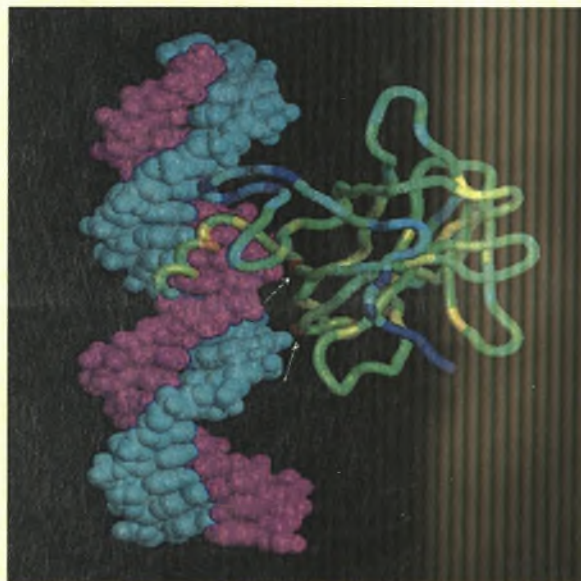


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

658
14-9-09

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ p53
ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ**

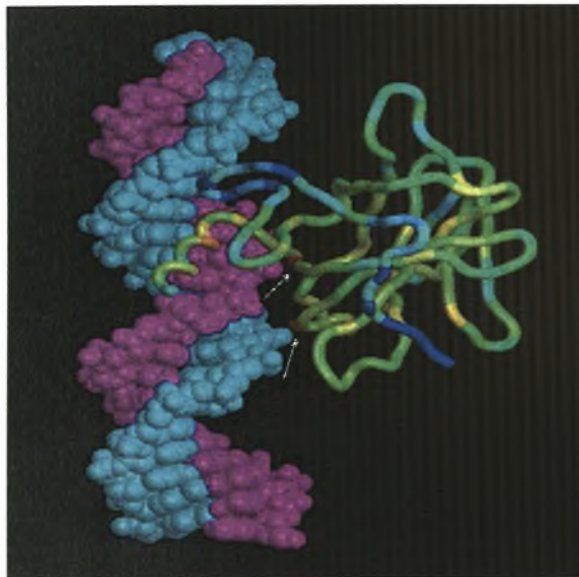


**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΜΠΑΣΓΙΟΥΡΑΚΗ ΑΡΤΕΜΙΣ**

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2009

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

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ p53
ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ**



**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΜΠΑΣΓΙΟΥΡΑΚΗ ΑΡΤΕΜΙΣ**

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2009



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

Αριθ. Εισ.: 7654/1

Ημερ. Εισ.: 09-11-2009

Δωρεά: Π.Θ.

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2009

ΜΠΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087170

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

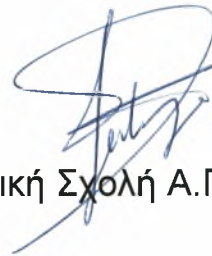
**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ p53
ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΜΠΑΣΓΙΟΥΡΑΚΗ ΑΡΤΕΜΙΣ**

Επιβλέπων Καθηγητής

Χαΐτογλου Κωνσταντίνος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Ιατρική Σχολή Α.Π.Θ



Μέλη Τριμελούς Επιτροπής

Χαΐτογλου Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Ιατρική Σχολή
Α.Π.Θ.

Μαρκουλάτος Παναγιώτης, Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας, Τμήμα
Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας,
Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. κατά το ακαδημαϊκό έτος 2008-2009. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κωνσταντίνο Χαϊτογλου, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ., για την επιστημονική κατάρτιση, την καθοδήγηση και το ενδιαφέρον του, που συνέβαλαν καθοριστικά στην άψογη συνεργασία μας. Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη του εργαστηρίου, συγκεκριμένα τον κ. Γεώργιο Τζημαγιώργη, Επίκουρο Καθηγητή Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. καθώς και την κα. Κωνσταντίνα Τοπουλίδου, υποψήφια Διδάκτορα, την κα. Κατερίνα Φράγγου, υποψήφια διδάκτορα και τον κ. Χρήστο Κουκοράβα, προπτυχιακό φοιτητή για τις συμβουλές τους αλλά και για το ευχάριστο κλίμα στο χώρο του εργαστηρίου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο, Καθηγητή Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς και τον κ. Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ευκαιρία που μου δώσαν να εμπλακώ στο χώρο της έρευνας καθώς και για τις χρήσιμες συμβουλές τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2009

Άρτεμις Μπασγιουράκη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
<u>A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	7
A.1 Κυτταρικός κύκλος	7
A.1.1 Η κυτταρική διαίρεση και ο κυτταρικός κύκλος	7
A.2 Καρκίνος	8
A.2.1 Επιδημιολογία του καρκίνου	8
A.2.2 Βιολογία του καρκίνου	9
A.2.3 Αρχή της καρκινογένεσης	10
A.2.4 Ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια στην καρκινογένεση	10
A.3 Καρκίνος του πνεύμονα	13
A.3.1 Επιδημιολογία του καρκίνου του πνεύμονα	13
A.3.2 Ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του πνεύμονα	13
A.3.3 Παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου στον πνεύμονα	14
A.4 Η πρωτεΐνη p53	16
A.4.1 Πρωτεΐνη p53 η ιστορία της ανακάλυψης	16
A.4.2 Δομή της πρωτεΐνης p53	17
A.4.3 Ισομορφές της p53 και ο ρόλος τους	18
A.4.4 Λειτουργίες της πρωτεΐνης p53	20
A.4.5 Απενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53	22
A.4.6 Απόκριση της πρωτεΐνης p53 σε περιβαλλοντικά σήματα	24
A.4.7 Καρκίνος και πρωτεΐνη p53	25
A.4.8 Το γονίδιο p53 και καρκίνος	25
<u>B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	27
B.1 Υλικά	27
B.1.1 Βιολογικό υλικό	27
B.1.2 Αντιδραστήρια Μοριακής Βιολογίας	27
B.1.3 Αντισώματα	28
B.1.4 Αντιδραστήρια-Διαλύματα	28

B.1.5	Υλικά	31
B.1.6	Εργαστηριακός εξοπλισμός	32
B.2	Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας	32
B.2.1	Απομόνωση πρωτεϊνών από ιστό	32
B.2.2	Προσδιορισμός ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης BCA	34
B.2.3	Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE	36
B.2.4	Χρώση πηκτικής ακρυλαμιδίου με Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250	37
B.2.5	Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης- Ανοσοαποτύπωμα Western (Western blotting)	37
Γ.	<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	39
Γ.1	Απομόνωση πρωτεϊνών από ιστό (μεθοδος 1)	39
Γ.1.1	Απομόνωση πρωτεϊνών από ιστό με τη χρήση του αντιδραστηρίου Trizol.	39
Γ.1.2	Προσδιορισμός ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης-Μέθοδος BCA	39
Γ.1.3	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-PAGE	40
Γ.1.4	Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης - Ανοσοαποτύπωμα Western (Western blotting)	40
Γ.2	Απομόνωση πρωτεϊνών από ιστό (μεθοδος 2)	41
Γ.2.1	Απομόνωση πρωτεϊνών με τη χρήση «διαλύματος εκχύλισης πρωτεϊνών» και υγρού αζώτου	41
Γ.2.2	Προσδιορισμός ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης-Μέθοδος BCA	41
Γ.2.3	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-PAGE	42
Γ.2.4	Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης - Ανοσοαποτύπωμα Western (Western blotting)	43
Δ.	<u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	45
Ε.	<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	48

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αρκετά χρόνια τώρα ο καρκίνος αποτελεί μία από τις πρώτες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Στις περισσότερες χώρες του κόσμου, όπως και στην Ελλάδα, ο καρκίνος είναι η δεύτερη αιτία θανάτου μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Συγκεκριμένα, ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την πιο συχνά εμφανιζόμενη θανατηφόρα κακοήθεια παγκοσμίως. Μελέτες έχουν συσχετίσει την απώλεια της δραστηριότητας της φυσιολογικής πρωτεΐνης p53, είτε λόγω απενεργοποίησης του γονιδίου p53, είτε λόγω της δημιουργίας συμπλοκών της φυσιολογικής πρωτεΐνης p53 με μεταλλαγμένη πρωτεΐνη p53, με την εμφάνιση καρκίνου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο καρκίνος του πνεύμονα όπου, μεταλλάξεις στο γονίδιο p53 βρέθηκαν σε ποσοστό 33% στα αδενοκαρκινώματα και 77% στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι κυρίως μεταβάσεις τύπου GC>AT και σχετίζονται με το κάπνισμα. Ο ρόλος της φυσιολογικής ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 είναι η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η επαγωγή της απόπτωσης και η σταθεροποίηση του γονιδιώματος.

Σκοπός της παρούσης διπλωματικής εργασίας ήταν η επιτυχής απομόνωση πρωτεϊνών από καρκινικό και παρακείμενο μη-καρκινικό ιστό πνεύμονα, καθώς και η μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 στα δείγματα αυτά. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκαν δύο μέθοδοι απομόνωσης των πρωτεϊνών.

Τα αποτελέσματα από τη μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 έδειξαν πιθανή έκφραση των ισομορφών Δ133p53β και Δ133p53γ καθώς και μεγαλύτερη έκφραση στον καρκινικό ιστό από το μη-καρκινικό.

A.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

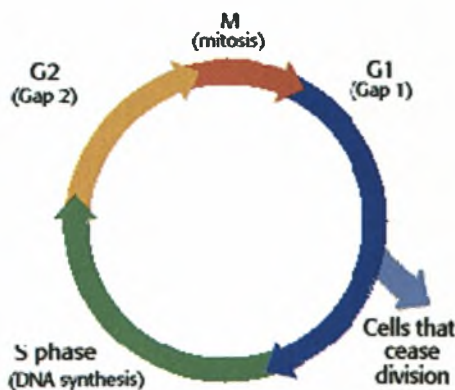
❖ A.1.1 Η κυτταρική διαίρεση και ο κυτταρικός κύκλος

Ένα κύτταρο αναπαράγεται μέσω μίας ακολουθίας γεγονότων κατά την οποία διπλασιάζει το περιεχόμενό του και εν συνεχεία διαιρείται στα δύο. Αυτός ο κύκλος διπλασιασμού και διαίρεσης, γνωστός ως κυτταρικός κύκλος, είναι ο βασικός μηχανισμός με τον οποίο παράγονται όλοι οι οργανισμοί (εικόνα A.1.1).

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, ο κυτταρικός κύκλος μπορεί να διακριθεί σε δύο στάδια τη μίτωση ή αλλιώς φάση M και τη μεσόφαση. Η μίτωση περιλαμβάνει τη διαίρεση του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος και έχει ως αποτέλεσμα τη διαίρεση του κυττάρου σε δύο θυγατρικά κύτταρα.⁽¹⁾

Η μεσόφαση (interphase) κατά τη διάρκεια της οποίας το κύτταρο μεταγράφει τα γονίδιά του και συνθέτει πρωτεΐνες, παρεμβάλλεται ανάμεσα σε δύο φάσεις M. Η μεσόφαση μπορεί να διαιρεθεί σε τρεις φάσεις. Συγκεκριμένα, ξεκινάει με τη φάση G₁ (Gap 1), η οποία παρεμβάλλεται ανάμεσα στο τέλος της διαίρεσης και στην αρχή της φάσης S. Στη φάση G₁ το κύτταρο καλείται να αποφασίσει αν θα προχωρήσει στη διαίρεση, μέσω της φάσης S και της φάσης G₂, ή αν θα παραμείνει στη μεσόφαση. Ακολουθεί η φάση S (synthesis), κατά τη διάρκεια της οποίας το κύτταρο αντιγράφει το DNA του πυρήνα. Τέλος, η φάση G₂ (Gap 2) αποτελεί το μεσοδιάστημα ανάμεσα στη φάση S και τη φάση M. Σε περίπτωση που το κύτταρο δεν περάσει στο υπόλοιπο του κύκλου βγαίνει εκτός στη φάση «ηρεμίας» ή αλλιώς φάση G₀.⁽¹⁾

Εικόνα A.1.1. Ο κυτταρικός κύκλος



Η φυσιολογική λειτουργία του κυτταρικού κύκλου εξαρτάται από ρυθμιστικά σύμπλοκα 2 πρωτεϊνών μίας κυκλίνης και μίας κινάσης. Η κυκλίνη δεσμεύεται στην

κινάση και την ενεργοποιεί. Η κινάση με τη σειρά της, φωσφορυλιώνει διάφορες πρωτεΐνες απαραίτητες για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, οι φωσφορικές ομάδες που προστίθενται, αλλάζουν τη δομή των πρωτεϊνών και οι πρωτεΐνες ενεργοποιούνται ή απενεργοποιούνται ανάλογα με τη λειτουργία τους. Σύμπλοκα κυκλίνης/κινάσης υπάρχουν στα σημεία εισόδου στις φάσεις G₁, S και M του κυτταρικού κύκλου.⁽²⁾

Επιπλέον, η σωστή λειτουργία του κυτταρικού κύκλου εξαρτάται και από την πρωτεΐνη p53, η οποία παράγεται όταν το DNA έχει υποστεί βλάβη. Πιο αναλυτικά, η πρωτεΐνη p53 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που συνδέεται με το DNA, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή της πρωτεΐνης p21. Η πρωτεΐνη p21 εμποδίζει τη λειτουργία ενός συμπλόκου κυκλίνης/κινάσης, απαραίτητου για την εξέλιξη της φάσης G₁. Επομένως, το κύτταρο έχει τον απαιτούμενο χρόνο για να επιδιορθώσει το DNA του πριν διαιρεθεί. Στην περίπτωση που οι βλάβες στο DNA είναι τόσο εκτεταμένες ώστε να μην μπορούν να επιδιορθωθούν, η πρωτεΐνη p53 οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση (κυτταρικός θάνατος).⁽²⁾

A.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ

❖ A.2.1 Επιδημιολογία του καρκίνου

Αρκετά χρόνια τώρα ο καρκίνος αποτελεί μία από τις πρώτες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Στις περισσότερες χώρες του κόσμου, όπως και στην Ελλάδα, ο καρκίνος είναι η δεύτερη αιτία θανάτου μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Σύμφωνα με την Αμερικανική Εταιρία Καρκίνου μόνο το 2007 πέθαιναν από καρκίνο σε όλο τον κόσμο περίπου 7,6 εκατομμύρια άνθρωποι. Κατά το ίδιο έτος διαγνώστηκαν 12,3 εκατομμύρια νέα κρούσματα. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ο αριθμός των θανάτων από καρκίνο αναμένεται να ξεπεράσει τα 10 εκατομμύρια το 2020 και τα νέα κρούσματα να αυξηθούν στα 16 εκατομμύρια.

Οι πιο γνωστές αιτίες θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως είναι:

- i. Ο καρκίνος του πνεύμονα με 1,3 εκατομμύρια θανάτους το χρόνο.
- ii. Ο καρκίνος του στομάχου με σχεδόν 1 εκατομμύρια θανάτους το χρόνο.
- iii. Ο καρκίνος του ήπατος με 662.000 θανάτους το χρόνο.
- iv. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου με 665.000 θανάτους το χρόνο.
- v. Ο καρκίνος του μαστού με 502.000 θανάτους το χρόνο.

