NSCLC, μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα· SCLC, μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα· SqCLC, πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα

Επίσης, η μελέτη της έκφρασης της KHRSP στη βάση δεδομένων Rohbeck με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών έδειξε ότι υπερεκφράζεται στο SCLC σε σύγκριση με τα υγιή δείγματα αλλά όχι σε σύγκριση με το πλακώδες καρκίνο πνεύμονα. **Εικόνα 16.**

Η έκφραση της KHRSP, αντιθέτως, δεν αυξήθηκε στη μελέτη Bhattachajee σε σύγκριση με τον υγιή ιστό ή άλλους καρκίνους πνεύμονα, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 17.**



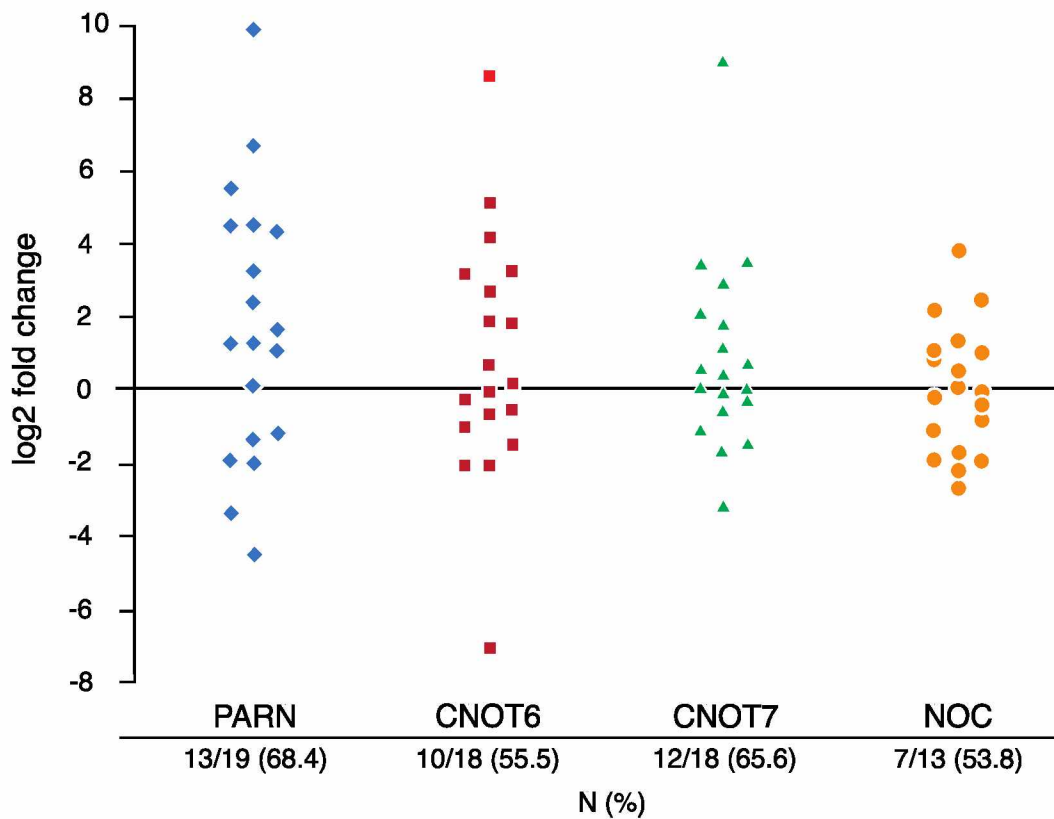
Εικόνα 17. NV, φυσιολογικός ιστός· LA, αδenoκαρκίνωμα πνεύμονα· LCT, καρκινοειδής όγκος· SCLC, μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα· SqCLC, πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα

Συμπερασματικά, από την υπολογιστική μεταγραφωματική ανάλυση με μικροσυστοιχίες, ενώ παρατηρείται αυξημένη έκφραση της KHRSP στο SCLC, δεν

παρατηρείται σε επίπεδο απαδενυλασών. Παρόμοια συμπεράσματα με αυξημένη έκφραση της KHRSP προκύπτουν από την έκφραση της σε κυτταρικές σειρές SCLC (NCI-H69, NCI-H82 και NC1-H209) σε σύγκριση με κυτταρικές σειρές NSCLC (A549, NCI-H23 και NCI-H520) (Sebahat Ocak et al, 2014).

Έκφραση των απαδενυλασών σε δείγματα ασθενών με SCLC

Πραγματοποιήσαμε συγκριτική ποσοτικοποίηση (comparative quantification) σε δείγματα 19 ασθενών με SCLC με τα αντίστοιχα μη-παθολογικά δείγματα των ίδιων ασθενών και αναλύσαμε τα επίπεδα έκφρασης των απαδενυλασών από τις δυο υπεροικογένειες, DEDD και EEP. Από τις υπό εξέταση απαδενυλάσες η έκφραση των ANGEL1, ANGEL2, PARNL, CNOT8 και PAN2 δε διέφερε μεταξύ κακοήθους και φυσιολογικού ιστού. Τα επίπεδα mRNA της PARN ήταν αυξημένα σε 13 δείγματα SCLC (68,4%, $\log_2 FC > 0$), ενώ σε 6 δείγματα η έκφραση ήταν μειωμένη (31,6%, $\log_2 FC < 0$). Τα επίπεδα της CNOT6 ήταν αυξημένα σε 10 παθολογικά δείγματα (55,5%) και ήταν μειωμένα σε 8 ασθενείς (44,5%). Η NOC υπερεκφράστηκε σε 7 δείγματα (53,8%) ενώ υποεκφράστηκε σε 6 δείγματα (46,2%). Η CNOT7 υπερεκφράστηκε σε 12 (66,65%) και υποεκφράστηκε σε 6 δείγματα (33,4%). Η συγκριτική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των απαδενυλασών αναλύθηκε με Real-Time PCR όπως φαίνεται στην **Εικόνα 18**.



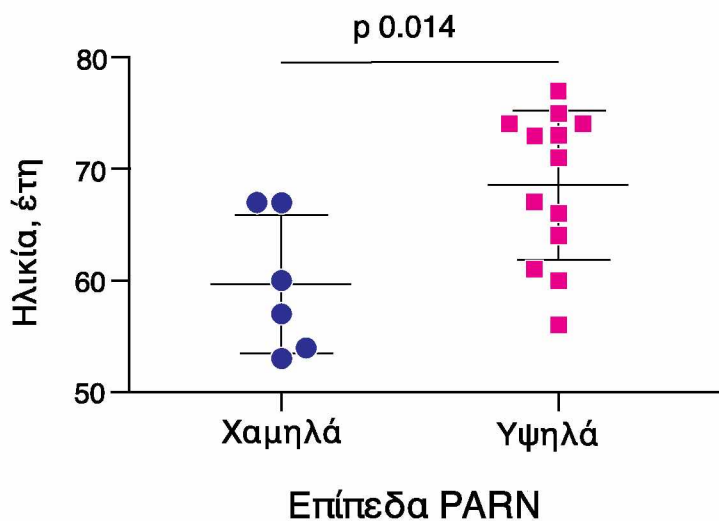
Εικόνα 18. Συγκριτική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των απαδενυλασών στο μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα (SCLC). Τα επίπεδα mRNA των PARN (ρόμβος), CNOT6 (τετράγωνο), CNOT7 (τρίγωνο) και NOC (κύκλος) μετρήθηκαν με Real-Time PCR σε κυτταρικά εκχυλίσματα SCLC και εκφράζονται ως μεταβολές σε σχέση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό (\log_2 fold-change). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη σχετική έκφραση της απαδενυλάσης στον κακοήγη ιστό συγκριτικά με τον φυσιολογικό του ίδιου ασθενούς. Η έκφραση των μη-παθολογικών δειγμάτων καθορίστηκε ως $p < 0,05$.

Συσχέτιση της έκφρασης των απαδενυλασών με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά

Για να συσχετίσουμε τα προηγούμενα αποτελέσματα με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, χωρίσαμε τα δείγματα σε δυο ομάδες, όπου η έκφραση της κάθε απαδενυλάσης είναι αυξημένη ή μειωμένη στα παθολογικά δείγματα σε σχέση με τα αντίστοιχα μη-παθολογικά. Παρόμοια προσέγγιση έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την ταυτοποίηση των γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό του RNA, όπου οι ασθενείς χωρίστηκαν σύμφωνα με υψηλά και χαμηλά επίπεδα έκφρασης του mRNA (Valles et al. 2012).

