



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

***ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΠΕΡΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ
ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ DNA ΜΕΘΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ
ΤΗΣ 0⁶-ΜΕΘΥΛΟΓΟΥΑΝΙΝΗΣ (MGMT) ΣΕ ΜΗ-
ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΚΑΙ ΣΕ
ΠΤΥΕΛΑ ΑΠΟ ΒΑΡΕΙΣ ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ***

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2006



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

***ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΠΕΡΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ
ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ DNA ΜΕΘΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ
ΤΗΣ 0⁶-ΜΕΘΥΛΟΓΟΥΑΝΙΝΗΣ (MGMT) ΣΕ ΜΗ-
ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΚΑΙ ΣΕ
ΠΤΥΕΛΑ ΑΠΟ ΒΑΡΕΙΣ ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ***

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΣ

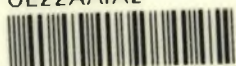
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2006



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

Αριθ. Εισ.: 4726/1
Ημερ. Εισ.: 27-02-2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2006
ΚΑΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087840

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

***ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΠΕΡΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ
ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ DNA ΜΕΘΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ
ΤΗΣ O⁶-ΜΕΘΥΛΟΓΟΥΑΝΙΝΗΣ (MGMT) ΣΕ ΜΗ-
ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΚΑΙ ΣΕ
ΠΤΥΕΛΑ ΑΠΟ ΒΑΡΕΙΣ ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ***

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΣ

Υπεύθυνος καθηγητής:

- ❖ Τζημαγιώργης Γεώργιος, Λέκτορας Βιοχημείας Ιατρικής Σχολής Α.Π.Θ.

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

- ❖ Τζημαγιώργης Γεώργιος, Μοριακός Βιολόγος Λέκτορας Βιοχημείας Ιατρικής Σχολής Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Α.Π.Θ.
- ❖ Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- ❖ Κοντού Μαρία, Λέκτορας Κλινικής Χημείας Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

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

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κωνσταντίνο Σταθόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, καθώς και τον σύλλογο των καθηγητών, που μου έδωσαν την ευκαιρία να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο Εργαστήριο της Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής του Α.Π.Θ.

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

Ευχαριστώ ιδιαίτερω, την Τάνια Αγγίδου για την πολύτιμη βοήθεια καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων και την Ελισάβετ Γεωργίου για τις συμβουλές της. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους δουλεύουν στο χώρο του εργαστηρίου.

Θεσσαλονίκη, 2006

Χ. Καραγεωργόπουλος

* Η χρηματοδότηση της εργασίας αυτής έγινε από το Υπουργείο Παιδείας και Θρησκευμάτων, Πρόγραμμα Πυθαγόρας 1.

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Abstract	6
Εισαγωγή	7
1. Καρκίνος του πνεύμονα	7
• Επιδημιολογία του καρκίνου του πνεύμονα	7
• Τύποι καρκίνου του πνεύμονα	9
• Αιτιολογία του καρκίνου του πνεύμονα	10
2. Μεθυλίωση του DNA	13
• Είδη μεθυλίωσης	14
• Μεθυλίωση και CpG νησίδες	15
3. DNA Μεθυλοτρανσφεράση της O ⁶ -Μεθυλογουανίνης (<i>MGMT</i>)	17
• Δομή του <i>MGMT</i>	17
• Λειτουργία του <i>MGMT</i>	18
• <i>MGMT</i> και καρκίνος του πνεύμονα	19
Υλικά & Μέθοδοι	22
1. Προέλευση δειγμάτων	22
2. Εργαστηριακός εξοπλισμός	22
3. Χημικά αντιδραστήρια	23
4. Μέθοδοι	24
• Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ιστούς	25
• Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από αίμα	26
• Ποσοτικοποίηση δειγμάτων DNA	28
• C ^{met} -U τροποποίηση δειγμάτων DNA	29
• Methylated Specific PCR (MSP) σε τροποποιημένα δείγματα DNA	31
• Έλεγχος προϊόντων MSP με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	34
Αποτελέσματα	35
• Στρατηγική ανίχνευσης της μεθυλίωσης του υποκινητή του <i>MGMT</i>	35
• Μελέτη μεθυλίωσης του υποκινητή του <i>MGMT</i> σε καρκίνο πνεύμονα	36
• Μελέτη μεθυλίωσης του υποκινητή του <i>MGMT</i> σε πτύελα από βαρείς καπνιστές	40
Συζήτηση	42
Βιβλιογραφία	46

Περίληψη

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την πιο σημαντική αιτία θανάτου από καρκίνο σε παγκόσμια κλίμακα. Η ανώμαλη μεθυλίωση των CpG νησίδων στην περιοχή του υποκινητή, που συμβαίνει κατά την ανάπτυξη του καρκίνου, είναι ένας μηχανισμός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε μεταγραφική απενεργοποίηση πολλών ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Η ανάπτυξη ευαίσθητων μοριακών δεικτών που ανιχνεύονται στα πρώιμα στάδια της νόσου, θα μπορούσε να μειώσει σημαντικά τα ποσοστά θνησιμότητας της νόσου. Σε αυτή την μελέτη, προσδιορίστηκε η συχνότητα της ανώμαλης υπερμεθυλίωσης του γονιδίου *MGMT* σε δείγματα από μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC), καθώς και στα αντίστοιχα δείγματα φυσιολογικού παρακείμενου ιστού, χρησιμοποιώντας την μέθοδο MSP (methylation specific PCR). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, έδειξαν την ύπαρξη υπερμεθυλίωσης στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου *MGMT* σε ποσοστό 79.3% (23/29). Στον φυσιολογικό παρακείμενο ιστό η συχνότητα υπερμεθυλίωσης του *MGMT* ήταν 21/28 (75.0%). Επίσης, προσδιορίστηκε η συχνότητα της ανώμαλης υπερμεθυλίωσης του γονιδίου *MGMT* σε 40 δείγματα από πτύελα βαρέων καπνιστών (άτομα ελευθέρων νόσου). Τα αποτελέσματα έδειξαν ανώμαλη υπερμεθυλίωση στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου *MGMT* (8/36, 22.2%). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, υποδεικνύεται ότι η ανώμαλη υπερμεθυλίωση του *MGMT* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοριακός δείκτης για την πρώιμη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα σε μη επεμβατικό υλικό (βιολογικά υγρά).

Abstract

Lung cancer is the leading cause of cancer-related death in the world. Aberrant methylation of CpG islands in the promoter region acquired during tumor growth is one mechanism that could lead to transcriptional inactivation of a variety of tumor suppressor genes. The development of sensitive molecular markers detectable at the earliest stages of the disease could greatly reduce the mortality rate of the disease. In this study, we determined the frequency of aberrant promoter methylation of *MGMT* gene in 34 resected primary non-small cell lung cancer (NSCLC) specimens and in the corresponding non malignant lung tissues using a sensitive two-stage methylation specific PCR (MSP). Our results reveal that aberrant methylation was detected in the promoter region of *MGMT* gene (23/29, 79.3%). In the non-malignant lung tissues the observed frequency for the *MGMT* was 21/28 (75.0%). Also, we determined the frequency of aberrant promoter methylation of *MGMT* gene in 40 sputum samples from heavy smokers (cancer-free individuals). Our results reveal that aberrant methylation was detected in the promoter region of *MGMT* gene (8/36, 22.2%). Our results indicate that aberrant methylation of *MGMT* could be used as a molecular marker for the early diagnosis of the disease in suitable non-invasive biological fluids.

1. Καρκίνος του πνεύμονα

Επιδημιολογία του καρκίνου του πνεύμονα

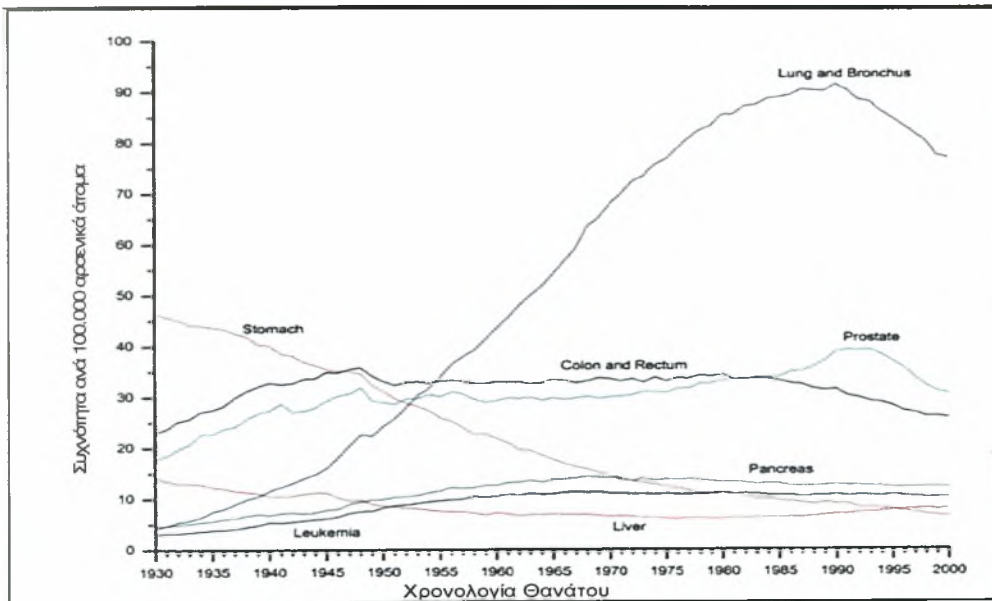
Ο καρκίνος είναι μια από τις σοβαρότερες ασθένειες που αντιμετωπίζει τις τελευταίες δεκαετίες η ανθρωπότητα. Παρά την υπέρμετρη ανάπτυξη των ιατρικών και βιο-ιατρικών επιστημών καθώς και την επινόηση πολλών προγνωστικών, διαγνωστικών και θεραπευτικών μεθόδων για την καταπολέμηση του καρκίνου, η νόσος αυτή συνεχίζει ακόμη και σήμερα να μαστίζει τον ανθρώπινο πληθυσμό με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Μόνο για το 2004 στις ΗΠΑ, η Αμερικάνικη Εταιρία Καρκίνου (*American Cancer Society*) κατέγραψε 1.368.030 νέες περιπτώσεις καρκίνου από τις οποίες προήλθαν 563.700 θάνατοι (Jemal *et al.*, 2004).

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η δεύτερη πιο συχνή μορφή καρκίνου παγκοσμίως (μετά τον καρκίνο του προστάτη στους άντρες και τον καρκίνο του στήθους στις γυναίκες), ενώ κατέχει τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας απ' όλους τους καρκίνους. Ο καρκίνος των πνευμόνων είναι η κύρια αιτία του θανάτου από καρκίνο σε όλο τον κόσμο με περισσότερο από ένα εκατομμύριο ετήσιοι θάνατοι (Peto *et al.*, 1996). Στις ΗΠΑ το 2004, καταγράφηκαν 173.770 περιστατικά με καρκίνο του πνεύμονα, από τα οποία 160.440 κατέληξαν σε θάνατο.

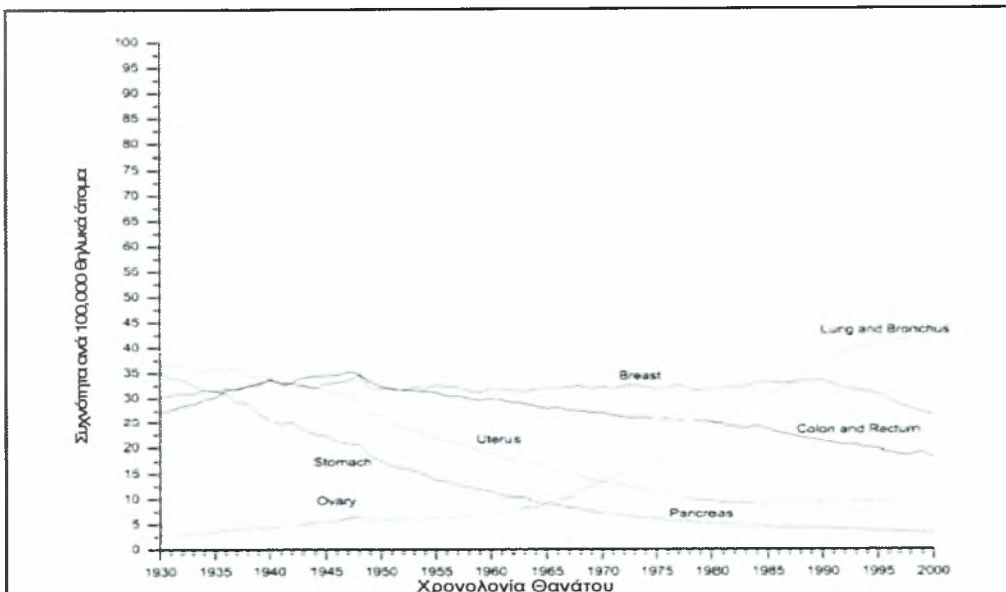
Τα ποσοστά θνησιμότητας τόσο στους άντρες όσο και στις γυναίκες είναι ιδιαίτερα υψηλά. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι στους άντρες τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια μικρή πτώση στο ποσοστό των θανάτων, σε αντίθεση με τις γυναίκες όπου φαίνεται να υπάρχει μια απότομη και συνεχόμενη αύξηση των θανάτων τα τελευταία χρόνια (Εικ. 1,2). Η ηλικιακή ομάδα που εμφανίζει τις περισσότερες περιπτώσεις θανάτου από καρκίνο του πνεύμονα είναι αυτή των 60-79 ετών (Πίνακας 1). Αυτό πιθανά να οφείλεται στο γεγονός ότι ο καρκίνος του πνεύμονα χρειάζεται αρκετά χρόνια για να εκδηλωθεί, αφού απαιτείται συνήθως μακροχρόνια χρήση καπνού.

Πίνακας 1: Θάνατοι από καρκίνο του πνεύμονα σύμφωνα με το φύλο και την ηλικία, ΗΠΑ, 2001 (Jemal et al., 2004).

Ηλικία	<20	20-39	40-59	60-79	>80
Άντρες					
90.367	-	401	15.866	56.911	17.088
Γυναίκες					
65.606	-	409	10.866	39.099	15.206



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



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

Τύποι καρκίνου του πνεύμονα

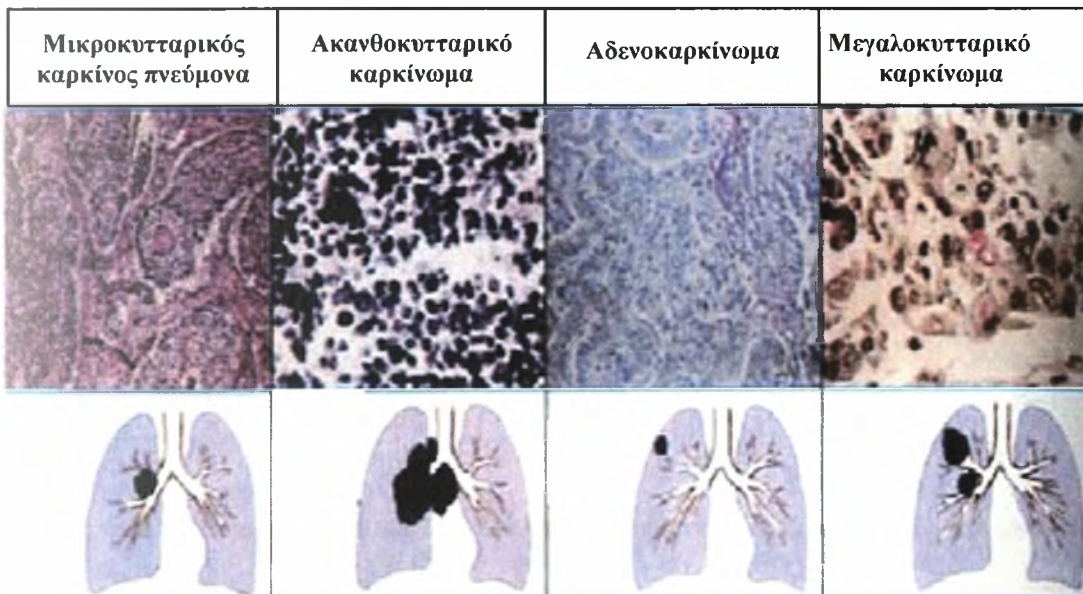
Ο καρκίνος του πνεύμονα διακρίνεται σε δύο κύριους τύπους, οι οποίοι περιλαμβάνουν ποσοστό μεγαλύτερο από το 90% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα. Οι τύποι αυτοί είναι ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (Small Cell Lung Cancer, SCLC) και ο μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC). Σε περιπτώσεις όπου ο καρκίνος του πνεύμονα παρουσιάζει χαρακτηριστικά τόσο του SCLC όσο και του NSCLC, τότε ο καρκίνος αυτός ονομάζεται «Συνδυασμένος μικροκυτταρικός/μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα» (Sekido *et al.*, 1998).