Για τους άνδρες οι πιο συχνές αιτίες θανάτου με βάση τον αριθμό των θανάτων παγκοσμίως είναι:

- i. Καρκίνος του πνεύμονα
- ii. Καρκίνος του στομάχου
- iii. Καρκίνος του ήπατος
- iv. Καρκίνος του παχέος εντέρου
- v. Καρκίνος του οισοφάγου
- vi. Καρκίνος του προστάτη

Για τις γυναίκες οι πιο συχνές αιτίες θανάτου με βάση τον αριθμό των θανάτων παγκοσμίως είναι:

- i. Καρκίνος του μαστού
- ii. Καρκίνος του πνεύμονα
- iii. Καρκίνος του στομάχου
- iv. Καρκίνος του παχέος εντέρου
- v. Καρκίνος της μήτρας

❖ A.2.2 Βιολογία του καρκίνου

Ο καρκίνος είναι αποτέλεσμα μίας ακολουθίας μοριακών γεγονότων, που μεταβάλλουν ριζικά τις φυσιολογικές λειτουργίες των κυττάρων. Συγκεκριμένα, κλωνικός πολλαπλασιασμός ενός πρόδρομου καρκινικού κυττάρου έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός όγκου νεοπλασματικών κυττάρων. Στα καρκινικά κύτταρα τα συστήματα ελέγχου που εμποδίζουν την υπερβολική αύξηση των κυττάρων και συνεπώς, εξασφαλίζουν τη σωστή λειτουργία του κυτταρικού κύκλου, υπολειτουργούν. Τα μεταλλαγμένα αυτά κύτταρα έχουν την ικανότητα να αυξάνονται και να διαιρούνται παρουσία σημάτων, τα οποία κανονικά εμποδίζουν την κυτταρική αύξηση. Καθώς τα καρκινικά κύτταρα αυξάνονται, αναπτύσσουν νέα χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένων των⁽³⁾ :

- i. ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση
- ii. αποφυγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση)
- iii. μειωμένη ανάγκη σε αυξητικούς παράγοντες
- iv. παραγωγή νέων ενζύμων
- v. μειωμένη πρόσφυση των κυττάρων
- vi. ικανότητα αγγειογένεσης
- vii. ικανότητα μετάστασης και διήθησης σε παρακείμενους ιστούς

❖ A.2.3 Αρχή της καρκινογένεσης

Η καρκινογένεση είναι μία πολυσταδιακή διαδικασία, η οποία διαρκεί δύο, τρεις ή και περισσότερες δεκαετίες.⁽³⁾ Η διαδικασία της καρκινογένεσης μπορεί να διακριθεί σε δύο κύρια στάδια:

- Έναρξη (initiation): Το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται από το μετασχηματισμό ενός φυσιολογικού κυττάρου σε νεοπλασματικό κύτταρο μέσα από μία σειρά γενετικών βλαβών. Οι γενετικές βλάβες αναφέρονται σε μία σειρά αλλοιώσεων του DNA όπως μεταθέσεις, απώλειες και αντικαταστάσεις κάποιων νουκλεοτιδίων ή και ολόκληρων τμημάτων του DNA, οι οποίες δεν είναι αναγνωρίσιμες από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς.⁽⁵⁾
- Προαγωγή (promotion): Κατά την προαγωγή της καρκινογένεσης συμμετέχουν επιπλέον γενετικοί και επιγενετικοί παράγοντες.⁽³⁾ Επομένως, αυξάνεται ο πολλαπλασιασμός των νεοπλασματικών κυττάρων, μειώνεται η απόπτωσή τους, με αποτέλεσμα τη δημιουργία κλώνων νεοπλασματικών κυττάρων που οδηγούν τελικά στο σχηματισμό όγκων.⁽⁵⁾

❖ A.2.4 Ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια στην καρκινογένεση

Οι ανωμαλίες στα καρκινικά κύτταρα είναι συνήθως αποτέλεσμα μεταλλάξεων σε γονίδια που συνθέτουν πρωτεΐνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη μεταγραφή γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο. Τα γονίδια που αποτελούν στόχο των γενετικών μεταλλάξεων και σχετίζονται με την καρκινογένεση διακρίνονται σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Τα **ογκογονίδια** πρωτοανακαλύφθηκαν σε ιούς και ήταν υπεύθυνα για την πρόκληση μετασχηματισμού στα κύτταρα ξενιστές. Αργότερα αποκαλύφθηκε ότι και στα κύτταρα των ευκαρυωτικών οργανισμών υπάρχουν γονίδια ομόλογα των ιικών ογκογονιδίων που ενέχονται σε φυσιολογικές λειτουργίες. Κατ' επέκταση, τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν έναν αριθμό από φυσιολογικά γονίδια τα οποία, κάτω από ορισμένες συνθήκες μπορούν να αλλοιωθούν και να μετατραπούν σε ογκογονίδια. Για τις αλλοιωμένες μορφές αυτών των γονιδίων επικράτησε ο όρος «κυτταρικό ογκογονίδιο» ή «c-onc» στα ευκαρυωτικά κύτταρα και «v-onc» στους ιούς, ενώ για το ίδιο γονίδιο στη φυσιολογική του μορφή ο όρος «πρωτο-ογκογονίδιο». Έχουν αναγνωριστεί περίπου 100 ογκογονίδια, τα οποία υποδιαιρούνται σε αρκετές ομάδες ανάλογα με τη δράση τους. Τα προϊόντα των

ογκογονιδίων καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνών περιέχοντας διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μέχρι και μεταγραφικούς παράγοντες και συμμετέχουν έτσι σε μηχανισμούς που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. ^(3,4)

Κατά τη μετατροπή ενός πρωτο-ογκογονιδίου σε ογκογονίδιο παρατηρούνται αλλαγές στη δομή /λειτουργικότητα του πρωτεϊνικού προϊόντος του ογκογονιδίου καθώς και στην έκφραση του ογκογονιδίου. Οι κυριότεροι μηχανισμοί που σχετίζονται με τη μετατροπή αυτή διακρίνονται στις εξής κατηγορίες: ⁽³⁾

1. **Μεταλλάξεις:** Κυρίως γίνεται αναφορά σε σημειακές μεταλλάξεις στην περιοχή του πρωτο-ογκογονιδίου. Αποτέλεσμα τέτοιων μεταλλάξεων είναι η αλλαγή κρίσιμων αμινοξέων του πρωτεϊνικού προϊόντος, με αποτέλεσμα να προκύπτουν προϊόντα με διαφορετική δραστηριότητα και ιδιότητες. Σημειακές μεταλλάξεις στα ογκογονίδια της οικογένειας Ras (πχ H-ras, K-ras και N-ras) βρέθηκε να σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου στον πνεύμονα και στο παχύ έντερο.
2. **Χρωμοσωμικές αναδιατάξεις:** Συγκεκριμένα χρωμοσωμικές μετατοπίσεις όταν συμβαίνουν πολύ κοντά στον γενετικό τόπο ενός πρωτο-ογκογονιδίου ή επι αυτού, μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές στη δομή /λειτουργικότητα του πρωτεϊνικού προϊόντος του ογκογονιδίου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η δημιουργία μίας χιμαιρικής (fused) πρωτεΐνης στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία.
3. **Χρωμοσωμικές ατυπίες:** Με τον όρο αυτό γίνεται αναφορά σε διπλοποιήσεις και ανασυνδυασμούς τμημάτων DNA που οδηγούν σε αλλαγή στην έκφραση των ογκογονιδίων με αποτέλεσμα τη γονιδιακή ενίσχυση/ υπερέκφραση του ογκογονιδίου.
4. **Τρανσποζόνια ή ιοί:** Παρεμβολή τρανσποζονίων στο γονίδιο ή ενσωμάτωση ιών στη ρυθμιστική περιοχή των «υπό-ενεργοποίηση» ογκογονιδίων έχουν ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση των γονιδίων αυτών.

Τα **ογκοκατασταλτικά γονίδια** ανακαλύφθηκαν έπειτα από ενδείξεις πειραματικών δεδομένων για την ύπαρξη μίας ομάδας γονιδίων, των οποίων η απώλεια ή η απώλεια της δραστηριότητας των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν, σχετίζεται με την καρκινογένεση. Τα γονίδια αυτά εμποδίζουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Οι αρχικές ενδείξεις για την ύπαρξη ογκοκατασταλτικών γονιδίων προήλθαν από πειράματα υβριδισμού, μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων, τα οποία έδειξαν ότι τα υβρίδια που προέκυπταν είχαν χάσει το

καρκινογόνο δυναμικό τους. Περισσότερες πληροφορίες για τα ογκοκατασταλτικά γονίδια έδωσαν και οι έρευνες για το ρετινοβλάστωμα, ενός κληρονομικού παιδικού καρκίνου. Οι έρευνες αυτές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι για την ανάπτυξη του ρετινοβλαστώματος είναι απαραίτητη η απώλεια ή αδρανοποίηση και των δύο αλληλομόρφων γονιδίων. Σύμφωνα, λοιπόν, με τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι, απαιτείται η αλλοίωση και των δύο φυσιολογικών αλληλομόρφων ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου για τη δημιουργία ογκογένεσης και ότι ένα μόνο φυσιολογικό αλληλόμορφο γονίδιο είναι ικανό για την καταστολή της.

Παρατηρήθηκε ότι, στους περισσότερους όγκους που προκύπτουν έπειτα από αλλοίωση και των δύο φυσιολογικών αλληλομόρφων ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου, υπάρχουν δύο πανομοιότυπα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα του γονιδίου. Οι όγκοι αυτοί έχουν απώλεια ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity, LOH).^(3,4)

Οι μηχανισμοί με τους οποίους επιτυγχάνεται απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) είναι οι εξής:

- i. Απώλεια ολόκληρου του χρωμοσώματος ή του βραχίονα που περιέχει το φυσιολογικό αλληλόμορφο
- ii. Απώλεια ολόκληρου του χρωμοσώματος με το φυσιολογικό αλληλόμορφο και διπλασιασμός του μεταλλαγμένου
- iii. Μιτωτικός ανασυνδυασμός με απομάκρυνση του τμήματος με το φυσιολογικό αλληλόμορφο
- iv. Ανεξάρτητο μεταλλαξιγόνο συμβάν (πχ. σημειακή μετάλλαξη) στο φυσιολογικό αλληλόμορφο

Τα κυριότερα ογκοκατασταλτικά γονίδια αλλοίωση των οποίων οδηγεί στους συνηθέστερους τύπους καρκίνου είναι

1. Rb (ρετινοβλαστώμα)
2. p53 (σύνδρομο Li-Fraumeni)
3. p16 (οικογενές μελάνωμα)
4. DCC (καρκίνος του παχέος εντέρου)⁽³⁾

A.3 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

❖ A.3.1 Επιδημιολογία του καρκίνου του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την πιο συχνά εμφανιζόμενη θανατηφόρα κακοήθεια παγκοσμίως. Ευθύνεται για 1,3 εκατομμύρια θανάτους το χρόνο σε διεθνές επίπεδο και είναι η δεύτερη αιτία θανάτου. Κάθε χρόνο διαγνώσκονται περισσότερα από 1,5 εκατομμύρια νέα κρούσματα σε όλο τον κόσμο. Στην Ευρώπη ο ετήσιος αριθμός νέων περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα ανέρχεται στις 20.000. Σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία από την Ευρωπαϊκή Ένωση, η Ελλάδα εμφανίζει τη μεγαλύτερη συχνότητα καρκίνου του πνεύμονα σε ηλικίες κάτω των 45 ετών και σημειώνονται περίπου 7.000 θάνατοι ετησίως από τη νόσο αυτή.

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η πιο θανατηφόρος από όλες τις κακοήθειες, εφόσον οι θάνατοι από τη νόσο αυτή ξεπερνούν το άθροισμα των θανάτων που οφείλονται στον καρκίνο του προστάτη, του μαστού και του παχέος εντέρου. Για όλους αυτούς τους λόγους αναφέρεται ότι ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί παγκόσμια επιδημία.

Τα στατιστικά στοιχεία των νέων περιπτώσεων για την Ελλάδα είναι τα εξής:

Άνδρες: 84% - Γυναίκες: 16%

Ηλικίες: 32-85+ (Μέσος όρος ηλικίας: 67.4 έτη).

Καπνιστές: 94% - Μη καπνιστές: 6%

A.3.2 Ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του πνεύμονα

Ο καρκίνος στον πνεύμονα σύμφωνα με τα ιστολογικά του χαρακτηριστικά ταξινομείται στο Μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Small Cell Lung Cancer, SCLC) και στο Μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC). Ο Μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα εμφανίζεται συχνότερα και αποτελεί το 80% των περιπτώσεων καρκίνου στον πνεύμονα.

Σε ένα μικρό ποσοστό εμφανίζεται «Συνδυασμένος μικροκυτταρικός /μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα» με χαρακτηριστικά τόσο του μικροκυτταρικού όσο και του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. ^(7,9)

Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (Small Cell Lung Cancer, SCLC)

Ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου εμφανίζεται σε ποσοστό 20 με 25% στον καρκίνο του πνεύμονα. Βασικό αίτιο εμφάνισής του αποτελεί το κάπνισμα. Η έγκαιρη διάγνωσή του θα μείωνε τη θνησιμότητα, όμως αυτό δεν είναι εφικτό λόγω του γρήγορου ρυθμού ανάπτυξής του και των συνεχών μεταστάσεων. Παρ' ολ' αυτά έχει καλύτερη ανταπόκριση στην ακτινοβολία και στις χημειοθεραπείες. Ο SCLC εντοπίζεται σε μεγάλο ποσοστό στο βρογχικό επιθήλιο στο κέντρο των πνευμόνων, ενώ σε μικρότερο ποσοστό στην περιφέρεια των πνευμόνων. ^(15,6)

Τα καρκινικά κύτταρα του SCLC παρουσιάζουν τα εξής χαρακτηριστικά:

1. Μικρό μέγεθος
2. Αραιό κυτταρόπλασμα
3. Στρογγυλό ή ωοειδή πυρήνα και διάχυτη χρωματίνη
4. Δυσδιάκριτοι πυρηνίσκοι

Μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC)

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως ο NSCLC είναι ο πιο συχνά εμφανιζόμενος τύπος καρκίνου του πνεύμονα με ποσοστά της τάξεως του 75 με 80%. Αν και έχει πιο αργό ρυθμό ανάπτυξης από το SCLC, ωστόσο δεν είναι εφικτή η έγκαιρη διάγνωσή του.

Ιστολογικά αποτελέσματα έδειξαν ότι αποτελεί ένα ετερογενές σύνολο τριών επιμέρους ιστολογικών τύπων: ^(15,6)

- Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (squamous cell carcinoma)
Αρχικά εμφανίζεται στους μεγάλους βρόγχους των πνευμόνων και παραμένει στην περιοχή του θώρακα, καθώς δεν παρουσιάζει μεταστάσεις. Είναι μία από τις πιο κοινές μορφές καρκίνου του πνεύμονα και βασικό χαρακτηριστικό του είναι η κερατινοποίηση των κυττάρων.
- Αδενοκαρκίνωμα (adenocarcinoma):
Στο αρχικό στάδιο της νόσου οι όγκοι εμφανίζονται επιθήλιο των βρόγχων και εντοπίζονται περιφερικά στους πνεύμονες. Στα επόμενα στάδια είναι συχνές οι μεταστάσεις. Είναι η πιο διαδεδομένη μορφή καρκίνου στον πνεύμονα και χαρακτηριστικό γνώρισμα της είναι η παραγωγή βλέννας από τα αδενοκαρκινικά κύτταρα. ^(15,6,8)
- Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (large cell carcinoma):
Ο τύπος αυτός καρκίνου δεν εμφανίζεται σε μεγάλο ποσοστό των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα. Μπορεί να εμφανιστεί σε οποιοδήποτε σημείο στον πνεύμονα με συνεχείς μεταστάσεις σε όλο το σώμα. ^(15,6,11)

❖ A.3.3 Παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου στον πνεύμονα

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

ΚΑΠΝΙΣΜΑ

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η πιο συχνά εμφανιζόμενη νόσος του βιομηχανικού κυρίως κόσμου με όλο και μεγαλύτερη συχνότητα σε άνδρες και γυναίκες που συνδέονται με την επιδημία του καπνίσματος. Θεωρείται ότι το κάπνισμα είναι υπεύθυνο για το 80-90% των καρκίνων του πνεύμονα.^(15,6,12,13) Έρευνες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι, ο καπνός του τσιγάρου προκαλεί κακοήθεις όγκους του αναπνευστικού συστήματος.^(15,6)

Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει 4.000 χημικές ουσίες, 55 από τις οποίες είναι δυνητικά καρκινογόνες. Οι ουσίες αυτές ανήκουν στην κατηγορία των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, νιτροζαμινών και αρωματικών αμινών και παράγονται κατά την καύση λιθανθρακόπισσας. Πιο ειδικά, βρέθηκε ότι προϊόντα του βενζο (α) πυρενίου, ενός πολυκυκλικού αρωματικού υδρογονάνθρακα, συνδέονται κυρίως με γουανίνη, δημιουργούν μεταβάσεις τύπου GC>AT. Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η έκθεση των κυττάρων σε βενζο (α) πυρένιο οδήγησε στο σχηματισμό προϊόντων προσθήκης (adducts) στα κωδικόνια 157, 248 και 273 του γονιδίου p53.⁽¹⁵⁾

Μελέτες έχουν δείξει ότι, εκτός από το ενεργητικό κάπνισμα και το παθητικό κάπνισμα αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου. Τα άτομα, που εκτίθενται σε παθητικό κάπνισμα έχουν 15% μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν ασθένειες, που σχετίζονται με το κάπνισμα και ο κίνδυνος να εκδηλώσουν καρκίνο των πνευμόνων αυξάνεται κατά 20-30%.^(16,17)

ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΑΜΙΑΝΤΟ

Ο αμίαντος αποτελεί την κοινή ονομασία για ομάδα ορυκτών που χρησιμοποιούνταν σε βιομηχανίες και σε εμπορικές κατασκευές κυρίως τις δεκαετίες '50-'60. Έκθεση σε αμίαντο έχει παρατηρηθεί σε ναυπηγεία, μεταλλεία αμιάντου, βιομηχανίες μονωτικών υλικών, εργασιακούς χώρους επισκευής φρένων. Άτομα που εκτίθενται σε αμίαντο και καπνό τσιγάρου έχουν σημαντικά αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα. Έχει βρεθεί ότι τα σωματίδια αμιάντου μπορούν να συμβάλλουν στη μεταφορά συγκεντρωμένων καρκινογόνων του καπνού στα κύτταρα που επενδύουν τους πνεύμονες. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο ο αμίαντος, μόνος του ή σε συνδυασμό με τον καπνό του τσιγάρου, οδηγεί σε καρκίνο πνεύμονα παραμένει αδιευκρίνιστος.

ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Μελέτες για την συσχέτιση διατροφής και καρκίνου του πνεύμονα είχαν αμφιλεγόμενα αποτελέσματα. Η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ καθώς και η πλούσια διατροφή σε

χοληστερόλη μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο για καρκίνο πνεύμονα. Από την άλλη πλευρά, μελέτες που έγιναν σε καπνιστές δείχνουν ότι η αυξημένη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών μειώνει τον κίνδυνο. Τα φρούτα και τα λαχανικά είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικές ουσίες όπως τα φλαβονοειδή και οι βιταμίνες A, C, E.⁽¹⁸⁾

ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

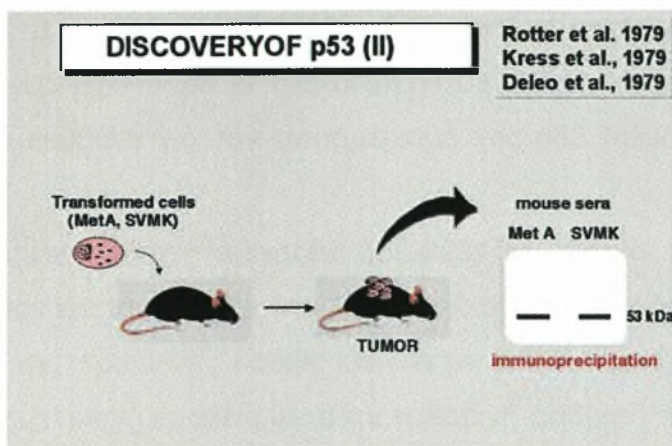
Μελέτες χρόνων έδειξαν ότι πολλά είδη γενετικών τροποποιήσεων συμβάλλουν είτε στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (SCLC) είτε στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC). Αναλυτικότερα, οι γενετικές τροποποιήσεις αυτές αναφέρονται σε ενεργοποίηση του γονιδίου *myc* έπειτα από γονιδιακή ενίσχυση, μετάλλαξη στα γονίδια της οικογένειας *ras* και απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH) σε περιοχές των χρωμοσωμάτων 3p, 13q και 17p2. Στις περιοχές 13q14 και 17p13 έχουν εντοπιστεί τα ογκοκατασταλτικά γονίδια RB και p53 αντίστοιχα.⁽¹⁵⁾

A.4 Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ p53

❖ A.4.1 Πρωτεΐνη p53 η ιστορία της ανακάλυψης

Η πρωτεΐνη p53 ανακαλύφθηκε πριν από 30 χρόνια σε κύτταρα μετασχηματισμένα από τον ιό SV40, στα οποία συνδέεται με το αντιγόνο T του ιού. Το αντιγόνο T είναι απαραίτητο για το μετασχηματισμό και θεωρήθηκε ότι δρα μέσω της επίδρασης του στην p53.⁽²⁷⁾ Συγκεκριμένα, μελέτες σε μεγάλη ποικιλία SV40 μετασχηματισμένων κυττάρων απέδειξαν ότι, η p53 κωδικοποιούνταν από το γονιδίωμα των κυττάρων, και ότι εκφραζόταν σε μεγάλες ποσότητες τόσο σε SV40 μετασχηματισμένα κύτταρα όσο και σε μη-προσβεβλημένα από SV40 εμβρυϊκά καρκινικά κύτταρα.⁽³⁴⁾ Παράλληλες *in vitro* μελέτες σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ποντικών απέδειξαν ότι, η ανοσολογική απόκριση των πειραματόζων κατευθύνονταν προς τη p53 (εικόνα A.4.1). Λίγο αργότερα, ο Crawford και οι συνεργάτες του περιέγραψαν για πρώτη φορά αντισώματα κατά της ανθρώπινης p53 σε 9% των ορών από ασθενείς με καρκίνο του μαστού.⁽³⁴⁾

Εικόνα A.4.1



Ανακάλυψη της πρωτεΐνης p53 με ανοσολογική προσέγγιση (34)

Σήμερα, είναι γνωστή η ογκοκατασταλτική δράση της πρωτεΐνης p53 και από πολλούς θεωρείται ως «Φύλακας του Γονιδιώματος». Ο λόγος είναι ότι η p53 παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, καθώς και στη ρύθμιση της έκφρασης άλλων γονιδίων που είναι απαραίτητα για την ομαλή κυτταρική ανάπτυξη. Συγκεκριμένα, προκαλεί είτε καταστολή του κυτταρικού κύκλου, είτε έναρξη του αποπτωτικού μονοπατιού, προκειμένου να προφυλαχτεί το γονιδίωμα από τη συσσώρευση μεταλλάξεων άλλων γονιδίων.^(20,21,22,33)

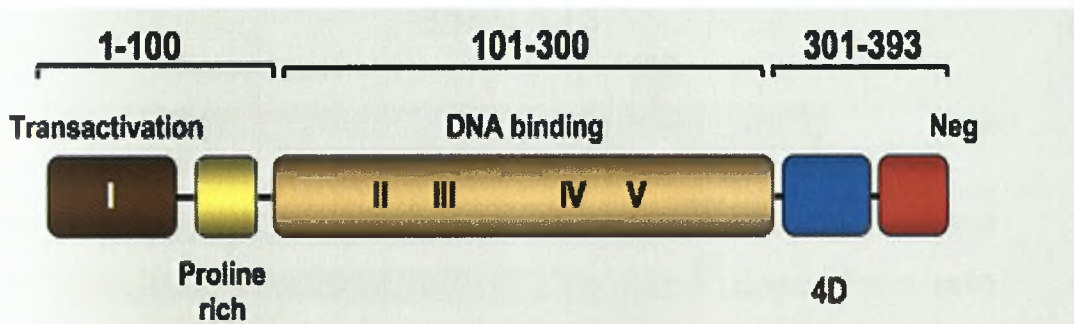
❖ A.4.2 Δομή της πρωτεΐνης p53

Η ανθρώπινη πρωτεΐνη p53 είναι μία πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη 393 αμινοξέων, μοριακού βάρους (MB) 53.000 Daltons και χρόνο ημιζωής περίπου 20min.^(3,32,37) Η λειτουργική p53 εμφανίζεται ως διμερές. Σε κάθε μονομερές της διακρίνονται πέντε σημαντικές για τη λειτουργία της δομές:

- i. Το αμινοτελικό άκρο (αμινοξέα 1-42), το οποίο είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων και γονιδίων-στόχων (transcription-activation domain, TAD)
- ii. Την περιοχή πλούσια σε προλίνη (αμινοξέα 40-92), η οποία διαδραματίζει τον κύριο ρόλο στην αποπτωτική απόκριση της πρωτεΐνης μετά από βλάβη του DNA. Η περιοχή αυτή είναι πολύ συντηρημένη στις περισσότερες ισομορφές της p53.
- iii. Την κεντρική περιοχή πρόσδεσης στο DNA (αμινοξέα 101-306), η οποία περιέχει πολλές αργινίνες, ποικιλία μοτίβων και έχει μοναδική δομή (DNA-binding domain, DBD). Έχει βρεθεί πως η περιοχή πρόσδεσης αποτελεί στόχο για το 90% των p53 μεταλλάξεων στους ανθρώπινους καρκίνους

- iv. Την περιοχή ολιγομερισμού (αμινοξέα 307- 355), η οποία αποτελείται από ένα β-φύλλο, που αλληλεπιδρά με ένα δεύτερο μονομερές της πρωτεΐνης, και από μία α-έλικα υπεύθυνη για τον τετραμερισμό της p53 (oligomerisation domain, OD)
- v. Το καρβοξυτελικό άκρο (αμινοξέα 356-393), το οποίο περιέχει πυρηνικά σήματα εξόδου και τοπολογίας (nuclear localization signal-NLS, nuclear export signal-NES) της πρωτεΐνης καθώς και μία μη ειδική περιοχή πρόσδεσης του DNA. Αυτή η περιοχή εμπλέκεται στην καθοδική ρύθμιση της πρόσδεσης του DNA από την κεντρική περιοχή.

Εικόνα A.4.2



Απεικόνιση λειτουργικών τμημάτων της p53

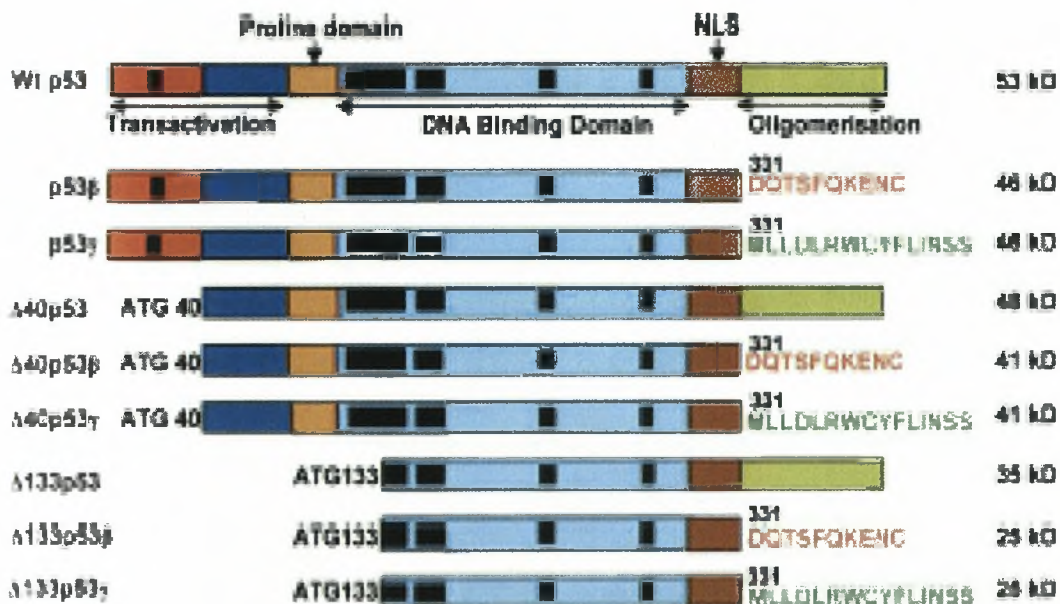
❖ A.4.3 Ισομορφές της p53 και ο ρόλος τους

Πρόσφατες έρευνες απέδειξαν ότι το γονίδιο p53 έχει δομή παρόμοια με αυτή των γονιδίων p63 και p73.⁽³⁸⁾ Η μεταγραφή του γονιδίου σε φυσιολογικό ανθρώπινο ιστό αρχίζει από δύο διαφορετικές περιοχές ανοδικά του εξονίου 1. Σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιείται επιπλέον και ένας εναλλακτικός προαγωγέας που βρίσκεται στο ιντρόνιο 4. Η χρήση του εναλλακτικού προαγωγέα οδηγεί στην δημιουργία p53 πρωτεΐνης με ελλείψεις στο αμινο-τελικό άκρο, η οποία ξεκινά από το κωδικόνιο 133 (Δ133p53,β,γ). Οι ισομορφές Δ133p53 αναστέλλουν τη δράση της φυσιολογικής p53, κυρίως το ρόλο που έχει στην απόπτωση, δημιουργώντας σύμπλοκα με αυτή.⁽²³⁾

Εναλλακτικό μάτισμα του ιντρονίου 9 οδηγεί στην παραγωγή των p53, p53β (p53i9) και p53γ ισομορφών. Η p53β ή p53i9 παρουσιάζει έλλειμμα των τελευταίων 60 αμινοξέων (καρβοξυ-τελικό άκρο). Εμφανίζει μη λειτουργική μεταγραφική ενεργότητα και ικανότητα πρόσδεσης του DNA. Με εναλλακτικό μάτισμα του ιντρονίου 9 σε

συνδυασμό με εναλλακτικό μάτισμα του ιντρονίου 2 ή εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης σχηματίζονται οι ισομορφές Δ40p53, Δ40p53β και Δ40p53γ.⁽⁴⁰⁾ Οι πρωτεΐνες Δ40p53 εμφανίζουν έλλειψη στο αμινο-τελικό άκρο από το οποίο έχουν διαγραφεί τα πρώτα 40 αμινοξέα. Ωστόσο, μπορούν να ενεργοποιήσουν την έκφραση γονιδίων, καθώς περιέχουν τμήμα της περιοχής TAD καθώς και μία δεύτερη δομή υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων μεταξύ των αμινοξέων 43 και 63.⁽⁴²⁾ Επιπλέον, η Δ40p53 έχει τη δυνατότητα να αλλάξει τη θέση της p53 στο κύτταρο και να αναστείλει την αποδόμηση της μέσω του μονοπατιού του MDM2.⁽⁴⁰⁾ Οι ισομορφές β και γ στερούνται την περιοχή ολιγομερισμού. Συνοψίζοντας, το γονίδιο p53 κωδικοποιεί 9 ισομορφές της πρωτεΐνης p53.⁽⁴⁰⁾ (εικόνα A.4.3⁽²⁴⁾)

Εικόνα A.4.3



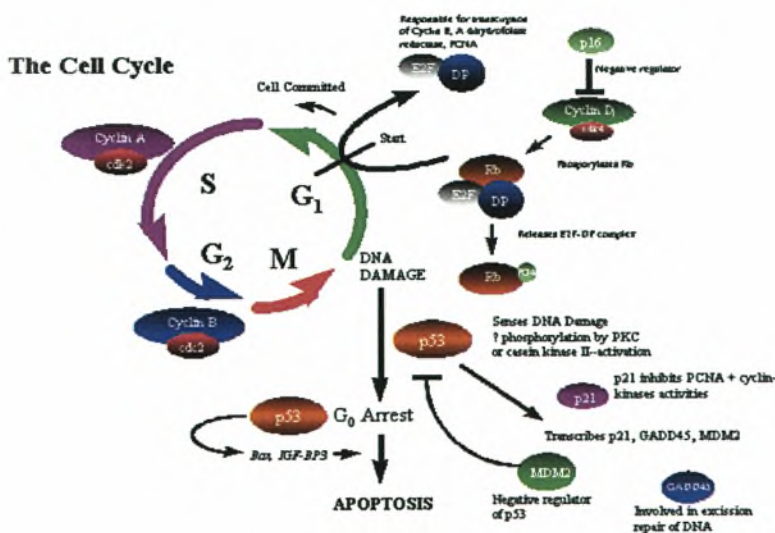
Οι διαφορετικές ισομορφές της p53, παρατηρήθηκε ότι εκφράζονται στους ιστούς ανάλογα με τη δράση τους ως απάντηση σε παράγοντες stress όπως η υποξία, το UV, η ακτινοβολία.^(43,44,45) Μελέτες έδειξαν ότι η Δ133p53 εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς αλλά δε βρέθηκε στη μήτρα, στον προστάτη και το στήθος. Η Δ133p53β δε βρέθηκε στην καρδιά, στο συκώτι, στο στήθος και στον εγκέφαλο. Οι πρωτεΐνες p53β και p53γ δε βρέθηκαν στον εγκέφαλο, στον πνεύμονα στο συκώτι και στον προστάτη.