Συμπεραίνεται ότι οι πιο ηλικιωμένοι ασθενείς είχαν αυξημένα επίπεδα PARN από τους νεότερους (68.5+6.7 vs 59.7+6.2 έτη) όπως φαίνεται στην **Εικόνα 19**.

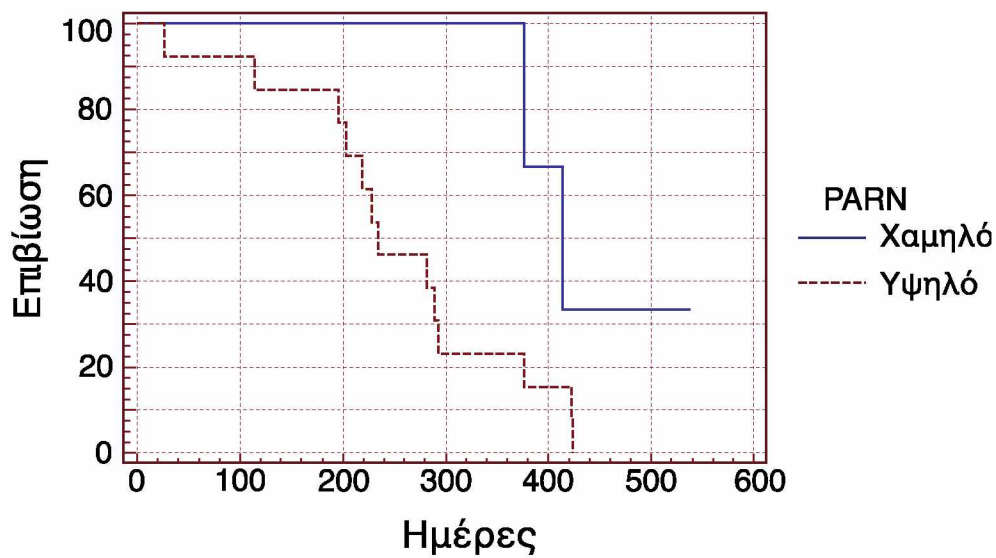
Δεν υπήρχε συσχέτιση με το καπνιστικό ιστορικό των ασθενών.



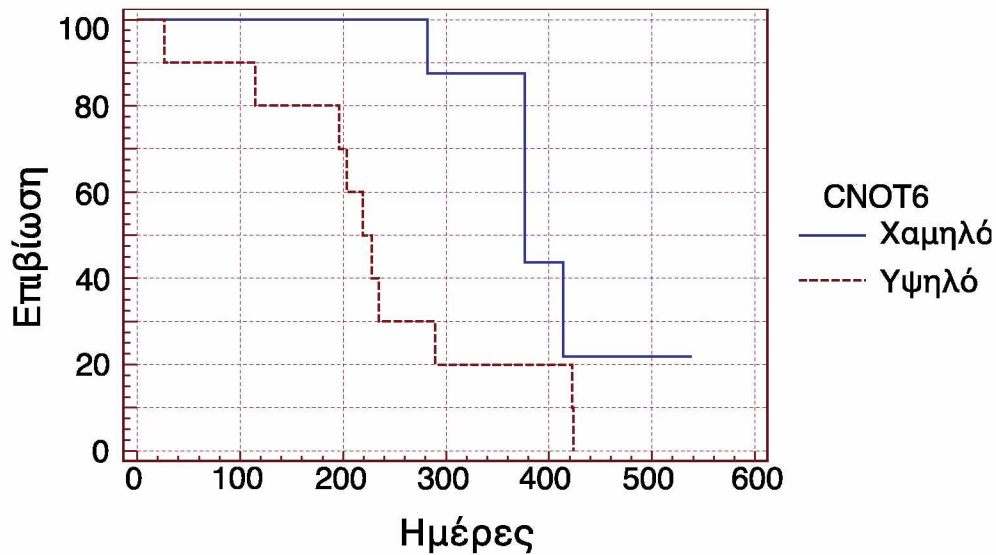
Εικόνα 19. Συσχέτιση μεταξύ ηλικίας και επιπέδων έκφρασης της PARN στον SCLC. Οι ηλικιωμένοι ασθενείς έχουν αυξημένα επίπεδα PARN. $p=0,014$.

Συσχέτιση της έκφρασης απαδενυλασών με την πρόγνωση ασθενών με SCLC

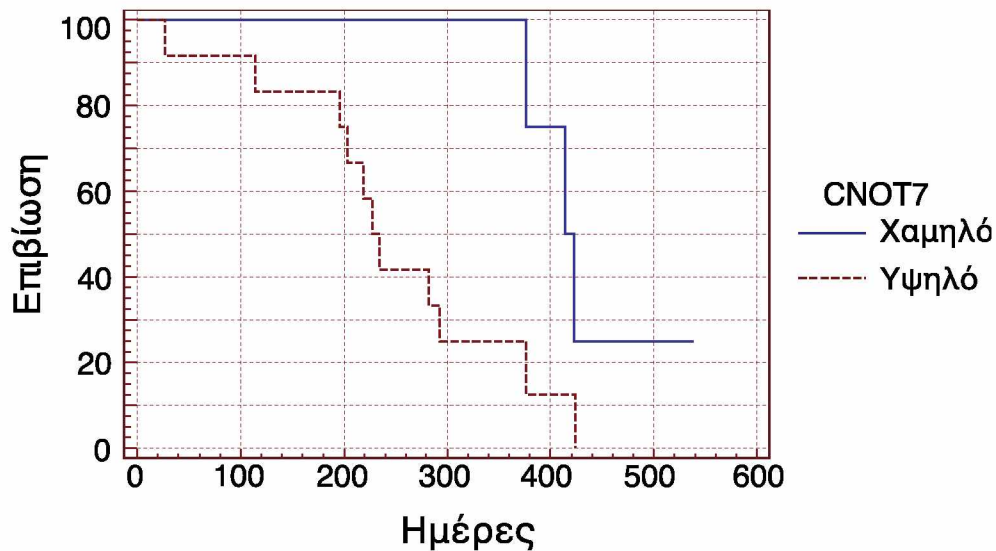
Με τον ίδιο τρόπο σχεδιάστηκαν οι καμπύλες επιβίωσης (Kaplan-Meier) για να αξιολογήσουμε την σημασία της έκφρασης των απαδενυλασών PARN, CNOT6, CNOT7 και στην πρόγνωση των ασθενών με SCLC. Από την ανάλυση προκύπτει ότι οι ασθενείς στους οποίους η PARN υπερεκφράζεται στον παθολογικό ιστό, η συνολική επιβίωση ήταν μικρότερη κατά 180 ημέρες (234 έναντι 414 ημερών, $p = 0,016$), όπως φαίνεται στην **(Εικόνα 20)** με παρόμοια αποτελέσματα για τη CNOT6 (224 έναντι 377 ημερών, $p=0,035$) (**Εικόνα 21**) και για τη CNOT7 (231 έναντι 419 ημερών, $p=0,021$), **(Εικόνα 22)**. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν πως πιθανώς η υψηλή έκφραση των απαδενυλασών θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως καρκινικός προγνωστικός βιοδείκτης σε ασθενείς με SCLC στο μέλλον.



Εικόνα 20. Καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier για τη σχέση επιπέδων της PARN με την επιβίωση στον SCLC. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, όπου τα επίπεδα έκφρασης της PARN του κακοήθους είναι υψηλότερα ή χαμηλότερα από το παθολογικό δείγμα-μάρτυρα. Η επιβίωση με υψηλότερα επίπεδα PARN (κόκκινη γραμμή) είναι μειωμένη κατά 6 μήνες συγκριτικά με τους ασθενείς με χαμηλά επίπεδα (μπλε γραμμή), $p=0,016$.



Εικόνα 21. Συσχέτιση επιπέδων της CNOT6 και επιβίωσης. Η επιβίωση των ασθενών με υψηλά επίπεδα CNOT6 (κόκκινη γραμμή) είναι χαμηλότερη κατά 153 ημέρες από τους ασθενείς με χαμηλά επίπεδα CNOT6 (μπλε γραμμή), $p=0,035$.



