



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ : ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ν. Ι. ΑΓΝΑΝΤΗ

ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟ ΚΑΙ ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

«Ο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ» - ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ν. ΠΑΝΔΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ ΜΗΝΥΜΑΤΟΣ  
ΤΟΥ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΟΥ *c-myc*  
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΠΟΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΟΥ  
*c-myc* ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΟΥΪΖΑ Γ. ΜΑΧΑΪΡΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2006



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32 άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».



**Αίτηση εκπόνησης της Διδακτορικής Διατριβής: 4-6-1999**

**Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: συν.αρ.390<sup>α</sup>/12-10-1999**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

1. Αγνάτη Νίκη, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, επιβλέπουσα
2. Πανδής Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστημίου Lund Σουηδίας, μέλος
3. Τζαβάρας Θεόδωρος, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος

**Ορισμός θέματος: 16-11-1999**

**ΑΝΑΣΥΣΤΑΣΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:**

συν.αρ.395<sup>α</sup>/21-12-1999

Αντικατάσταση του κ.Τζαβάρα Θεόδωρου, Επίκουρου Καθηγητή Βιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλους, από την κ. Σύρρου Μαρίκα, Επίκουρη Καθηγήτριας Γενικής Βιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

**Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: συν.αρ.573<sup>α</sup>/7-2-2006**

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. Αγνάτη Νίκη, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων, επιβλέπουσα
2. Ευαγγέλου Άγγελος, Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος
3. Καππός Άγγελος, Καθηγητής Χειρουργικής, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος
4. Γεωργίου Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής – Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος
5. Στεφάνου Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος
6. Μπατιστάτου Άννα, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος
7. Σύρρου Μαρίκα, Επίκουρη Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας – Ιατρικής Γενετικής, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος

**Κατάθεση Διδακτορικής Διατριβής: 15-3-2006**

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

Επαμεινώνδας Τσιάνος, Καθηγητής Παθολογίας

**Βαθμός Διδακτορικής Διατριβής: ΑΡΙΣΤΑ**

**ΓΡΑΜΜΑΤΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

Ευαγγελία Τσαγγαλά

COPY



# Στη Νανά μου



## Σύνθεση της Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

### **Αγνάντη Ι. Νίκη**

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων  
Πρόεδρος Τμήματος  
Επιβλέπουσα

### **Καππιάς Άγγελος**

Καθηγητής Χειρουργικής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων  
Μέλος

### **Ευαγγέλου Άγγελος**

Καθηγητής Φυσιολογίας  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων  
Μέλος

### **Στεφάνου Δημήτριος**

Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων  
Μέλος

### **Γεωργίου Ιωάννης**

Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων  
Μέλος

### **Μπατιστάτου Άννα**

Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων  
Μέλος

### **Μ. Σύρου**

Επίκουρος Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



## Σύνθεση της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

### N. Ι. Αγγάντη

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής

Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Πρόεδρος Τμήματος

Επιβλέπουσα

### N. Πανδής

Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής του Παν/ου της Lund

Διευθυντής του Εργαστηρίου Γενετικής του Αντικαρκινικού

Ογκολογικού Νοσοκομείου Αθηνών «Ο Άγιος Σάββας»

### M. Σύρου

Επίκουρος Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας

Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της διατριβής αυτής έγινε με τη συνεργασία των παρακάτω τμημάτων:

- Μορφολογικός – Κλινικοεργαστηριακός Τομέας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
- Τμήμα Γενετικής, Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών «ο Άγιος Σάββας».
- Κέντρο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου, Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών «ο Άγιος Σάββας».

Ολοκληρώνοντας αυτή την εργασία θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου σε όλους εκείνους που συνετέλεσαν στην πραγματοποίησή της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Πρόεδρο της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Κα Νίκη Αγνάντη, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής και Πρόεδρο της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την καθοριστική της συμβολή στην διεξαγωγή και περάτωση της παρούσας διατριβής. Την ανάθεση του θέματος, τις εποικοδομητικές συμβουλές της σε όλη τη διάρκεια της διατριβής και την κατανόηση της σε όλα τα προβλήματα μίας μακρόχρονης μελέτης. Από τους πρωτοπόρους της μελέτης του καρκίνου του μαστού στη χώρα μας, με την ευρυμάθεια και την πλατύτητα αντίληψης που τη διακρίνει σε συνδυασμό με την ευγένειά της υπήρξε ενθαρρυντικός και ουσιαστικός παράγοντας για την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής. Οι διεθνούς επιπέδου δημοσιεύσεις της, τόσο στην παθολογοανατομική θεώρηση του καρκίνου του μαστού όσο και στη βιολογική θεώρηση αυτού, και οι



προφορικές της υποδείξεις ήταν πολύτιμες σε όλη την πορεία της ερευνητικής αυτής εργασίας.

Τον Δρ Ν Πανδή, Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής του Παν/ου της Lund και μέλους της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, που μου έδωσε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω αυτή τη διατριβή στο εργαστήριο της Γενετικής του Ογκολογικού Νοσοκομείου «ο Άγιος Σάββας», το οποίο διευθύνει. Μου παρείχε δείγματα πρωτοπαθών καρκινωμάτων μαστού χαρακτηρισμένα ιστοπαθολογικά και γενετικά από την συνεργασία του με το Πανεπιστήμιο Odense της Δανίας και το Radium Hospital του Όσλο της Νορβηγίας. Με την εμπειρία και τις γνώσεις του στην Ογκολογική Γενετική με βοήθησε σε κρίσιμα ζητήματα και συνέβαλε με τον τρόπο αυτό στην ολοκλήρωση της διατριβής αυτής.

Τη Δρ Μ Σύρου, Επίκουρο Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τρίτο μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής, για τις εποικοδομητικές συμβουλές της.

Τον Δρ Μ. Παπαμιχαήλ, διευθυντή του «Κέντρου Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου» του Ογκολογικού Νοσοκομείου «ο Άγιος Σάββας», που μου επέτρεψε να πραγματοποιήσω ένα κομμάτι της ερευνητικής εργασίας μου στο τμήμα του, στα πλαίσια του Ερευνητικού Προγράμματος για την παραγωγή εμβολίων κατά του καρκίνου, χρηματοδοτούμενου από το Γ'ΚΠΣ με κωδικό ΟΠΣ 59605 και για το συνεχές ενδιαφέρον του.