❖ A.4.4 Λειτουργίες της πρωτεΐνης p53

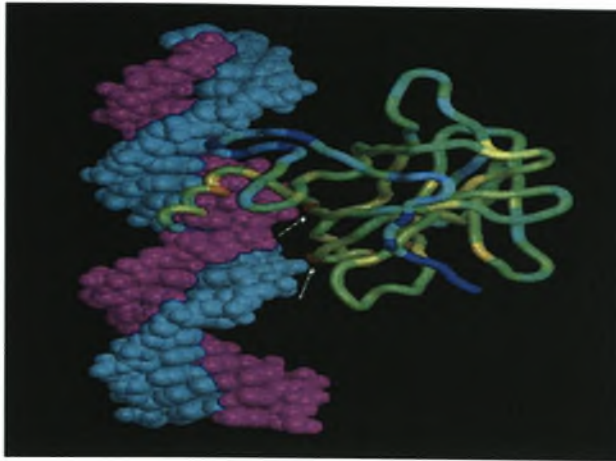
Η πρωτεΐνη p53 εμπλέκεται στη ρύθμιση διαφόρων γονιδίων και κυτταρικών μηχανισμών, που είναι απαραίτητοι για τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων. Σε

φυσιολογικές συνθήκες τα επίπεδα της πρωτεΐνης παραμένουν χαμηλά, παράγοντες, όμως, οι οποίοι επάγουν βλάβες στο DNA (π.χ ακτινοβολία) ενεργοποιούν μεταγραφικά το γονίδιο και επιφέρουν την αύξηση της ποσότητας της πρωτεΐνης.

Η πρωτεΐνη p53 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας με πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες όπως η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η επαγωγή της απόπτωσης και η σταθεροποίηση του γονιδιώματος.⁽⁴⁶⁾ (εικόνα A.4.4α) Για να ενεργοποιηθεί η πρωτεΐνη πρέπει να προσδεθεί στις θέσεις βλάβης του DNA, μέσω περιοχής μη ειδικής πρόσδεσης στο DNA. Η N-τελική επικράτεια trans-ενεργοποίησης αλληλεπιδρά άμεσα με υποκινητές που φέρουν μια αλληλουχία αναγνώρισης μεγέθους 10bp και με αυτό τον τρόπο ενεργοποιεί ή, σπανιότερα, απενεργοποιεί τη μεταγραφή άλλων γονιδίων. Η πρωτεΐνη για να δράσει ως μεταγραφικός παράγοντας απαιτεί τους συνενεργοποιητές p300/CBP. Οι συνενεργοποιητές προσδένονται στην περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής στο N-τελικό άκρο της p53. Η C-τελική επικράτεια της p53 προσδένεται μη ειδικά σε σύντομες μονόκλωνες περιοχές DNA ανεξάρτητα από την αλληλουχία τους.⁽⁴⁾ (εικόνα A.4.4β)



Εικόνα A.4.4α. Απεικόνιση της απόκρισης της p53 μετά από ερέθισμα stress του κυττάρου



Εικόνα A.4.4β Απεικόνιση πρόσδεσης της πρωτεΐνης p53 σε μόριο DNA

α. Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

Η πρωτεΐνη p53 ελέγχει τον κυτταρικό κύκλο κυρίως κατά τη φάση G1. Βλάβες του DNA οδηγούν σε υπερέκφραση της p53, η οποία εν συνέχεια επάγει την έκφραση διαφόρων γονιδίων που αναστέλλουν την πορεία του κυτταρικού κύκλου (cell cycle arrest). Με τον τρόπο αυτό παρέχεται ο απαραίτητος χρόνος στο κύτταρο, ώστε να ενεργοποιήσει τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA και να αποφευχθεί η επαγωγή ογκογένεσης. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα γονιδίων η έκφραση των οποίων εξαρτάται από την p53 και τα οποία αναστέλλουν την πορεία του κυτταρικού κύκλου είναι: το p21 και το GADD45.⁽²⁷⁾ Η πρωτεΐνη του γονιδίου p21 είναι ένας καταστολέας του κυτταρικού κύκλου, ο οποίος αποτρέπει την προώθηση των κυττάρων στη φάση G1. Η πρωτεΐνη GADD45 είναι μία πρωτεΐνη επιδιόρθωσης βλαβών, η οποία ενεργοποιείται ως απόκριση στη συσσώρευση βλαβών από ακτινοβολία. Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης αυτής ορίζει το μονοπάτι που ενέχεται στη διατήρηση της σταθερότητας του γονιδιώματος.⁽⁴⁾

β. Ρύθμιση της απόπτωσης

Η πρωτεΐνη p53 θεωρείται ότι δρα σε περιπτώσεις όπου οι βλάβες του DNA δεν μπορούν να επιδιορθωθούν και επομένως το κύτταρο θα πρέπει να οδηγηθεί σε προγραμματισμένο θάνατο (απόπτωση), προκειμένου να αποφευχθεί η συσσώρευση επιπρόσθετων γενετικών ανωμαλιών. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η p53 οδηγεί στην απόπτωση δεν έχει διευκρινισθεί, πιστεύεται ότι επιτυγχάνεται απόπτωση με δύο τρόπους. Ο ένας προκαλεί την παραγωγή πρωτεϊνών που επιδρούν στο μιτοχόνδριο πυροδοτώντας τις αποπτωτικές του λειτουργίες. Χαρακτηριστική είναι η πρωτεΐνη Bid, μέλος της οικογένειας Bcl2. Κάποια μέλη αυτής

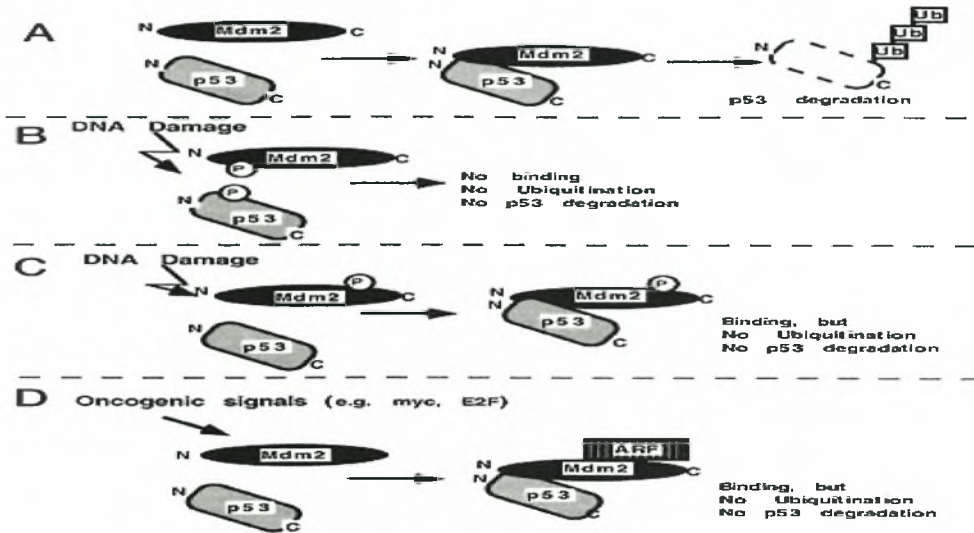
της οικογένειας είναι απαραίτητα για την απόπτωση και άλλα για την επιβίωση του κυττάρου. Καθώς επίσης και τα προϊόντα που προκύπτουν από τη μεταγραφή του γονιδίου Bax. Εναλλακτικά η p53 οδηγεί στην παραγωγή ή ενεργοποίηση υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης, οι οποίοι προκαλούν την απόπτωση. Η απόπτωση οδηγεί στη συρρίκνωση του κυττάρου σε μια μάζα με ετερογενή πυκνότητα, στην κατάτμηση του πυρηνικού DNA και τελικά στο θάνατό του. ⁽⁴⁾

❖ A.4.5 Απενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53

α. Απενεργοποίηση μέσω της πρωτεΐνης Mdm2

Σε φυσιολογικά κύτταρα, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης p53 παραμένει σε χαμηλά επίπεδα μέσω ενός μηχανισμού αυτορύθμισης, κατά τον οποίο η p53 ενεργοποιεί τη μεταγραφή του πρωτο-ογκογονιδίου mdm2. Η ενεργοποίηση αυτή βασίζεται στην πρόσδεση της p53 στην περιοχή πρόσδεσης του επαγωγέα του mdm2 με αποτέλεσμα την έκφραση της πρωτεΐνης Mdm2.⁽⁴⁷⁾ Η πρωτεΐνη mdm2, που εκφράζεται προσδένεται στο N-άκρο της p53 (σύμπλοκο πρωτεϊνών Mdm2-p53), με αποτέλεσμα την καταστολή της δράσης της p53 ως μεταγραφικού παράγοντα. Επιπλέον, η πρωτεΐνη Mdm2 έχοντας δράση όμοια με τη λιγάση E3 της ουβικουΐίνης επηρεάζει τη σταθερότητα της p53. Η πρόσδεση αυτή της mdm2 προκαλεί απενεργοποίηση της p53 και μεταφορά της στο σύστημα ουβικουΐίνης για αποδόμιση.^(4,48)

Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα, στα καρκινικά κύτταρα όπου το γονίδιο p53 είναι μεταλλαγμένο, η διαδικασία της φυσιολογικής αποδόμισης της p53 πρωτεΐνης διαφοροποιείται. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου p53 μπορεί να οδηγήσουν σε δομικές τροποποιήσεις της p53, με αποτέλεσμα την αδυναμία της πρωτεΐνης αυτής να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη mdm2 και να σχηματίζει το πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Επιπρόσθετα, περιπτώσεις όπου βλάβη στο DNA προκαλεί δομικές τροποποιήσεις είτε στην p53, είτε στην Mdm2 οδηγούν στο σχηματισμό του συμπλόκου Mdm2-p53 αλλά όχι σε αποδόμιση της p53. Στις περιπτώσεις αυτές, η p53 δεν οδηγείται στο σύστημα ουβικουΐίνης για αποδόμιση, και επομένως η ποσότητα της στα καρκινικά κύτταρα είναι εμφανώς υψηλότερη από αυτή των φυσιολογικών κυττάρων. (εικόνα A.4.5)



Εικόνα Α.4.5. Περιπτώσεις απενεργοποίησης και αδυναμία απενεργοποίησης της p53 από την πρωτεΐνη Mdm2

β. Απενεργοποίηση λόγω μεταλλάξεων του γονιδίου p53

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου p53 φαίνεται να συμμετέχουν στη διαδικασία της καρκινογένεσης με διάφορους μηχανισμούς. Συνήθως, μετάλλαξη του γονιδίου p53 οδηγεί σε απώλεια του φυσιολογικού αλληλόμορφου γονιδίου. Σε ορισμένους όγκους ωστόσο, το φυσιολογικό αλληλόμορφο φαίνεται να μένει ανεπηρέαστο και να εκφράζεται σε κανονικά επίπεδα. Μία πιθανή εξήγηση του φαινομένου αυτού είναι ότι, το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του p53 να δρα ως κυρίαρχο και να αναστέλλει τη λειτουργία της φυσιολογικής p53 πρωτεΐνης, καθώς προσδένεται στο DNA ως τετραμερές. Επιπλέον, *in vitro* μελέτες σε κύτταρα με ένα φυσιολογικό και ένα μεταλλαγμένο p53 αλληλόμορφο (p53^{+/-} κύτταρα) έδειξαν ότι η ελάττωση της ποσότητας του γονιδίου αυτού σχετίζεται ενδεχόμενα με παθογενετικές επιδράσεις στα κύτταρα αυτά.⁽⁴⁹⁾

γ. DNA ογκογόνοι ιοί

Πρωτεϊνικά προϊόντα DNA ογκογόνων ιών βρέθηκε ότι, αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη p53 και αναστέλλουν την ογκοκατασταλτική της δράση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι, το T αντιγόνο του ιού SV40 καθώς και η πρωτεΐνη E6 των ιών της οικογένειας HPV.⁽³⁶⁾

❖ A.4.6 Απόκριση της πρωτεΐνης p53 σε περιβαλλοντικά σήματα

Η p53 αποκρίνεται σε περιβαλλοντικά σήματα που επηρεάζουν την κυτταρική αύξηση. Η πιο συνηθισμένη μορφή τροποποίησης είναι η φωσφορυλίωση της σερίνης. Η φωσφορυλίωση μπορεί να μεταβάλλει τη στερεοδομή της πρωτεΐνης και επομένως να καταργήσει ή να δημιουργήσει θέσεις αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες. Σε ορισμένες περιπτώσεις συμβαίνει και ακετυλίωση της λυσίνης. Οι παράγοντες που ευθύνονται για τις τροποποιήσεις αυτές είναι οι εξής:

i. Ιονίζουσα ακτινοβολία

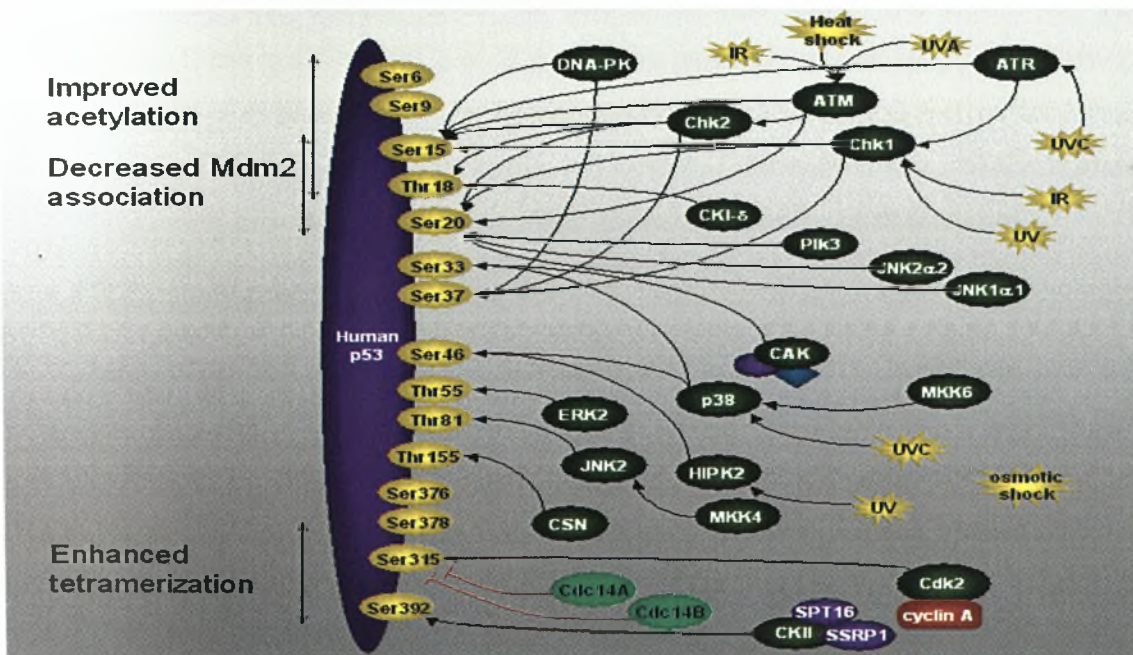
Η ακτινοβολία προκαλεί θραύσεις στο DNA με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κινάσης ATM. Η κινάση αυτή φωσφορυλιώνει την p53 στη σερίνη 15 (S15)

ii. Ακτινοβολία UV, χημειοθεραπευτικά φάρμακα

Οι παράγοντες αυτοί ενεργοποιούν τις κινάσες ATR και την καζεϊνική κινάση II, οι οποίες φωσφορυλιώνουν τις σερίνες 15,33 και 392

iii. Ογκογονίδια

«Μη-φυσιολογικά» σήματα αύξησης από ογκογονίδια όπως *ras* ή *myc* ενεργοποιούν την $p14^{ARF}$, η οποία απενεργοποιεί την πρωτεΐνη Mdm2, με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της p53. ⁽⁴⁾ (εικόνα A.4.6)



Εικόνα A.4.6. Θέσεις φωσφορυλίωσης της p53

❖ A.4.7 Καρκίνος και πρωτεΐνη p53

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η πρωτεΐνη p53 είναι μία ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη με ρόλο «κλειδί» στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Σε ποσοστό 50% των ανθρώπινων καρκίνων το γονίδιο p53 χάνεται ή απενεργοποιείται. Έλλειμμα και των δυο αλληλομόρφων του γονιδίου οδηγεί σε πλήρη απουσία της πρωτεΐνης p53. Επομένως, τα γονίδια-στόχοι της πρωτεΐνης δε μεταγράφονται, η αντιγραφή δεν καταστέλλεται από την εύρεση βλάβης στο DNA, η απόπτωση δεν επάγεται και έτσι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός καθίσταται ανεξέλεγκτος. Επιπρόσθετα, μεταλλαγμένη υπομονάδα της πρωτεΐνης, ως αποτέλεσμα σημειακής μετάλλαξης, εμποδίζει τη φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης και την καθιστά αναποτελεσματική. Πιο ειδικά, η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη δρα με επικρατή τρόπο, παρουσία της φυσιολογικής p53, δημιουργώντας σύμπλοκα με αυτήν και αναστέλλοντας τη δράση της φυσιολογικής p53.