Εικόνα 22. Συσχέτιση μεταξύ επιπέδων της CNOT7 και επιβίωσης. Για τους ασθενείς με αυξημένα επίπεδα του ενζύμου (κόκκινη γραμμή), η επιβίωση είναι κατά 188 ημέρες χαμηλότερη από τους ασθενείς με χαμηλά επίπεδα (μπλε γραμμή), $p=0,021$.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν και αναλύθηκαν τα επίπεδα απαδενυλασών σε κλινικά δείγματα που σχετίζονται με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με μελέτη μας στο πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα, τα οποία αναλύθηκαν περαιτέρω.

Στην εργασία έγινε ανάλυση των δεδομένων των μικροσυστοιχιών cDNA μετά από αποσιώπηση απαδενυλασών σε δύο κυτταρικές σειρές, NCI-H520 και HEP-2, καθώς και σύγκριση με δεδομένα από άλλες εργασίες στην κυτταρική σειρά MCF7. Η ανάλυση έδειξε πως επιλεγμένες απαδενυλάσες στοχεύουν μοναδικά σύνολα mRNAs. Τα επίπεδα ορισμένων mRNA μπορούν να μεταβληθούν από κοινού από περισσότερες από μία απαδενυλάσες, κάτι που υπαινίσσεται πως τα ένζυμα έχουν επικαλυπτόμενες δράσεις. Η παρατήρηση αυτή ενισχύεται από προηγούμενες εργασίες, από πρόσφατη μελέτη μας όπου δείχνει πως η αποσιώπηση μιας απαδενυλάσης επηρεάζει τα επίπεδα των άλλων, καθώς επίσης και από το ότι η CNOT8 δεν εντοπίστηκε στην σειρά NCI-H520, μιας και στόχοι της σε άλλες κυτταρικές σειρές στις οποίες εντοπίζεται το ένζυμο αποικοδομούνται. Έτσι ενισχύεται η πρόταση πως οι απαδενυλάσες έχουν αλληλεπικαλυπτόμενες ιστοειδικές δράσεις, δηλαδή η έλλειψη (μη έκφραση) μιας απαδενυλάσης αντισταθμίζεται από άλλες για να ολοκληρωθεί η αποσταθεροποίηση και αποικοδόμηση επιλεγμένων mRNA.

Επιπλέον, αναλύθηκαν τα επίπεδα απαδενυλασών σε κλινικά δείγματα μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, που αποτελεί βάση για ευρύτερη μελέτη που θα εξετάζει τη γονιδιακή έκφραση και στους δύο υπότυπους του καρκίνου του πνεύμονα. Θα ήταν πολύ σημαντικό, να επεκταθεί η ανάλυση σε άλλους υπότυπους έτσι ώστε από την

συνολική εικόνα να αναδειχθούν κοινά γονίδια, μετάγραφέ τους και πρωτεΐνες που κωδικοποιούν με διαγνωστικό, προγνωστικό και θεραπευτικό ενδιαφέρον.

Η έκφραση των απαδενυλασών είναι απορρυθμισμένη στο μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα

Οι απαδενυλάσες διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο κύτταρο καθώς ρυθμίζουν τη σταθερότητα των mRNAs επηρεάζοντας ως εκτούτου τη γονιδιακή έκφραση. Αρχικά η συσχέτιση των απαδενυλασών με καρκινικούς όγκους, περιορίζονταν σε δύο εξ αυτών, τις απαδενυλάσες PARN και CNOT6L και μόνο για συγκεκριμένα γονίδια (Kim and Lee, 2009). Ακολούθησε ο προσδιορισμός των επιπέδων των απαδενυλασών σε παθολογικές καταστάσεις όπως είναι ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα και οι λευχαιμίες (Maragozidis P et al. 2015· Maragozidis P et al. 2012). Για πρώτη φορά στην παρούσα μελέτη προσδιορίζονται τα επίπεδα των απαδενυλασών στο μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα. Δεδομένου ότι ο όγκος δεν αντιμετωπίζεται χειρουργικά και το υλικό από βρογχοσκοπικές βιοψίες χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον για διαγνωστικούς λόγους σε ιδιαίτερα επιβαρυσμένους κλινικά ασθενείς, η μελέτη μας σε υλικό βιοψίας από παθολογικό και φυσιολογικό ιστό του ίδιου ασθενούς της προσδίδει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Η υπολογιστική μεταγραφωματική ανάλυση σε δεδομένα μικροσυστοιχιών στο SCLC μας έδωσε πολύ ενδιαφέρουσες πληροφορίες καθώς διαπιστώθηκε σημαντικά μειωμένη έκφραση της PARN σε δείγματα SCLC ($p=5,00$) σε σύγκριση με μη παθολογικά δείγματα και σημαντικά αυξημένη έκφραση της CNOT7 ($p=0,037$) ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στις υπόλοιπες απαδενυλάσες. Όμως, το μέγεθος του δείγματος ήταν πολύ

μικρό, στην πρώτη μελέτη 6 δείγματα SCLC με 17 controls και στη δεύτερη, 5 SCLC με 6 controls. Ως εκ τούτου η διαφορετική έκφραση των απαδενυλασών θα πρέπει να ερμηνευθεί με φειδώ.

Τα παραπάνω συμπεράσματα μας ώθησαν να εξετάσουμε την έκφραση των απαδενυλασών με συγκριτική ποσοτικοποίηση σε δείγματα ασθενών με SCLC (εξετάσαμε 19 δείγματα) και τη συγκρίναμε με δείγματα μη παθολογικού ιστού του ίδιου ασθενούς. Διαπιστώσαμε ότι η έκφραση των απαδενυλασών ANGEL1, ANGEL2, PARNL, CNOT8 και PARN δε διέφερε μεταξύ φυσιολογικού και παθολογικού ιστού του ίδιου ασθενούς. Η PARN και η CNOT7 παρουσίασαν τη μεγαλύτερη διαφορά και συγκεκριμένα η PARN υπερεκφράστηκε σε 13 δείγματα SCLC (68,4%, $\log_2 FC > 0$), ενώ σε 6 δείγματα η έκφραση ήταν μειωμένη (31,6%, $\log_2 FC < 0$). Η CNOT7 υπερεκφράστηκε σε 12 (66,65%) και υποεκφράστηκε σε 6 δείγματα (33,4%). Η περαιτέρω ανάλυση αυτών των δεδομένων έδειξε πως η έκφραση των PARN, CNOT6 και CNOT7 είχε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών, καθώς και ότι τα επίπεδα της PARN ήταν αυξημένα σε ασθενείς με μεγαλύτερη ηλικία (68,5 +6,7 έναντι 59,7+6,2 έτη). Επιπλέον, τα αυξημένα επίπεδα των PARN, CNOT6 και CNOT7 συσχετίστηκαν με χαμηλότερη επιβίωση των ασθενών. Ειδικότερα η υπερέκφραση της PARN διαπιστώθηκε σε ασθενείς με χαμηλότερη επιβίωση 180 ημερών (234 έναντι 414 ημέρες, $p=0,016$), με παρόμοια αποτελέσματα για τη CNOT6 (224 έναντι 377 ημερών, $p=0,035$) και για τη CNOT7 (231 έναντι 419 ημερών, $p=0,021$), πληροφορίες με αυξανόμενο ενδιαφέρον καθώς ο SCLC είναι μία νόσος με ιδιαίτερα χαμηλή επιβίωση (7 μήνες), στάσιμη τις τελευταίες δεκαετίες. Πιθανώς,

μελλοντικά οι απαδενυλάσες και ειδικά η PARN να αποτελέσει χρήσιμο προγνωστικό καρκινικό δείκτη για το SCLC.

Η επίδραση των απαδενυλασών στη γονιδιακή έκφραση

Επιχειρήσαμε να μελετήσουμε το ρόλο των απαδενυλασών στον άνθρωπο μέσω των νοσημάτων του πνεύμονα, εστιάζοντας βασικά στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Δεδομένου ότι όταν εμφανίζεται αυτός ο τύπος καρκίνου, είναι ήδη μεταστατικός, και επομένως ανεγχείρητος, δεν είναι διαθέσιμες χειρουργικές βιοψίες. Η μελέτη έγινε σε δείγματα βιοψιών βρογχικού βλεννογόνου παθολογικού και φυσιολογικού αντίστοιχα του ιδίου ασθενούς. Δεδομένου ότι η καλύτερα μελετημένη απαδενυλάση είναι η PARN εστίασαμε το ενδιαφέρον μας αρχικά σε αυτήν.