► **Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (SCLC):** το 20-25% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα είναι μικροκυτταρικού τύπου. Ο τύπος αυτός καρκίνου χαρακτηρίζεται από ταχύτατο ρυθμό ανάπτυξης και διάδοσης σε όλο το σώμα, αφού συνήθως κατά το στάδιο της διάγνωσης του έχει ήδη προχωρήσει σε μεταστάσεις στους λεμφαδένες και σε άλλα όργανα (π.χ., οστά, εγκέφαλος, ήπαρ, επινεφρίδιοι αδένες κλπ). Το κύριο σημείο εμφάνισης μικροκυτταρικού καρκίνου είναι η βρογχική βλενώδη μεμβράνη (Εικ.3) κάτω από το επιθήλιο στο κέντρο των πνευμόνων (80%), ενώ πιο σπάνια (20%) η νόσος ξεκινά από την περιφέρεια (βρόγχοι). Τα καρκινικά κύτταρα του SCLC είναι μικρά σε μέγεθος ενώ το σχήμα τους μπορεί να είναι είτε πολυπλευρικό είτε ατρακτοειδές. Ο κύριος παράγοντας που οδηγεί στην εμφάνιση μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα είναι η κατανάλωση καπνού. Είναι πολύ σπάνιο για κάποιον που δεν έχει καπνίσει ποτέ, να εμφανίσει μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

► **Μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC):** το υπόλοιπο 75-80% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα είναι μη-μικροκυτταρικού τύπου. Ο τύπος αυτός καρκίνου διακρίνεται σε 3 επιμέρους υπομορφές, η καθεμιά από τις οποίες παρουσιάζει μεμονωμένα διακριτά στοιχεία:

1. **Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (squamous cell carcinoma):** είναι από τις πιο κοινές μορφές καρκίνου του πνεύμονα παγκοσμίως, καθώς ευθύνεται για το 30% περίπου όλων των περιπτώσεων. Η μορφή αυτή καρκίνου του πνεύμονα συνήθως ξεκινά από τους μεγάλους βρόγχους και παραμένει στην περιοχή του θώρακα χωρίς να προχωρεί σε μεταστάσεις (Εικ.3).

2. **Αδενοκαρκίνωμα (adenocarcinoma)**: είναι η πιο διαδεδομένη μορφή καρκίνου του πνεύμονα καθώς ευθύνεται για το 40% όλων των περιπτώσεων. Τα αδενοκαρκινικά κύτταρα έχουν σωληνοειδές σχήμα και συνήθως εμφανίζονται πρώτα στις εξωτερικές άκρες των πνευμόνων (Εικ.3).
3. **Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (large cell carcinoma)**: ο όρος αυτός χρησιμοποιείται για όλους τους καρκίνους του πνεύμονα που δεν ανήκουν στις κατηγορίες του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος και αδενοκαρκινώματος. Η μορφή αυτή καρκίνου του πνεύμονα ευθύνεται για το 15% περίπου όλων των περιπτώσεων και μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε περιοχή του πνεύμονα (Εικ.3) (Schiller *et al.*, 2002).



Εικόνα 3: Οι 4 τύποι καρκινικών κυττάρων στον πνεύμονα και οι περιοχές του πνεύμονα που εμφανίζονται (A. Riccardi).

Αιτιολογία καρκίνου του πνεύμονα

Η εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα φαίνεται να έχει ως κύρια αιτία τον καπνό του τσιγάρου. Η πιθανότητα να εμφανίσει κάποιος καρκίνο του πνεύμονα οφείλεται κατά 85% στο κάπνισμα, ενώ κατά 15% σε άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες, αλλά και σε γενετικές και επιγενετικές αλλοιώσεις. Οι διάφοροι παράγοντες που μπορεί να αυξήσουν την πιθανότητα για την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα μπορούν να ομαδοποιηθούν στις παρακάτω κατηγορίες:

- **Γενετικές αλλαγές :** στα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα συσσωρεύονται πολλές γενετικές αλλοιώσεις, οι οποίες είναι απαραίτητες για να μετατραπεί το φυσιολογικό βρογχικό επιθήλιο σε καρκίνο του πνεύμονα (Sekido *et al.*, 2001). Αυτές οι γενετικές αλλαγές αφορούν συχνά είτε την υπερέκφραση ογκογονιδίων είτε την απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, δημιουργώντας έτσι αλλοιώσεις σε γονίδια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και ελέγχουν την κυτταρική ανάπτυξη. Πολλές περιπτώσεις καρκίνου του πνεύμονα οφείλονται σε απώλεια ετεροζυγωτίας κάποιων χρωμοσωμικών θέσεων (Mitsuuchi *et al.*, 2002). Κάποιες από αυτές τις πιο σημαντικές αλλαγές σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2: Συχνές γενετικές αλλαγές σε καρκίνο του πνεύμονα (Mitsuuchi *et al.*, 2002).

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

- **Επιγενετικές αλλαγές:** εκτός από τις γενετικές αλλαγές που αναφέρθηκαν παραπάνω, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν στην απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων στον καρκίνο του πνεύμονα. Οι παράγοντες αυτοί ονομάζονται «επιγενετικοί», είναι κληρονομήσιμοι σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και δεν αφορούν αλλαγές στην αλληλουχία του DNA. Μία επιγενετική αλλαγή που φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με τη καρκινογένεση είναι η μεθυλίωση του DNA ιδιαίτερα στον προαγωγέα των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Herman, 2004). Η μεθυλίωση των κυτοσινών σε συγκεκριμένες θέσεις στους υποκινητές των γονιδίων, μπορεί να επιφέρει παρεμπόδιση της μεταγραφής των γονιδίων αυτών και επομένως ανωμαλίες

στην έκφραση των παραγόμενων πρωτεϊνών. Περισσότερες λεπτομέρειες για την μεθυλίωση αναφέρονται στην αντίστοιχη ενότητα.

- ▶ **Δράση Τελομεράσης:** Η αντιγραφή του DNA δεν είναι πλήρης στα άκρα των χρωμοσωμάτων λόγω της παρουσίας των τελομερών. Έτσι παρουσιάζεται μόνιμη αναστολή του πολλαπλασιασμού μετά από ένα πεπερασμένο όριο κυτταρικών διαιρέσεων. Η τελομεράση είναι ένα ένζυμο που προσθέτει TTAGGG νουκλεοτίδια στο άκρο του χρωμοσωμικού DNA, ώστε να αντισταθμιστούν οι οποιεσδήποτε απώλειες που προκύπτουν μετά από κάθε κύκλο διπλασιασμού του DNA. Σε φυσιολογικά κύτταρα δεν υπάρχει δράση της τελομεράσης ενώ αντίθετα τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν αυξημένη δράση της τελομεράσης. Μελέτες σε όγκους πνεύμονα έδειξαν ότι η τελομεράση εκφράζεται στο 80% των NSCLC περιπτώσεων και στο 100% των SCLC περιπτώσεων (Bunn, 2002).
- ▶ **Χρήση καπνού:** κύρια θέση στην κατηγορία των εξωγενών παραγόντων που αυξάνουν τις πιθανότητες για δημιουργία καρκίνου του πνεύμονα κατέχει η κατανάλωση καπνού. Υπολογίζεται ότι τουλάχιστον 87% των περιπτώσεων του καρκίνου του πνεύμονα συσχετίζονται με το κάπνισμα. Ο κίνδυνος συσχετίζεται με το συσσωρευτικό ποσό που καπνίζεται ή με τα “pack-years”, τα οποία καθορίζονται με τη διαίρεση του μέσου αριθμού τσιγάρων που καπνίζονται ανά ημέρα δια του 20, από 20^ο έτος και έπειτα, πολλαπλασιάζοντας με τον αριθμό ετών καπνίσματος. Η ηλικία της έναρξης του καπνίσματος είναι επίσης σημαντική, πιθανώς επειδή το ιστορικό καπνίσματος είναι μεγαλύτερο. Τα τσιγάρα με υψηλά ποσοστά σε πίσσα και νικοτίνη, ειδικά εκείνα χωρίς φίλτρο, αλλά και το βάθος της εισπνοής θέτουν έναν μεγαλύτερο κίνδυνο. Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα μειώνεται αναλογικά προς τον αριθμό των ετών μετά από τη διακοπή καπνίσματος. Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει πολλές χημικές ουσίες, εκ των οποίων πολλές έχουν βρεθεί ότι είναι καρκινογόνες (Πίν. 3) (Hecht, 1999). Μερικές από τις ουσίες αυτές γίνονται καρκινογόνες μόνο μετά την ενεργοποίηση τους από συγκεκριμένα ένζυμα που υπάρχουν σε διάφορους ιστούς του σώματος, ενώ έχει αποδειχτεί ότι το είδος των μεταλλάξεων που επάγονται από τις ουσίες αυτές είναι μεταβάσεις τύπου G>T. Οι διάφορες μεταλλάξεις επηρεάζουν πολλά γονίδια με συνέπεια την εμφάνιση καρκίνου.

Πίνακας 3: Τα κύρια καρκινογόνα που περιέχονται στον καπνό του τσιγάρου (Hecht, 1999).

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

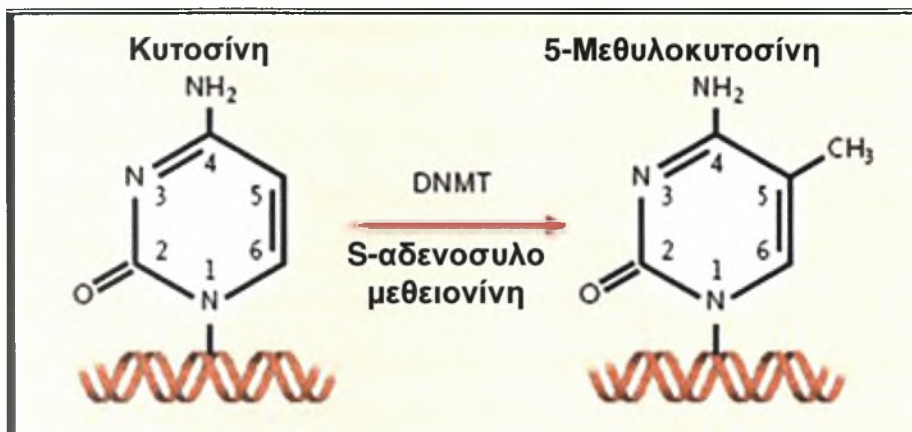
- ▶ **Διατροφή:** μελέτες έχουν δείξει ότι άτομα η κακή διατροφή σε συνάρτηση με το κάπνισμα μπορεί να αυξήσει τις πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα. Αυτό παρατηρήθηκε σε πληθυσμούς που η διατροφή τους ήταν φτωχή σε φρούτα και λαχανικά (Jemal *et al.*, 2004).

2. Μεθυλίωση του DNA

Σχεδόν στους περισσότερους οργανισμούς, από τα βακτήρια μέχρι τον άνθρωπο, εκτός από τις τέσσερις κύριες βάσεις (A, G, C, T), περιέχονται και τροποποιημένες βάσεις στο γενετικό υλικό. Μια τέτοια τροποποίηση είναι η προσθήκη μιας μεθυλομάδας (CH₃) σε συγκεκριμένες θέσεις της αλληλουχίας του DNA. Στον άνθρωπο και τα περισσότερα θηλαστικά, η μεθυλίωση του DNA επηρεάζει μόνο τις αζωτούχες βάσεις της κυτοσίνης, όταν αυτές ακολουθούνται από γουανίνες (CpG δινουκλεοτίδια)(Szyf M.,1996). Η μεθυλίωση του DNA είναι απαραίτητη στην ανάπτυξη των θηλαστικών, παίζει σημαντικό ρόλο στην καταστολή της έκφρασης και στη διαμόρφωση της δομής της χρωματίνης. Επίσης, υπηρετεί βασική λειτουργία στην απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος, στην αποτύπωση του γονιδιώματος (genomic imprinting), καθώς και στην καταστολή επαναλαμβανόμενων και παρασιτικών αλληλουχιών DNA (Tsou *et al.*,2002).

Η μεθυλίωση των κυτοσινών καταλύεται από μία οικογένεια τριών τροποποιητικών ενζύμων, που ονομάζονται DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs). Οι

DNMTs καταλύουν την μεθυλίωση στον 5^ο άνθρακα του δακτυλίου της κυτοσίνης, χρησιμοποιώντας την S-αδενοσυλο-μεθειονίνη ως δότη της μεθυλομάδας (Εικ. 4).



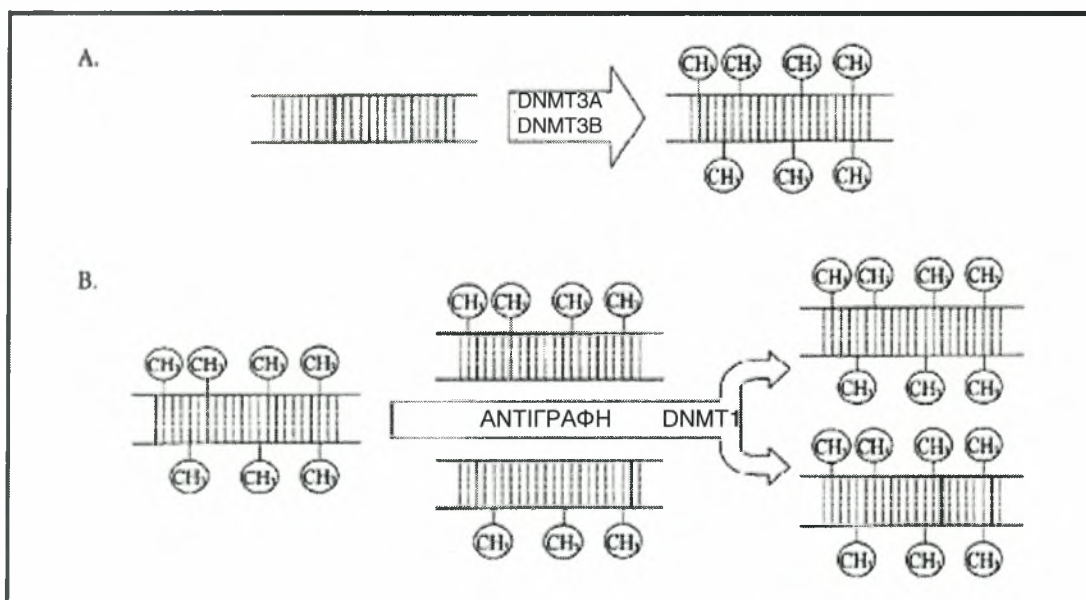
Εικόνα 4: Χημική αντίδραση μεθυλίωσης της κυτοσίνης (Herman et al.,2003).