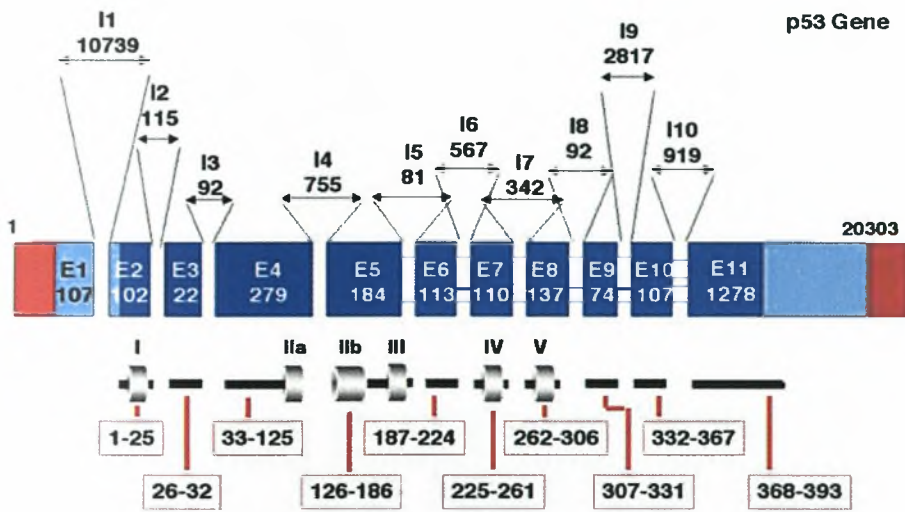
Απώλεια της λειτουργίας της p53 οδηγεί σε αθανатоποίηση των κυττάρων ένα βασικό χαρακτηριστικό που συναντάται στα καρκινικά κύτταρα. Τα φυσιολογικά κύτταρα έπειτα από κάποιο χρονικό διάστημα «γερνούν». Η γήρανση προέρχεται εξαιτίας της βράχυνσης των τελομερών. Κατά τη διαδικασία αυτή χάνεται η πρωτεΐνη TRF2, ο ρόλος της οποίας είναι να συνδέεται στο άκρο του DNA και να το προστατεύει. Όταν χαθεί η TRF2 το 3' άκρο που αποκαλύπτεται ενεργοποιεί την p53, η οποία οδηγεί φυσιολογικά στη διακοπή του πολλαπλασιασμού ή στην απόπτωση. Μη λειτουργική p53 πρωτεΐνη στα καρκινικά κύτταρα, επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό τους οδηγώντας έτσι σε γενετική αστάθεια και συσσώρευση μεταλλάξεων. ⁽⁴⁾

❖ A.4.8 Το γονίδιο p53 και καρκίνος

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 (γνωστό και ως TP53) βρίσκεται στο κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 17 στη θέση 17p13.1 και παρουσιάζει υψηλό βαθμό συντήρησης στα διάφορα είδη οργανισμών. Το ανθρώπινο ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 περιέχει ένα γραμμικό μόριο DNA συνολικού μήκους 20.303 νουκλεοτιδίων. Η δομή του p53 περιλαμβάνει 11 εξόνια και 10 ιντρόνια. (εικόνα A.4.8)

Το γονίδιο p53 εμπλέκεται στην ανάπτυξη διάφορων μορφών καρκίνου. Συγκεκριμένα, στο σύνδρομο Li-Fraumeni το γονίδιο εμφανίζεται απενεργοποιημένο. Το σύνδρομο περιλαμβάνει ένα εξαιρετικά πολύπλοκο φαινότυπο, ο οποίος εκδηλώνεται με διάφορους τύπους καρκίνου.⁽⁵⁰⁾ Τα άτομα που πάσχουν από Li-Fraumeni εμφανίζουν ισχυρότατη προδιάθεση για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού, σαρκώματος, λευχαιμίας

και άλλων νεοπλασμάτων. Οι πάσχοντες έχουν συνήθως μόνο ένα φυσιολογικό αντίγραφο του γονιδίου και εκδηλώνουν τα συμπτώματα του συνδρόμου μετά από τυχαία μετάλλαξη στο λειτουργικό αντίγραφο.^(3, 50)



Εικόνα Α.4.8. Δομή γονιδίου p53. I1-I10: ιντρόνια και τα μεγέθη τους, E1-E11: εξόνια και τα μεγέθη τους, I-V: συντηρημένες περιοχές γονιδίου.

Μεταλλάξεις στο γονίδιο p53 έχουν παρατηρηθεί και στον καρκίνο του πνεύμονα. Πιο αναλυτικά, πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο βρέθηκαν σε ποσοστό 33% στα αδενοκαρκινώματα και 77% στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι κυρίως μεταβάσεις τύπου GC>AT και σχετίζονται με το κάπνισμα.⁽¹⁵⁾

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1 ΥΛΙΚΑ

❖ B.1.1 Βιολογικό υλικό

Το βιολογικό υλικό της παρούσας πειραματικής εργασίας προήλθε από τη Θωρακοχειρουργική Κλινική του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης «Θεαγένειο». Οι ασθενείς, οι οποίοι έπασχαν από καρκίνο του πνεύμονα, υποβλήθηκαν σε πνευμονοεκτομή προς αντιμετώπιση της νόσου. Σε κάθε περίπτωση ασθενούς κατά την προγραμματισμένη χειρουργική αφαίρεση του όγκου, λαμβάνονταν μικρή ποσότητα καρκινικού και παρακειμένου μη καρκινικού ιστού για επεξεργασία. Τα δείγματα αμέσως μετά την παραλαβή τους, τοποθετούνταν σε υγρό άζωτο και μεταφέρονταν στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του τμήματος Ιατρικής ΑΠΘ, όπου διατηρούνταν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

❖ B.1.2 Αντιδραστήρια Μοριακής Βιολογίας

Για τα πειράματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (SDS-PAGE) καθώς και για τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης (western blot), χρησιμοποιήθηκαν έγχρωμοι μάρτυρες προσδιορισμού μοριακής μάζας πρωτεϊνών. Οι μάρτυρες αυτοί ήταν οι Precision Plus Protein Standards Dual Color της εταιρίας BIO-RAD.

Για την απομόνωση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε διάλυμα με αναστολείς πρωτεασών, protease inhibitor cocktail EDTA-Free που αγοράστηκε από την εταιρία Thermo Scientific. Το διάλυμα αυτό αναστέλλει πρωτεάσες σερίνης, κυστεΐνης, καλπαΐνης καθώς και μεταλλοπρωτεάσες.

❖ B.1.3 Αντισώματα

Για την ανίχνευση της πρωτεΐνης p53 τόσο στα δείγματα καρκινικού, όσο και στα δείγματα παρακείμενου μη καρκινικού ιστού χρησιμοποιήθηκε ως πρώτο αντίσωμα το Pab 240. Το αντίσωμα αυτό είναι ένα μονοκλωνικό IgG1 αντίσωμα από ποντίκι και αναγνωρίζει την ειδικά τα αμινοξέα 156-214, τα οποία βρίσκονται στην «κεντρική περιοχή πρόσδεσης του DNA» στην ανθρώπινη p53 πρωτεΐνη. Το αντίσωμα αυτό αγοράστηκε από την εταιρία *SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.* Ως δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό βόειο αντίσωμα που αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες IgG του πρώτου αντισώματος και είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση από αγριοράπανο (HRP). Το δεύτερο αντίσωμα αγοράστηκε από την εταιρία *SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.*

❖ B.1.4 Αντιδραστήρια-Διαλύματα

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

- Αντιδραστήριο απομόνωσης πρωτεϊνών Trizol
- Χλωροφόρμιο
- 100% αιθανόλη
- Ακετόνη
- Διάλυμα καθαρισμού πρωτεϊνών (Wash Solution)
0,3 M υδροχλωρική γουανιδίνη σε 95% (v/v) αιθανόλη
2.5% (v/v) γλυκερόλη
(φυλάσσεται στους 4 °C)
- Διάλυμα διαλυτοποίησης πρωτεϊνών
1% (w/v) SDS(ανιοντικό απορρυπαντικό)
10M Ουρία
(φυλάσσεται στους 4 °C)
- Αντιδραστήριο προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών BCA
Το διάλυμα εργασίας BCA παρασκευάζεται πριν τη χρήση του σε αναλογία
50V Reagent A+1V Reagent B. Υπολογισμός συνολικού όγκου BCA :
(n δείγματα + 2) x 200μl
- Διάλυμα «εκχύλισης πρωτεϊνών» (Protein extraction buffer)
50mM Tris/HCl pH 8 (ρυθμιστικό διάλυμα)

150mM NaCl

0,02% (w/v) sodium azide (παρεμποδίζει την ανάπτυξη μικροοργανισμών)

0,1% (w/v) SDS (ανιοντικό απορρυπαντικό)

0,5% (w/v) sodium deoxycholate (απορρυπαντικό για τη διαλυτοποίηση πρωτεϊνών)

0,4mM EDTA (χηλικός παράγοντας των δισθενών κατιόντων)

10mM NaF

0.75mM PMSF (ευρέως φάσματος αναστολέας πρωτεασών)

Στο protein extraction buffer προστίθεται 1% v/v protease inhibitor cocktail EDTA-Free (Thermo Scientific).

➤ Υγρό άζωτο

➤ Διάλυμα Tris-HCl 1,5M pH 8,8

18,15gr Tris

100ml dH₂O

Το pH ρυθμίζεται με HCl στο 8,8, το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

➤ Διάλυμα Tris-HCl 0,5M pH 6,8

6gr Tris

100ml dH₂O

Το pH ρυθμίζεται με HCl στο 6,8, το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

➤ Διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (Running Gel) 10%

3,3 ml 30% (w/v) Ακρυλαμίδιο / 2,67% Bis- acrylamide

50μl SDS 20% (w/v)

2.5ml Tris-HCl 1,5M pH 8,8

4,1ml dH₂O

75μl APS 10% (w/v)

10 μl TEMED

Τελικός όγκος 10ml

Το διάλυμα παρασκευάζεται πριν τη χρήση του.

➤ Διάλυμα πηκτής επιστοίβαξης (Stacking gel) 4%

1,3 ml 30% (w/v) Ακρυλαμίδιο / 2,67% Bis- acrylamide

50μl SDS 20% (w/v)

2.5ml Tris-HCl 0,5M pH 6,8

6,1ml dH₂O

75μl APS 10% (w/v)

10 μl TEMED

Τελικός όγκος 10ml

Το διάλυμα παρασκευάζεται πριν τη χρήση του.

- Διάλυμα φόρτωσης ηλεκτροφόρησης Loading buffer 1x

3%(w/v) SDS

0,08M Tris-HCl pH6.8

15% (v/v) γλυκερόλη

0,01% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue)

Διατηρείται σε aliquots των 950μl στους -20 °C και λίγο πριν την χρήση τους προστίθενται 50μl β-μερκαπτοαιθανόλη (beta-mercaptoethanol)

- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer) SDS-PAGE 1x pH 8,3

1gr SDS 0,1%(w/v)

14,425gr γλυκίνη

3,025gr Tris

Τελικός όγκος 1lt, (φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου, RT)

- Διάλυμα χρώσης πηκτής SDS-PAGE με Coomassie Brilliant Blue (CBB) R250

CBB R-250 0,1% w/v

Μεθανόλη 50% v/v

Οξικό οξύ 10% v/v

Το διάλυμα παρασκευάζεται πριν τη χρήση του.

- Διάλυμα αποχρωματισμού πηκτής SDS-PAGE

Μεθανόλη 50% v/v

Οξικό οξύ 10% v/v

- Διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτρικουταρίνης 10x (Transfer buffer)

15.15g Tris

72g Γλυκίνη

Σε τελικό όγκο 500ml. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

- Διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτρικουταρίνης 1x (Transfer buffer)

1 όγκος Transfer buffer 10x

7 όγκοι dH₂O

2 όγκοι μεθανόλη

Το pH ρυθμίζεται μόνο του στο 8,3. Το διάλυμα φτιάχνεται πριν τη χρήση του.

➤ Διάλυμα TBS 10x

12,1g Tris

40g NaCl

Τελικός όγκος 500ml

Το pH ρυθμίζεται με HCl στο 7,6 . Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

➤ Διάλυμα μη-ειδικής δέσμευσης πρωτεϊνών (Blocking Buffer)

10ml TBS 10x

0,02% (v/v) Tween-20

5%(w/v) σκόνη άπαχου γάλακτος

90ml dH₂O

(Διατηρείται για 1 μέρα στους 4 °C)

➤ Διάλυμα 1x TBST

10ml TBS 10x

0,02% (v/v) Tween-20

90ml dH₂O

Το διάλυμα παρασκευάζεται πριν τη χρήση του.