Θα ήθελα ξεχωριστά, να ευχαριστήσω τον Δρ Π. Ιωαννίδη, ερευνητή στο Εργαστήριο Γενετικής του Ογκολογικού Νοσοκομείου «ο Άγιος Σάββας», για την ουσιαστική του συμβολή και τις ατέλειωτες ώρες που ήταν δίπλα μου, ακούραστος, να δίνει πρωτότυπες ιδέες και να καθοδηγεί τόσο στο θεωρητικό όσο και στο τεχνικό μέρος της δουλειάς μου. Τον ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθειά του στην αξιολόγηση των πειραματικών αποτελεσμάτων καθώς και τη θεωρητική τεκμηρίωση αυτών.

Θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ. Θ. Τράγκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Παν/ου Ιωαννίνων και υπεύθυνη της Μοριακής Γενετικής Μονάδας του τμήματος Γενετικής του Ογκολογικού Νοσοκομείου «ο Άγιος Σάββας». Η





επιστημονική της κατάρτιση και πολύπλευρη γνώση σε συνδυασμό με το συνεχές και ειλικρινές ενδιαφέρον της για την εργασία μου, συνετέλεσαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της διατριβής μου.

Τον συνάδελφο Δρ Θ. Δημητριάδη για τις συμβουλές του και την καθοδήγηση του καθώς και για την ηθική του υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια της εργασίας αυτής. Το ειλικρινές ενδιαφέρον του, οι εποικοδομητικές παρατηρήσεις του, η προσοχή του και η άρτια τεχνική του κατάρτιση με βοήθησαν σημαντικά.

Την Δρ Σ. Περέζ, ερευνήτρια στο «Κέντρο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου» του Ογκολογικού Νοσοκομείου «Ο Άγιος Σάββας», για την αμέριστη ηθική υποστήριξή της και την εμπιστοσύνη της. Η σημαντική συνεισφορά της στην άρτια ολοκλήρωση των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο τμήμα αυτό συνετέλεσαν στη πληρότητα της εργασίας αυτής.

Όλους τους συναδέλφους τόσο του τμήματος της Γενετικής όσο και του Κέντρου Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου, για τη συνεργασία τους όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ την οικογένεια μου, τους φίλους μου και τον Αλέξανδρο.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>9</b>
<b>1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ: ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΣΘΕΝΕΙΑ</b>	<b>9</b>
<b>2 ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΑΚΑΤΑΤΑΞΕΙΣ</b>	<b>10</b>
2.1 ΓΕΝΙΚΑ	10
2.2 ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΑΚΑΤΑΤΑΞΕΙΣ	12
2.2.1 Καθαρή απώλεια χρωμοσωμικού υλικού	12
2.2.2 Καθαρή περίσσεια χρωμοσωμικού υλικού	12
2.2.3 Επανατοποθέτηση αλληλουχιών χωρίς να συμβαίνει απώλεια ή αύξηση του γενετικού υλικού	12
2.3 ΟΙ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ	13
2.3.1 Σημειακές μεταλλάξεις	13
2.3.2 Γονιδιακή επέκταση	14
2.3.3 Ευρύτερες γενωμικές αλλαγές	14
2.4 ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ & ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ	15
2.4.1 ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ	15
2.4.2 ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ	16
<b>3 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟ</b>	<b>19</b>
<b>4 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ</b>	<b>23</b>
4.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	23
4.2 ΑΙΤΙΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	23
4.3 ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	26
4.4 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	27
4.4.1 Χρωμοσωμικές ανακατατάξεις στον καρκίνο του μαστού	27
4.4.2 Γονιδιακές αλλαγές στον καρκίνο του μαστού	28
<b>5 ΤΟ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΟ C-MYC – ΔΟΜΗ &amp; ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ</b>	<b>30</b>



<b>5.1</b>	<b>ΓΕΝΙΚΑ</b>	<b>30</b>
<b>5.2</b>	<b>ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ C-MYC ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΗΣ</b>	<b>32</b>
5.2.1	c-MYC και κυτταρικός πολλαπλασιασμός	35
5.2.2	Το c-MYC αναστέλλει την κυτταρική διαφοροποίηση	39
5.2.3	Απόπτωση επαγόμενη από το c-MYC	41
5.2.4	Έκτοπη έκφραση του c-myc σε ανθρώπινους όγκους	45
5.2.5	Απορύθμιση της έκφρασης του c-myc στον καρκίνο	47
5.2.5.1	Χρωμοσωμική μετάθεση:	47
5.2.5.2	Γονιδιακή επέκταση:	47
5.2.5.3	Σημειακές μεταλλάξεις:	48
5.2.6	Σύγκριση της ογκογονικής δράσης του c-MYC <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i>	48
<b>6</b>	<b>ΕΠΙΠΕΔΑ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ C-MYC</b>	<b>53</b>
<b>6.1</b>	<b>ΓΕΝΙΚΑ</b>	<b>53</b>
<b>6.2</b>	<b>ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ</b>	<b>54</b>
6.2.1	Έναρξη της μεταγραφής	54
6.2.2	Ολοκλήρωση της μεταγραφής	55
<b>6.3</b>	<b>ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ: ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ mRNA ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΡΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΟΥ</b>	<b>57</b>
6.3.1	Ρύθμιση της ημιζωής του μηνύματος του c-myc	57
6.3.2	Ρύθμιση της μετάφρασης	60
<b>7</b>	<b>ΓΕΝΙΚΑ ΤΩΝ RNA ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ</b>	<b>67</b>
<b>7.1</b>	<b>RNA-ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΑ</b>	<b>68</b>
<b>7.2</b>	<b>ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ CRD-BP/IMP1 ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ</b>	<b>69</b>
7.2.1	RNA στόχοι της CRD-BP/IMP1	70
7.2.1.1	<i>H19</i>	70
7.2.1.2	<i>IGFII leader 3'</i>	71
7.2.1.3	<i>tau</i> mRNA	72
<b>7.3</b>	<b>ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΓΓΕΝΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΤΗΣ CRD-BP/IMP1</b>	<b>73</b>
<b>7.4</b>	<b>ΠΙΘΑΝΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΟ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CRD-BP/IMP1</b>	<b>75</b>
<b>7.5</b>	<b>CRD-BP/IMP1 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ</b>	<b>78</b>