Είδη μεθυλίωσης

Δύο είναι τα κύρια είδη της μεθυλίωσης του DNA: i) *de novo* μεθυλίωση κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης ή διαφοροποίησης των κυττάρων, και ii) μεθυλίωση διατήρησης (maintenance methylation) που συντηρεί το πρότυπο μεθυλίωσης αφού αυτό έχει καθιερωθεί (Szyf M.,1996). Οι τρεις μεθυλοτρανσφεράσες που είναι υπεύθυνες για την μεθυλίωση του DNA είναι οι: DNMT1, DNMT3a και DNMT3b. Αυτά τα τρία ένζυμα, μαζί με κάποιες άλλες πρωτεΐνες, είναι υπεύθυνα για τα σχήματα μεθυλίωσης κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης, της εμβρυογένεσης και της ανάπτυξης των σωματικών ιστών. Η DNMT3a και η DNMT3b είναι υπεύθυνες για τη *de novo* μεθυλίωση, ενώ η DNMT1 καταλύει την προσθήκη μεθυλομάδων κατά τη μεθυλίωση διατήρησης (Laird, 2003).

Η *de novo* μεθυλίωση, που πραγματοποιείται από τις DNMT3a και DNMT3b, σχετίζεται με την καθιέρωση των πρωταρχικών προτύπων μεθυλίωσης που είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική εμβρυϊκή ανάπτυξη (Εικ.5Α). Τα επίπεδα έκφρασης των DNMT3a και DNMT3b είναι υψηλά σε αδιαφοροποίητα εμβρυϊκά στελεχιαία κύτταρα και χαμηλά σε κύτταρα σωματικών ιστών. Η δράση των ενζύμων αυτών εντοπίζεται σε περιπτώσεις μεθυλίωσης επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, ενώ, πρόσφατες σχετικά μελέτες σε καρκινικά κύτταρα, απέδειξαν ότι η δράση αυτή αυξάνει με ρυθμό ανάλογο προς την πρόοδο των καρκινικών όγκων (Turek-Plewa et al., 2005).

Η μεθυλίωση διατήρησης πραγματοποιείται από την DNMT1 και είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση των σχημάτων μεθυλίωσης αφού αυτά έχουν καθιερωθεί με τη *de novo* μεθυλίωση. Κατά την διάρκεια της αντιγραφής του ευκαρυωτικού γενωμικού DNA, περίπου 40 εκατομ. μεθυλωμένα CpG δινουκλεοτίδια μετατρέπονται στην ημιμεθυλωμένη κατάσταση στη νεοσυντιθόμενη έλικα του DNA. Αυτά τα ημιμεθυλωμένα CpG δινουκλεοτίδια πρέπει να μεθυλωθούν ώστε να διατηρηθεί το πρότυπο σχήμα μεθυλίωσης στο DNA (Εικ. 5B). Η DNMT1 βρίσκεται στη διχάλα της αντιγραφής, όπου αναγνωρίζει τις μεθυλωμένες CpG θέσεις της μητρικής αλυσίδας και καταλύει την προσθήκη μεθυλομάδων στις αντίστοιχες CpG θέσεις της θυγατρικής αλυσίδας (Turek-Plewa *et al.*, 2005).



Εικόνα 5: Η *de novo* μεθυλίωση (A) και η μεθυλίωση διατήρησης (B) από τις DNMTs (Turek-Plewa *et al.*, 2005).

Μεθυλίωση και CpG νησίδες

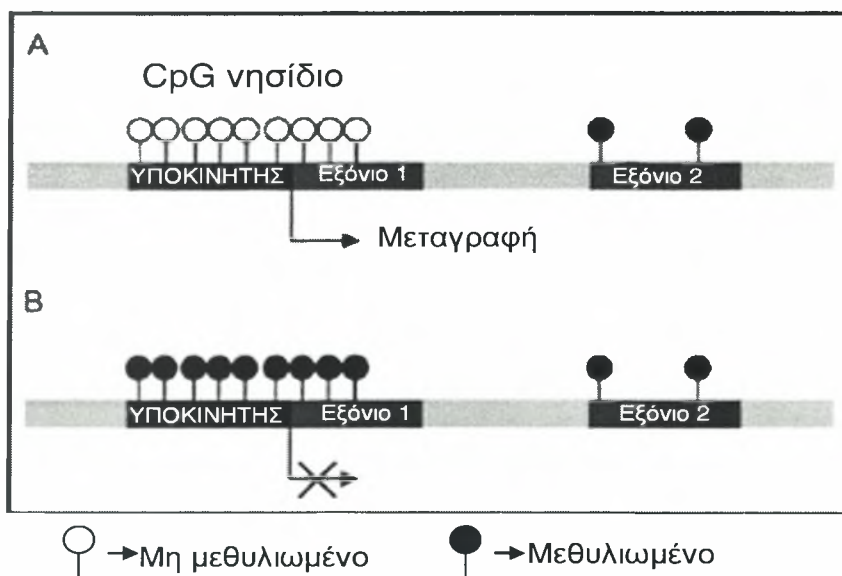
Όπως αναφέρθηκε, οι περιοχές που υφίστανται μεθυλίωση στο ανθρώπινο γονιδίωμα, είναι οι κυτοσίνες των CpG νουκλεοτιδίων. Παρά την υψηλή πιθανότητα μια κυτοσίνη και μια γουανίνη, να βρίσκονται η μια δίπλα στην άλλη στην αλληλουχία του DNA, υπάρχουν πραγματικά πολύ λίγες περιοχές CpG στα ευκαρυωτικά γονιδιώματα. Αυτό οφείλεται στη δράση της μεθυλοτρανσφεράσης, η οποία αναγνωρίζει αυτές τις CpG περιοχές και μεθυλιώνει την κυτοσίνη, μετατρέποντας την σε 5-μεθυλο-κυτοσίνη. Μετά από αυθόρμητες απαμινώσεις, η 5-μεθυλο-κυτοσίνη μετατρέπεται σε θυμίνη. Εάν αυτή η μεταλλαγή δεν έχει καμία επίδραση (όπως στις περισσότερες περιπτώσεις), το λάθος δεν αναγνωρίζεται από

τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης, με συνέπεια την απώλεια της περιοχής CpG (Laird, 2003).

Η χαμηλή συχνότητα των CpG δινουκλεοτιδίων είναι εμφανής σε όλο το μήκος του ανθρώπινου γονιδιώματος, εκτός από κάποιες περιοχές, στις οποίες η συχνότητα των δινουκλεοτιδίων αυτών βρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα. Οι περιοχές αυτές ονομάζονται CpG νησίδες (CpG islands) και θεωρείται ότι καταλαμβάνουν το 1% ολόκληρου του γονιδιώματος. Οι CpG νησίδες έχουν μήκος ~200-1000 bp, ενώ υπάρχουν περίπου 29.000 στο ανθρώπινο γονιδίωμα (Zochbauer-Muller *et al.*, 2002).

Οι περισσότερες CpG νησίδες παρατηρούνται στην 5' περιοχή των γονιδίων του ανθρώπινου γονιδιώματος, ενώ ποσοστό μεγαλύτερο από 60% των γονιδιακών υποκινητών περιέχεται μέσα σε νησίδες αυτού του τύπου. Το 80% των CpG νουκλεοτιδίων που δεν ανήκουν σε CpG νησίδες είναι πλήρως μεθυλιωμένο. Αντίθετα, τα CpG νουκλεοτίδια που ανήκουν σε CpG νησίδες, και ειδικότερα αυτών που ανήκουν σε υποκινητές γονιδίων, είναι συνήθως μη μεθυλιωμένα. Εξαιρέση αποτελούν οι CpG νησίδες που σχετίζονται με την απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος και την αποτύπωση του γονιδιώματος (Herman *et al.*, 2003).

Η κατάσταση μεθύλισης των CpG νησίδων ενός υποκινητή σχετίζεται με την μεταγραφική ικανότητα του γονιδίου. Έτσι αν ο υποκινητής δεν είναι μεθυλιωμένος, τότε το γονίδιο είναι μεταγραφικά ενεργό (Εικ.6A), ενώ στην αντίθετη περίπτωση το γονίδιο είναι μεταγραφικά ανενεργό (Εικ.6B).



Εικόνα 6: Μεθύλιση των CpG νησίδων του υποκινητή ενός γονιδίου (Worm *et al.*, 2002).

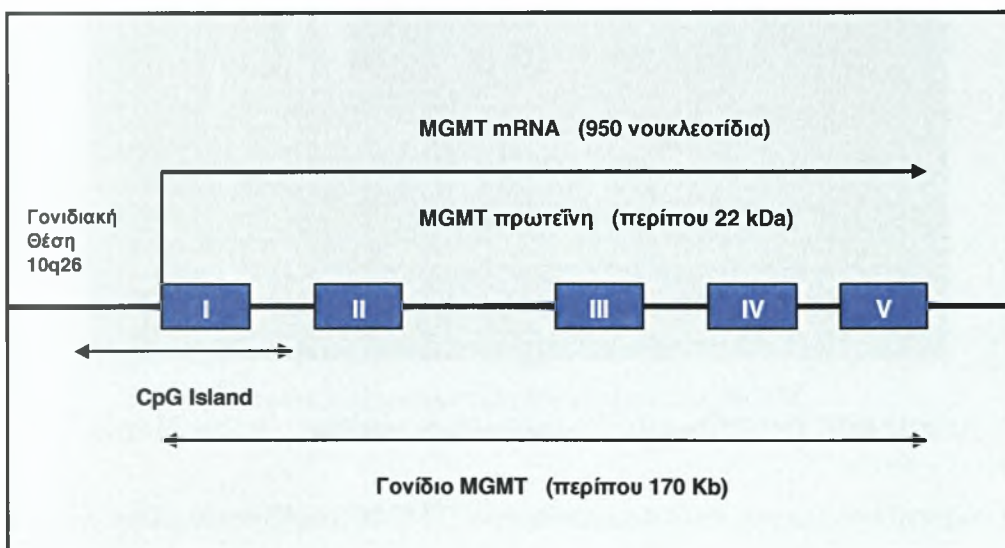
Έτσι, αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA, μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στην έκφραση ενός γονιδίου, γεγονός που είναι σημαντικό στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Μία τέτοια περίπτωση είναι και η υπερμεθυλίωση του υποκινητή ενός γονιδίου που κωδικοποιεί το επιδιορθωτικό ένζυμο *MGMT* και σχετίζεται με την εμφάνιση καρκίνου.

3. DNA Μεθυλοτρανσφεράση της O⁶-Μεθυλογουανίνης (*MGMT*)

Δομή του *MGMT*

Η DNA μεθυλοτρανσφεράση της O⁶-μεθυλογουανίνης (*MGMT*) είναι ένα ένζυμο που παίζει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA. Το ανθρώπινο γονίδιο της *MGMT* κλωνοποιήθηκε πρώτη φορά από τον Tano και συνεργάτες (Tano *et al.*, 1990). Το cDNA που κλωνοποιήθηκε περιέχει ένα μόνο πλαίσιο ανάγνωσης, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με 21,7 kDa που φέρει πολλές ομοιότητες με τρεις βακτηριακές μεθυλοτρανσφεράσες.

Το γονίδιο της *MGMT* υπολογίστηκε ότι έχει μήκος περίπου 15 Kb (Rydberg *et al.*, 1990), ενώ η χρωμοσωμική του θέση βρέθηκε να είναι στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 10 στη θέση 10q26 (Natarajan *et al.*, 1992). Στο ανθρώπινο γονίδιο της *MGMT* υπάρχουν 5 εξόνια (Εικ. 7), ενώ έχει αναγνωριστεί και μία CpG νησίδα στον υποκινητή του γονιδίου (Harris *et al.*, 1991). Το mRNA, που κωδικοποιεί το ένζυμο *MGMT*, έχει μήκος 950 νουκλεοτίδια.

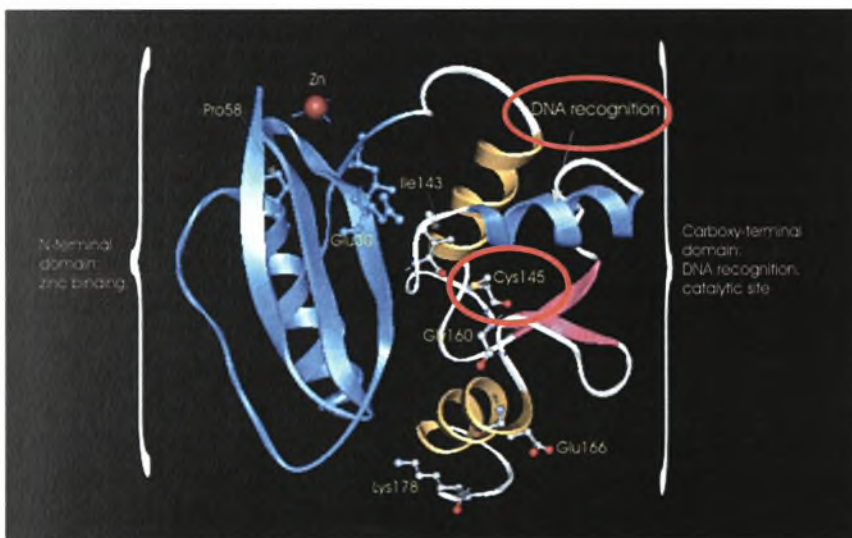


Εικόνα 7: Διαγραμματική απεικόνιση της δομής του γονιδίου της *MGMT*. Με μπλε χρώμα διακρίνονται τα 5 εξόνια του γονιδίου

Λειτουργία του MGMT

Το MGMT είναι ένα ένζυμο επιδιόρθωσης του DNA που απομακρύνει μεταλαξιγόνα και κυτοτοξικά κατάλοιπα (αλκύλια) από την O⁶ θέση της γουανίνης του DNA (Pegg *et al.*,1990). Η αλκυλίωση του DNA στη θέση O⁶ της γουανίνης, παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία μεταλλάξεων στον καρκίνο. Αυτό συμβαίνει κυρίως επειδή η O⁶-μεθυλο-γουανίνη τείνει να δημιουργεί δεσμό με τη θυμίνη κατά την αντιγραφή, με αποτέλεσμα να έχουμε μετατροπή του ζευγαριού G-C σε A-T στο DNA (Coulondre *et al.*,1977). Επίσης, ένα κατάλοιπο O⁶-αλκυλο-γουανίνης μπορεί να ενωθεί με τα απέναντι κατάλοιπα κυτοσίνης, εμποδίζοντας την αντιγραφή του DNA (Erickson *et al.*,1980).

Το MGMT προστατεύει τα κύτταρα από αυτές τις βλάβες, μεταφέροντας την αλκυλική ομάδα από την θέση O⁶ της γουανίνης του DNA σε μια ενεργοποιημένη κυστεΐνη του ίδιου του ενζύμου, απενεργοποιώντας ταυτόχρονα και ένα μόριο της MGMT (Pegg *et al.*,1990). Στην εικόνα 8 διακρίνεται η κυστεΐνη και η θέση πρόσδεσης του DNA. Το αλκυλιωμένο πλέον MGMT αποσυνδέεται από το DNA και αποικοδομείται με τη διαδικασία της ουβικουΐτινωσης. Έτσι, η ικανότητα του κυττάρου να ανταπεξέλθει σε τέτοιες βλάβες εξαρτάται από την ποσότητα MGMT που έχει κάθε κύτταρο, καθώς και από την *de novo* σύνθεση του.