➤ Αντιδραστήριο Western Blotting Luminol (ECL)

Η λουμινόλη παρέχει το υπόστρωμα στην υπεροξειδάση από αγριοράππανο (HRP), η οποία είναι συζευγμένη στο δεύτερο αντίσωμα. Το αντιδραστήριο αποτελείται από δύο διαλύματα τα οποία αναμειγνύονται σε αναλογία 1:1 λίγο πριν τη χρήση του και φυλάσσεται το σκοτάδι. Το αντιδραστήριο προέρχεται από την εταιρία *SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.*

➤ Αντιδραστήριο εμφάνισης φιλμ (Developer)

➤ Αντιδραστήριο σταθεροποίησης (Fixer)

❖ B.1.5 Υλικά

➤ Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που χρησιμοποιήθηκε κατά τη μεταφορά πρωτεϊνών ήταν της εταιρίας Applichem

➤ Blot papers

Τα χαρτάκια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την τεχνική Western Blot ήταν της εταιρίας Biorad

➤ Φιλμ

Το φιλμ που χρησιμοποιήθηκε κατά την τεχνική Western Blot ήταν το Hyperfilm ECL της εταιρίας Amersham

❖ B.1.6 Εργαστηριακός εξοπλισμός

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

- Συσκευή ομογενοποίησης Teflon
- Μηχάνημα φυγοκέντρησης
- Ρότορα
- Αναδευτήρα vortex
- Αναδευτήρα plate shaker
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE (Mini-Protean Tetra Cell [BIO-RAD])
- ELISA reader
- Ανακινούμενο υδατόλουτρο
- Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς (Συσκευή Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell [BIO-RAD])
- pH-μετρο
- Ηλεκτρονικό ζυγό
- Κασετίνα εμφάνισης φιλμ

B.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

❖ B.2.1 Απομόνωση πρωτεϊνών από ιστό

Μετά τη συλλογή των ιστών και την κατάλληλη συντήρηση τους στους -80°C , το πρώτο στάδιο της επεξεργασίας των δειγμάτων ήταν η ομογενοποίησή τους. Στη συνέχεια, ακολούθησε απομόνωση των πρωτεϊνών με τη χρήση δύο διαφορετικών μεθόδων. Πιο ειδικά, απομόνωση πρωτεϊνών με τη χρήση του αντιδραστηρίου Trizol και απομόνωση με τη χρήση «διαλύματος εκχύλισης πρωτεϊνών» (protein extraction buffer) και υγρό άζωτο.

i. Ομογενοποίηση των ιστών

Για την ομογενοποίηση του ιστού χρειάστηκαν αποστειρωμένα και παγωμένα γουδιά καθώς και υγρό άζωτο. Αμέσως μετά την ομογενοποίηση ο κονιορτοποιημένος ιστός,

τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf και διατηρούνταν στους - 80°C μέχρι την επόμενη χρήση του.

ii. Απομόνωση πρωτεϊνών με τη χρήση του αντιδραστήριου Trizol

Η τεχνική αυτή διακρίνεται σε έξι στάδια τα οποία φαίνονται παρακάτω:

➤ Λύση των κυττάρων

Σε 20mg κονιορτοποιημένου ιστού προστέθηκε 1ml από αντιδραστήριο Trizol και έπειτα με τη χρήση του Teflon έγινε λύση των κυττάρων.

➤ Απομάκρυνση του RNA

Μετά τη λύση των κυττάρων προστέθηκε χλωροφόρμιο σε αναλογία 200μl χλωροφόρμιο/ml Trizol, ούτως ώστε να επιτευχθεί απομάκρυνση του RNA. Ακολούθησε ήπια ανακίνηση και επώαση για 3min σε θερμοκρασία δωματίου (Room Temperature, RT). Έπειτα, έγινε φυγοκέντρηση για 15min, στα 12.000g και σε 4°C. Το RNA βρισκόταν στο υπερκείμενο το οποίο και αφαιρείται.

➤ Καθίζηση του DNA

Αφού είχε απομακρυνθεί από όλα τα δείγματα το RNA, προστέθηκε 100% αιθανόλη σε αναλογία 0,3ml αιθανόλη/0,75ml Trizol. Στη συνέχεια, έγινε ήπια ανάδευση και επώαση των δειγμάτων για 3min σε θερμοκρασία δωματίου.

Τέλος, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5min, στα 2.000 g και σε 4°C, έτσι ώστε να απομακρυνθεί το DNA. Το DNA έμεινε κάτω ως ίζημα και στο υπερκείμενο βρισκόταν οι πρωτεΐνες.

➤ Καθίζηση Πρωτεϊνών

Από την προηγούμενη φυγοκέντρηση οι πρωτεΐνες ήταν στο υπερκείμενο το οποίο και κρατήθηκε. Σε κάθε δείγμα προστέθηκε ακετόνη σε αναλογία 3 όγκοι ακετόνη:1 όγκος υπερκείμενο. Έγινε ήπια ανακίνηση ώστε να ομογενοποιηθεί το διάλυμα και ακολούθησε επώαση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, με φυγοκέντρηση για 10min, στα 12.000g και σε 4°C οι πρωτεΐνες παρέμειναν ως ίζημα.

➤ Καθαρισμός Πρωτεϊνών

Αφού απομακρύνθηκε το υπερκείμενο από το προηγούμενο στάδιο, έγινε διαλυτοποίηση του ιζήματος με 1ml διαλύματος καθαρισμού (Wash Solution). Ακολούθησε επώαση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 5min, στα 8.000g και σε 4°C. Αφαιρέθηκε το διάλυμα καθαρισμού, που βρισκόταν στο υπερκείμενο και ακολούθησαν άλλες τρεις πλύσεις με το ίδιο τρόπο. Μετά και την

τελευταία πλύση γυρίσαμε ανάποδα τα erpendorf για 10min, ώστε να στεγνώσει το ίζημα.

➤ Διαλυτοποίηση Πρωτεϊνών

Αφού στέγνωσε το ίζημα έγινε διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών με 400μl από το διάλυμα διαλυτοποίησης και συνεχή έντονη ανάδευση για 20min.

Μετά τη διαλυτοποίηση οι πρωτεΐνες χωρίστηκαν σε aliquots των 100μl και διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι την επόμενη χρήση τους.

iii. Απομόνωση Πρωτεϊνών με τη χρήση «διαλύματος εκχύλισης πρωτεϊνών» (protein extraction buffer) και υγρό άζωτο

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει μόνο δύο στάδια:

➤ Λύση των κυττάρων

Στη μέθοδο αυτή για την απομόνωση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε «διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών» σε αναλογία 300μl/100mg κονιορτοποιημένου ιστού. Στη συνέχεια, με τη χρήση υγρού αζώτου έγινε λύση των κυττάρων, όπου τα δείγματα πάγωναν και ξεπάγωναν περίπου 5-6 φορές.

➤ Απομόνωση των Πρωτεϊνών

Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων για 4,5h σε 4°C με συνεχή ανάδευση και έπειτα, φυγοκέντρηση σε 4°C , 15.000g για 25min. Οι πρωτεΐνες βρίσκονταν στο υπερκείμενο, το οποίο χωρίστηκε σε aliquots των 25μl, τα οποία διατηρήθηκαν στους -80°C για μετέπειτα χρήση.

❖ B.2.2 Προσδιορισμός ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης BCA

Ο προσδιορισμός ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης με το αντιδραστήριο BCA στηρίζεται κυρίως σε δύο αντιδράσεις.

Αρχικά, οι πεπτιδικοί δεσμοί των πρωτεϊνών ανάγουν τα ιόντα χαλκού, που προέρχονται από το θειικό χαλκό του αντιδραστηρίου, από Cu^{2+} σε Cu^{1+} . Η ποσότητα των ιόντων Cu^{2+} μειώνεται αναλογικά με την ποσότητα των πρωτεϊνών που βρίσκονται στο προς ανάλυση διάλυμα. Στη συνέχεια, δύο μόρια του bicinchoninic οξέος σχηματίζουν χηλική ένωση με κάθε ιόν Cu^{1+} , με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός μοβ χρώματος προϊόντος, που απορροφά έντονα φως σε μήκος κύματος 565nm.

Το σύμπλοκο bicinchoninic οξέος- Cu^{1+} ενισχύεται σε δείγματα πρωτεϊνών από την παρουσία κυστεΐνης, κυστίνης, τυροσίνης, και τρυπτοφάνης.

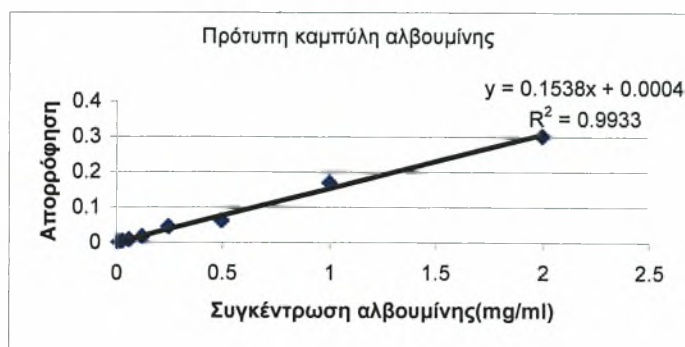
Πιο αναλυτικά, η μέθοδος αυτή βασίζεται στην κατασκευή πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιώντας την απορρόφηση, στα 570nm, διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης (πρότυπο διάλυμα). Ως πρότυπο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αλβουμίνης βοείου ορού (BSA).

Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν διαλύματα BSA γνωστής συγκέντρωσης (πίνακας B.2.2.1) με διαδοχικές αραιώσεις σε διάλυμα, στο οποίο βρίσκονται διαλυτοποιημένες οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν από τους ιστούς. Από τα πρότυπα διαλύματα, το τυφλό καθώς και από τα διαλύματα αγνώστου συγκεντρώσεως που βρίσκονται οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν από τους ιστούς, πήραμε 10μl και τα τοποθετήσαμε σε 96άρα πλάκα ELISA. Σε όλα τα πηγαδάκια που χρησιμοποιήθηκαν προστέθηκαν 200μl από το αντιδραστήριο BCA. Ακολούθησε ανακίνηση σε αναδευτήρα «plate shaker» για 30sec και έπειτα επώαση σε 37 °C για 30min. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η απορρόφηση σε ELISA reader στα 570nm. Από τις τιμές των απορροφήσεων των πρότυπων διαλυμάτων παρασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη (σχήμα B.2.2.1), η οποία είχε τη μορφή $y=ax+\beta$ και η εξίσωσή της χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των αγνώστων διαλυμάτων.

Πίνακας B.2.2.1

Πρότυπα διαλύματα	Συγκέντρωση αλβουμίνης
1	2
2	1
3	0,5
4	0,25
5	0,125
6	0,0625
7	0,03125
8	0,015625
9	τυφλό(blank)

Σχήμα Β.2.2.1



❖ B.2.3 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (PAGE) υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, κατά την οποία το φορτίο των πρωτεϊνών προκύπτει από την πρόσδεση SDS μέσω της υδρόφοβης περιοχής του. Η πηκτή σχηματίζεται κατά το συμπολιμερισμό του ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) και του N,N-μεθυλενοδιακρυλαμιδίου (bis-ακρυλαμίδιο / $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2$).

Συγκεκριμένα, δημιουργείται ένα πορώδες πλέγμα όπου το bis-ακρυλαμίδιο χρησιμοποιείται για τη δημιουργία των γεφυρών μεταξύ των πολυμερών του ακρυλαμιδίου. Ως καταλύτης της έναρξης της αντίδρασης του πολυμερισμού χρησιμοποιείται το υπερθειικό αμμώνιο (APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$), το οποίο είναι δότης ελευθέρων ριζών, ενώ ως πολλαπλασιαστής των ελευθέρων αυτών ριζών χρησιμοποιείται η N,N,N,N-τετραμεθυλοαιθυλοδιαμίνη (TEMED). Το μέγεθος των πόρων του πλέγματος είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης του μονομερούς ακρυλαμιδίου που χρησιμοποιείται.

Το SDS (δωδεκυλοθειικό νάτριο) είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό το οποίο, σε συγκέντρωση της τάξεως μmoles προσδένεται σε πρωτεΐνες και προκαλεί την αποδιάταξή τους, σχηματίζοντας σύμπλοκα SDS-πρωτεΐνης. Η ποσότητα του προσδεμένου SDS είναι ανάλογη του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης. Κάθε μόριο SDS συνεισφέρει ένα αρνητικό φορτίο στην πρωτεΐνη, εξουδετερώνοντας έτσι το ενδογενές φορτίο της. Επειδή, το φορτίο είναι ανάλογο με την επιφάνεια της πρωτεΐνης και η αντίσταση στην κίνηση είναι ανάλογη με τη διάμετρο οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σύμφωνα με το μέγεθός τους.

Για την ηλεκτροφόρηση παρασκευάστηκε πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel) 4%, η οποία είναι υπεύθυνη για τη συμπύκνωση των πρωτεϊνών, πηκτή διαχωρισμού (running gel) 10%, η οποία είναι υπεύθυνη για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών και έχει

την ικανότητα να διαχωρίζει πρωτεΐνες μεγέθους 15-100kDa. Στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης, πραγματοποιείται αρχικά για 60min ο πολυμερισμός της πηκτικής διαχωρισμού και στη συνέχεια προστίθεται η πηκτική επιστοίβαξης, η οποία πολυμερίζεται για 45min. Επιπλέον, παρασκευάσθηκε Loading buffer 1x καθώς και διάλυμα ηλεκτροφόρησης Running buffer 1x.

Πριν την ηλεκτροφόρηση έγινε αραίωση στα δείγματα των πρωτεϊνών, ούτως ώστε να βρίσκονται στο gel σε συγκέντρωση της τάξης του 1,5mg/ml. Στο gel φορτώσαμε 20μl από το κάθε δείγμα και 20μl loading buffer. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σταθερά στα 150V για 60-65min.

❖ B.2.4 Χρώση πηκτικής ακρυλαμιδίου με Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250

Η αρχή της μεθόδου αυτής στηρίζεται στη δημιουργία συμπλόκου κυανού χρώματος, μεταξύ των πρωτεϊνών και της χρωστικής CBB R-250. Προκειμένου να δημιουργηθεί το σύμπλοκο η πηκτική εμβαπτίζεται στο διάλυμα χρώσης όλο το βράδυ (over night). Με το διάλυμα αυτό συγχρόνως γίνεται στερέωση των πρωτεϊνικών ζωνών στην πηκτική. Για τον αποχρωματισμό της, η πηκτική εμβαπτίζεται σε διάλυμα αποχρωματισμού για αρκετές ώρες. Με τη χρήση της μεθόδου αυτής είναι ικανή η ανίχνευση μέχρι και 0,1μg πρωτεΐνης.

❖ B.2.5 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης- Ανοσοαποτύπωμα Western (Western blotting)

Η μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτική πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού στις πρωτεΐνες της πηκτικής. Οι πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν αρνητικό φορτίο λόγω της σύνδεσής τους με το SDS, υπό την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την άνοδο. Έτσι, μεταφέρονται διαμέσου της πηκτικής και καθλώνονται στο πλέγμα της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, με τη βοήθεια υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των καθηλωμένων πρωτεϊνών με τη χρήση κατάλληλων πολυκλωνικών ή μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Αρχικά μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ίδιων διαστάσεων με την πηκτική πολυακρυλαμιδίου, εμβαπτίζεται σε διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer) για 20min, στο ίδιο διάλυμα εμβαπτίζονται επίσης για 15min 2 blot papers. Στην πηκτική πολυακρυλαμιδίου γίνονται 3 πλύσεις των 3min με Transfer buffer. Στη συνέχεια

συναρμολογείται η διάταξη της μεταφοράς που αποτελείται κατά σειρά από: 1 blot paper-μεμβράνη νιτροκυτταρίνης-πηκτική πολυακρυλαμίδιου-1 blot paper.

Η διάταξη αυτή τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς, με τέτοιο τρόπο ώστε η μεμβράνη να βρίσκεται προς την πλευρά της ανόδου. Η μεταφορά γίνεται στα 60V για 45min.

Μετά το τέλος της μεταφοράς, η μεμβράνη επωάζεται σε διάλυμα μη-ειδικής δέσμευσης πρωτεϊνών (Blocking Buffer) για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, η μεμβράνη επωάζεται με το πρωτεύον αντίσωμα (Pab 240), το οποίο προστίθεται σε διάλυμα μη-ειδικής δέσμευσης πρωτεϊνών (Blocking Buffer) σε αναλογία 1:2.000 ολονύκτια (over night) στους 4° C. Την επόμενη μέρα ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης των 3min με διάλυμα 1x TBST. Έπειτα γίνεται επώαση με το δεύτερο αντίσωμα, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το δεύτερο αντίσωμα, αναγνωρίζει και δεσμεύει τις ανοσοσφαιρίνες IgG του πρώτου αντισώματος, και είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση από αγριοράππανο (HRP). Στη συνέχεια, ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης των 3min με διάλυμα 1x TBST.

Οι υπόλοιπες διεργασίες γίνονται στο σκοτάδι.