<b>ΣΚΟΠΟΣ</b>	<b>81</b>
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>85</b>
<b>1 ΜΕΡΟΣ Α΄: ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ ΜΗΝΥΜΑΤΟΣ ΤΟΥ C-MYC</b>	<b>86</b>
1.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ DNA	86
1.1.1 Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	86
1.1.2 Απομόνωση τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζη	86
1.1.3 Επανασύνδεση των τμημάτων DNA και μετασχηματισμός βακτηρίων E.coli	87
1.1.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	88
1.1.5 Επιμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων (transfection)	89
1.1.6 Λουμινομετρικός προσδιορισμός των επιπέδων της renilla- και της firefly-luciferase	90
<b>2 ΜΕΡΟΣ Β΄: ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΠΟΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ C-MYC ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ</b>	<b>91</b>
2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΓΚΩΝ	91
2.2 ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	91
2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΑΓΩΜΕΝΟ ΙΣΤΟ	92
2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΙΣΤΟ	93
2.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	94
2.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	94
2.7 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	94
2.8 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ ΓΕΝΟΜΙΚΟΥ DNA	95
2.9 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ ΟΛΙΚΟΥ RNA	95
2.10 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ- ΣΥΝΘΕΣΗ COMPLEMENTARY DNA	96



2.11	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CRD-BP ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION) – NESTED PCR	97
2.12	ΣΧΕΤΙΚΗ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΝΥΜΑΤΟΣ ΤΟΥ C-MYC ΣΤΟΥΣ ΟΓΚΟΥΣ	99
2.13	ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ PCNA ΣΤΟ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ	101
2.14	ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ C-ERBB2 ΣΤΟ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ	102
2.15	ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ (COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION)	103
<b>3</b>	<b>ΜΕΡΟΣ Γ΄: ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΚΑΙ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CRD-BP/IMP1</b>	<b>109</b>
3.1	ΘΕΩΡΙΑ ΤΗΣ ΑΡΧΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΗΣ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΩΝ ΔΙΚΛΩΝΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA (siRNA)	109
3.2	ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ siRNA	110
3.3	ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ siRNA	111
3.4	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ	113
3.4.1	Βασική αρχή λειτουργίας του FACS	113
3.4.2	Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής στα MCF-7 κύτταρα μετά την επιμόλυνση με τα siRNAs	114
3.5	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ MRNA ΤΩΝ CRD-BP/IMP1, c-myc ΚΑΙ IGFII ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΟΥ REAL TIME RT-PCR	114
3.5.1	Βασική αρχή λειτουργίας του Real Time PCR	114
3.5.2	Προσδιορισμός των επιπέδων του CRD-BP/IMP1 mRNA	115
3.5.3	Προσδιορισμός των επιπέδων του IGF-II mRNA	116
3.5.4	Προσδιορισμός των επιπέδων του c-myc mRNA	117
3.6	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΟΥ IGFII	117
3.7	ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΟΥ WESTERN BLOT	118
3.7.1	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-PAGE	118
3.7.2	Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη	119



3.7.3	Ανοσοπροσδιορισμός των ακινητοποιημένων στη μεμβράνη πρωτεϊνών με τη χρήση χημειοφωταύγειας	119
3.8	<b>ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΜΕ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ <sup>3</sup>H-ΘΥΜΙΔΙΝΗΣ</b>	121
	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>123</b>
1	<b>ΜΕΡΟΣ Α΄ : ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ ΜΗΝΥΜΑΤΟΣ ΤΟΥ C-MYC</b>	<b>123</b>
1.1	<b>ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ</b>	<b>123</b>
1.2	<b>ΣΤΑΔΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ</b>	<b>124</b>
1.2.1	Κατασκευή του pBITRluc	124
1.2.2	Κατασκευή του pBITMRluc	125
1.2.3	Κατασκευή του pBITMRlucM	126
1.2.4	Κατασκευή του pBITRLucM	127
1.3	<b>ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MCF-7 TET-OFF ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΑΝΑΦΟΡΑΣ</b>	<b>128</b>
1.4	<b>ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΑΝΑΦΟΡΑΣ</b>	<b>128</b>
2	<b>ΜΕΡΟΣ Β΄ : ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΠΟΡΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ C-MYC ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ</b>	<b>136</b>
2.1	<b>ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ</b>	<b>136</b>
2.2	<b>ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ</b>	<b>136</b>
2.3	<b>ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CRD-BP/IMP1 ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ</b>	<b>137</b>
2.3.1	Συσχέτιση της έκφρασης του CRD-BP/IMP1 με βιολογικές παραμέτρους χαρακτηριστικές για τον καρκίνο του μαστού	139
2.3.2	Συσχέτιση των γενετικών ανωμαλιών των πρωτογενών όγκων με την έκφραση του CRD-BP/IMP1	140



<b>2.4</b>	<b>ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΠΕΚΤΑΣΗΣ ΤΟΥ 8q24 ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ</b>	<b>140</b>
2.4.1	Συσχέτιση της επέκτασης του 8q24 με βιολογικές παραμέτρους	141
<b>2.5</b>	<b>ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΠΕΚΤΑΣΗΣ 17q21.3–q22 ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ</b>	<b>142</b>
<b>2.6</b>	<b>ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ</b>	<b>142</b>
<b>2.7</b>	<b>ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΤΟΥΣ</b>	<b>143</b>
2.7.1	Συσχέτιση των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών στις τέσσερις κατηγορίες των όγκων	143
2.7.2	Μελέτη της επίδρασης της ταυτόχρονης παρουσίας της έκφρασης του CRD–BP/IMP1 και της επέκτασης στη θέση 8q24 στον βαθμό κακοήθειας ενός όγκου	144
2.7.3	Συσχέτιση της κατάταξης ενός όγκου στις τέσσερις κατηγορίες και βασικών βιολογικών δεικτών.	145
<b>2.8</b>	<b>ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CRD–BP/IMP1 ΣΕ ΚΑΛΟΗΘΕΙΣ ΟΓΚΟΙ ΜΑΣΤΟΥ</b>	<b>146</b>
<b>2.9</b>	<b>ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CRD–BP/IMP1 ΣΕ ΔΙΗΘΗΜΕΝΟΥΣ ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ ΚΑΙ ΣΤΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ</b>	<b>146</b>
<b>3</b>	<b>ΜΕΡΟΣ Γ΄: ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΚΑΙ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CRD–BP/IMP1</b>	<b>157</b>
3.1	ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ	157
<b>3.2</b>	<b>ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΤΩΝ MCF–7 ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CRD–BP/IMP1</b>	<b>158</b>
3.2.1	Προσδιορισμός των επιπέδων του <i>c–myc</i> και <i>IGFII</i> mRNA μετά την παρεμπόδιση της έκφρασης του CRD–BP/IMP1	159
3.2.2	Προσδιορισμός της επίδρασης της στοχευμένης παρεμπόδισης της έκφρασης της CRD–BP/IMP1 στα πρωτεϊνικά επίπεδα των δύο στόχων της <i>c–myc</i> και <i>IGFII</i>	160
3.2.3	Μελέτη της επίδρασης της στοχευμένης παρεμπόδισης της έκφρασης της CRD–BP/IMP1 στο ποσό του εκκρινόμενου από τα MCF–7 κύτταρα παράγοντα IGFII	161
3.2.4	Διερεύνηση της αντι–πολλαπλασιαστικής δράσης της παρεμπόδισης της έκφρασης της CRD–BP/IMP1 στα MCF–7 κύτταρα	161