Εικόνα 8: Η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου MGMT
(http://scmgc.cmo.washington.edu/GeneModels/3Danalysis/MGMT_3Dstill.htm)

Οι ποσότητες του ενζύμου MGMT εξαρτώνται από τον τύπο του κυττάρου αλλά και από τον ιστό στον οποίο ανήκουν τα κύτταρα (Gerson *et al.*,1986). Τα επίπεδα ενεργότητας του MGMT σε υγιή κύτταρα ρυθμίζονται από την κατάσταση

φωσφορυλίωσης του ενζύμου, την δράση της p53, την σύνδεση της Ε6 ογκοπρωτεΐνης, τα γλυκοκορτικοειδή και κάποιους άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (Esteller *et al.*,2004).

MGMT και καρκίνος του πνεύμονα

Η απώλεια έκφρασης του γονιδίου του *MGMT* οφείλεται συνήθως σε μετάλλαξη, σε ανασυνδυασμό του γονιδίου ή σε αστάθεια του mRNA. Η υπερμεθυλίωση των κυτοσινών των CpG νησιδίων είναι η κύρια επιγενετική τροποποίηση του DNA των κυττάρων των θηλαστικών (Esteller *et al.*,2002). Σε κάποιες μελέτες βρέθηκε υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου του *MGMT* σε κυτταρικές σειρές που είχε αποτέλεσμα την απώλεια έκφρασης του γονιδίου (Costello *et al.*,1996). Πρόσφατα όμως έχουν γίνει μελέτες σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, που δείχνουν συσχέτιση της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου της *MGMT* με την απώλεια έκφρασης του γονιδίου. Επίσης έχουν γίνει έρευνες οι οποίες μελετούν την μεθυλίωση του *MGMT* σε βιολογικά υγρά όπως πτύελα (Palmisano *et al.*,2000). Σκοπός αυτών των ερευνών είναι η εύρεση βιολογικών μοριακών δεικτών που να υποδεικνύουν την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου σε καπνιστές. Παρακάτω παρατείνεται ένας συγκεντρωτικός πίνακας με αποτελέσματα διαφόρων ερευνητών:

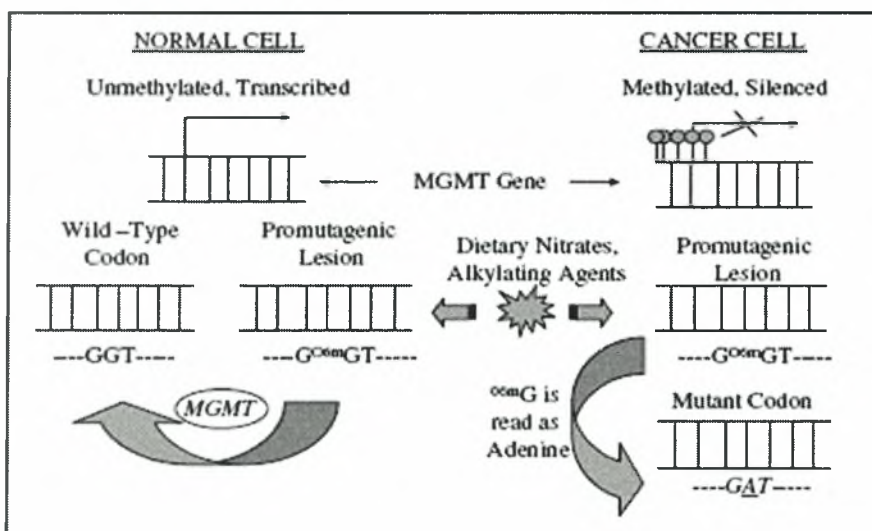
Πίνακας 4: Ποσοστά μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου του *MGMT* σε καρκίνο του πνεύμονα (Tsou *et al.*,2002).

Τύπος Καρκίνου	Μεθυλωμένα Δείγματα	Ποσοστό Μεθυλίωσης	Βιβλιογραφία
NSCLC	27/92	29%	Esteller <i>et al.</i> , 1999a
NSCLC	22/107	21%	Palmisano <i>et al.</i> , 2000
NSCLC	6/22	27%	Wolf <i>et al.</i> , 2001
NSCLC	6/10	60%	Zochbauer-Muller <i>et al.</i> , 2001b
NSCLC	10/41	24%	Esteller <i>et al.</i> , 2001
<i>NSCLC</i>	10/34	29%	Esteller <i>et al.</i> , 1999a

Η υπερμεθυλίωση του *MGMT* έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της ενζυματικής του δραστηριότητας (Esteller *et al.*,2004), γεγονός που είναι πολύ σημαντικό στην ογκογένεση στον άνθρωπο. Αυτό σχετίζεται με το γεγονός ότι απουσία δράσης του *MGMT*, δημιουργούνται μεταλλάξεις στο DNA που οδηγούν σε καρκίνο.

Όπως αναφέρθηκε πριν, η ύπαρξη αλκυλιωτικών παραγόντων έχει ως αποτέλεσμα δημιουργία καταλοίπων που μπορεί να οδηγήσει σε λάθος της DNA πολυμεράσης κατά την διάρκεια της αντιγραφής. Αυτό οφείλεται στην αλλοίωση της ικανότητας της βάσης, που είναι συνδεδεμένη η μεθυλομάδα, να δημιουργήσει δεσμούς υδρογόνου. Έτσι, η O⁶-μεθυλογουανίνη διαβάζεται ως αδενίνη και σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την θυμίνη. Άρα οι πιο συχνές μεταλλάξεις που συμβαίνουν, παρουσία αλκυλιωτικών παραγόντων, είναι μεταπτώσεις G : C σε A : T (Horsfall *et al.*,1990). Για να αποφευχθούν αυτές οι μεταλλάξεις, είναι απαραίτητη η παρουσία του ενζύμου *MGMT* (Pegg *et al.*,1995).

Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το ογκογονίδιο *K-ras*, στο οποίο οι μεταλλάξεις G σε A είναι πολύ συχνές. Μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι υπερέκφραση του *MGMT* σε ποντίκια, τα προστατεύει από την μεθυλονιτροσουρία (δημιουργεί κατάλοιπα O⁶-μεθυλογουανίνης στο DNA) (Dumenco *et al.*,1993) και από τις G σε A μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο *K-ras* σε καρκίνο του πνεύμονα (Zaidi *et al.*,1995). Συσχέτιση μεταξύ της απενεργοποίησης του επιδιορθωτικού ενζύμου *MGMT* και του ογκογονιδίου *K-ras*, παρατηρήθηκαν το 2000 (Esteller *et al.*,2000a). Το ογκογονίδιο *K-ras* ενεργοποιείται ύστερα από σημειακές μεταλλάξεις στο ίδιο το γονίδιο. Η πιο συχνή από αυτές είναι η μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 (GGT), που οδηγεί στην αντικατάσταση του αμινοξέος γλυκίνη, ενεργοποιώντας την ογκογόνο δράση αυτού του μορίου (Barbacid, 1987). Η μεθυλίωση του *MGMT* συνδέεται πολύ συχνά με την ύπαρξη του καρκίνου του πνεύμονα, όπου οι μεταλλάξεις στο *K-ras* είναι πολύ συχνές (Εικ.9).



Εικόνα 9: Μέθυλίωση του *MGMT* οδηγεί σε μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο *K-ras*, ενεργοποιώντας την ογκογόνο δράση του (Esteller *et al.*,2004).

Σκοπός της παρούσας πειραματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της ανώμαλης υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου της *MGMT* σε δείγματα από καρκίνο του πνεύμονα, καθώς και σε πτύελα από βαρείς καπνιστές. Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με την μέθοδο της Methylated Specific PCR (MSP). Αυτή η εργασία έχει ως σκοπό να μελετήσει την πιθανή συσχέτιση της υπερμεθυλίωσης του *MGMT* με τον καρκίνο του πνεύμονα, καθώς και την εύρεση επιγενετικών προγνωστικών δεικτών με τη μελέτη βιολογικών υλικών (πτύελα) από τους καπνιστές.

1. Προέλευση δειγμάτων

Το βιολογικό υλικό της παρούσας πειραματικής εργασίας προήλθε από την Πνευμονολογική Χειρουργική Κλινική του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης “Θεαγένειο” και την Θωρακική Καρδιοχειρουργική Κλινική του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου “ΑΧΕΠΑ”. Το βιολογικό υλικό προέρχεται από ασθενείς οι οποίοι έπασχαν από καρκίνο του πνευμονά. Σε κάθε περίπτωση ασθενούς, κατά την προγραμματισμένη χειρουργική αφαίρεση του όγκου, λαμβάνονταν μικρή ποσότητα παθολογικού και παρακειμένου ιστού για επεξεργασία, ενώ το υπόλοιπο τμήμα του όγκου αποστέλλονταν στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου για τη συνήθη συμβατική ιστοπαθολογική εξέταση. Τα δείγματα προς επεξεργασία, αμέσως μετά την παραλαβή τους, τοποθετούνταν σε υγρό άζωτο και μεταφέρονταν στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του ΑΠΘ, όπου διατηρούνταν στους $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι τη χρήση τους.

Επίσης βιολογικό υλικό χρησιμοποιήθηκε και από το ιατρείο διακοπής καπνίσματος του Θεαγενείου Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης. Οι ασθενείς του ιατρείου ήταν και των δύο φύλων. Το βιολογικό υλικό προέρχεται από πτύελα των ασθενών, τα οποία λήφθηκαν κατά την εξέταση τους στο ιατρείο.

Εκτός από τα παραπάνω δείγματα ασθενών, απαραίτητη κρίθηκε η συλλογή λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος από φυσιολογικά άτομα, το γενετικό υλικό των οποίων χρησιμοποιήθηκε ως υλικό ελέγχου (μάρτυρας). Τα φυσιολογικά αυτά δείγματα (δέκα στον αριθμό) προήλθαν από εθελοντές του εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας του τμήματος ΑΠΘ με αιμοληψία.

2. Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων για τη μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου της *MGMT* είναι ο εξής:

- Ανακινούμενο υδατόλουτρο
- Ρότορα
- Μηχανήματα φυγοκέντρωσης
- Φασματοφωτόμετρο
- Ηλεκτρονικές πιπέτες
- Μηχάνημα PCR
- Αναδευτήρα Vortex
- Μηχάνημα θέρμανσης THERMOBLOC
- pH-μετρο
- Φούρνο μικροκυμάτων
- Μηχάνημα αποστείρωσης
- Μηχάνημα οριζόντιας ηλεκτροφόρησης
- Τράπεζα υπεριάδους ακτινοβολίας με ψηφιακή φωτογράφιση

3. Χημικά αντιδραστήρια

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

- *Διάλυμα μετουσίωσης (Solution D):*
 - 4 M θεικυανική γουανιδίνη
 - 25 mM κιτρικό νάτριο pH 7.0
 - 0,5% Sarcosyl
 - 0,1 M 2-μερκαπτοαιθανόλη

Φυλάσσεται στους 4 °C.

- *Διάλυμα χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1):*
 - 24 ml χλωροφόρμιο
 - 1 ml ισοαμυλικής αλκοόλης

Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

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

Αποστειρώνεται και φυλάσσεται στους 4 °C

- *Διάλυμα 10 X TBE:*
 - 108 gr Tris base

55 gr βορικό οξύ
40 ml 0,5M EDTA (pH 8.0)
ddH₂O

Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- *Διάλυμα φόρτωσης ηλεκτροφόρησης (Loading Buffer):*
0.25% Βρωμοφαινόλη
0.25% Xylene cyanol
40% Γλυκερόλη
ddH₂O

Φυλάσσεται σε RT.

- *Διάλυμα 10X TAE:*
48,4 gr Tris base
22,96 gr οξικό οξύ
20 ml 0,5M EDTA (pH 8.0)
ddH₂O

Φυλάσσεται στους 4 °C.

Για την παρασκευή των απαραίτητων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν χημικά αντιδραστήρια της εταιρείας “Sigma Chemical Company”, ενώ το ένζυμο Taq Platinum πολυμεράση προήλθε από την εταιρεία “InvitrogenTM”. Επιπλέον, το “Wizard DNA Clean-up System” που χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό των τροποποιημένων δειγμάτων DNA ήταν προϊόν της “Promega, USA”. Τέλος, στις ηλεκτροφορήσεις των MSP προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε μοριακός δείκτης ελέγχου 100 bp της εταιρείας “InvitrogenTM”.

4. Μέθοδοι

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είχε ως στόχο τη μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου της MGMT σε καρκίνο του πνεύμονα, καθώς και σε παρακείμενο, μακροσκοπικά υγιή ιστό. Αρχικά απομονώθηκε γενετικό υλικό (DNA) από ομογενοποιημένους ιστούς. Στη συνέχεια ακολούθησε χημική τροποποίηση του γενετικού υλικού, ώστε να εφαρμοστεί στη συνέχεια η MSP (Methylated Specific PCR). Τέλος, ο έλεγχος των προϊόντων της MSP έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

► Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ιστούς

Μετά τη συλλογή των ιστών ακολούθησε η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA με την χρήση οργανικών διαλυτών. Η όλη διαδικασία περιλάμβανε συνολικά 8 στάδια:

- i. Ομογενοποίηση των ιστών: για την ομογενοποίηση ιστών χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα ιγδία και υγρό άζωτο. Μετά την κονιορτοποίηση του ιστού, το δείγμα (20 mg ιστού) κάθε ασθενή τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf και διατηρούνταν στον -70°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί για απομόνωση γονιδιωματικού DNA.
- ii. Λύση κυτταρικών μεμβρανών: για να διαλυθούν οι κυτταρικές και οι πυρηνικές μεμβράνες των κυττάρων, προστεθήκαν 500 μl Ρυθμιστικού Διαλύματος Λύσης κυττάρων (lysis buffer) για 20 mg κονιορτοποιημένου ιστού. Στη συνέχεια προστέθηκαν 15 μl Πρωτεϊνάσης K (20mg/ml) για την πρωτεόλυση των ιστονών του DNA. Ακολουθούσε επώαση των δειγμάτων στους 55°C για 3 ώρες.
- iii. Απομάκρυνση πρωτεϊνών: μετά την διάσπαση των πρωτεϊνών ακολούθησε η εκχύλιση τους με προσθήκη σε κάθε δείγμα ίσου όγκου (500 μl) ουδέτερης φαινόλης (pH 8.0) εξισορροπημένης με 0.1 M Tris.HCl. Τα δείγματα στη συνέχεια αναδεύονταν ήπια στο ρότορα για 5 λεπτά, και ακολούθως φυγοκεντρώνταν σε 12500 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου 4°C .
- iv. Ολοκληρωτική απομάκρυνση πρωτεϊνών: μετά τη φυγοκέντρηση σχηματίζονταν δύο διακριτές φάσεις, απ' όπου λαμβάνονταν η υπερκείμενη στιβάδα (υδατική φάση) και τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf (100-1000 μl). Με την προσθήκη 250 μl ουδέτερης φαινόλης (pH 8.0) εξισορροπημένης με 1M Tris.HCl (pH 8), και 250 μl διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) σε κάθε δείγμα, πραγματοποιούνταν η ολοκληρωτική απομάκρυνση των πρωτεϊνών. Ακολουθούσε ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 12500 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου 4°C .
- v. Απομάκρυνση φαινόλης: μετά την φυγοκέντρηση σχηματίζονται δυο διακριτές φάσεις, εκ των οποίων λαμβάνονταν η υπερκείμενη στιβάδα (υδατική φάση) και τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf

(100-1000 μl). Για την απομάκρυνση της φαινόλης από τα δείγματα ακολουθούσε προσθήκη 500 μl διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) σε κάθε δείγμα. Τα δείγματα στη συνέχεια αναδεύονταν ήπια στο ρότορα για 5 λεπτά και ακολούθως φυγοκεντρώνταν στις 12500 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου 4 °C.