- Μετά το τέλος των πλύσεων γίνεται επώαση της μεμβράνη με διάλυμα ECL σε θερμοκρασία δωματίου για 2min. Στο σημείο αυτό, το ένζυμο HRP, που είναι συζευγμένο με το δεύτερο αντίσωμα, καταλύει την οξειδωση του υποστρώματος της λουμινόλης από H_2O_2 προς ένα ενδιάμεσο παράγοντα, που περιέχει ένα τριπλό διεγερμένο καρβονύλιο το οποίο κατά τη μετάπτωση του σε μονό εκλύει φως. Το φως αυτό καταγράφεται στο φιλμ. Στη συνέχεια, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης τοποθετείται σε διαφανή μεμβράνη και έπειτα στην κασετίνα εμφάνισης. Πάνω από τη μεμβράνη τοποθετείται το φιλμ ίδιου μεγέθους με τη μεμβράνη. Ακολουθεί έκθεση συνήθως για 60sec (εξαρτάται από τις πειραματικές συνθήκες) και έπειτα εμφάνιση. Η εμφάνιση γίνεται αρχικά στο διάλυμα εμφάνισης (Developer) μέχρι να εμφανιστούν ταινίες και τέλος στο διάλυμα σταθεροποίησης (Fixer). Το φιλμ δεν επηρεάζεται πλέον από το φως.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1 Απομόνωση πρωτεϊνών από ιστό (μέθοδος 1)

❖ Γ.1.1 Απομόνωση πρωτεϊνών από ιστό με τη χρήση του αντιδραστηρίου Trizol

Το πρώτο βήμα της όλης πειραματική διαδικασίας, ήταν η επιτυχής απομόνωση πρωτεϊνών από καρκινικό καθώς και από παρακείμενο μη καρκινικό πνευμονικό ιστό. Αρχικά εφαρμόστηκε η μέθοδος απομόνωσης με τη χρήση του αντιδραστηρίου Trizol. Κατά τη μέθοδο αυτή έγινε απομόνωση πρωτεϊνών, συνολικά από 16 δείγματα, 8 δείγματα καρκινικού ιστού και τα αντίστοιχά τους (8) από μη καρκινικό ιστό.

❖ Γ.1.2 Προσδιορισμός ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης-Μέθοδος BCA

Το επόμενο βήμα μετά την απομόνωση των πρωτεϊνών ήταν ο προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης που είχε το κάθε δείγμα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε, η μέθοδος BCA. Με τη χρήση διαλύματος αλβουμίνης βοείου ορού (BSA), ως πρότυπο διάλυμα, δημιουργήθηκε μία πρότυπη καμπύλη σύμφωνα με την οποία υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης και στα 16 δείγματα. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω (πίνακας Γ.1.2):

Πίνακας Γ.1.2 Η ένδειξη C αναφέρεται στα καρκινικά δείγματα, ενώ η ένδειξη NC στα μη καρκινικά

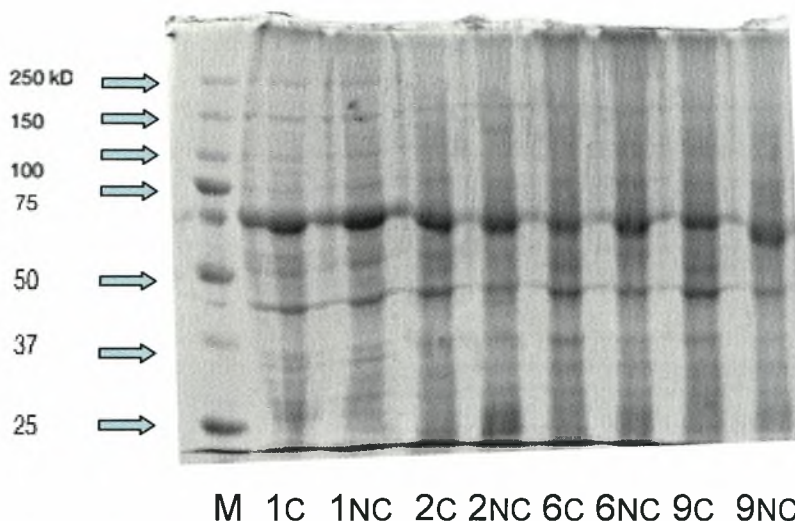
ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΔΕΙΓΜΑ	ΟΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ(mg/ml)
1	1C	5,3
2	1NC	3,8
3	2C	2,5
4	2NC	2,1
5	6C	3,4
6	6NC	5,3
7	9C	4
8	9NC	8,5
9	10C	6,1
10	10NC	6,2

11	11C	4,8
12	11NC	3,5
13	19C	4,1
14	19NC	5,6
15	20C	2,4
16	20NC	3,3

❖ Γ.1.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-PAGE

Στη συνέχεια, έγινε αραίωση των δειγμάτων ούτως ώστε το κάθε δείγμα να έχει τελική συγκέντρωση 1,5mg/ml. Ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση σε 10% πηκτή SDS-PAGE. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή τοποθετήθηκε ολονύκτια (over night) σε διάλυμα χρώσης Coomassie Brilliant Blue (CBB) R250. Την επόμενη μέρα η πηκτή τοποθετήθηκε σε διάλυμα αποχρωματισμού τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω (εικόνα Γ.1.3.α):

Εικόνα Γ.1.3.α



Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε gel 10%. Η ένδειξη (M) αναφέρεται στο μάρτυρα μοριακών βαρών και οι ενδείξεις (C) στα καρκινικά δείγματα, ενώ οι ενδείξεις (NC) στα μη καρκινικά δείγματα.

❖ Γ.1.4 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης- Ανοσοαποτύπωμα Western (Western blotting)

Προκειμένου να ελεγχθεί η έκφραση της πρωτεΐνης p53 στα δείγματα μας πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωμα Western Blot, κατά το οποίο έγινε μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή SDS-PAGE σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Ακολούθησε επώαση με το αντίσωμα Pab 240, το οποίο είναι ειδικό για την πρωτεΐνη p53. Από την ανάλυση αυτή δεν πήραμε αποτελέσματα.

Γ.2 Απομόνωση πρωτεϊνών (μέθοδος 2)

❖ Γ.2.1 Απομόνωση πρωτεϊνών με τη χρήση «διαλύματος εκχύλισης πρωτεϊνών» (protein extraction buffer) και υγρού αζώτου

Από την προηγούμενη ανάλυση δεν πήραμε τα επιθυμητά αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό κρίθηκε απαραίτητο να αλλάξει η μέθοδος απομόνωσης.

Κατά τη νέα μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν 20 δείγματα, 10 από καρκινικό πνευμονικό ιστό και τα αντίστοιχα (10) από παρακείμενο μη καρκινικό πνευμονικό ιστό

❖ Γ.2.2 . Προσδιορισμός ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης-Μέθοδος BCA

Έπειτα από την απομόνωση των πρωτεϊνών, ακολούθησε προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA. Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αλβουμίνης βοείου ορού (BSA) γνωστής συγκέντρωσης. Σύμφωνα με την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης υπολογίστηκε η ολική συγκέντρωση των δειγμάτων σε πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα Γ.2.2.

Πίνακας Γ.2.2 Η ένδειξη C αναφέρεται στα καρκινικά δείγματα, ενώ η ένδειξη NC στα μη καρκινικά

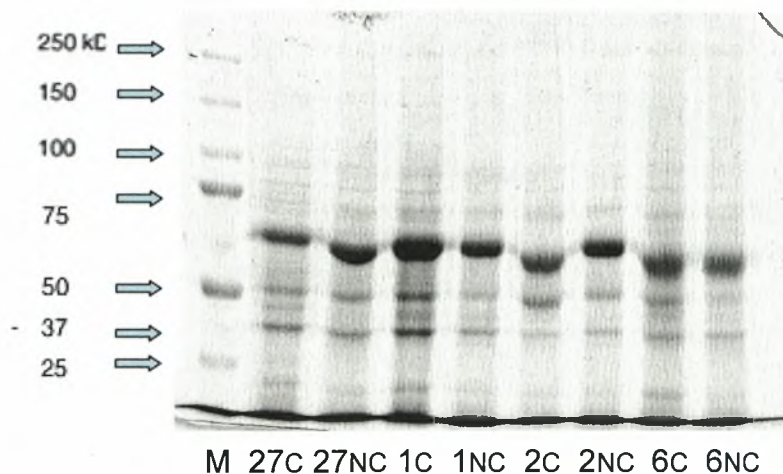
ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΔΕΙΓΜΑ	ΟΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ(mg/ml)
1	1C	25.6
2	1NC	25
3	2C	19.1
4	2NC	22.5
5	6C	12.6
6	6NC	18.62
7	9C	20.1
8	9NC	23.6
9	10C	22.2

10	10NC	13.4
11	11C	18.6
12	11NC	17.2
13	13C	22.3
14	13NC	24.6
15	19C	18.1
16	19NC	14.9
17	24C	15
18	24NC	22
19	27C	17
20	27NC	18.5

❖ Γ.2.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-PAGE

Για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών, έγινε αραιώση των δειγμάτων έτσι ώστε το κάθε δείγμα να έχει τελική συγκέντρωση 1,5mg/ml. Στη συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε 10% πηκτή SDS-PAGE. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή τοποθετήθηκε ολονύκτια (over night) σε διάλυμα χρώσης Coomassie Brilliant Blue (CBB) R250. Την επόμενη μέρα η πηκτή τοποθετήθηκε σε διάλυμα αποχρωματισμού τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω (εικόνα Γ.2.3.α):

Εικόνα Γ.2.3.α

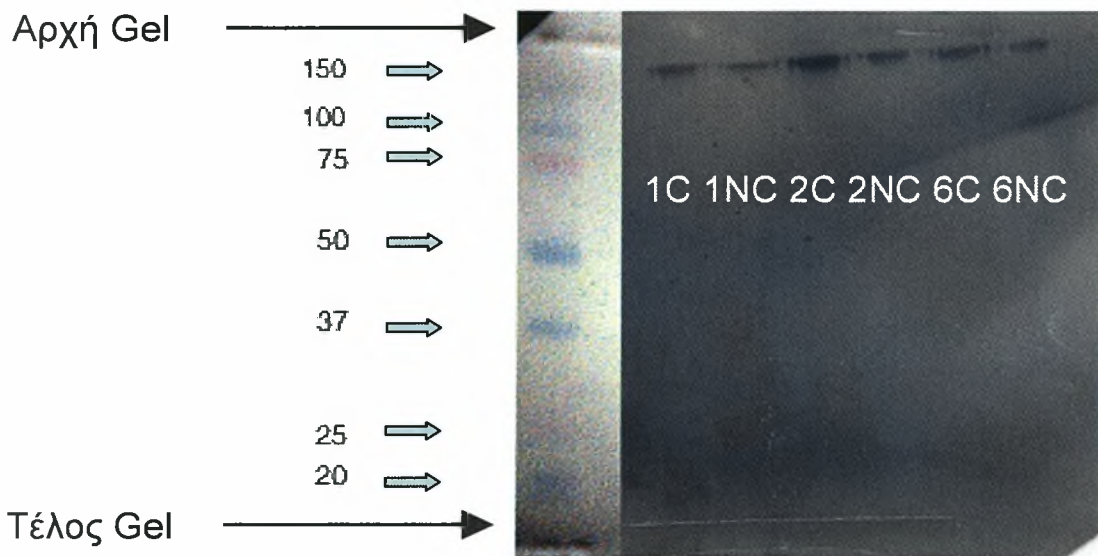


Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε gel 10%. Η ένδειξη (M) αναφέρεται στο μάρτυρα μοριακών βαρών και οι ενδείξεις (C) στα καρκινικά δείγματα, ενώ οι ενδείξεις (NC) στα μη καρκινικά δείγματα

❖ Γ.2.4 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης- Ανοσοαποτύπωμα Western (Western blotting)

Προκειμένου να ελεγχθεί η έκφραση της πρωτεΐνης p53 στα δείγματα μας πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωμα Western Blot, κατά το οποίο έγινε μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτική SDS-PAGE σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης. Ακολούθησε επώαση με το αντίσωμα Pab 240, το οποίο είναι ειδικό για την πρωτεΐνη p53. Αρχικά παρατηρήθηκαν ταινίες πάνω από 150kD (εικόνα Γ.2.4.α), για το λόγο αυτό πριν την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών έγινε μία επιπλέον φυγοκέντρηση για 15 min, στα 18.000g και σε 4 °C (εικόνες Γ.2.4.β και Γ.2.4.γ). Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω:

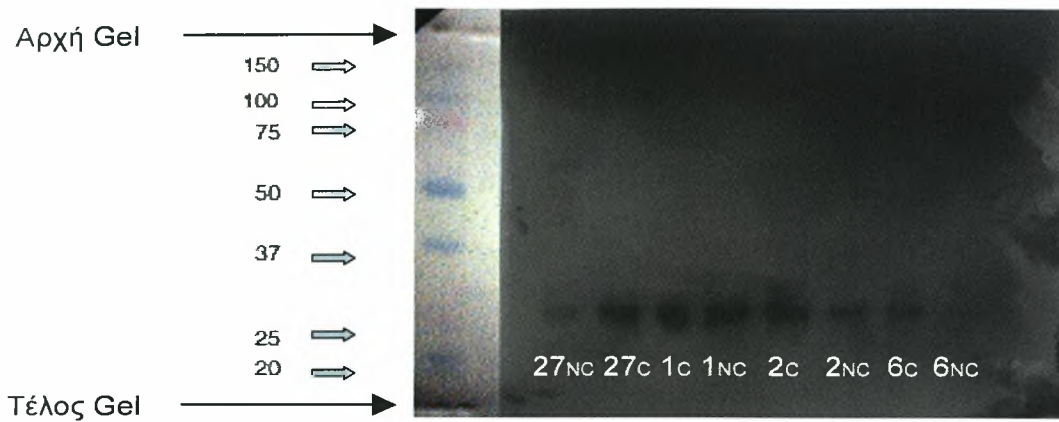
Εικόνα Γ.2.4.α



Έκθεση του φιλμ για 60' : Παρατηρούνται ταινίες πάνω από 150 kD.

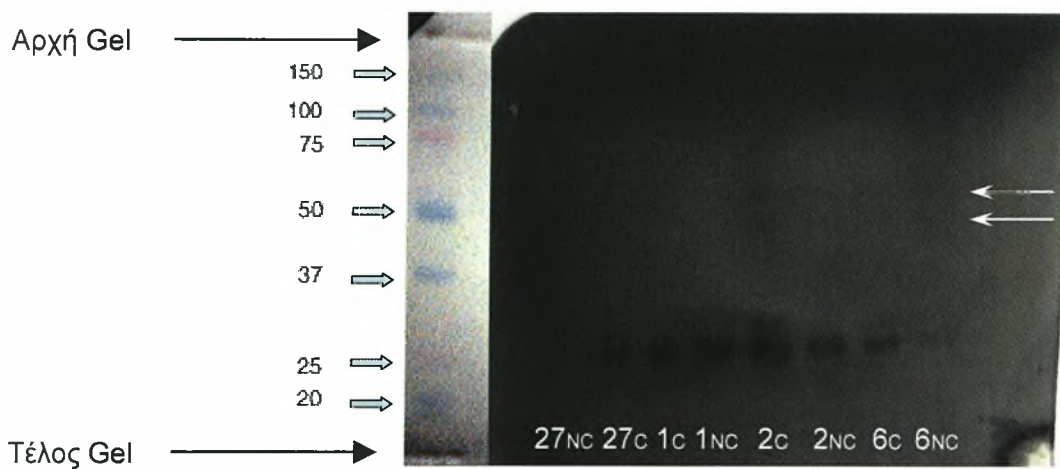
Η ένδειξη C αναφέρεται στα καρκινικά δείγματα, ενώ η ένδειξη NC στα μη καρκινικά

Εικόνα Γ.2.4.β



Έκθεση του φιλμ για 60sec : Παρατηρούνται ταινίες στα 25 kD. Στα δείγματα αυτά έχει γίνει επιπλέον φυγοκέντρωση. Η ένδειξη C αναφέρεται στα καρκινικά δείγματα, ενώ η ένδειξη NC στα μη καρκινικά

Εικόνα Γ.2.4.γ



Έκθεση του φιλμ για 90sec : Παρατηρούνται ταινίες στα 25 kD και στα ~50 kD . Στα δείγματα αυτά έχει γίνει επιπλέον φυγοκέντρωση. Η ένδειξη C αναφέρεται στα καρκινικά δείγματα, ενώ η ένδειξη NC στα μη καρκινικά

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, μοριακού βάρους 53kD, είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας με σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και παράγεται έπειτα από βλάβη στο DNA. Απώλεια της δραστικότητας της φυσιολογικής πρωτεΐνης p53, έχει βρεθεί σε μεγάλο ποσοστό των ανθρώπινων καρκίνων. Αυτό συμβαίνει γιατί τα γονίδια-στόχοι της πρωτεΐνης δε μεταγράφονται, με αποτέλεσμα η αντιγραφή να μην καταστέλλεται από την εύρεση βλάβης στο DNA. Τελικό αποτέλεσμα είναι να μην επάγεται η απόπτωση και έτσι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός να καθίσταται ανεξέλεγκτος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, συσχέτισης της πρωτεΐνης p53 με την εμφάνιση καρκίνου, αποτελεί ο καρκίνος του πνεύμονα όπου, μεταλλάξεις στο γονίδιο p53 βρέθηκαν σε ποσοστό 33% στα αδενοκαρκινώματα και 77% στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι κυρίως μεταβάσεις τύπου GC>AT και σχετίζονται με το κάπνισμα.