<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>169</b>
<b>1 ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>169</b>
<b>2 ΔΕΥΤΕΡΟ ΚΑΙ ΤΡΙΤΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>171</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>183</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>187</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>191</b>





## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ – ΠΙΝΑΚΩΝ – ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

ΕΙΚΟΝΑ 1	11
ΕΙΚΟΝΑ 2	25
ΕΙΚΟΝΑ 3	31
ΕΙΚΟΝΑ 4	32
ΕΙΚΟΝΑ 5	38
ΕΙΚΟΝΑ 6	40
ΕΙΚΟΝΑ 7	43
ΕΙΚΟΝΑ 8	46
ΕΙΚΟΝΑ 9	60
ΕΙΚΟΝΑ 10	82
ΕΙΚΟΝΑ 11	83
ΕΙΚΟΝΑ 12	107
ΕΙΚΟΝΑ 13	108
ΕΙΚΟΝΑ 14	131
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1	132
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2	133
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3	134
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4	135
ΠΙΝΑΚΑΣ 1	148
ΠΙΝΑΚΑΣ 2	149
ΠΙΝΑΚΑΣ 3	150
ΠΙΝΑΚΑΣ 4	150
ΠΙΝΑΚΑΣ 5	151
ΠΙΝΑΚΑΣ 6	152
ΠΙΝΑΚΑΣ 7	153
ΠΙΝΑΚΑΣ 8	154
ΠΙΝΑΚΑΣ 9	154
ΕΙΚΟΝΑ 15	156
ΕΙΚΟΝΑ 16	163
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 5	164
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 6	164
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 7	165
ΕΙΚΟΝΑ 17	165
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 8	166
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 9	166
ΕΙΚΟΝΑ 18	167



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ: ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΣΘΕΝΕΙΑ

Ο καρκίνος αποτελεί σήμερα μια από τις κυριότερες αιτίες θανάτου από ασθένειες, στο δυτικό κόσμο. Παρόλο που υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που χρονολογούνται αιώνες πριν, σχετικές με μορφές της ασθένειας και παρά το γεγονός ότι όλο και περισσότερες ομάδες της επιστημονικής κοινότητας ασχολούνται με αυτή και παρά την πρόοδο που έχει επιτελεσθεί, ο καρκίνος παραμένει ουσιαστικά μια νόσος δύσκολα αντιμετωπίσιμη, εν μέρει λόγω των πολλών κατηγοριών της καθώς επίσης και λόγω του ότι ακόμη δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί όλοι οι μηχανισμοί της καρκινογένεσης, ώστε να αναπτυχθούν πιο αποτελεσματικές θεραπευτικές παρεμβάσεις.

Με τον όρο καρκίνο ουσιαστικά περιγράφουμε ένα ετερογενές σύνολο πολλών ασθενειών οι οποίες ξεκινούν με την απορύθμιση της λειτουργίας κάποιου γονιδίου και εξελίσσονται με την απόκτηση επιπρόσθετων γενετικών αλλαγών. Υπό την έννοια αυτή, δηλαδή ότι το πρωτογενές «πάσχων» υλικό είναι το γενετικό και ο καρκινικός φαινότυπος οφείλεται στις δικές του «βλάβες», ο καρκίνος θεωρείται γενετική ασθένεια. Η καρκινογένεση, δηλαδή ο μετασχηματισμός των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά, θεωρείτε σήμερα ότι είναι μια περίπλοκη και πολυσταδιακή διαδικασία που στη βάση της αφορά μη φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες, οι οποίες οφείλονται σε γονιδιακές μεταλλάξεις [1].

Οι μεταλλάξεις αυτές αφορούν κυρίως δύο κατηγορίες γονιδίων, τα **ογκογονίδια** και τα **ογκοκατασταλτικά γονίδια**, και είναι κληρονομούμενες ή επίκτητες. Η **κληρονομική μετάλλαξη** βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού, μεταδίδεται από τους γονείς στους απογόνους και μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία καρκίνου, ο οποίος σε



αυτήν την περίπτωση καλείται κληρονομούμενος, καταχρηστικά όμως, γιατί στην πραγματικότητα δεν κληρονομείται ο καρκίνος, αλλά η ευαισθησία/προδιάθεση στην ανάπτυξή του. Οι **επίκτητες μεταλλάξεις** βρίσκονται μόνο στο παρέγχυμα του όγκου και συνεπώς δε μεταβιβάζονται από γενιά σε γενιά. Οι όγκοι που οφείλονται αποκλειστικά σε επίκτητες μεταλλάξεις ονομάζονται σποραδικοί και αποτελούν την πλειοψηφία (90%) των όγκων [2].