- vi. Απομάκρυνση υπολειμμάτων φαινόλης: Επανάληψη του 5^{ου} σταδίου ώστε να απομακρυνθεί εντελώς η φαινόλη.
- vii. Κατακρήμιση DNA: μετά τη φυγοκέντρωση σχηματίζονταν δύο διακριτές φάσεις, απ' όπου λαμβάνονταν η υπερκείμενη στοιβάδα (υδατική φάση) και τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf (100-1000 μl). Ακολουθούσε προσθήκη διπλάσιου όγκου (1000 μl) παγωμένης απόλυτης αιθανόλης (100%) σε κάθε δείγμα με σκοπό την αφυδάτωση και κατακρήμιση του DNA. Στη συνέχεια τα δείγματα αναδεύονταν ήπια στο ρότορα για 5 λεπτά, και ακολούθως φυγοκεντρώνταν στις 6000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου 4 °C. Μετά την φυγοκέντρωση είχαμε κατακρήμιση του DNA, το οποίο σχημάτιζε ένα άσπρο "κουβάρι" στον πάτο των σωληνάρων. Με προσεκτική απόχυση της αιθανόλης έμενε στο σωληνάριο μόνο το DNA, το οποίο ξεπλενόταν με 500 μl αιθανόλης 70%, αναδεύονταν ήπια στο ρότορα για 5 λεπτά, και απομονώνονταν με απόχυση της υπερκείμενης αιθανόλης και στέγνωμα στον αέρα.
- viii. Διαλυτοποίηση και διατήρηση δειγμάτων DNA: μετά την ολοκληρωτική εξάτμιση της αιθανόλης, τα προκύπτοντα δείγματα DNA διαλύονταν σε 50-150 μl διαλύματος συντήρησης (TE), ανάλογα με την ποσότητα DNA του κάθε δείγματος. Τα δείγματα στη συνέχεια διατηρούνταν στους 4 °C για 24 ώρες, έτσι ώστε να επιτευχθεί η πλήρης διαλυτοποίηση τους στο TE, και στη συνέχεια φυλάσσονταν στους -20 °C μέχρι τη χρήση τους.

► Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από αίμα

Απαραίτητη προϋπόθεση για την αποφυγή λανθασμένων αποτελεσμάτων σε οποιαδήποτε πειραματική διαδικασία αποτελεί η λήψη δειγμάτων που να λειτουργούν ως συγκριτικοί παράγοντες (μάρτυρες). Στην παρούσα πειραματική εργασία τα δείγματα που επιλέχθηκαν για το σκοπό αυτό προέρχονταν από υγιή άτομα με

εθελοντική αιμοδοσία. Το γονιδιωματικό DNA από το αίμα των ατόμων αυτών απομονώθηκε σύμφωνα με το ακόλουθο πειραματικό πρωτόκολλο:

- i. Λήψη δειγμάτων: η λήψη των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την καθιερωμένη μέθοδο κλινικής αιμοληψίας από εθελοντές που προέρχονταν μέσα από το χώρο του εργαστηρίου. Συνολικά από τον κάθε εθελοντή λήφθηκαν 6 ml αίματος, το οποίο αμέσως διοχετεύθηκε σε σωληνάρια 'Γενικής Εξέτασης Αίματος' των 6 ml. Τα σωληνάρια αυτά ήταν ήδη εφοδιασμένα με αντιπηκτικό διάλυμα αίματος EDTA. Αμέσως μετά την αιμοληψία, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 4500 rpm για 30 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου 4 °C.
- ii. Απομόνωση στοιβάδας λευκών αιμοσφαιρίων: μετά την παραπάνω φυγοκέντρηση, το κάθε δείγμα αίματος παρουσίασε τρεις διακριτές φάσεις: την υπερκείμενη φάση (πλάσμα αίματος), την ενδιάμεση φάση (λευκά αιμοσφαίρια) και την ιζηματική φάση (ερυθρά αιμοσφαίρια). Για τη λήψη των λευκών αιμοσφαιρίων, αρχικά απομακρύνθηκε το πλάσμα από όλα τα δείγματα με πλαστική πιπέττα Pasteur. Ακολούθως, και πάλι με τη χρήση πλαστικής πιπέττας Pasteur και με κυκλικές κινήσεις, απομονώθηκε προσεκτικά η στοιβάδα των λευκών αιμοσφαιρίων από κάθε δείγμα και διοχετεύθηκε σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf.
- iii. Απομάκρυνση ερυθρών αιμοσφαιρίων: με τη λήψη των λευκών αιμοσφαιρίων αναπόφευκτη ήταν η πρόσληψη και μικρή ποσότητα ιζήματος (ερυθρά αιμοσφαίρια). Για την απομάκρυνση των ερυθρών αιμοσφαιρίων από τα δείγματα, προστέθηκαν 6 ml αποστειρωμένου ddH₂O σε κάθε δείγμα. Ακολούθησε μαλακή ανακίνηση με πλαστική πιπέττα Pasteur για 5 λεπτά μέχρι την πλήρη διάλυση του ιζήματος, και φυγοκέντρηση σε 2500 rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου 4 °C.
- iv. Καθαρισμός λευκών αιμοσφαιρίων: μετά την παραπάνω φυγοκέντρηση, σε κάθε δείγμα εντοπίστηκαν δύο διακριτές φάσεις, εκ των οποίων η υδατική φάση (υπερκείμενη στοιβάδα) απομακρύνθηκε προσεκτικά με πλαστική πιπέττα Pasteur. Τα λευκά αιμοσφαίρια υπό μορφή ιζήματος στις βάσεις των σωληναρίων καθαρίστηκαν στη συνέχεια με την προσθήκη 6 ml Nonidet P40 % σε κάθε δείγμα. Ακολούθησε μαλακή ανακίνηση με πλαστική πιπέττα Pasteur για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε 2500 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία φυγοκέντρου 4 °C.

ν. Λύση κυτταρικών μεμβρανών και πρωτεόλυση ιστονών: μετά την παραπάνω φυγοκέντρηση, σε κάθε δείγμα εντοπίστηκαν δύο διακριτές φάσεις, εκ των οποίων η υδατική φάση (υπερκείμενη στοιβάδα) απομακρύνθηκε προσεκτικά με πλαστική πιπέττα Pasteur. Τα καθαρά πλέον λευκά αιμοσφαίρια υπό μορφή ιζήματος στις βάσεις των σωληναρίων υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε λύση των κυτταρικών μεμβρανών και πρωτεόλυση των ιστονών. Η διάσπαση των κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών των λευκών αιμοσφαιρίων επιτεύχθηκε με προσθήκη 500 μl Ρυθμιστικού Διαλύματος Λύσης κυττάρων (lysis buffer). Ακολούθησε μαλακή ανακίνηση με πλαστική πιπέττα Pasteur μέχρι την πλήρη διάσπαση του ιζήματος. Στη συνέχεια, σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 20 μl Πρωτεϊνάσης K (10 mg/ml) με στόχο την πρωτεόλυση των ιστονών που συμμετέχουν δομικά στην οργάνωση του DNA στα χρωμοσώματα. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στους 55 °C για 3 ώρες ή στους 37 °C για τουλάχιστον 18 ώρες σε ανακινούμενο υδατόλουτρο.

Τα επακόλουθα στάδια της πειραματικής εργασίας που περιλάμβαναν απομάκρυνση των πρωτεϊνών και της φαινόλης, καθώς και κατακρήμνιση και διαλυτοποίηση των δειγμάτων DNA, πραγματοποιούνταν σύμφωνα με το πρωτόκολλο της σελίδας 25-26 της παρούσας εργασίας.

► Ποσοτικοποίηση δειγμάτων DNA

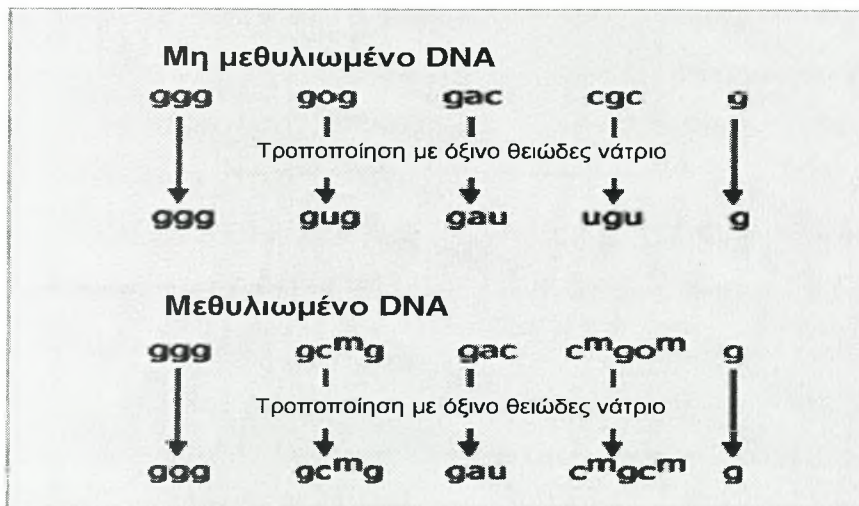
Μετά τη διαλυτοποίηση του γονιδιωματικού DNA σε διάλυμα συντήρησης TE (pH 7,5) (Tris.HCl, EDTA), ακολούθησε ποσοτικός των δειγμάτων με τη μέθοδο της φωτομέτρησης. Αρχικά πραγματοποιούνταν μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου με ddH₂O και στη συνέχεια ακολουθούσε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) των δειγμάτων DNA. Το DNA ήταν αραιωμένο σε ddH₂O. Συνήθως χρειαζόταν 4 μl DNA σε 996 μl ddH₂O, αλλά πολλές φορές αυτή η αναλογία άλλαζε ανάλογα με το διαθέσιμο γενετικό υλικό.

Η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων μετρούνταν σε μήκη κύματος 260 nm και 280 nm, ενώ ο λόγος OD₂₆₀/OD₂₈₀ καταγράφονταν για το προσδιορισμό της καθαρότητας των δειγμάτων. Από την οπτική πυκνότητα στα 260 nm υπολογίζονταν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων DNA σύμφωνα με το τύπο: 1 OD= 50 μg/ml. Στη συνέχεια, με βάση τις καταγεγραμμένες τιμές του λόγου OD₂₆₀/OD₂₈₀ του φασματοφωτομέτρου, προσδιορίζονταν η καθαρότητα του κάθε δείγματος. Σε

περιπτώσεις δειγμάτων όπου ο λόγος OD₂₆₀/OD₂₈₀ ήταν μεγαλύτερος ή ίσος με 1,8, τα δείγματα θεωρούνταν ικανοποιητικής καθαρότητας.

► *C^{met}*-U τροποποίηση δειγμάτων DNA

Για να εφαρμοστεί η μέθοδος MSP, ώστε να μελετηθεί η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου της MGMT, έπρεπε πρώτα να καταστεί δυνατός ο διαχωρισμός του μεθυλιωμένου DNA από αυτό που δεν είναι. Αυτό επιτυγχάνεται με την χημική τροποποίηση των δειγμάτων του DNA με όξινοθειώδες νάτριο (NaHSO₃). Μετά την τροποποίηση, οι μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες μετατρέπονται σε ουρακίλες, ενώ οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες παραμένουν ως έχουν (Εικ.10). Έτσι, με ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές, ακολουθεί η MSP (Methylated Specific PCR) ώστε να επιτευχθεί προσδιορισμός της παρουσίας μεθυλιωμένου και μη-μεθυλιωμένου DNA.



Εικόνα 10: Τροποποίηση των δειγμάτων του DNA με όξινοθειώδες νάτριο

Το πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την τροποποίηση των δειγμάτων DNA είναι αυτό των Eads και Laird (Eads *et al.*, 2002), και περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

1. 1-10 µg DNA προστίθονταν σε αποστειρωμένο ddH₂O, έτσι ώστε ο τελικός όγκος των δειγμάτων να ανάγεται στα 18 µl. Τα δείγματα στη συνέχεια θερμαίνονταν στους 95°C για 10 λεπτά (Eppendorf PCR machine), ενώ ακολουθούσε άμεση τοποθέτησή τους σε πάγο.
2. Προκειμένου να επιτευχθεί μετουσίωση του DNA, ακολουθούσε προσθήκη 2 µl 3M NaOH σε κάθε δείγμα και επώαση στους 42 °C για 20 λεπτά (υδατόλουτρο).

3. Κατά τη διάρκεια της επώασης των δειγμάτων, προετοιμάζονταν φρέσκο διάλυμα 5M οξίνου θειώδους νατρίου/υδροκινόνης (pH 5.0). Μετά τη λήξη της επώασης, ακολουθούσε προσθήκη 380 μl του παραπάνω διαλύματος στα ήδη αποδιαταγμένα δείγματα DNA, και ελαφρά ανάδευση (Vortex).
4. Προκειμένου να αποφευχθεί εξάτμιση, σε κάθε δείγμα προστίθονταν 5-6 σταγόνες ελαίου (mineral oil) και ακολουθούσε επώαση στους 50 °C για 16 ώρες (Thermobloc). Η αυστηρή τήρηση του χρόνου επώασης αποτελούσε καθοριστικό παράγοντα, καθώς παρατεταμένη επώαση στους 50 °C μπορούσε να προκαλέσει μη-αντιστρεπτά αποτελέσματα.
5. Μετά την επώαση των 16 ωρών, τα δείγματα υποβάλλονταν σε καθαρισμό με το ειδικό “Wizard DNA Clean-up System” της εταιρίας Promega, USA. Η διαδικασία αυτή του καθαρισμού πραγματοποιούνταν με βάση το κατευθυντήριο πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας..
6. Τα καθαρισμένα πλέον δείγματα DNA μεταφέρονταν στη συνέχεια σε καθαρά σωληνάρια Eppendorf 100-1000μl, όπου αραιώνονταν με 45 μl αποστειρωμένου ddH₂O.
7. Μετά την αραιώση, ακολουθούσε προσθήκη 5 μl 3M NaOH σε κάθε δείγμα και επώαση στους 37 °C για 15 λεπτά (υδατόλουτρο), έτσι ώστε να επιτευχθεί αποσουλφονυλίωση.
8. Μετά τη λήξη της παραπάνω επώασης, ακολουθούσε προσθήκη 75 μl 5M οξικού αμμωνίου (pH 7.4) σε κάθε δείγμα και ελαφρά ανάδευση (Vortex).
9. Για την κατακρήμνιση του DNA προστίθονταν στη συνέχεια όγκος απόλυτης αιθανόλης (100%) διπλάσιος του υπάρχοντος όγκου του κάθε δείγματος, και ακολουθούσε επώαση στους -70 °C για 1 ώρα.
10. Η κατακρήμνιση του DNA ολοκληρώνονταν με φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε 14.000 rpm για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία φυγοκέντρου 20 °C.
11. Μετά τη φυγοκέντρηση, σε κάθε δείγμα εντοπίζονταν δύο στοιβάδες, εκ των οποίων η υδατική φάση (υπερκείμενη στοιβάδα) απομακρύνονταν με πλαστική πιπέττα Pasteur.
12. Το «κουβάρι» του DNA στη βάση του κάθε σωληναρίου «ξεπλένονταν» στη συνέχεια με 200 μl κρύας αιθανόλης 70%, ενώ τα δείγματα ακολούθως υποβάλλονταν σε φυγοκέντρηση σε 14.000 rpm για 5 λεπτά.
13. Μετά τη φυγοκέντρηση, σε κάθε δείγμα εντοπίζονταν δύο στοιβάδες, εκ των οποίων η υδατική φάση (υπερκείμενη στοιβάδα) απομακρύνονταν με

πλαστική πιπέττα Pasteur. Ακολουθούσε στέγνωμα των ιζημάτων στον αέρα και διάλυση των τροποποιημένων πλέον δειγμάτων DNA σε 40 μ l TE pH 7.5. Τα τροποποιημένα δείγματα φυλάσσονταν στους -70 $^{\circ}$ C, μέχρι τη χρησιμοποίησή τους σε αντιδράσεις MSP.