Μελετήσαμε την παραγωγή των πρωτεϊνών που συνδέονται με RNA (RNA-binding proteins, RBP) στον SCLC και την πιθανή συσχέτιση τους με τις απαδενυλάσες. Δύο μελέτες που αφορούν σε κυτταρικές σειρές SCLC έδειξαν ότι η KHSRP εμφανίζει αυξημένα επίπεδα στον SCLC σε σύγκριση με τον NSCLC (Ocak S et al. 2014)

Η KHSRP είναι μία RNA-binding protein που στρατολογεί την PARN προάγοντας την αποικοδόμηση των mRNA μέσω απαδενυλίωσης τους (Gherzi R et al. 2010, 2004). Τα παραπάνω μας ώθησαν να διερευνήσουμε περαιτέρω το ρόλο της KHRSP στο SCLC. Η υπολογιστική μεταγραφωματική ανάλυση από δεδομένα μικροσυστοιχιών έδειξε ότι υπάρχει αυξημένη έκφραση του KHRSP mRNA στο SCLC σε σχέση με υγιή ιστό (Garber Lung study, Roberck Lung study), ενώ δεν παρατηρήθηκε υπερέκφραση του στην μελέτη των Battarcharjee, στην οποία η έκφραση της PARN ήταν σημαντικά μειωμένη ($p=5,00$). Τα

παραπάνω αποτελούν ενδείξεις ότι η PARN παίζει ρόλο στην παθογένεια του SCLC και, επίσης, στο πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα διαπιστώθηκε τροποποιημένη έκφραση των επιπέδων των απαδενυλασών σε κλινικά δείγματα. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της PARN, CNOT6, CNOT7 και NOC παρουσίασαν διαφορετική έκφραση μεταξύ των καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων ιδιαίτερα για τα επίπεδα έκφρασης της PARN και NOC. Η υπερέκφραση της PARN συσχετίστηκε με αυξημένη επιβίωση των ασθενών και με μικρότερη ηλικία. Αντιθέτως, στην παρούσα μελέτη, στα δείγματα ασθενών με SCLC η υπερέκφραση της PARN συσχετίστηκε με μικρότερη επιβίωση 180 ημερών (234 έναντι 414 ημερών, $p=0,016$) και με μεγαλύτερη ηλικία. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων στους δύο τύπους καρκίνου πνεύμονα είναι ιδιαίτερος ενδιαφέρουσα και παρόλες τις διαφορές τους στη μοριακή τους βιολογία και στην παθογένεια της νόσου, φαίνεται ότι ίσως ο ρόλος των απαδενυλασών και ιδιαίτερα της PARN να δώσει απαντήσεις σε άγνωστους μηχανισμούς της καρκινογένεσης. Παρακάτω φαίνονται συγκριτικά τα αποτελέσματα στην έκφραση των απαδενυλασών μεταξύ του SCLC και SCC.

Πίνακας 8. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης απαδενυλασών μεταξύ SCLC και SCC

Υπότυπος	PARN Υψηλά (%)	CNOT6 Υψηλά (%)	CNOT7 Υψηλά (%)	NOC Υψηλά (%) ^a
SCLC	68,4	55,5	66,6	53,8
SCC	52	48	48	56

^a δείγματα με αυξημένα επίπεδα έκφρασης

Πίνακας 9. Σύγκριση της σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης PARN και NOC με την επιβίωση των ασθενών στο SCLC και SCC αντίστοιχα

Υπότυπος	PARN ^α	NOC ^α
SCLC	6 μήνες ^β	0 μήνες ^γ
SCC	7 μήνες ^δ	7,9 μήνες ^δ

^α αυξημένα επίπεδα · ^β μειωμένη επιβίωση · ^γ καμία συσχέτιση · ^δ αυξημένη επιβίωση

Επιπλέον η αποσιώπηση της PARN στο SCC οδήγησε σε αυξορύθμιση σε 233 μετάγραφα που πιθανώς αποτελούν στόχους της PARN καθώς και σε απορρύθμιση της κυτταρικής διασύνδεσης και προσκόλλησης. Το τελευταίο πιθανώς εξηγούσε την αυξημένη επιβίωση σε ασθενείς με υπερέκφραση της PARN στο πλακώδες καρκίνο πνεύμονα.

Η PARN έχει μελετηθεί, επίσης, στις οξείες λευχαιμίες με αύξηση των επιπέδων της και υπερέκφραση της φωσφορυλιωμένης μορφής της (Maragozidis P et al. 2012). Στον καρκίνο στομάχου μελετήθηκε η έκφραση της PARN σε δύο κυτταρικές σειρές (Zhang L et al. 2014). Η αποσιώπηση της PARN στις κυτταρικές σειρές ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό και διέκοψε τον κυτταρικό κύκλο μέσω της p21 πρωτεΐνης.

Αρκετές μελέτες συσχετίζουν το ρόλο της PARN στην καρκινογένεση. Αρχικά ο Lee και οι συνεργάτες του (2009) συσχέτισαν την PARN με την καρκινογένεση καθώς η τελευταία προσελκύεται από RNA-binding proteins όπως την τριστετραπρολίνη και την CUG-BP μειώνοντας τα επίπεδα της IL-8, VEGF, TNF και c-fos. Αργότερα ο Lee και οι

συνεργάτες του (2012) αποσιώπησαν την PARN σε μυοβλάστες ποντικού και διαπίστωσαν σταθεροποίηση στα επίπεδα έκφρασης 40 μεταγράφων και παραγόντων που επηρεάζουν την κυτταρική μετανάστευση και προσκόλληση. Επίσης, σε κυτταρική σειρά καρκινικών κυττάρων μαστού, η υπερέκφραση της PARN οδήγησε σε εξασθένιση της μειωμένης έκφρασης της φωσφολιπάσης (PLD2) που σχετίζεται με την κυτταρική μετανάστευση και προσκόλληση (Taylor et al. 2017). Η PARN φαίνεται να ενεργοποιείται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο BARD1 και πιθανώς να παίζει ρόλο κατασταλτικό των όγκων (Cevher MA et al. 2010, Devany E et al. 2013 και Zhang et al. 2015) ενώ έχει διαπιστωθεί αύξηση της σταθερότητας του TP53 mRNA μέσω ARE και μέσω miRISC αντιστοίχως (Devany E et al. 2013, Zhang et al.2015).

Αυτά τα αποτελέσματα αυξάνουν το ενδιαφέρον για τους μηχανισμούς της απαδενυλίωσης στον καρκίνο του πνεύμονα και την καλύτερη κατανόησή τους. Λαμβάνοντας υπόψιν τις παρατηρήσεις στις οξείες λευχαιμίες, στο πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα, στον καρκίνο στομάχου και στο μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η PARN παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των ανωτέρω όγκων και πιθανώς να αποτελέσει σημαντικό προγνωστικό βιοδείκτη στο μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα.

Σύμπλοκο CCR4-NOT

Πρόκειται για ένα πολύπλοκο δομικά σύμπλοκο με πολλές υπομονάδες που διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο στις διαδικασίες της μεταγραφής και της απαδενυλίωσης (Denis and Chen 2003). Σε πρόσφατη μελέτη, διαπιστώθηκε μειωμένη η έκφραση των

υπομονάδων CNOT2 και CNOT9 σε θυμικό καρκίνωμα. (Xin Ku et al, 2020). Στα θηλαστικά υπάρχουν πρόσφατες μελέτες για τις υπομονάδες του CNOT6 και CNOT6L τόσο σε κυτταρικές σειρές όσο και σε κακοήθεις όγκους.

Στην κυτταρική σειρά MCF-7 καρκινικών κυττάρων μαστού οι CNOT6 και CNOT6L επηρέασαν την κυτταρική ανάπτυξη. Όταν ακολούθησε αποσιώπηση της CNOT6, διαπιστώθηκε ότι είχε μικρή επίδραση στα επίπεδα mRNA σε σύγκριση με την αποσιώπηση της CNOT6L (Mittal et al. 2011). Επίσης, η CNOT6L και όχι η CNOT6 επηρέασε την κυτταρική ανάπτυξη στην κυτταρική σειρά (NIH3T3) (Morita et al. 2007, Morita et al. 2008) καθώς φάνηκε ότι καταστέλλεται στο εργαστήριο από την αντιπολλαπλασιαστική πρωτεΐνη TOB.