## 2 ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΑΚΑΤΑΤΑΞΕΙΣ

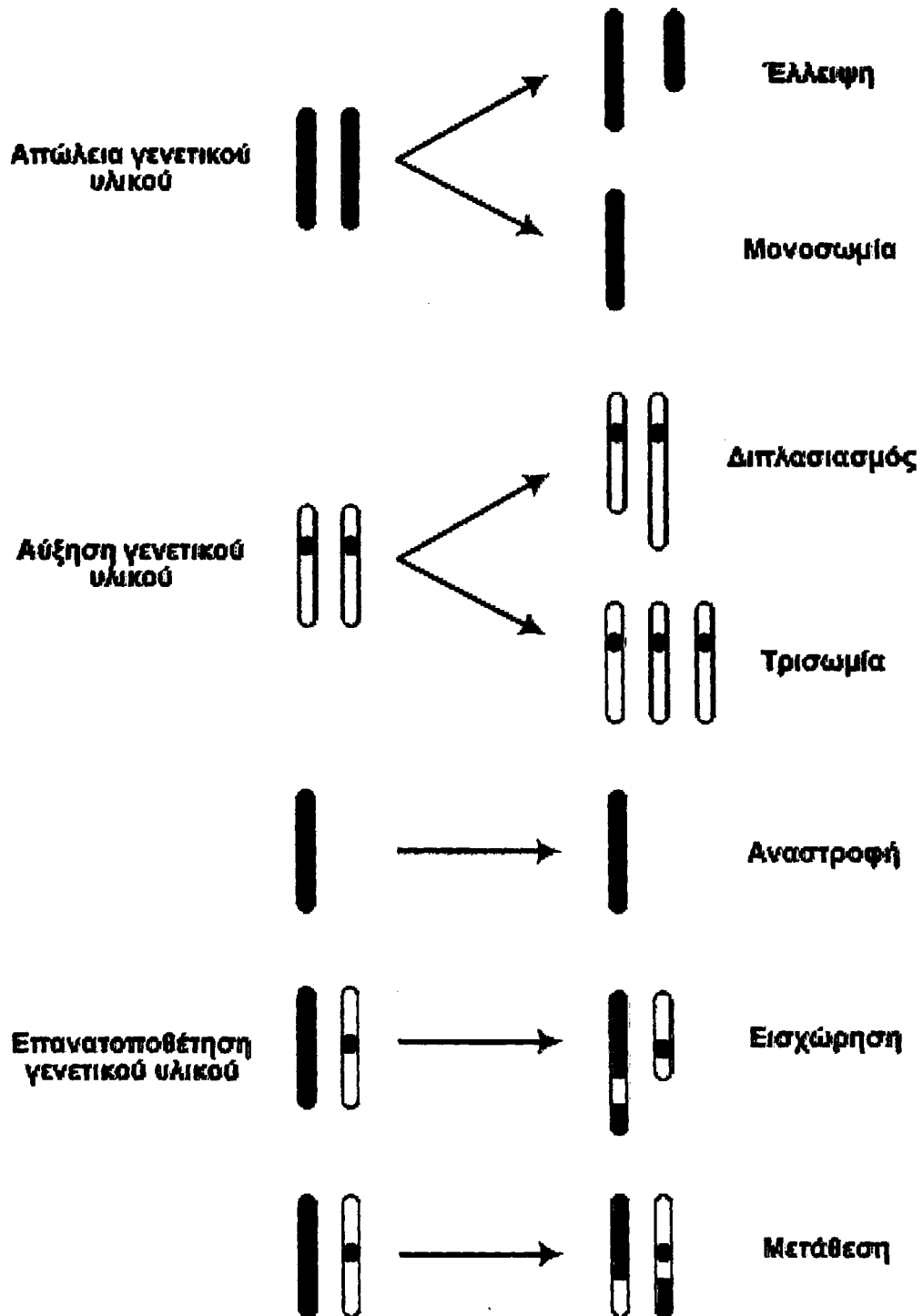
### 2.1 ΓΕΝΙΚΑ

Όπως προαναφέρθηκε, ο καρκίνος θεωρείται ως γενετική ασθένεια από τη στιγμή που η δημιουργία και εξέλιξη του οφείλονται σε γενετικές ανακατατάξεις. Οι ανακατατάξεις αυτές διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις χρωμοσωμικές και τις γονιδιακές ανακατατάξεις, ανάλογα με το επίπεδο οργάνωσης του γενετικού υλικού [3].

Οι δύο βασικές κατηγορίες γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο, τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, έχουν θεωρηθεί ως το κύριο παθογενετικό αποτέλεσμα των χρωμοσωμικών ανωμαλιών που σχετίζονται με τον καρκίνο. Αυτές διακρίνονται σε αριθμητικές και δομικές και οδηγούν σε απώλεια γενετικού υλικού, αύξηση γενετικού υλικού ή επανατοποθέτηση ολόκληρων χρωμοσωμικών τμημάτων. Παρατίθενται κατωτέρω οι βασικές συνέπειες που μπορεί να έχουν οι διάφοροι τύποι χρωμοσωμικών ανακατατάξεων [3] (Εικόνα 1).



Εικόνα 1  
Χρωσωμικές ανακατατάξεις



Σχηματική απεικόνιση των χρωσωμικών ανωμαλιών οι οποίες βασικά καταλήγουν σε απώλεια γενετικού υλικού, αύξηση του γενετικού υλικού ή επανατοποθέτηση ολόκληρων χρωσωμικών τμημάτων [3].

## **2.2 ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΑΚΑΤΑΤΑΞΕΙΣ**

### **2.2.1 Καθαρή απώλεια χρωμοσωμικού υλικού**

Αυτή μπορεί να οφείλεται σε ελλείψεις, μη ισοζυγισμένες μεταθέσεις χρωμοσωμικών τμημάτων ή απώλεια ολόκληρου χρωμοσώματος (μονοσωμία). Η γενικά αποδεκτή παθογενετική θεωρία υποστηρίζει ότι τέτοιες αλλαγές μπορεί να προκαλούν καρκινογένεση λόγω της απώλειας κάποιου ογκοκατασταλτικού γονιδίου. Εάν βέβαια, η χρωμοσωμική έλλειψη είναι εμβόλιμη, τότε είναι πιθανό ο ανασυνδυασμός που λαμβάνει χώρα να επηρεάζει τα γονίδια που βρίσκονται κοντά στις περιοχές αποκοπής του χρωμοσωμικού τμήματος [3].