► *Methylated Specific PCR (MSP) σε τροποποιημένα δείγματα DNA*

Η MSP είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί αν υπάρχει μεθυλίωση στις CpG νησίδες. Έτσι, είναι δυνατόν να εντοπιστεί αν υπάρχει μεθυλίωση σε τμήματα DNA. Με αυτή την μέθοδο μπορούμε να δούμε που υπάρχουν μη φυσιολογικά μεθυλιωμένες CpG νησίδες σε γονιδιωματικό DNA που έχει απομονωθεί από καρκινικά κύτταρά. Η MSP ανιχνεύει τις διαφορές που υπάρχουν στην αλληλουχία του DNA ανάμεσα σε μεθυλιωμένα και μη μεθυλιωμένα, οι οποίες προκύπτουν ύστερα από την τροποποίηση του DNA με όξινο θειώδες νάτριο (sodium bisulphate treatment). Οι εκκινητές έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να διακρίνουν το μεθυλιωμένο από το μη μεθυλιωμένο DNA σε συγκεκριμένους γονιδιακές περιοχές. Αυτές οι περιοχές έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε κυτοσίνες, ώστε να καθίσταται δυνατή η διαφοροποίηση των αλληλουχιών με την τροποποίηση. Επίσης, στο 3' άκρο των εκκινητών υπάρχουν CpG ζευγάρια με αποτέλεσμα η μέθοδος να αποκτά ακόμα μεγαλύτερη ευαισθησία (Herman *et al.*, 1996).

Έτσι, με την τροποποίηση ακολούθησε MSP με βήμα θερμική έναρξης (Hot-start Nested PCR) σε δύο στάδια. (Palmisano *et al.*, 2000). Στο πρώτο στάδιο γινόταν μεγέθυνση του DNA, ενώ στο δεύτερο στάδιο γινόταν η διάκριση του DNA σε μεθυλιωμένου ή μη.

Στάδιο 1

Κάθε σωληνάριο MSP είχε όγκο 37 μ l και αναλυτικά περιείχε:

Διάλυμα	Όγκος
10 X Ρυθμιστικό Διάλυμα PCR	5 μ l
50 mM MgCl ₂	3.5 μ l
25 mM dNTPs	0.4 μ l
S primer MGMT _{FOR} (50 pmol/ μ l)	1 μ l
AS primer MGMT _{REV} (50 pmol/ μ l)	1 μ l
Αποστειρωμένο ddH ₂ O	26.1 μ l
Σύνολο	37 μ l

Το ζεύγος εκκινητών (S και AS primers) που χρησιμοποιούνταν στο 1^ο στάδιο της MSP είχε τις παρακάτω νουκλεοτιδικές ακολουθίες:

Forward Primer: 5'-GGATATGTTGGGATAGTT-3'

Reverse Primer : 5'-CCAAAAACCCCAAACCC-3'

Μετά την παρασκευή του μίγματος ακολουθούσε η προσθήκη 8 μl τροποποιημένου DNA (50ng). Αμέσως μετά, τα δείγματα τοποθετούνταν στο θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf PCR Machine) για τη διεξαγωγή των αντιδράσεων. Το αναμενόμενο τμήμα DNA μετά την MSP είχε μέγεθος 289 bp. Οι συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας κάτω από τις οποίες πραγματοποιούνταν το 1^ο στάδιο της MSP είναι οι ακόλουθες:

1. Μετουσίωση (Denaturation): 95 °C για 5 mins
2. Προσθήκη 2 μονάδων Taq Platinum πολυμεράσης.
3. Μετουσίωση (Denaturation): 94 °C για 30 secs
4. Μετουσίωση (Denaturation): 94 °C για 30 secs
5. Σύνδεση εκκινητών (Annealing): 60 °C για 30 secs
6. Σύνθεση νέου DNA (Extension): 72 °C για 30 secs
7. Επιστροφή στο βήμα 3 και επανάληψη 40 κύκλων.
8. Διακοπή δράσης ενζύμου: 72 °C για 10 mins

Μετά την ολοκλήρωση των παραπάνω 40 κύκλων της MSP, τα MSP προϊόντα φυλάσσονταν στους 4 °C μέχρι τη χρήση τους στο δεύτερο στάδιο της MSP.

Στάδιο 2

Μετά τη μεγέθυνση του DNA στο 1^ο στάδιο της MSP, ακολουθούσε η διερεύνηση της μεθυλίωσης με την εφαρμογή του δεύτερου σταδίου. Πριν την εφαρμογή του σταδίου αυτού προηγούνταν η παρασκευή δύο μιγμάτων MSP, καθένα από τα οποία περιείχε διαφορετικό ζεύγος εκκινητών. Έτσι, το κάθε δείγμα εξετάζονταν ταυτόχρονα με ζεύγος εκκινητών που συνδέονταν σε μη-μεθυλιωμένη αλληλουχία DNA και με ζεύγος εκκινητών που συνδέονταν σε μεθυλιωμένη αλληλουχία DNA.

Τα μίγματα MSP που προετοιμάζονταν για την εφαρμογή του 2^{ου} σταδίου περιείχαν :

Μείγμα 1 (εκκινητές για μη-μεθυλιωμένη αλληλουχία DNA)		Μείγμα 2 (εκκινητές για μεθυλιωμένη αλληλουχία DNA)	
10X Ρυθμιστικό Διάλυμα PCR	5μl	10X Ρυθμιστικό Διάλυμα PCR	5μl
50 Mm MgCl ₂	3.5μl	50 Mm MgCl ₂	3.5μl
25 Mm dNTPs	0.4μl	25 Mm dNTPs	0.4μl
S primer U _{FOR} (50 pmol/μl)	1μl	S primer M _{FOR} (50 pmol/μl)	1μl
AS primer U _{REV} (50 pmol/μl)	1μl	AS primer M _{REV} (50 pmol/μl)	1μl
Αποστειρωμένο ddH ₂ O	26.1μl	Αποστειρωμένο ddH ₂ O	26.1μl
Σύνολο	37μl	Σύνολο	37μl

Το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιούνταν στο Μίγμα 1 της MSP (Zochbauer-Muller *et al.*, 2001) είχε τις παρακάτω νουκλεοτιδικές ακολουθίες:

Forward Primer: 5'-TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT-3'

Reverse Primer : 5'-AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA-3'

Το αναμενόμενο τμήμα DNA είχε μέγεθος 93 bp.

Το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιούνταν στο Μίγμα 2 της MSP είχε τις παρακάτω νουκλεοτιδικές ακολουθίες:

Forward Primer: 5'-TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC-3

Reverse Primer : 5'-GCACTCTTCCGAAAACGAAACG-3

Το αναμενόμενο τμήμα DNA είχε μέγεθος 81 bp.

Πριν την εφαρμογή των κύκλων του 2^ο σταδίου της MSP, προηγούνταν αραιώση 1:10 των MSP προϊόντων του 1^ο σταδίου σε αποστειρωμένο ddH₂O. Από τα προκύπτοντα αραιωμένα δείγματα προστίθονταν 8 μl δείγματος σε 37 μl μίγματος MSP, ακολουθούσε σύντομη ανακίνηση (Vortex) και ελαφρά φυγοκέντρωση. Αμέσως μετά, τα δείγματα τοποθετούνταν στο θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf PCR Machine) για τη διεξαγωγή των αντιδράσεων του 2^ο σταδίου. Οι συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας κάτω από τις οποίες πραγματοποιούνταν το 2^ο στάδιο της MSP είναι οι ακόλουθες:

1. Μετουσίωση (Denaturation): 95 °C για 5 mins
2. Προσθήκη 2 μονάδων Taq Platinum πολυμεράσης.
3. Μετουσίωση (Denaturation): 94 °C για 15 secs
4. Μετουσίωση (Denaturation): 94 °C για 15 secs
5. Σύνδεση εκκινητών (Annealing): 60 °C για 15 secs

6. Σύνθεση νέου DNA (Extension): 72 °C για 15 secs
7. Επιστροφή στο βήμα 3 και επανάληψη 40 κύκλων.
8. Διακοπή δράσης ενζύμου: 72 °C για 10 mins

Μετά την ολοκλήρωση των παραπάνω 40 κύκλων, τα προϊόντα MSP φυλάσσονταν στους 4°C, μέχρι να διεξαχθεί ο έλεγχος τους με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης.

► Έλεγχος προϊόντων MSP με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Μετά την ολοκλήρωση των δύο σταδίων της MSP, τα προκύπτοντα προϊόντα υποβάλλονταν σε έλεγχο, με στόχο την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση τους. Η μέθοδος που επιλέχθηκε για το σκοπό αυτό ήταν αυτή της οριζόντιας ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης υψηλής ηλεκτροφορητικής ανάλυσης (MetaPhor) 4,0% σε 1X TBE. Η ηλεκτροφόρηση διεξάγονταν σε ~ 75 V τάσης και σε ~ 90 mA ηλεκτρικού ρεύματος, και διαρκούσε 20-30 λεπτά.

Σε κάθε εφαρμογή ηλεκτροφόρησης MSP προϊόντων χρησιμοποιούνταν 14 μl προϊόντος, αφού πρώτα είχε προηγηθεί ανάμειξή του με 4 μl διαλύματος φόρτωσης ηλεκτροφόρησης (loading buffer). Μετά τη φόρτωση των MSP προϊόντων στην πηκτή αγαρόζης, ακολουθούσε φόρτωση (5 μl) δείκτη γνωστού μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder), με στόχο το προσδιορισμό μεγέθους των MSP προϊόντων. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αγαρόζης μεταφέρονταν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (2UVTM Transilluminator) για την ανάγνωση, την φωτογράφιση και την εκτύπωση των αποτελεσμάτων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα πειραματική εργασία μελετήθηκε η ανώμαλη υπερμεθυλίωση της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου της *MGMT*. Η υπερμεθυλίωση του υποκινητή της *MGMT* σχετίζεται με την απενεργοποίηση του γονιδίου και την πιθανή εμπλοκή του στην ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη, λήφθηκαν από ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (non-small cell lung cancer, NSCLC).

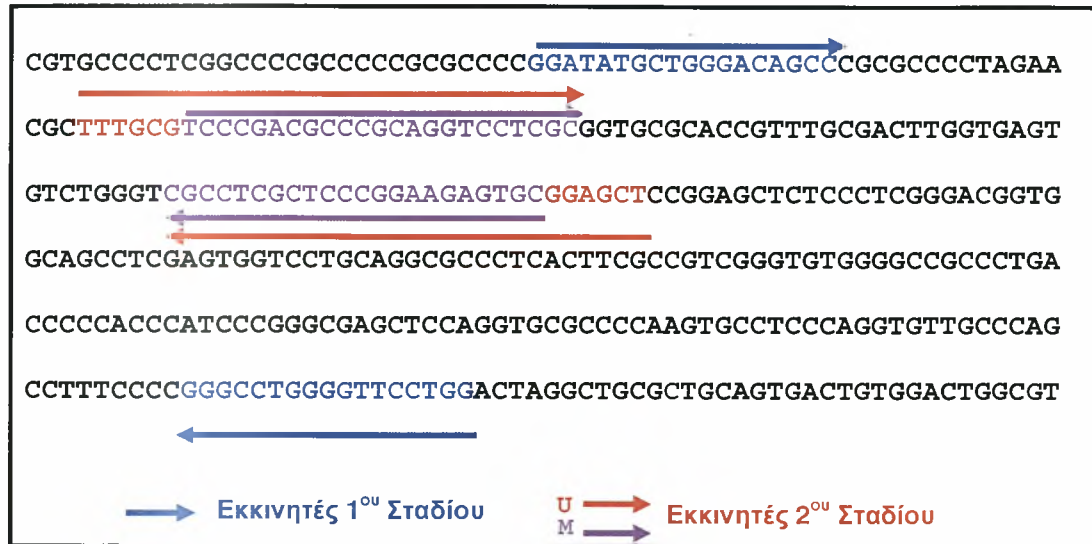
Εκτός όμως από την συσχέτιση της υπερμεθυλίωσης του *MGMT* με την παρουσία καρκίνου του πνεύμονα, πολύ σημαντικό κομμάτι είναι η πρόωμη διάγνωση της νόσου και η εύρεση μοριακών γενετικών δεικτών. Η πρόληψη του καρκίνου του πνεύμονα είναι καίριας σημασίας, μιας και ο καρκίνος του πνεύμονα μπορεί πολύ δύσκολα να διαγνωσθεί σε πρώιμο στάδιο. Έτσι μελετήθηκε η ανώμαλη υπερμεθυλίωση του γονιδίου του *MGMT* και σε δείγματα που προέρχονταν από πτύελα υγιών ατόμων, που καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες καπνού.

Στρατηγική ανίχνευσης της μεθυλίωσης του υποκινητή του *MGMT*

Για την ανίχνευση της μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου του *MGMT*, εφαρμόστηκε η τεχνική της Methylated Specific PCR (MSP). Η MSP είναι ένα είδος φωλιασμένης PCR (Nested PCR) που πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο γινόταν μεγέθυνση του DNA, ενώ στο δεύτερο στάδιο γινόταν η διάκριση σε μεθυλιωμένου με μη μεθυλιωμένου. Η MSP έχει μεγάλη ευαισθησία και μπορεί να ανιχνεύσει περισσότερα από ένα μεθυλιωμένο αλληλόμορφο σε >50.000 μη μεθυλιωμένα αλληλόμορφα.

Σύμφωνα με την νουκλεοτιδική αλληλουχία του υποκινητή του γονιδίου *MGMT*, σχεδιάστηκαν τα ζεύγη εκκινητών για τα δύο στάδια της MSP (Εικ.11). Για το πρώτο στάδιο οι εκκινητές παρουσιάζουν ομολογία με τις περιοχές στα άκρα του υποκινητή. Στο δεύτερο στάδιο της MSP, χρησιμοποιούνται δύο ζεύγη εκκινητών. Το πρώτο ζεύγος αναγνωρίζει τις μη μεθυλιωμένες περιοχές, ενώ το δεύτερο τις μεθυλιωμένες. Οι εκκινητές που αναγνωρίζουν τις μη μεθυλιωμένες περιοχές του DNA, είναι κατά 6 βάσεις μεγαλύτεροι από τους αντίστοιχους για το μεθυλιωμένο. Έτσι μετά την

τροποποίηση του DNA, εκτός του διαχωρισμού των μεθυλιωμένων από τα μη, παίρνουμε και διαφορετικά ηλεκτροφορητικά πρότυπα. Τα μη μεθυλιωμένα τμήματα έχουν μήκος 93 βάσεις, ενώ τα μεθυλιωμένα έχουν μήκος 81 βάσεις. Στο παρακάτω σχήμα διακρίνεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία του υποκινητή του *MGMT*, καθώς και οι περιοχές που συνδέονται οι εκκινητές κατά τα δύο στάδια της MSP.



Εικόνα 11: Στρατηγική ανίχνευσης μεθυλίωσης του γονιδίου *MGMT*. Διαγραμματική απεικόνιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του υποκινητή καθώς και των ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών. Με μπλε χρώμα σημειώνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στο πρώτο στάδιο της MSP, ενώ με κόκκινο (μη μεθυλιωμένο) και ροζ (μεθυλιωμένο) του δεύτερου σταδίου της MSP.