Έχει, επίσης, μελετηθεί σε καρκίνους όπως στο αδenoκαρκίνωμα εντέρου στον άνθρωπο (Tay et al. 2011), στις οξείες λευχαιμίες (Maragozidis P et al. 2012) και στο πλακώδες καρκίνο πνεύμονα (Maragozidis P et al. 2015). Στη τελευταία μελέτη παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα της CNOT6 ήταν διαφορετικά συγκριτικά σε δείγματα καρκινικού και φυσιολογικού ιστού ενώ η αυξημένη έκφραση της συσχετίστηκε με απουσία μεταστάσεων. Τα επίπεδα της δεν παρουσίασαν συσχέτιση με την επιβίωση των ασθενών. Η αποσιώπηση της οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης 578 μεταγράφων και μείωση σε 59 που συνδέονται με διεργασίες όπως, η σηματοδότηση μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων της κυτταρικής προσκόλλησης και διεργασίες νευρολογικού συστήματος.

Στη μελέτη για το μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα η έκφραση των επιπέδων της CNOT6 ήταν, επίσης, διαφορετική μεταξύ παθολογικού και φυσιολογικού ιστού. Συγκεκριμένα σε 10 ασθενείς (55,5%) ήταν αυξημένη ενώ σε 8 ασθενείς (44,5%) ήταν

μειωμένη. Επιπλέον φάνηκε ότι οι ασθενείς με αυξημένη την έκφραση της CNOT6 είχαν μικρότερη επιβίωση 153 ημερών (224 έναντι 377 ημερών, $p=0,035$), γεγονός που δε διαπιστώθηκε στη μελέτη του πλακώδους καρκίνου πνεύμονα.

Στα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, υπάρχουν δύο ορθόλογα της CAF1, της άλλης σημαντικής υπομονάδας του CCR4-NOT συμπλέγματος: οι CNOT7 και CNOT8. Μελέτες της CNOT7 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές όπως στη MCF7 σειρά από καρκινικά κύτταρα μαστού έδειξε ότι προήγαγε την κυτταρική ανάπτυξη καταστέλλοντας το αντιπολλαπλασιαστικό γονίδιο PMP22 δρώντας ως απαδενυλάση (Aslam et al. 2009). Επιπλέον, επηρεάζει με διαφορετικά μονοπάτια τις δραστηριότητες της αντιπολλαπλασιαστικής πρωτεΐνης TOB (Horiuchi et al. 2009), (Doidge et al. 2012).

Τα επίπεδα έκφρασης της CNOT7 μελετήθηκαν στις οξείες λευχαιμίες και διαπιστώθηκε υποέκφραση τους (Maragozidis P et al. 2012). Επίσης, στο πλακώδες καρκίνο πνεύμονα διαπιστώθηκε ότι είχαν τροποποιημένη έκφραση. Συγκεκριμένα υπερεκφράστηκε σε 12 δείγματα (48%), υποεκφράστηκε σε άλλα 12 δείγματα (48%) και αμετάβλητη σε 1 δείγμα (4%). Δεν παρουσιάστηκε συσχέτιση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά. Η αποσιώπηση της CNOT7 στο SCC οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα 355 μεταγράφων και μείωσε τα επίπεδα 130 μεταγράφων. Τα περισσότερα συνδέονται με διεργασίες όπως η σηματοδότηση μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων διεργασίες νευρολογικού συστήματος και ανίχνευση χημικού ερεθίσματος.

Από την υπολογιστική μεταγραφωματική ανάλυση στο SCLC διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης της CNOT7 (Garber Lung study) στα δείγματα

SCLC σε σύγκριση με τα controls, όμως, ο μικρός αριθμός δειγμάτων κάνει τα αποτελέσματα επισφαλή.

Στη μελέτη μας, στον SCLC τα επίπεδα της CNOT7 υπερεκφράστηκαν σε 12 (66,6%) και υποεκφράστηκαν σε 6 δείγματα (33,4%). Οι ασθενείς που παρουσίασαν υπερέκφραση της CNOT7 είχαν χαμηλότερη επιβίωση 188 ημερών (231 έναντι 419 ημερών, $p=0,021$), ενώ στο πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση με την επιβίωση των ασθενών.

Λαμβάνοντας υπόψιν τις προηγούμενες παρατηρήσεις στο ρόλο του συμπλόκου CCR4-NOT στην καρκινογένεση και τα αποτελέσματα στο SCLC, πιθανώς, το σύμπλοκο αυτό να παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια και να επηρεάζει δυσμενώς την πρόγνωση του SCLC.

Nocturnin

Η Nocturnin (Ccrn4l, NOC) αρχικά χαρακτηρίστηκε ως απαδενυλάση και φάνηκε πως τα επίπεδά της μεταβάλλονται κατά την διάρκεια του 24ώρου, αναδεικνύοντας μια σύνδεση με τον κερκάρδιο ρυθμό (Baggs and Green, 2003). Τελικά, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι είναι μία φωσφατάση που μετατρέπει τα $NADPH^+$ και NADP σε NADH και NAD^+ , αντίστοιχα (Estrella M et al, 2019) (Laothamatas I et al, 2020). Οι ιδιαιτερότητες της συνίστανται στη ρυθμική της έκφραση που καθορίζεται από το βιολογικό ρολόι, ενώ μπορεί να συμβάλλει στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης ανεξάρτητα από την ενεργότητα απαδενυλάσης (Godwin et al. 2013). Η αδρανοποίηση της NOC σε ποντίκια έχει συσχετιστεί με μειωμένη έκφραση λιπογενών γονιδίων, μειωμένη αποθήκευση λιπιδίων

στον λιπώδη ιστό, μειωμένη συσσώρευση λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα, αυξημένη οξείδωση λιπιδίων σε σχέση με ποντίκια φυσικού τύπου, με μεταβολές στην ομοιόσταση της γλυκόζης και με ενίσχυση της οστεογένεσης ([Green et al. 2007](#); [Guntur et al. 2011](#)). Η σημασία των προηγούμενων παρατηρήσεων στο ότι η διακοπή ή απορρύθμιση του κινκάρδιου ρολογιού συνδέεται με υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου, ταχύτερη εξέλιξή του και μικρότερη επιβίωση ([Hrushesky 1985](#); [Mormont et al. 2000](#); [Silberfarb et al. 1993](#); [Viswanathan et al. 2007](#); [Zhu et al. 2007](#)). Σε συνέχεια των προηγούμενων, τα γονίδια *Per1* και *Per2* που σχετίζονται με τον κινκάρδιο ρυθμό θεωρούνται ογκοκατασταλτικά και συνδέονται με τον αριθμό των όγκων και τους ρυθμούς ανάπτυξης του καρκίνου ([Wood et al. 2007](#)), ενώ προβληματικοί κινκάρδιοι ρυθμοί έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με προχωρημένο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα ([Hrushesky et al. 2009](#)).

Στην παρούσα μελέτη, η υπερέκφραση της NOC διαπιστώθηκε σε 7 δείγματα (53,8%), ενώ υποεκφράστηκε σε 6 δείγματα (46,2%). Δεν παρουσίασε συσχέτιση με την επιβίωση των ασθενών. Αντιθέτως, συσχετίστηκε με αυξημένη επιβίωση στο πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα (μέσος όρος 13,8 μήνες έναντι 5,9 μήνες, $p = 0,003$). Επιπλέον, η αποσιώπηση της NOC στα κύτταρα NCI-H520 οδήγησε στην αυξορρύθμιση 212 μεταγράφων τα οποία αποτελούν πιθανούς στόχους του ενζύμου στο SCC. Η σύγκριση των απορρυθμισμένων μεταγράφων μεταξύ των δυο κυτταρικών σειρών, NCI-H520 και HEP-2, εμφάνισε μόνο δυο κοινά μετάγραφα, υπονοώντας πως επηρεάζονται διαφορετικά μονοπάτια από την NOC στο SCC σε σύγκριση με άλλες κυτταρικές σειρές. Ένα από αυτά,

το DPPA3 (Developmental Pluripotency Associated 3), έχει συσχετιστεί με όγκους γεννητικών κυττάρων (germ cell tumors) σε παλαιότερη μελέτη ([Bowles et al. 2003](#)).