### **2.2.2 Καθαρή περίσσεια χρωμοσωμικού υλικού**

Ανώμαλοι διαχωρισμοί των χρωμοσωμάτων μπορεί να προκαλέσουν τρισωμίες ή και πιο εκτεταμένες πολυσωμίες. Διπλασιασμός και τριπλασιασμός μιας συγκεκριμένης περιοχής ή τμήματος μπορεί επίσης να προκαλέσει αλλαγές των γονιδιακών προϊόντων. Σε κάθε περίπτωση, ο μηχανισμός με τον οποίο η μεγαλύτερη ποσότητα γενετικού υλικού μπορεί να προκαλέσει νεοπλασία έχει να κάνει με την παρουσία περισσότερων αντιτύπων ενεργών ογκογονιδίων (dose effect). Τέλος, παθογενετική σχέση με τη νεοπλασία μπορεί να έχει και η επέκταση μεγαλύτερων τμημάτων χρωμοσωμάτων, στα οποία περιλαμβάνονται ογκογονίδια [3].

### **2.2.3 Επανατοποθέτηση αλληλουχιών χωρίς να συμβαίνει απώλεια ή αύξηση του γενετικού υλικού**

Ανακατατάξεις με τέτοιο αποτέλεσμα μπορεί να είναι είτε μεταξύ χρωμοσωμάτων (μεταθέσεις ή εισχωρήσεις), ή ενδοχρωμοσωμικές (αναστροφές). Με τον ανασυνδυασμό που λαμβάνει χώρα σε αυτές τις περιπτώσεις, γονίδια μπορεί να καταστραφούν, νέα, χιμαιρικά γονίδια



μπορεί να σχηματιστούν ή μπορεί να παρεμποδιστεί η φυσιολογική δράση ρυθμιστικών περιοχών του γονιδιώματος. Τέτοιες επιδράσεις της αναδιάταξης της θέσης του χρωμοσωμικού υλικού είναι ο μηχανισμός πίσω από την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων σε ορισμένα ανθρώπινα νεοπλάσματα [3].

## 2.3 ΟΙ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ

Αφορούν αλλαγές του γενετικού υλικού σε υπομικροσκοπικό επίπεδο και απαιτούν τη χρήση μοριακών τεχνικών για να ανιχνευθούν επειδή δεν είναι ορατές σε χρωμοσωμικό επίπεδο. Περιλαμβάνουν τις σημειακές μεταλλάξεις, τη γονιδιακή επέκταση και τις γενωμικές (ευρύτερες) αναστροφές και εισχωρήσεις [4].

### 2.3.1 Σημειακές μεταλλάξεις

Οι σημειακές μεταλλάξεις είναι αλλαγές που τροποποιούν μια μόνο βάση και μπορούν να έχουν ποικίλα αποτελέσματα στο συντιθέμενο γονιδιακό προϊόν. Έτσι, σε μια missense σημειακή μετάλλαξη, μια βάση αντικαθίσταται από μια άλλη, γεγονός που συνεπάγεται την αλλαγή ενός αμινοξικού κατάλοιπου στην συντιθέμενη πρωτεΐνη. Ανάλογα με τη θέση αυτού του τροποποιημένου αμινοξέος μέσα στην πρωτεΐνη, αυτή η σημειακή μετάλλαξη μπορεί να επηρεάσει ή όχι την πρωτεϊνική δομή και λειτουργία.

Με τον όρο nonsense mutations χαρακτηρίζουμε εκείνες τις σημειακές μεταλλάξεις στις οποίες μια αλλαγή βάσης δημιουργεί ένα κωδικώνιο λήξης, το οποίο προκαλεί τη λήξη της πρωτεϊνοσύνθεσης αντί να κωδικοποιεί κάποιο αμινοξύ. Η συντιθέμενη πρωτεΐνη είναι κολοβωμένη και συνήθως μη λειτουργική.

Μια μετάλλαξη αλλαγής του πλαισίου ανάγνωσης έχουμε όταν συμβαίνει μια προσθήκη ή απώλεια μιας βάσης. Αυτό αλλάζει όλες τις τριπλέτες που βρίσκονται έπειτα από το σημείο της αλλαγής (εκτός και αν



η προσθήκη ή η έλλειψη αφορά μια ολόκληρη τριπλέτα). Μια τέτοια αλλαγή οδηγεί στη σύνθεση μιας τελείως διαφορετικής πρωτεϊνικής αλληλουχίας και συνήθως δημιουργεί και πρόωρη τριπλέτα λήξης.

Μια σημειακή μετάλλαξη σαν αυτές που περιγράφηκαν μπορεί να συμβεί και μέσα στις μη κωδικές περιοχές, στο 5' άκρο ενός γονιδίου όπου υπάρχουν ρυθμιστικές αλληλουχίες, όπως οι υποκινητές (promoters) ή οι ενεργοποιητές (enhancers). Μεταλλάξεις σε αυτές τις αλληλουχίες μπορεί να επηρεάσουν τη μεταγραφή του γονιδίου, παρεμποδίζοντας ή μειώνοντας σημαντικά τα επίπεδα της συντιθέμενης πρωτεΐνης. Στις μη κωδικές περιοχές υπάρχουν επίσης ρυθμιστικές αλληλουχίες που καταστέλλουν τη γονιδιακή μεταγραφή (repressors). Μετάλλαξη σε αυτές τις αλληλουχίες οδηγεί σε ανεξέλεγκτη παραγωγή της αντίστοιχης πρωτεΐνης [4].

### 2.3.2 Γονιδιακή επέκταση

Είναι εκείνη η γενετική αλλαγή κατά την οποία υπάρχουν **πολλαπλά αντίτυπα ενός γονιδίου**, γεγονός που οδηγεί σε παραγωγή της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης σε πολύ υψηλότερα επίπεδα από τα φυσιολογικά. Η γονιδιακή επέκταση μπορεί να συμβεί σε διαφορετικούς βαθμούς. Έτσι, μπορεί να έχουμε από δυο μέχρι και 100 αντίτυπα ενός γονιδίου [4].

### 2.3.3 Ευρύτερες γενωμικές αλλαγές

Είναι **αναστροφές, ελλείψεις και εισχωρήσεις**, αφορούν την αλλαγή της θέσης μικρού τμήματος της αλληλουχίας ενός γονιδίου, την προσθήκη ή την έλλειψη μιας περιοχής (π.χ. ενός εξωνίου), γεγονότα που έχουν ως συνέπεια την παραγωγή τροποποιημένου γονιδιακού προϊόντος [4].