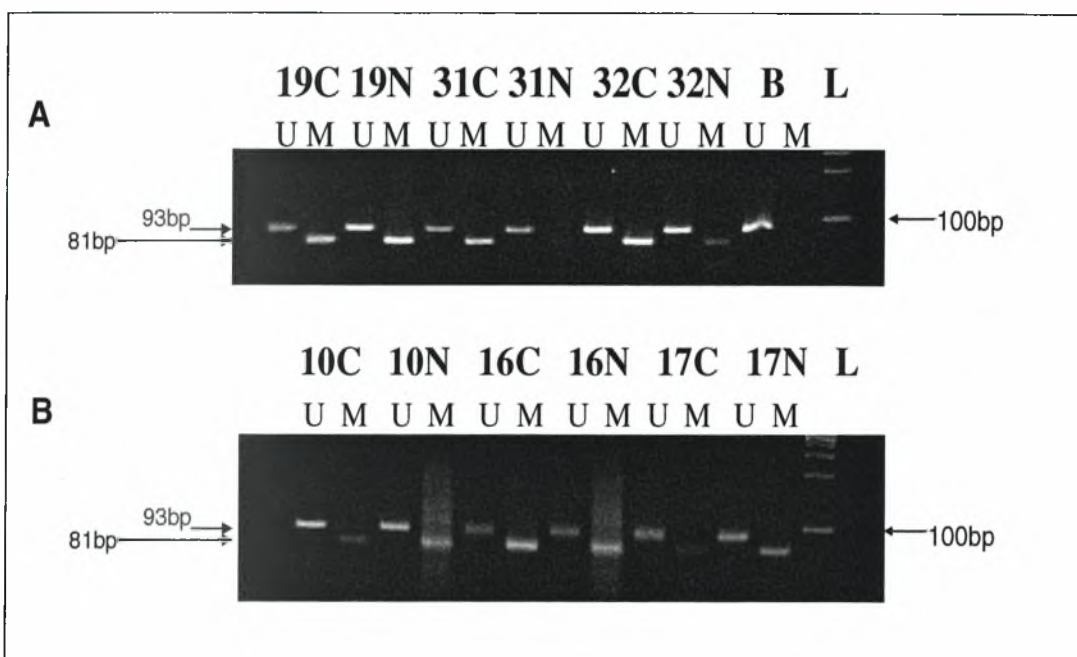
Μελέτη μεθυλίωσης του υποκινητή του *MGMT* σε καρκίνο του πνεύμονα

Στην παρούσα πειραματική εργασία εξετάστηκαν 57 δείγματα DNA για την ανίχνευση μεθυλίωσης του υποκινητή του *MGMT*. Τα 29 δείγματα προέρχονταν από καρκινικούς ιστούς, ενώ τα υπόλοιπα 28 δείγματα προέρχονται από τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό των ίδιων ασθενών (Πίνακας 4). Επίσης μελετήθηκαν δείγματα DNA από λευκοκύτταρα ως αρνητικός μάρτυρας για την μεθυλίωση.

Από την εφαρμογή της μεθόδου ελέγχου της μεθυλίωσης σε δύο στάδια (Methylation Specific PCR –MSP) προέκυψαν τα αποτελέσματα που αναφέρονται στον Πίνακα 5. Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα των MSP αναλύσεων παρατίθενται στην εικόνα 12. Όπως χαρακτηριστικά παρατηρείται, το τροποποιημένο DNA από ανθρώπινα λευκοκύτταρα δεν έδωσε PCR προϊόν παρουσία των εκκινητών που

ανιχνεύουν μεθυλιωμένη αλληλουχία (Εικ.12Α). Αντίθετα, το τροποποιημένο DNA από καρκινικά κύτταρα ιστού πνεύμονα, παρουσία εκκινητών που ανιχνεύουν μεθυλιωμένη αλληλουχία, έδωσε PCR προϊόντα αναμενόμενου μοριακού βάρους (81bp). Μεθυλίωση όμως ανιχνεύθηκε και σε αντίστοιχα δείγματα που προέρχονται από παρακείμενο φυσιολογικό ιστό (Εικ. 12). Σε όλα τα δείγματα πήραμε προϊόντα PCR αναμενόμενου μοριακού βάρους (93 bp), παρουσία των εκκινητών που ανιχνεύουν τη μη μεθυλιωμένη αλληλουχία.

Από την ένταση των ηλεκτροφορητικών προτύπων προσδιορίζεται η αναλογία των μεθυλιωμένων περιοχών προς αυτών που δεν είναι μεθυλιωμένες. Έτσι σε κάποια δείγματα οι περισσότερες αλληλουχίες είναι μεθυλιωμένες, ενώ σε άλλα οι περισσότερες αλληλουχίες είναι μη μεθυλιωμένες.



Εικόνα 12: Ανώμαλη μεθυλίωση στον προαγωγέα του γονιδίου MGMT

Μεγέθυνση του τροποποιημένου DNA, που απομονώθηκε από καρκινικό (C) και από τον αντίστοιχο παρακείμενο υγιή ιστό (NC), με εκκινητές που αναγνωρίζουν τη μεθυλιωμένη (M) ή τη μη μεθυλιωμένη (U) αλληλουχία του προαγωγέα του γονιδίου MGMT.

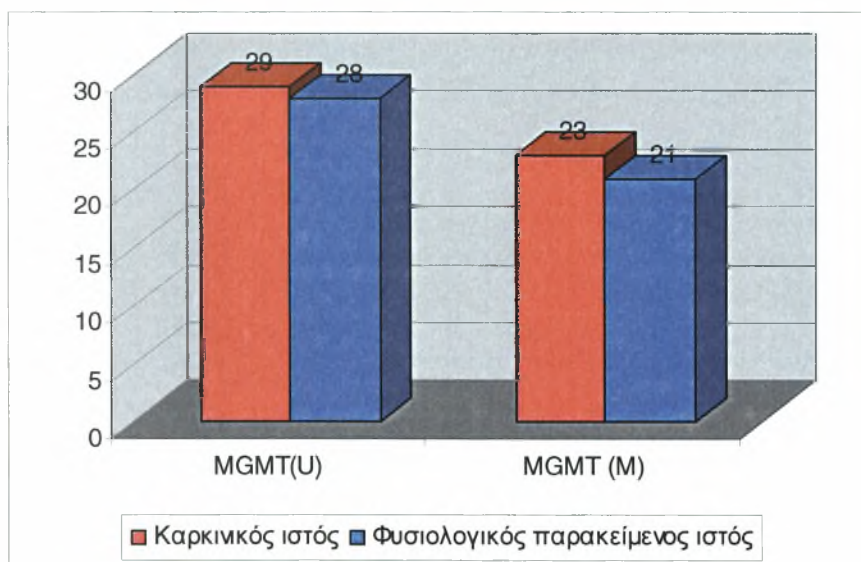
B, DNA από λευκοκύτταρα L, 100 bp μοριακός δείκτης

Ανώμαλη μεθυλίωση του προαγωγέα του γονιδίου *MGMT* ανιχνεύτηκε σε 23/29 (79.3%) από τα καρκινικά δείγματα που ελέγχθηκαν, ενώ στα δείγματα από παρακείμενο φυσιολογικό ιστό θετικά βρέθηκαν τα 21/28 (75,0%) (Εικ. 3). Στις περισσότερες περιπτώσεις (21/28, 75%), δεν υπήρχε διαφορά στην κατάσταση

μεθυλίωσης ανάμεσα στον καρκινικό και τον αντίστοιχο παρακείμενο φυσιολογικό ιστό.

Όπως προκύπτει από τη μελέτη των παραπάνω ηλεκτροφορήσεων, στις περισσότερες περιπτώσεις, η ένταση της ηλεκτροφορητικής ταινίας των μη-μεθυλιωμένων δειγμάτων είναι χαμηλότερη από την ένταση της ηλεκτροφορητικής ταινίας του προϊόντος που δίνουν τα τροποποιημένα δείγματα, με εκκινητές που ανιχνεύουν τη μεθυλιωμένη αλληλουχία. Η διαφορά αυτή στην ένταση των ηλεκτροφορητικών ταινιών είναι ιδιαίτερα ορατή σε δείγματα καρκινικών ιστών, σε αντίθεση με τα δείγματα παρακειμένων ιστών των ίδιων ασθενών.

Μόνο τέσσερις από αυτές τις περιπτώσεις βρέθηκαν να είναι αρνητικές για ανώμαλη μεθυλίωση. Είναι σημαντικό να αναφερθεί το γεγονός ότι ενώ 4/33 δείγματα εμφάνισαν ανώμαλη μεθυλίωση μόνο στον καρκινικό ιστό, υπήρχαν επίσης τρεις περιπτώσεις στις οποίες η ανώμαλη μεθυλίωση παρατηρήθηκε μόνο στον παρακείμενο υγιή ιστό (Πιν. 5).



Εικόνα 13: Διαγραμματική απεικόνιση της μεθυλίωσης στον προαγωγέα του γονιδίου MGMT

Επίσης στον Πίνακα 5 παρατίθενται στοιχεία για τους ασθενείς, όπως η ηλικία, το φύλο, καθώς και τα ποσά καπνού που έχουν καταναλώσει. Τα δεδομένα αυτά είναι χρήσιμα για την συσχέτιση του καπνίσματος με τον καρκίνο του πνεύμονα.

Πίνακας 5. Ανώμαλη υπερμεθυλίωση στον προαγωγέα του γονιδίου *MGMT* σε καρκινώματα πνεύμονα καθώς και σε παρακείμενο φυσιολογικό ιστό

	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ (pack years)	<i>MGMT</i> μεθυλίωση (καρκίνωμα)	<i>MGMT</i> μεθυλίωση (παρακείμενος ιστός)
1	M	57	YES	+	+
2	M	70	>100	ND	ND
3	M	59	YES	ND	ND
4	M	74	80	+	+
5	M	68	45	N.D.	ND
6	M	58	YES	-	-
7	F	58	NO	+	+
8	M	71	>100	+	-
9	M	60	-	+	+
10	M	62	>100	+	+
11	M	66	40	+	-
12	M	75	55	+	+
13	M	70	100	+	-
14	M	59	80	+	+
15	M	51	45	+	+
16	M	63	NO	+	+
17	M	57	80	-	+
18	M	68	NO	+	+
19	M	70	80	+	+
20	M	56	-	ND	ND
21	M	45	25	+	+
22	M	65	50	+	+
23	M	67	-	-	+
24	F	63	-	-	-
25	F	60	40	-	-
26	M	54	-	+	+
27	M	54	>100	+	-
28	M	67	-	-	+
29	M	60	120	+	+
30	M	69	120	+	+
31	M	64	40	+	+
32	M	69	35	+	+
33	M	-	-	ND	ND
34	M	73	60	+	ND

M= male

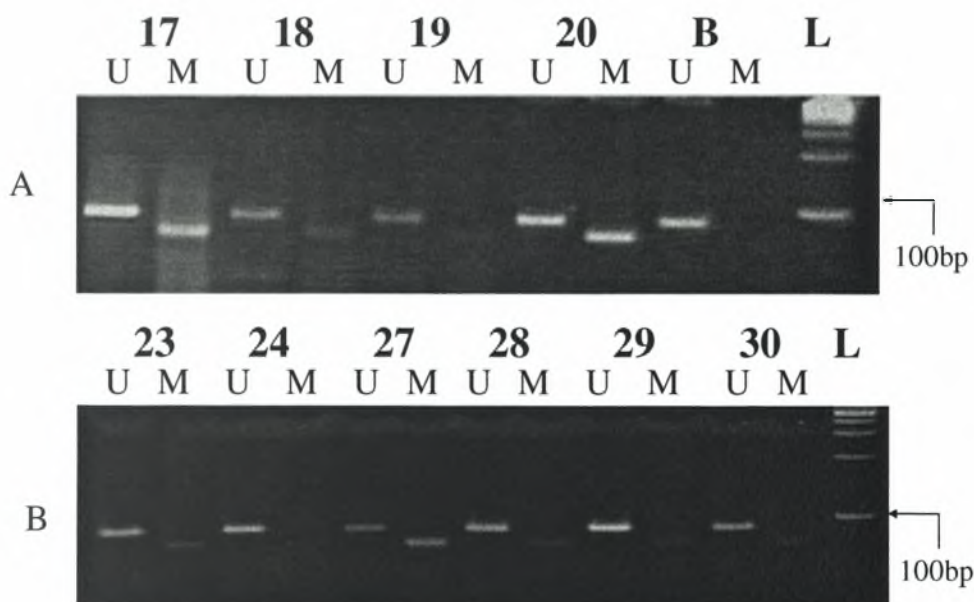
F= female

ND= not determined (δεν έχει προσδιοριστεί)

Μελέτη μεθυλίωσης του υποκινητή του *MGMT* σε πτύελα από βαρείς καπνιστές

Για την αξιολόγηση της σπουδαιότητας ανίχνευσης της ανώμαλης μεθυλίωσης του γονιδίου *MGMT* ως μοριακού δείκτη για την πρόιμη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα, μελετήθηκαν δείγματα πτυέλων που απομονώθηκαν από 40 βαρείς καπνιστές, ελεύθεροι νόσου, που επισκέφτηκαν για θεραπεία το ιατρείο διακοπής του καπνίσματος του Θεαγενείου Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης, χρησιμοποιώντας την τεχνική της φωλιασμένης MSP, σε δύο στάδια. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης φαίνονται στον Πίνακα 6. Ανώμαλη μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *MGMT* ανιχνεύτηκε σε 8/36 (22.2%) πτύελα των ατόμων υψηλού κινδύνου.

Σε όλες τις περιπτώσεις, γονιδιωματικό DNA που απομονώθηκε από λευκοκύτταρα υγιών ατόμων, βρέθηκε αρνητικό για μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου του *MGMT*, ενώ ανιχνεύονται προϊόντα PCR μόνο με τους εκκινητές που αναγνωρίζουν τη μη μεθυλιωμένη αλληλουχία (Εικ.14Α).



Εικόνα 14: Ανώμαλη μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου *MGMT* σε πτύελα από βαρείς καπνιστές

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης τροποποιημένου DNA, που απομονώθηκε από πτύελα καπνιστών, που έχει μεγεθυνθεί με εκκινητές που αναγνωρίζουν τη μη μεθυλιωμένη (U) ή τη μεθυλιωμένη (M) αλληλουχία του προαγωγέα των γονιδίων *p16* (A) και *MGMT* (B)

B, DNA από λευκοκύτταρα L, 100 bp δείκτης μοριακού βάρους

**Πίνακας 6. Ανώμαλη υπερμεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου
MGMT σε πύελα από βαρείς καπνιστές**

	Φύλο	Ηλικία	Κατανάλωση καπνού (pack years)	MGMT μεθυλίωση
1	F	46	40	+
2	F	45	35	-
3	F	37	30	-
4	F	59	20	-
5	M	55	70	N.D.
6	F	50	50	-
7	F	33	35	-
8	M	43	65	-
9	M	43	25	-
10	M	65	80	-
11	F	51	70	-
12	M	26	15	-
13	F	32	20	+
14	M	45	30	-
15	M	47	25	N.D.
16	M	37	30	N.D.
17	F	42	30	+
18	M	50	35	+
19	F	33	20	-
20	F	58	40	+
21	F	38	35	+
22	F	57	50	-
23	F	42	25	-
24	M	57	40	-
25	F	48	50	-
26	F	56	60	-
27	M	35	25	+
28	F	32	15	-
29	M	45	50	-
30	F	56	50	-
31	F	50	45	+
32	F	54	50	-
33	F	47	25	-
34	F	49	45	-
35	F	60	60	-
36	M	58	65	-
37	F	32	10	-
38	F	43	25	-
39	F	55	40	N.D.
40	M	58	40	-

M= male

F= female

ND= not determined (δεν έχει προσδιοριστεί)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την πιο σημαντική αιτία θανάτου από καρκίνο σε παγκόσμια κλίμακα (Jemal *et al*, 2004). Πολυάριθμες επιδημιολογικές μελέτες έχουν διεξαχθεί κατά καιρούς, έτσι ώστε να προσδιοριστούν οι πιθανοί αιτιολογικοί παράγοντες που οδηγούν στην εμφάνιση της νόσου αυτής. Διάφοροι εξωγενείς παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα, μεταξύ των οποίων εξέχουσα θέση κατέχει το κάπνισμα. Γενετικές ανωμαλίες σε επίπεδο DNA, καθώς και φαινόμενα επιγενετικής τροποποίησης όπως αυτό της μεθυλίωσης των κυτοσινών, έχουν επίσης συσχετιστεί με την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα. Αυτές οι γενετικές ανωμαλίες έχουν κυρίως ως στόχο κάποια ογκοκατασταλτικά γονίδια, καθώς και κάποια γονίδια που σχετίζονται με τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA (Herman *et al.*, 2003).