Συμπερασματικά

Η ανάλυση των επιπέδων των απαδενυλασών σε SCC, σε SCLC, και η σύγκριση των δεδομένων οδηγεί σε συμπεράσματα που συνοψίζονται παρακάτω:

1. Επιλεγμένες απαδενυλάσες στοχεύουν συγκεκριμένα σύνολα σε κύτταρα NCI-H520 (από NSCLC) και HEP-2.
2. Τα επίπεδα ορισμένων mRNA μπορούν να μεταβληθούν από κοινού από περισσότερες από μία απαδενυλάσες, κάτι που υπαινίσσεται πως τα ένζυμα έχουν επικαλυπτόμενες ιστοειδικές δράσεις.
3. Τα επίπεδα των PARN, CNOT6 και CNOT7 μεταβάλλονται στον SCLC και συσχετίζονται με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και με την πρόγνωση των ασθενών, γεγονός που τις καθιστά παράγοντες προς περαιτέρω διερεύνηση ώστε να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη ως προγνωστικοί δείκτες.
4. Ειδικά, η PARN, μια εκτενώς μελετημένη απαδενυλάση, συσχετίσθηκε με μεγαλύτερη ηλικία των ασθενών και μειωμένη επιβίωση (180 ημερών) στον SCLC.

5. Τα τελευταία χρόνια γίνονται ολοένα και περισσότερες αναφορές σε μελέτες που συσχετίζουν κάποια από τις απαδενυλάσες με άλλες παθολογικές καταστάσεις και άλλα νοσήματα του πνεύμονα.
6. Η έρευνα της δράσης των απαδενυλασών στην καρκινογένεση και η μεταβολή των επιπέδων έκφρασης τους τόσο σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα αλλά και με οξείες λευχαιμίες, αυξάνει το ενδιαφέρον για τη σχέση των ενζύμων αυτών με το SCLC.
7. Απαιτείται μεγαλύτερη έρευνα για το μηχανισμό δράσης των απαδενυλασών καθώς είναι γνωστό ότι οι διάφορες απαδενυλάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες ρυθμίζοντας τη σταθερότητα και το χρόνο ζωής των mRNAs.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aslam, A., et al. (2009), 'The Ccr4-NOT deadenylase subunits CNOT7 and CNOT8 have overlapping roles and modulate cell proliferation', *Mol Biol Cell*, 20 (17),3840-50.

Auperin A, Arriagada R, et al. (1999), 'Prophylactic cranial irradiation for patients with small-cell lung cancer in complete remission', *N Engl J Med*, 34 (7), 476-84.

Baggs, J. E. and Green, C. B. (2003) 'Nocturnin, a deadenylase in *Xenopus laevis* retina: a mechanism for posttranscriptional control of circadian-related mRNA', *Curr Biol*, 13 (3), 189-98.

Balagopal, V., Fluch, L., and Nissan, T. (2012), 'Ways and means of eukaryotic mRNA decay', *Biochim Biophys Acta*, 1819 (6), 593-603.

Balatsos, N. A., et al. (2006), 'Inhibition of mRNA deadenylation by the nuclear cap binding complex (CBC)', *J Biol Chem*, 281 (7), 4517-22.

Balatsos, N. A., et al. (2009), 'Competitive inhibition of human poly(A)-specific ribonuclease (PARN) by synthetic fluoro-pyranosyl nucleosides', *Biochemistry*, 48 (26), 6044-51.

Barbot W, et al. (2002), 'A murine gene with circadian expression revealed by transposon insertion: self-sustained rhythmicity in the liver and the photoreceptors'. *Biochim Biophys Acta*, 1576, 81-91.

Bernhardt B. Erica et al. (2016), 'Small Cell Lung Cancer', *Cancer Treat Res*, 170,301-22.

Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J et al. (2001), 'Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses'. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98 (24), 13790-13795.

Bogdan, J. A., et al. (1998), 'Human carbon catabolite repressor protein (CCR4)-associative factor 1: cloning, expression and characterization of its interaction with the B-cell translocation protein BTG1', *Biochem J*, 336 (Pt 2), 471-81.

Bowles, J., et al. (2003), 'Dppa3 is a marker of pluripotency and has a human homologue that is expressed in germ cell tumours', *Cytogenet Genome Res*, 101 (3-4), 261-5.

Brennan SM, Gregory DL, et al.(2010), 'Should extrapulmonary small cell cancer be managed like small cell lung cancer?', *Cancer*, 116 (4), 888-95.

Brown, C. E. and Sachs, A. B. (1998), 'Poly(A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation', *Mol Cell Biol*, 18 (11), 6548-59.

Burstein, H. J. and Schwartz, R. S. (2008), 'Molecular origins of cancer', *N Engl J Med*, 358 (5), 527.

Cevher MA, et al. (2010), 'Nuclear deadenylation /polyadenylation factors regulate 3 processing in response to DNA damage', *EMBO J*, 29, 1674-1687.

Chen, J., et al. (2001), 'Purification and characterization of the 1.0 MDa CCR4-NOT complex identifies two novel components of the complex', *J Mol Biol*, 314 (4), 683-94.

Chen, C. Y., et al. (2009), 'Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps', *Nat Struct Mol Biol*, 16 (11), 1160-6.

Chen J et al. (2011), 'Distinct expression patterns of the subunits of the CCR4-Not deadenylase complex during neural development', *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 411, 360-364.

Collart MA., et al. (2017), 'The Ccr4-NOT Complex: Architecture and Structural Insights', *Subcell Biochem*, 83, 349-379. Crick, F. H. (1958), 'On protein synthesis', *Symp Soc Exp Biol*, 12, 138-63.

Crick, F. H. (1958), 'On protein synthesis', *Symp Soc Exp Biol*, 12, 138-63

Curran KL, et al. (2014), 'Circadian genes xBmal1 and xNocturnin modulate the timing and differentiating of somites in *Xenopus Laevis*', *PLoSOne*.9(9): e108266.

Curtis W. Noonan, et al. (2017), 'Environmental asbestos exposure and risks of mesothelioma', *Ann Transl Med*, 5 (11),234.

Dehlin, E., et al. (2000), 'Cap-dependent deadenylation of mRNA', *EMBO J*, 19 (5), 1079-86.

Dela Cruz S. Charles, et al. (2011), 'Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention', *Clin Chest Med*, 32 (4), 605-644.

Denis C. L. and Chen, J. (2003), 'The CCR4-NOT complex plays diverse roles in mRNA metabolism', *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 73, 221-50. υπ'αρχει στο κειμενο?

Dens C.L. et al. (1984), 'Identification of new genes involved in the regulation of yeast alcohol dehydrogenase II', *Genetics*, 108, 833-844.

Dettebeck C. Frank et al. (2017), 'The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification,' *Chest*, 151 (1),193-203.

Devany E, et al. (2013), 'Positive and negative feedback loops in the p53 and mRNA 3' processing pathways', *Proc Natl Acad Sci*, 110 (9), 3351-3356.

Dhanraj S., et al. (2015), 'Bone marrow failure and developmental delay caused by mutations in poly(A)-specific ribonuclease (PARN)', *J Med Genet*, 52 (11), 738-48.

Dignon JP, et al. (1992), 'A meta-analysis of thoracic radiotherapy for small-cell lung cancer', *N Engl J Med*, 327(23), 1618-24.

Doidge R , et al.(2012), 'Deadenylation of cytoplasmic mRNA by the mammalian Ccr4-Not complex', *Biochem Soc Trans*, 40 (4), 896-901.

Ezzeddine, N., et al. (2007), 'Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a poly(A)-binding protein-dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation', *Mol Cell Biol*, 27 (22), 7791-801.

Estrella M et al. (2019), 'The metabolites NADP⁺ and NADPH are the targets of the circadian protein Nocturnin', *Nature Communications* 10, Article number 2367.

Fabian M, et al. (2013), 'Structural basis for the recruitment of the human CCR-NOT deadenylase complex by Tristetraprolin', *Nat Struct Mol Biol*, 20 (6), 735-739.

Farazi F et al. (2014), 'An integrated systems genetics screen reveals the transcriptional structure of inherited predisposition to metastatic disease', *Genome Res*, 24, 227-240.