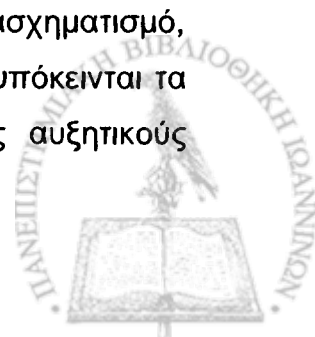
## 2.4 ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ & ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ

### 2.4.1 ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ

Ως ογκογονίδια χαρακτηρίζονται τα γονίδια εκείνα των οποίων η απορρυθμισμένη έκφραση – που προκαλείται πιθανά από κάποια γενετική αλλαγή – μπορεί να προκαλέσει καρκινογένεση. Η δράση των ογκογονιδίων αναγνωρίστηκε λόγω της παρουσίας τους σε ιούς που είχαν την ικανότητα με τη μόλυνσή τους, να προκαλούν όγκους σε ζώα ή να μετασχηματίζουν κύτταρα *in vitro*. Πολλοί από αυτούς τους ιούς είναι ρετροϊοί – έχουν δηλαδή RNA για γενετικό υλικό. Τα ογκογονίδια που περιέχουν οι ιοί αυτοί παρουσιάζουν υψηλή ομολογία στην αλληλουχία με ομόλογα φυσιολογικά κυτταρικά γονίδια τα οποία καλούνται πρωτο-ογκογονίδια. Τα πρωτο-ογκογονίδια είναι γενικά πολύ συντηρημένα και σε φυσιολογικές συνθήκες τα προϊόντα τους είναι πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε κάποια κυτταρική λειτουργία [2, 4, 5].

Ιοί που δεν μεταφέρουν οι ίδιοι κάποιο ογκογονίδιο μπορεί, κατά την επιμόλυνση, να ενεργοποιήσουν κάποιο κυτταρικό πρωτο-ογκογονίδιο, καθώς το προ-ϊικό γενετικό τους υλικό εισέρχεται σε κατάλληλες θέσεις του γονιδιώματος του κυττάρου-ξενιστή. Έτσι, τροποποιείται, άμεσα ή έμμεσα, η έκφραση του πρωτο-ογκογονιδίου, λόγω της επίδρασης ισχυρών ρυθμιστικών περιοχών που περιέχονται στο ιικό γονιδίωμα. Παρά την ικανότητά τους να προκαλούν καρκινογένεση σε διάφορα ζώα, ο ρόλος των ρετροϊών στην εμφάνιση νεοπλασίας στον άνθρωπο είναι ακόμη υπό διερεύνηση, με εξαίρεση τον HTLV που έχει διαπιστωθεί ότι σχετίζεται με την εμφάνιση T-λευχαιμιών. Υπάρχουν σήμερα περίπου 200 γνωστά ογκογονίδια τα οποία – υπό συνθήκες – ενέχονται στη διαδικασία της καρκινογένεσης [2, 4, 5].

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ποιοτικές ή ποσοτικές αλλαγές στη λειτουργικότητα και το μοτίβο έκφρασης των ογκογονιδίων επηρεάζουν λειτουργίες που σχετίζονται με την κυτταρική αύξηση και τον πολλαπλασιασμό. Έτσι, τα κύτταρα που έχουν υποστεί μετασχηματισμό, στερούνται όλων εκείνων των περιορισμών στους οποίους υπόκεινται τα φυσιολογικά κύτταρα, όπως είναι η εξάρτηση από τους αυξητικούς





παράγοντες ή η αναστολή αύξησης από την επαφή και παράλληλα, αποκτούν και νέες ιδιότητες, όπως η ικανότητα να μεθίστανται.

Γενικά, είναι πολλές οι φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ ενός φυσιολογικού και ενός καρκινικού κυττάρου. Τα προϊόντα των ογκογονιδίων που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι τώρα έχει διαπιστωθεί ότι μπορεί ανήκουν σε μια από τις παρακάτω κατηγορίες [4]:

- Κινάσες (κυτταροπλασματικοί ή μεμβρανικοί υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, πχ. HER2/NEU, KIT, SRC, AKT1, AKT2)
- Αυξητικοί παράγοντες ( πχ. WNT1, PDGFB/SIS)
- GTP–δεσμευτικές πρωτεΐνες
- Πρωτεΐνες του πυρήνα (παράγοντες της μεταγραφής πχ. E2F1, FOS, JUN, MYC).

Το βασικό κοινό χαρακτηριστικό είναι ότι κάθε τύπος από τις παραπάνω πρωτεΐνες είναι σε θέση να πυροδοτήσει γενικές αλλαγές στον κυτταρικό φαινότυπο, είτε αλλάζοντας απευθείας τη γονιδιακή έκφραση, είτε ξεκινώντας αλλαγές που αφορούν την κυτταρική αύξηση είτε απαντώντας σε αυτές.

#### 2.4.2 ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ

Το κύριο κοινό στοιχείο των ογκογονιδίων στην καρκινογένεση είναι ότι η απορρυθμισμένη έκφρασή τους – ανεξάρτητα από το μηχανισμό που προκάλεσε αυτήν την τροποποίηση – οδηγεί στην καρκινογένεση [2, 4, 5].

Υπάρχει όμως και μια άλλη κατηγορία γονιδίων, των οποίων η ποιοτική ή ποσοτική απώλειά τους (λόγω γενετικών αλλαγών που οδηγούν στην απώλεια ή την απενεργοποίηση και των δύο αλληλομόρφων) συνδέεται με την καρκινογένεση και χαρακτηρίζονται ως **ογκοκατασταλτικά**. Αυτό συμβαίνει γιατί η απορύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων επιτρέπει στο κύτταρο που έχει υποστεί γενετική βλάβη να επιβιώσει και να έτσι να συσσωρεύσει

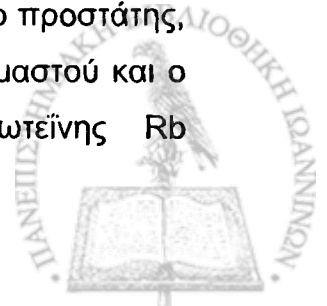


επιπλέον γενετικές βλάβες, επομένως αφήνει τα περιθώρια στον καρκίνο να εξελιχθεί.