Ένα από τα γονίδια που απενεργοποιείται, μέσω της υπερμεθυλίωσης, είναι το *MGMT*, καθώς φέρεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου (Esteller *et al.*, 1999). Το γονίδιο *MGMT* κωδικοποιεί το ένζυμο MGMT, ένα επιδιορθωτικό ένζυμο, που αφαιρεί αλκυλομάδες από το DNA. Έτσι η υπερμεθυλίωση του γονιδίου *MGMT*, οδηγεί στην απουσία του ενζύμου, με συνέπεια τη μη επιδιόρθωση του DNA και την εμφάνιση μεταλλάξεων, που σχετίζεται άμεσα με την εμφάνιση του καρκίνου. Η ανώμαλη μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *MGMT* αποτελεί ένα πολύ συχνό γεγονός στον καρκίνο του πνεύμονα (Herman *et al.*, 2004).

Αντικείμενο μελέτης της παρούσας πειραματικής εργασίας ήταν η ανίχνευση της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του *MGMT* σε γονιδιωματικό DNA που έχει απομονωθεί από ιστικά δείγματα καρκινικού πνεύμονα, καθώς και σε παρακείμενο μακροσκοπικά υγιή ιστό. Επίσης μελετήθηκε η ενδεχόμενη παρουσία μεθυλίωσης σε πτύελα από βαρείς καπνιστές (ελευθέροι νόσου).

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι υπάρχει ανώμαλη υπερμεθυλίωση στον υποκινητή του *MGMT* σε ποσοστό 79,3% σε δείγματα καρκινικού ιστού. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι αυτές οι επιγενετικές αλλαγές υπάρχουν σε αρκετά

σημαντικό ποσοστό στον καρκίνο του πνεύμονα. Σε άλλες μελέτες ανίχνευσης υπερμεθυλίωσης που έχουν γίνει με την μέθοδο της MSP, από διάφορες ερευνητικές ομάδες, τα ποσοστά μεθυλίωσης του *MGMT* βρέθηκαν να κυμαίνονται από 21-60% (Πίνακας 4). Τα υψηλά ποσοστά ανίχνευσης της υπερμεθυλίωσης στη δική μας μελέτη, πιθανόν να αντανακλούν στη ευαισθησία της μεθόδου και στον σχεδιασμό της. Σε άλλες μελέτες (Esteller *et al.*, 1999) πραγματοποίησαν απλή (one step) MSP και σε διαφορετικές συνθήκες PCR. Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας διαφοροποίησης, μπορεί να είναι και η προέλευση των δειγμάτων. Τα δείγματα της ερευνάς μας προέρχονται από τον ελληνικό πληθυσμό, σε αντίθεση με τις άλλες έρευνες. Το περιβάλλον, καθώς και οι συνήθειες των ατόμων, μπορούν να επηρεάσουν τα ποσοστά υπερμεθυλίωσης. Είναι γεγονός, πως οι Έλληνες καπνίζουν πολύ περισσότερο από πολλούς λαούς, κάτι που θα μπορούσε ίσως να δικαιολογήσει αυξημένα ποσοστά μεθυλίωσης.

Πολύ σημαντική είναι όμως και η ανίχνευση μεθυλίωσης στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό σε αρκετά υψηλό ποσοστό (75%). Η ανίχνευση επιγενετικών αλλοιώσεων και στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό μπορεί να υποδεικνύει την ύπαρξη προκαρκινικών αλλοιώσεων. Είναι γεγονός, ότι σε ασθενείς που αφαιρέθηκε χειρουργικά ο καρκίνος του πνεύμονα, παρουσιάζεται πολύ συχνά επανεμφάνιση της νόσου. Αυτό μπορεί να συσχετίζεται με την παρουσία υπερμεθυλίωσης στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό.

Η ανάλυση υπερμεθυλίωσης στα ίδια δείγματα, στον υποκινητή του γονιδίου *p16* (ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου) έδειξε υψηλά ποσοστά υπερμεθυλίωσης του DNA (81,8%) (Georgiou *et al.*, 2006)

Από τα παραπάνω είναι σαφές ότι η ανώμαλη υπερμεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων *MGMT* και *p16* αποτελεί μια πολύ σημαντική επιγενετική τροποποίηση στην παθογένεση του καρκίνου του πνεύμονα και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την πρόωμη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα σε κατάλληλο μη επεμβατικό υλικό (βρογχικά εκπλύματα ή πτύελα). Όταν ο καρκίνος του πνεύμονα ανιχνεύεται σε αρχικό στάδιο, τότε με μία χειρουργική επέμβαση, για ένα ποσοστό 70%, μπορεί να επιτευχθεί παράταση ζωής για πέντε χρόνια. Στις περισσότερες περιπτώσεις όμως, είναι αδύνατη η πρόωμη διάγνωση της ασθένειας, με αποτέλεσμα να μην είναι θεραπεύσιμη. Η ανάπτυξη επιγενετικών δεικτών για την πρόωμη διάγνωση του

καρκίνου του πνεύμονα είναι ένας ταχύτατα αναπτυσσόμενος τομέας με μεγάλη σπουδαιότητα για τη βιολογία του καρκίνου του πνεύμονα.

Στα πλαίσια αυτά, έγινε και ο έλεγχος ανώμαλης υπερμεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου *MGMT*, σε πτύελα από βαρείς καπνιστές. Αναλύθηκαν πτύελα από υγιή άτομα που προσήλθαν για παρακολούθηση στο ιατρείο διακοπής καπνίσματος του Θεαγένειου Νοσοκομείου. Αυτός ο πληθυσμός των ατόμων με αυξημένο κίνδυνο, δίνει τη δυνατότητα μελέτης της συχνότητας της ανώμαλης μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου *MGMT*, σε καπνιστές με διαφορετικές συνήθειες καπνίσματος. Η ανάλυση έγινε πάλι με την MSP, βάσει του ίδιου σχεδιασμού, σε DNA που είχε απομονωθεί από τα πτύελα των καπνιστών.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν την ύπαρξη ενός σημαντικού ποσοστού δειγμάτων που παρουσιάζουν ανώμαλη υπερμεθυλίωση (22,2%). Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, έδειξε ότι δεν υπάρχει πιθανή συσχέτιση με παράγοντες όπως τα pack years, η ηλικία και το φύλο των ασθενών. Παρόλα αυτά, τα περισσότερα δείγματα που είχαν αυξημένη υπερμεθυλίωση, προέρχονταν από άτομα σχετικά μικρής ηλικίας (25-40), τα οποία κατά μέσο όρο καπνίζουν ένα πακέτο την μέρα.

Δυστυχώς, ο σχετικά μικρός αριθμός των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την μελέτη, δεν επιτρέπει την εξαγωγή στατιστικά σημαντικών συμπερασμάτων. Παρόλα αυτά, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τα αποτελέσματα άλλων ερευνητικών μελετών, που αφορούν στην ανίχνευση υπερμεθυλίωσης του γονιδίου *MGMT* σε πτύελα καπνιστών, είναι παρόμοια (Palmisano *et al.*, 2000).

Εντύπωση προκαλούν τα αποτελέσματα, αν συγκριθούν με τις αναλύσεις που έγιναν στα ίδια δείγματα για το γονίδιο *p16* (Georgiou *et al.*, 2006). Αν και η συχνότητα της υπερμεθυλίωσης στους υποκινητές των γονιδίων *MGMT* και *p16* είναι παρόμοιες με αυτές που αναφέρονται σε άλλες εργασίες, η παρουσία πτυέλων με μεθυλίωση μόνο σε ένα από τα δύο γονίδια είναι ένα αρκετά ενδιαφέρον γεγονός. Κάτι τέτοιο μπορεί να υποδεικνύει, ότι η μεθυλίωση εμφανίζεται κάτω από διαφορετικές συνθήκες στα δύο γονίδια.

Η παρακολούθηση των ατόμων (καπνιστών), σε βάθος χρόνου, που παρουσιάζουν ανώμαλη υπερμεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων *MGMT* και *p16*, μπορεί να είναι ενδεικτική για την χρησιμοποίησή τους ως επιγενετικούς μοριακούς δείκτες στην “μάχη” της έγκαιρης διάγνωσης του καρκίνου του πνεύμονα.

Η ανίχνευση της μεθυλίωσης σε καρκινικό ιστό, αλλά και σε πτύελα καπνιστών, παρουσιάζει τεράστιο ενδιαφέρον αφού μπορεί να οδηγήσει σε πολλές πιθανές κλινικές εφαρμογές. Η ύπαρξη ανώμαλης υπερμεθυλίωσης σε αρχικά στάδια καρκίνου του πνεύμονα, μπορεί να επηρεάσει τις στρατηγικές θεραπείας του ασθενούς. Κατά δεύτερο λόγο, η ανίχνευση μεθυλίωσης σε πτύελα μπορεί να καταδείξει άτομα “υψηλού κινδύνου” για την ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bunn P.A. Molecular biology and early diagnosis in lung cancer. *Lung Cancer* 2002; **38**:S5-S8.
2. Costello J.F., Futscher B.W., Tano K., Graunke D.M., Pieper, R.O. Graded methylation in the promoter and in the body of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene correlates with MGMT expression in human glioma cells. *Cancer Res.* 1996; **56**: 13916–13924.
3. Coulondre C., Miller J.H. Genetic studies of the lac repressor IV. Mutagenic specificity in the *lacI* gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 1977;**117**: 577–606.
4. Dumenco L.L., Allay E., Norton K., Gerson S.L. The prevention of thymic lymphomas in transgenic mice by human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Science*, 1993; **259**:219–222.
5. Eads C.A., Laird P.W. Combined bisulfite restriction analysis (COBRA). *Methods Mol Biol.* 2002; **200**:71-85.
6. Erickson L.C., Laurent G., Sharkey N.A., Kohn K.W. DNA cross-linking and monoadduct repair in nitrosourea-treated human tumour cells. *Nature (Lond.)*,1980; **288**:727–729
7. Esteller M., Hamilton S.R, Burger P.C., Baylin S.B., Herman J.G. Inactivation of the DNA Repair Gene *O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase* by Promoter Hypermethylation is a Common Event in Primary Human Neoplasia. *Cancer Research* 1999; **59**:793-797
8. Esteller M., Herman J.G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol.* 2002;**196**:1-7.
9. Esteller M., Herman J.G. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene* 2004; **23**:1-8.
10. Georgiou E., Valeri ., Tzimagiorgis G., Antzel J., Krikelis D., Tsilikas C., Sarikos G., Destouni C., Kouidou S. Aberrant p16 promoter methylation

- among Greek lung cancer patients and smokers. Correlation with smoking. *Eur. J. of Cancer Prevent.* 2006 (submitted)
11. Gerson S.L., Trey J.E., Miller K., Berger N.A. Comparison of O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat and mouse tissues. *Carcinogenesis* (Lond.), 1986; **7**: 745–749.
 12. Harris L.C., Potter P.M., Tano K., Shiota S., Mitra S., Brent T. P. Characterization of the promoter region of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Nucleic Acids Res.* 1991; **19**: 6163–6167.
 13. Hecht S. Stephen. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**:1194–1210.
 14. Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D., and Baylin, S. B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; **93**: 9821–9826.
 15. Herman J.G., Baylin S.B.. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; **349**:2042-54.
 16. Herman JG. Epigenetics in Lung Cancer: Focus on Progression and Early Lesions. *Chest* 2004; **125**:119-122.
 17. Horsfall M.J., Gordon A.J., Burns P.A., Zielenska M., van der Vliet G.M., Glickman B.W. Mutational specificity of alkylating agents and the influence of DNA repair. *Mol. Mutagen.*, 1990; **15**:107–122.
 18. Jemal A., Tiwari RC., Murray T., Ghafoor A., Samuels A., Ward E., Feuer EJ. and Thun MJ. Cancer Statistics 2004. *CA Cancer J Clin* 2004; **54**:8-29.
 19. Laird W. Peter. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Rev. Cancer* 2003; **3**: 253-266.
 20. Liu L., Qin X., Gerson S.L. Reduced lung tumorigenesis in human methylguanine DNA--methyltransferase transgenic mice achieved by expression of transgene within the target cell. *Carcinogenesis*, 1999; **20**: 279–284.
 21. Mitsuuchi Y., Testa JR. Cytogenetics and molecular genetics of lung cancer. *Am. J. Med. Genetics* 2002; **115**:183-188.
 22. Natarajan A.T., Vermeulen S., Darroudi F., Valentine M.B., Brent T.P., Mitra S., Tano K. Chromosomal localization of human O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene by in situ hybridization. *Mutagenesis* 1992; **7**: 83-85.

23. Palmisano W.A., Divine K.K., Saccomanno G, Gilliland F.D., Baylin S.B., Herman J.G., Belinsky S.A. Predicting Lung Cancer by Detecting Aberrant Promoter Methylation in Sputum. *Cancer Res.*, 2000; **60**: 5954–5958.
24. Pegg, A.E. Mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res.* 1990; **50**: 6119–6129.
25. Pegg A.E., Dolan M.E., Moschel R.C. Structure function and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, 1995; **51**:167–223.
26. Peto R, Lopez AD, Boreham J, Thun M, Heath C, Doll R. Mortality from smoking worldwide. *Br Med Bull* 1996; **52**:12- 21.
27. Rydberg B., Spurr N., Karran P. cDNA cloning and chromosomal assignment of the human O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase: cDNA expression in Escherichia coli and gene expression in human cells. *J. Biol. Chem.* 1990; **265**: 9563-9569.
28. Schiller JH., Harrington D., Belani CP. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small cell lung cancer. *N. Engl. J. Med* 2002; **346**: 92-98.
29. Sekido Y., Fong KM., Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; **1378**:21-59.
30. Sekido Y, Fong KM, Minna JD.. Molecular biology of lung cancer. In: De Vita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Cancer: principles and practice of oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001; p917–925.
31. Szyf Moshe. The DNA methylation machinery as a target for anticancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 1996; **70**:1-37.
32. Tano K., Shiota S., Collier J., Foote R. S., Mitra S. Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O(6)-alkylguanine. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1990; **87**: 686-690.
33. Tsou J.A., Hagen J.A., Carpenter C.L., Laird-Offringa I.A. DNA methylation analysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis. *Oncogene* 2002; **21**: 5450 – 5461.

34. Turek-Plewa J., Jagodzinski P.P. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell.Mol.Biol.Lett.* 2005; **10**: 631-647.
35. Worm Jesper, Guldborg Per. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *J Oral Pathol Med* 2002; **31**: 443-9
36. Zochbauer-Muller S, Minna J.D., Gazdar A.F. Aberrant DNA Methylation in Lung Cancer: Biological and Clinical Implications. *The Oncologist* 2002;7:451-457.