Fried DB, Morris DE, et al. (2004), 'Systematic review evaluating the timing of thoracic radiation therapy for limited-stage small-cell lung cancer', *J Clin Oncol*, 22 (23), 4837-45.

Funakoshi, Y., et al. (2007), 'Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases', *Genes Dev*, 21 (23), 3135-48.

Gao J et al. (2013), 'Advances in the development of cancer immunotherapies', *Trends Immunol*, 34 (2), 90-98.

Gao, M., et al. (2000), 'Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates in vitro', *Mol Cell*, 5 (3), 479-88.

Gao, M., et al. (2001), 'A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements', *EMBO J*, 20 (5), 1134-43.

Garneau, N. L., Wilusz, J., and Wilusz, C. J. (2007), 'The highways and byways of mRNA decay', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (2), 113-26.

Garbarino-Pico, E., et al. (2007), 'Immediate early response of the circadian polyA ribonuclease nocturnin to two extracellular stimuli', *RNA*, 13 (5), 745-55.

Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K et al. (2001), 'Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung'. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 (24), 13784-13789.

Gilbert MR et al. (2011), 'Nocturnin expression is induced by fasting in the white adipose tissue of restricted fed mice', *PLoS One* 6, e17051.

Gherzi R et al. (2010), 'The role of KSRP in mRNA decay and microRNA precursor maturation', *John Wiley & Sons, Ltd*, 1, 230-239.

Gherzi R, Lee KY, Brista P, Wegmuller D, Moroni C, Karin M, Chen CY (2004), 'A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery', *Mol Cell*, 14 (5), 571-83.

Godwin, A. R., et al. (2013), 'Kiss your tail goodbye: the role of PARN, Nocturnin, and Angel deadenylases in mRNA biology', *Biochim Biophys Acta*, 1829 (6-7), 571-9.

Goldstrohm, A. C. and Wickens, M. (2008), 'Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9 (4), 337-44.

Govindan R, Page N et al. (2006), 'Changing Epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic and end results database', *J Clin Oncol*, 24(28), 4539-44.

Gowrishankar, G., et al. (2005), 'Inhibition of mRNA deadenylation and degradation by ultraviolet light', *Biol Chem*, 386 (12), 1287-93.

Green, C. B., et al. (2007), 'Loss of Nocturnin, a circadian deadenylase, confers resistance to hepatic steatosis and diet-induced obesity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (23), 9888-93.

Gronke S, Bickmeyer I et al. (2009), 'Curled encodes the Drosophila homolog of the vertebrate circadian deadenylase Nocturnin', *Genetics*, 219-232.

Guntur, A. R., et al. (2011), 'An essential role for the circadian-regulated gene nocturnin in osteogenesis: the importance of local timekeeping in skeletal homeostasis', *Ann N Y Acad Sci*, 1237, 58-63.

Hammerle M et al. (2013), 'Posttranscriptional destabilization of the liver-specific long noncoding RNA HULC by the IGF2 mRNA –binding protein I (IGF2BPI)', *Hepatology* ,58 (5), 1703-1712.

Hendifar A, Marchevsky A et al. (2017), ' Neuroendocrine Tumors of the Lung: Current Challenges and Advances in the Diagnosis and Management of well-Differentiated Disease', *Journal of Thoracic Oncology*, 12 (3),425-436.

Horn L, Mansfield A.S., et al. (2018), 'First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive –Stage Small-Cell Lung Cancer' *N Engl J of Med*, 379:2220-2229.

Hrushesky, W. J., et al. (2009), 'Circadian clock manipulation for cancer prevention and control and the relief of cancer symptoms', *Integr Cancer Ther*, 8 (4), 387-97.

Huang L et al. (2017), 'Systemic review and meta-analysis of the efficacy of serum neuron-specific enolase for early small cell lung cancer screening', *Oncotarget*, 8, 64358-64372.

Huntzinger, E. and Izaurralde, E. (2011), 'Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay', *Nat Rev Genet*, 12 (2), 99-110.

Horiuchi et al. (2009), 'Structural basis for the antiproliferative activity of the Tob-h Caf1complex', *J. Biol. Chem*, 284,13244-13255.

Indranath Ghosh et al. (2013), 'Diagnostic Role of Tumour Markers CEA, CA15-3, CA19-9 and CA125 in Lung Cancer', *Indian J Clin Biochem*, 28 (1), 24-29.

Isgro MA et al. (2015), 'Neuron-specific enolase as a biomarker:biochemical and clinical aspects', *Adv Exp Med Biol*, 867, 125-143.

Kalemkerian GP, Akerley W et al. (2013), 'Small cell lung cancer', *J Natl Compr Canc Netw*, 11 (1), 78-98.

Kawai, M., et al. (2010), 'A circadian-regulated gene, Nocturnin, promotes adipogenesis by stimulating PPAR-gamma nuclear translocation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (23), 10508-13.

Kim, W. C. and Lee, C. H. (2009), 'The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer', *Biochim Biophys Acta*, 1796 (2), 99-113.

Koinis F, Kotsakis A et al. (2016), 'Small cell lung cancer(SCLC): no treatment advances in recent years', *Transl Lung Cancer Res*, 5 (1) ,39-50.

Kojima, K., et al. (2011), 'MicroRNA122 is a key regulator of alpha-fetoprotein expression and influences the aggressiveness of hepatocellular carcinoma', *Nat Commun*, 2, 338.

Korner, C. G. and Wahle, E. (1997), 'Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease', *J Biol Chem*, 272 (16), 10448-56.

Kumar, Vinay, Cotran, Ramzi S., and Robbins, Stanley L. (2003), *Robbins basic pathology* (7th edn.; Philadelphia, PA: Saunders) xii, 873 p.

Lai, W. S., Kennington, E. A., and Blackshear, P. J. (2003), 'Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease', *Mol Cell Biol*, 23 (11), 3798-812.

Lauthamatas I et al. (2020), 'Spatiotemporal regulation of NADPH phosphatase Nocturnin and its role in oxidative stress response', *PNAS*, 117(2), 993-999.

Lau, N. C., et al. (2009), 'Human Ccr4-Not complexes contain variable deadenylase subunits', *Biochem J*, 422 (3), 443-53.

Leclerc, J., et al. (2011), 'Xenobiotic metabolism and disposition in human lung: transcript profiling in non-tumoral and tumoral tissues', *Biochimie*, 93 (6), 1012-27.

Lewin, Benjamin (2004), *Genes VIII* (Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall) xxi, 1027 p.

Luisella R, Gatti G et al. (2017), 'Lung neuroendocrine tumors: pathological characteristics,' *Journal of Thoracic Disease*, 9, (Suppl 15), S1442-1447.

Newton-Cheh C et al. (2009), 'Common variants at ten loci influence QT interval duration on the QTGEN study', *Nat.Genet.* 41, 399-406.

Maragozidis, P., et al. (2015), 'Poly(A)-specific ribonuclease and Nocturnin in squamous cell lung cancer: prognostic value and impact on gene expression', *Mol Cancer*, 14 (1), 187.

Maragozidis, P., et al. (2012), 'Alterations of deadenylase expression in acute leukemias: evidence for poly(a)-specific ribonuclease as a potential biomarker', *Acta Haematol*, 128 (1), 39-46.

Martinez, J., et al. (2000), 'A 54-kDa fragment of the Poly(A)-specific ribonuclease is an oligomeric, processive, and cap-interacting Poly(A)-specific 3' exonuclease', *J Biol Chem*, 275 (31), 24222-30.

Matthew G Oser et al. (2015), 'Transformation from non-small cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin,' *Lancet Oncol*, 16 (4):e165-e172.

Mascaux G et al. (2000), ' A systematic review of the role of etoposide and cisplatin in the chemotherapy of small cell lung cancer with methodology assesment and meta-analysis', *Lung Cancer*, 30 (1),23-26.

Mittal, S., et al. (2011), '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*, 22 (6), 748-58.

Moon, D. H., et al. (2015), 'Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) mediates 3'-end maturation of the telomerase RNA component', *Nat Genet*, 47 (12), 1482-8.

Moon Ho Kim, et al. (2015)., 'Paraneoplastic Guillain- Barre Syndrome in Small Cell Lung Cancer,' *Case Rep in Oncology*, 8 (2), 295-300.