Σκοπός της παρούσης διπλωματικής εργασίας ήταν η επιτυχής απομόνωση πρωτεϊνών από καρκινικό και παρακείμενο μη-καρκινικό ιστό πνεύμονα, καθώς και η μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 στα δείγματα αυτά.

Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκαν δύο μέθοδοι απομόνωσης των πρωτεϊνών.

Κατά την πρώτη μέθοδο έγινε απομόνωση πρωτεϊνών σε 16 δείγματα, 8 από καρκινικό ιστό και τα αντίστοιχα 8 από παρακείμενο μη καρκινικό ιστό με τη χρήση του αντιδραστηρίου Trizol. Ο προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών των δειγμάτων έγινε με τη χρήση του αντιδραστηρίου BCA. Η μέση συγκέντρωση πρωτεΐνης των δειγμάτων κυμαίνονταν στα 4.5mg/ml. Στη συνέχεια, έγινε αραίωση στα δείγματα ούτως ώστε κάθε δείγμα να έχει τελική συγκέντρωση πρωτεϊνών 1,5mg/ml. Οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορήθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε 10%gel, τα αποτελέσματα της οποίας ήταν ικανοποιητικά. Το επόμενο βήμα ήταν η ανίχνευση της πρωτεΐνης p53 με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης- Western blot, έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης τόσο στα καρκινικά όσο και στα μη καρκινικά δείγματα. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεύον αντίσωμα το Pab 240, το οποίο αναγνωρίζει ειδικά τα αμινοξέα 156-144 που βρίσκονται στην «κεντρική περιοχή πρόσδεσης του DNA» στην ανθρώπινη p53 πρωτεΐνη. Το δεύτερο αντίσωμα, αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες IgG του πρώτου

αντισώματος και είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP, το οποίο κατά την οξείδωση του υποστρώματος της λουμινόλης εκλύει φως όπου αποτυπώνεται σε φιλμ. Από τη μέθοδο αυτή δεν πήραμε αποτελέσματα. Αφού έγινε έλεγχος σε όλες τις παραμέτρους της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης- Western blot και τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι κατά την απομόνωση των πρωτεϊνών χάνεται μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης, για το λόγο αυτό καθίσταται δύσκολη η ανίχνευσή της p53. Κρίθηκε επομένως απαραίτητο να εφαρμοστεί και μία καινούρια μέθοδος απομόνωσης πρωτεϊνών.

Κατά τη νέα μέθοδο έγινε απομόνωση πρωτεϊνών σε 20 δείγματα, 10 από καρκινικό ιστό και τα 10 αντίστοιχα από παρακείμενο μη-καρκινικό ιστό. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκε ένα διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών καθώς και υγρό άζωτο για τη λύση των κυττάρων. Με τη χρήση του αντιδραστηρίου BCA έγινε προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα δείγματα. Μελετώντας τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό, βρέθηκε ότι η μέση συγκέντρωση των δειγμάτων σε ολική πρωτεΐνη κυμαίνονταν κοντά στα 19,5mg/ml. Το επόμενο βήμα περιελάμβανε την αραίωση των δειγμάτων, έτσι ώστε να έχουν τελική συγκέντρωση 1,5mg/ml, και έπειτα την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE των πρωτεϊνών σε 10%gel. Τα αποτελέσματα από τη χρώση του gel με Coomassie Brilliant Blue (CBB) R250 ήταν αρκετά ικανοποιητικά. Το τελευταίο στάδιο αφορούσε την επιτυχή ανίχνευση της πρωτεΐνης p53 στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τα δείγματά μας, με στόχο τη μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 σε καρκινικό και παρακείμενο μη-καρκινικό ιστό πνεύμονα. Για το σκοπό έγινε ανοσοαποτύπωση-Western blot χρησιμοποιώντας το ίδια αντισώματα (πρωτεύον αντίσωμα Pab 240 και δεύτερο αντίσωμα με συζευγμένο το ένζυμο HRP). Τα πρώτα αποτελέσματα παρουσίασαν στο φιλμ πολύ έντονες ταινίες πάνω από τα 150kD. Τα αποτελέσματα αυτά δεν ήταν τα αναμενόμενα εφόσον η πρωτεΐνη p53 έχει μοριακό βάρος 53kD. Επομένως, θεωρήθηκε ότι η πρωτεΐνη βρίσκεται σε σύμπλοκα τα οποία δεν έχουν διαλυθεί ούτε κατά τη διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε μία επιπλέον φυγοκέντρηση των εκχυλισμάτων πριν την ηλεκτροφόρηση. Τα αποτελέσματα παρουσίασαν έντονες ταινίες στα 25kD, αλλά και αχνές ταινίες κοντά στα 53kD. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι στα 25kD βρίσκονται οι ισομορφές Δ133p53β και Δ133p53γ.⁽²⁴⁾ Επίσης, σε κάποια ζεύγη καρκινικών-μη καρκινικών δειγμάτων ήταν εμφανής η διαφορά του σήματος. Συγκεκριμένα, στα καρκινικά δείγματα το σήμα ήταν πιο έντονο από τα αντίστοιχα μη-καρκινικά.

Αυτό προκύπτει έχοντας λάβει υπόψη ότι όλα τα δείγματα πριν την ηλεκτροφόρηση είχαν τελική συγκέντρωση 1,5mg/ml. Επομένως, οι διαφορές στην ένταση του σήματος δεν οφείλονται σε διαφορές στη συγκέντρωση, αλλά πιθανώς σε διαφορές στην έκφραση του πρωτεϊνικού προϊόντος.

Συνοψίζοντας, έχοντας μελετήσει δύο μεθόδους απομόνωσης πρωτεϊνών καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι κατά τη δεύτερη μέθοδο τα αποτελέσματα ήταν πιο ικανοποιητικά εφόσον κατά τον προσδιορισμό της ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης, οι συγκεντρώσεις ήταν εμφανώς μεγαλύτερες αλλά και καταφέραμε να ανιχνεύσουμε την πρωτεΐνη p53 που ήταν και ο τελικός στόχος. Όσο αναφορά τη μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 σε καρκινικό και παρακείμενο μη-καρκινικό ιστό παρατηρήθηκε ότι πιθανώς να εκφράζονται οι ισομορφές Δ133p53β και Δ133p53γ. Η έκφραση αυτή φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στον καρκινικό ιστό. Η άποψη αυτή ενισχύεται και από άλλες μελέτες που έχουν δείξει ότι οι ισομορφές Δ133p53β και Δ133p53γ αναστέλλουν τη δράση της φυσιολογικής p53 και κυρίως όσο αναφορά το ρόλο της στην απόπτωση.⁽²³⁾

Κλείνοντας, θα πρέπει να σημειωθεί ότι έχει κριθεί απαραίτητο και είναι μελλοντικός στόχος του εργαστηρίου η πιο εκτεταμένη έρευνα που θα περιλαμβάνει περισσότερα δείγματα καρκινικού και μη-καρκινικού ιστού, αλλά και θα βελτιώσει τόσο τη μέθοδο απομόνωσης, όσο και τη μέθοδο ανίχνευσης της πρωτεΐνης ούτως ώστε τα αποτελέσματα να είναι περισσότερο αξιόπιστα.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας –Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία του Κυττάρου. Alberts-Bray-Johnson-Lewis-Raff-Roberts-Walter. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ 2000
2. Hartwell. L.H and Weinert, T.A – Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246,629-34 (1989)
3. Βιολογία του Καρκίνου. Ε.ΚΙΤΡΑΚΗ-Κ.ΤΡΟΥΓΚΟΣ . Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ 1999
4. GENES VIII . Lewin τόμος Β Ελληνική έκδοση 2004
5. Vineis P, Porta M. Causal thinking, biomarkers, and mechanisms of carcinogenesis. *J Clin Epidemiol* 1996;49:951
6. Soussi, T., Asselain, B., Hamroun, D., Kato, S., Ishioka, C., Clausters, M. and Beroud, C (2006) Meta –analysis of the p53 mutation database for mutant p53 biological activity reveals a methodologic bias in mutation detection. *Clin.Cancer.Res*, 12,62-69
7. R.Ribeiro et al –A functional polymorphism in the promoter region of leptin gene increases susceptibility for non-small lung cancer. *European Journal of Cancer*, 42,1(2006),17-23
8. Yi-Wen Chu et al. Selection of invasive and metastatic subpopulations from a human lung adenocarcinoma cell line. *Amer. J. Respir. Cell Mol. Biol.*,(1997) Vol. 17, No 3
9. Y. Sekido, KM. Fong, JD Minna. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim. Biophys. Acta* (1998); 1378:21-59.
10. J. H. Schiller, D. Harrington, CP. Belani. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small cell lung cancer. *New Engl. J. Med* (2002); 346: 92-98.
11. N. Jafri, R. Salgia. Biology and novel therapeutics for neuroendocrine tumors of the lung. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*(2004)
12. R. Dammann et al. CpG island methylation and expression of tumour-associated genes in lung carcinoma. *European Journal of Cancer*, 41 (2005), 1223-1236.
13. X. Wu, H. Zhao, R. Suk and D. Christiani. Genetic susceptibility to tobacco-related cancer. *Oncogene* (2004) 23, 6500-6523.

14. Travis WD, Travis LB, DeVessa SS. 1995 Lung Cancer. *Cancer* 75:191-202
15. Sinichi Toyooka, Toshihide Tsuda, and Adi F Gazdar. The TP53 Gene, Tobacco Exposure, and Lung Cancer. *Human Mutation* 21:229-239(2003)
16. Trichopoulos D. Risk of lung cancer and passive smoking. *Important Advances in Oncology* 1995:77-85.
17. Tridaniel J., Boeffetta P., Saracci R., Hirsch A.. Environmental tobacco smoke and the risk of cancer in adults. *European Journal of Cancer* 1993, 29A: 2058-68.
18. <http://www.oncologychannel.com/lungcancer/enironmental.shtml>
19. p53-Mdm2 the affair that never ends –*Carcinogenesis* 2002
20. Cell cycle checkpoint signalling through the ATM and ATR kinases- *Genes and Development*, 2001
21. p53 from complexity to simplicity mutant p53 stabilization, gain-of[function and dominant-negative effect.-*FASEB J.*, 2000
22. p53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence- specific and non-sequence specific DNA binding- *Carcinogenesis* 2001
23. J-C Bourdon p53 and its isoforms in cancer-*British Journal of Cancer* (2007) 97, 227-282
24. J-C Bourdon, Kenneth Fernandes, Fiona Murray-Zmijewski, Geng Liu, Alexandra Diot, Dimitris P. Xirodimas, Mark k. Saville, and David P.Lane p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity-*Genes and Development*, 19:2122-2137 (2005)
25. Alea A. Mills p53:link to the past, bridge to the future-*Genes and Development*, 19:2091-2099 (2005)
26. Oren., M. (1999) Regulation of the p53 tumor suppressor Protein *J.Biol.Chem*
27. De Leo et al. 1979, Kress et al. 1979 ; Lane and Crawford 1979 ; Linzer and Levine 1979 ; Melero et al. 1979
28. Oren. M. 2003 Decision making by p53 : life, death and cancer- *Cell Death Differ* 1:431-422
29. Stratton MR : The p53 gene in human cancer *Europea Journal of Cancer*. 28:290,1992

30. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan J-C, Valent A, Minty A, Chalton P, Lelias L, M Dumont X et al. 1997 – Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers
31. Soussi T, Bérout C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2001 ; 1 :233-24.
32. Kol.J Prives C : p53 Puzzle and Paradigm- *Genes and Development* 10:1054-1072,1996
33. Strachan T., Read AB.,: "Cancer Genetics". *Human Molecular Genetics*; Vol: 2, Ch 18, 1999.
34. Soussi T: "The p53 tumor suppressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer". *Mol. Med. Today*; Vol: 2, 32-37, 2000.
35. Soussi T and Bérout, C. Significance of TP53 mutations in human cancer: A critical analysis of mutations at CpG dinucleotides. *Hum. Mutat.* 21, 2003; 192-200.
36. Linda J., Ko and Carol Prives: "p53: puzzle and paradime". *Genes and Development*; Vol: 10, 1054-1072, 1996.
37. Hainaut P. The tumor suppressor protein p53: a receptor to genotoxic stress that controls cell growth and survival. *Curr Opin Oncol*. 1995 Jan; 7(1):76-82. Review.
38. J-C Bourdon , Deguin-Chambon V, Lelong JC, Dessen P, May P, Debuire B, May E (1997) Further characterisation of the p53 responsive element-identification of new candidate gene for trans-activation by p53. *Oncogene* 14:85-94
39. Flaman, J.-M. , Waridel, F., Estreicher, A., Vannier, A., Limacher, J.-M., Gilbert, D., Iggo, R, and Frebourg, T.1996 The human tumor suppressor gene p53 is alternatively spliced in normal cells. *Oncogene* 12:813-818
40. Ghosh, A., Stewart, D., and Matlashewski, G. 2004. Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. *Mol.Cell.Biol.*24:7987-7997
41. Zhu, J., Zhou, W., Jiang, J., AND Chen, X . 1998. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for mediating apoptosis. *J.Biol.Chem.* 273:13030-13036
42. Harms, K.L. and Chen, X.2005. The C terminus of p53 family proteins is a cell fate determinant. *Mol. Cell. Biol.*25:2014-2030

43. Midgley CA, Owens B, Briscoe CV, Thomas DB, Lane DP, Hall PA (1995) – Coupling between gamma irradiation, p53 induction and the apoptosis response depends upon cell type in vivo. *J Cell Sci.* 108:1843-1848
44. Bouvard V, Zaitchouk T, Vacher M, Duthu A, Canivet M, Choisy-Rossi C, Nieruchalski M, May E (2000) Tissue and cell specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2, and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice. *Oncogene* 19:649-660
45. Fei P, Bernhard EJ, El-Deiry WS (2002) Tissue specific induction of p53 targets in vivo. *Cancer Res* 62:7316-7327
46. Lane DP. The regulation of p53 function: Steiner Award Lecture. *Int J Cancer.* 1994 Jun 1; 57(5):623-7. Review.
47. Zakian VA: "Telomeres: beginning to understand the end". *Science*; Vol: 270, 1601-1607, 1995.
48. Oliff A., Gibbs JB., McCormick F: "New molecular targets for cancer therapy". *Scientific American*; Vol: 275, 110-115, 1996.
49. Santarosa M., Ashworth A: "Haploinsufficiency for tumor suppressor genes: when you don't need to go all the way" *Biochim et Biophys Acta*; Vol: 1654, 105-122, 2004.
50. Frebourg T, Abel A, Bonaiti-Pellie C, Brugières L, Berthet P, Bressac-de Paillerets B, Chevrier A, Chompret A, Cohen-Haguénauer O, Delattre O, Feingold J, Feunteun J, Frappaz D, Fricker JP, Gesta P, Jonveaux P, Kalifa C, Lasset C, Leheup B, Limacher JM, Longy M, Noques C, Oppenheim D, Sommelet D, Soubrier F, Stoll C, Stoppa-Lyonnet D, Tristant H. Li-Fraumeni syndrome: update, new data and guidelines for clinical management. *Bull Cancer.* 2001 Jun;88(6):581-7. Review.