Mormont, M. C., et al. (2000), 'Marked 24-h rest/activity rhythms are associated with better quality of life, better response, and longer survival in patients with metastatic colorectal cancer and good performance status', *Clin Cancer Res*, 6 (8), 3038-45.

Moura R et al. (2014), 'Exome analysis of HIV patients submitted to dendritic cells therapeutic vaccine reveals an association of CNOT1 gene with response to the treatment, *Journal of the International AIDS Society* 17:18938.

Morita, M., et al. (2007), 'Depletion of mammalian CCR4b deadenylase triggers elevation of the p27Kip1 mRNA level and impairs cell growth', *Mol Cell Biol*, 27 (13), 4980-90.

NCCN Guidelines 2016

Ocak Sebahat, Friedman DB, Chen H, Ausborn JA. (2014), 'Discovery of New Membrane-Associated Proteins Overexpressed in Small-Cell Lung Cancer', *Lung Cancer*, 9, 324-336.

Oronsky B, Reid TR et al. (2017), 'What's new in SCLC? A Review', *Neoplasia*, 19 (10), 842-847.

Parker, R. and Song, H. (2004), 'The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover', *Nat Struct Mol Biol*, 11 (2), 121-7.

Poschman G et al. (2013), 'A combination of two electrophoretical approaches for detailed proteome-based characterization of SCLC subtypes', *Archives of Physiology and Biochemistry*, 119 (114-125).

Pousic Manca et al. (2019), 'Real-World effectiveness and tolerability of small-cell lung cancer (SCLC) treatments. A systematic literature review (SLR)', *PLOS ONE*, 0219622

Prieto, S., de la Cruz, B. J., and Scheffler, I. E. (2000), 'Glucose-regulated turnover of mRNA and the influence of poly(A) tail length on half-life', *J Biol Chem*, 275 (19), 14155-66.

Richardson RL et al. (1982), 'Undifferentiated small cell carcinomas in extrapulmonary sites', *Semin Oncol*, 9 (4), 484-96.

Sandler H et al. (2011), 'Not1 mediates recruitment of the deadenylase Caf1 to mRNAs targeted for degradation by tristetraprolin,' *Nucleic Acids Res*, 39, 4373-4386.

Schnabel PA et al. (2015), 'Pulmonary neuroendocrine tumors in the new WHO 2015 classification:Start of breaking new grounds?,' *Pathologie*, 36 (3), 283-92.

Shuncong Wang et al., (2017), 'Survival changes in patients with small cell lung cancer and disparities between different sexes, socioeconomic statuses and ages,' *Scientific Reports* :1339.

Seiden-Long et al. (2006), 'Transcriptional target of hepatocyte growth factor signaling and ki-ras oncogene activating in colorectal cancer', *Oncogene*, 25:91-102.

Silberfarb, P. M., et al. (1993), 'Assessment of sleep in patients with lung cancer and breast cancer', *J Clin Oncol*, 11 (5), 997-1004.

Slotman B et al. (2007), 'Prophylactic cranial irradiation in extensive small-cell lung cancer', *N Engl J Med*, 357 (7), 664-72.

Stahel R et al. (1989), 'Staging and prognostic factors in small cell lung cancer: a consensus report, *Lung Cancer*, 5 (4-6), 119-26.

Stuart, B. D., et al. (2015), 'Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening', *Nat Genet*, 47 (5), 512-7.

Sundstrom Stein et al. (2002), 'Cisplatin and Etoposide Regimen is Superior to Cyclophosphamide, Epirubicin, and Vincristine Regimen in Small- Cell Lung Cancer: Results From a Randomised Phase III Trial with 5 Years Follow –Up,' *Journal of Clinical Oncology* , 24 ,4665-72.

Tay Y, Kats L et al. (2011), 'Coding independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs, *Cell*, 147,344-357.

Taylor E. Miller et al. (2017), 'A feedback mechanism between PLD and deadenylase PARN for the shortening of eukaryotic poly(A) mRNA tails that is deregulated in cancer cells', *The Company of Biologists Ltd* 6, 176-186.

Tendler S et al. 2018, 'Validation of the 8th TNM classification for small-cell lung cancer in a retrospective material from Sweden', *Lung Cancer*, 120 (75-81).

Travis WD et al. (2015), 'The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors of Thoracic Oncology', *Journal of Thoracic Oncology*, 10 (9), 1243-1260.

Travis WD et al. (2012), 'Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas', *Modern Pathology* 25, 518-530.

Trichopoulos D et al. (1981), Lung cancer and passive smoking, *Int J Cancer* 27 (1),1-4.

Trichopoulos D et al. (1992), Active and passive smoking and pathological indicators of lung cancer risk in an autopsy study, *JAMA*, 268 (13),1697-701.

Tummala, H., et al. (2015), 'Poly(A)-specific ribonuclease deficiency impacts telomere biology and causes dyskeratosis congenita', *J Clin Invest*, 125 (5), 2151-60.

Valk, K., et al. (2010), 'Gene expression profiles of non-small cell lung cancer: survival prediction and new biomarkers', *Oncology*, 79 (3-4), 283-92.

Valles, I., et al. (2012), 'Identification of novel deregulated RNA metabolism-related genes in non-small cell lung cancer', *PLoS One*, 7 (8), e42086.

Viswanathan N. Akila et al (2004), 'Small cell neuroendocrine carcinoma of the cervix: outcome and patterns of recurrence', *Gynecologic Oncology*, 93 (1), 27-33.

Viswanathan, A. N., Hankinson, S. E., and Schernhammer, E. S. (2007), 'Night shift work and the risk of endometrial cancer', *Cancer Res*, 67 (21), 10618-22.

Wagner PL et al. (2009), 'Combined Small cell lung carcinomas:genotypic and immunophenotypic analysis of the separate morphologic components', *Am J Clin Pathol*, 131 (93), 376-82.

Wang Y et al. (2001), 'Rhythmic expression of Nocturnin mRNA in multiple tissues of the mouse', *BMC Dev. Biol* 1:9.

Wang H et al. (2010), 'Crystal structure of the human CNOT6L nuclear domain reveals strict poly(A) substrate specificity. *EMBO J.* 29, 2566-2576.

Warde P et al. (1992), 'Does thoracic irradiation improve survival and local control in limited-stage small –cell carcinoma of the lung? A meta analysis,' *J Clin Oncol*, 10(6), 890-5.

Winkler, G. S., et al. (2006), 'Human Ccr4-Not complex is a ligand-dependent repressor of nuclear receptor-mediated transcription', *EMBO J*, 25 (13), 3089-99.

Winston W Tan et al. (2016), 'Small Cell Lung Cancer', *Medscape*, 1-43.

Wistuba II et al. (2001), 'Molecular genetics of small cell lung carcinoma,' *Semin Oncol*, 28 (2 Suppl4), 3-13.

Wolf, J. and Passmore, L. A. (2014), 'mRNA deadenylation by Pan2-Pan3', *Biochem Soc Trans*, 42 (1), 184-7.

Wojcik Ewa et al.(2017), 'Pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP) as a biomarker in small-cell lung cancer diagnosis, monitoring and evaluation of treatment response', *Lung Cancer:Targets and Therapy*, 8, 231-240.

Xiaoliang Zhao et al. (2018), 'Combined Small Cell Carcinoma of the Lung:ls it a Single Entity?' 13(2), 237-245.

Xin Ku et al. (2020), 'Deciphering tissue-based proteome signatures revealed novel subtyping and prognostic markers for thumic epithelial tumors', *Mol Oncol* 14(4) : 721-741.

Yo-Taro Shirai et al. (2014), 'Multifunctional roles of the mammalian CCR4-NOT complex in physiological phenomena, *Front Genetics* 5:286.

Zhang, L. and Yan, Y. (2014), 'Depletion of poly(A)-specific ribonuclease (PARN) inhibits proliferation of human gastric cancer cells by blocking cell cycle progression', *Biochim Biophys Acta*.

Zhang et al. (2015), 'Depletion of poly(A) –specific proliferation of human gastric cancer cells by blocking cell cycle progression, *Biochim Biophys Acta*, 1853,522-534.

Zhou L et al. (2015), 'Clinical features and treatment of paraneoplastic neurological syndrome associated with small cell lung cancer,' *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 95 (37), 3023-06.

Zhu, Y., et al. (2007), 'Ala394Thr polymorphism in the clock gene NPAS2: a circadian modifier for the risk of non-Hodgkin's lymphoma',