Η λειτουργία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων διαπιστώθηκε για πρώτη φορά όταν έγιναν πειράματα σύντηξης καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων και τα υβρίδια που προέκυψαν ενέθηκαν σε πειραματόζωα, όπου διαπιστώθηκε ότι δεν προκαλούσαν τη δημιουργία όγκου, όπως συνέβαινε με την μητρική καρκινική σειρά. Η έκτοπη ενεργοποίηση ενός ογκογονιδίου είναι συνήθως αποτέλεσμα γενετικής βλάβης που συμβαίνει σε σωματικά κύτταρα κατά την εξέλιξη του όγκου. Σε αντίθεση με αυτό, κάποιοι σπάνιοι κληρονομούμενοι τύποι καρκίνου οφείλονται στη γενετική μεταφορά ενός ανεπαρκούς ογκοκατασταλτικού γονιδίου το οποίο έχει απενεργοποιηθεί λόγω συνήθως μιας σημειακής μετάλλαξης. Παιδιά που κληρονομούν τέτοια ανενεργά ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν αυξημένη προδιάθεση να εμφανίσουν κάποιο τύπο καρκίνου.

Η ασθένεια που έχει δώσει τις περισσότερες και πιο πειστικές αποδείξεις για το ρόλο και το μηχανισμό δράσης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι το ρετινοβλάστωμα, μια παιδική μορφή καρκίνου του αμφιβληστροειδούς. Εκτενείς μελέτες έχουν δείξει ότι το ρετινοβλάστωμα προκαλείται όταν και τα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου *rb* (που εδράζεται στη θέση 13q14) απενεργοποιηθούν από μεταλλάξεις που εμποδίζουν την έκφραση του, με αποτέλεσμα την πλήρη απουσία της πρωτεΐνης από το κύτταρο. Εάν ένα άτομο κληρονομήσει ένα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο από τον ένα γονέα του και ένα φυσιολογικό από τον άλλο, θα συνθέτει αρκετή πρωτεΐνη, ώστε να μην εμφανιστεί νεοπλασία από τα πρώτα στάδια εξέλιξης του νέου οργανισμού. Σταδιακά όμως, συμβαίνει και άλλη μετάλλαξη (που συνήθως είναι έλλειψη) οπότε απενεργοποιείται και το δεύτερο αλληλόμορφο του γονιδίου με αποτέλεσμα την πλήρη απώλεια από το κύτταρο της συγκεκριμένης πρωτεΐνης και κατά συνέπεια την νεοπλασία.

Η έλλειψη της πρωτεΐνης Rb συνδέεται και με άλλες μορφές καρκίνου, όπως το οστεοσάρκωμα, το ραβδομυοσάρκωμα, ο προστάτης, ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, ο καρκίνος του μαστού και ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης. Έλλειψη της πρωτεΐνης Rb



διαπιστώθηκε σε όλες τις περιπτώσεις μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, που αποτελούν περίπου το 25% των νεοπλασιών του πνεύμονα.

Γρήγορα ταυτοποιήθηκαν και άλλα γονίδια με ρόλο ανάλογο αυτού του *rb*, γονίδια δηλαδή των οποίων η απενεργοποίηση σχετίστηκε με κληρονομούμενες μορφές καρκίνου. Τέτοια γονίδια είναι το *p53*, το *APC* και το *BRCA1*. Το *p53* είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει τη φυσιολογική κυτταρική αύξηση. Τροποποιημένη έκφραση του έχει διαπιστωθεί στην πλειονότητα των νεοπλασιών του ανθρώπου και μεταλλάξεις του σχετίζονται με το γνωστό σύνδρομο κληρονομούμενου καρκίνου Li-Fraumeni. Το *APC* είναι μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στη μετάδοση δευτέρων μηνυμάτων και σχετίζεται την εμφάνιση του καρκίνου του παχέως εντέρου. Τέλος, το *BRCA1* είναι επίσης ένας μεταγραφικός παράγοντας που σχετίζεται με τον κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού, όπως ήδη αναφέρθηκε.



### 3 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟ

Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για να δοθεί ένας ορισμός του καρκινικού κυττάρου. Λόγω όμως των πολλών μορφών της ασθένειας στους διάφορους ιστούς, στα διάφορα στάδια και στους διάφορους τύπους, αυτό που για χρόνια θεωρούνταν ως κύριο χαρακτηριστικό ήταν η συνεχής κυτταρική διαίρεση. Σήμερα όμως είναι γνωστό ότι η εξάπλωση του όγκου οφείλεται στο διαταραγμένο ισοζύγιο μεταξύ της κυτταρικής «γέννησης» (κυτταρικών διαιρέσεων) και του κυτταρικού θανάτου. Στους ομαλούς ιστούς η κυτταρική γέννηση είναι ισοδύναμη με τον κυτταρικό θάνατο, δηλαδή όσα κύτταρα δημιουργούνται τόσα και πεθαίνουν, οδηγώντας στην ομοίωση. Επίδραση σε οποιοδήποτε από τα δύο σκέλη αυτής της ισορροπίας (γέννηση-θάνατος) οδηγεί στην τελική αύξηση, παρατηρούμενη ως ογκογένεση.

Ως γνωστό, η κυτταρική λειτουργία ελέγχεται και κατευθύνεται σε μοριακό επίπεδο από τη δράση συγκεκριμένων γονιδίων, τα οποία ενέχονται στη ρύθμιση όλων των κρίσιμων διεργασιών όπως ο κυτταρικός κύκλος, η διαφοροποίηση και η απόπτωση. Η έκφραση αυτών των γονιδίων σε φυσιολογικές συνθήκες είναι χρονικά εντοπισμένη και ποσοτικά περιορισμένη πολύ αυστηρά. Κατά συνέπεια, διαταραχή της ομαλής λειτουργίας των γονιδίων αυτών μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο σε απώλεια του ελέγχου της διαίρεσής του ή του προγραμματισμένου θανάτου του και σταδιακά σε εξαλλαγή του. Το σύνολο των τροποποιήσεων της ομαλής λειτουργίας των γονιδίων αυτών, προσδίδουν στο κύτταρο ένα σύνολο χαρακτηριστικών που καλείται καρκινικός φαινότυπος και περιλαμβάνει τις παρακάτω ιδιότητες [4]:

#### 1. Δυνατότητα ατελείτητου πολλαπλασιασμού.

Το κύτταρο ξεφεύγει από τον γενετικά και περιβαλλοντικά προκαθορισμένο και περιορισμένο αριθμό διαιρέσεων και αποκτά την ικανότητα να διαιρείται συνεχώς, χωρίς απαραίτητα άλλη φαινοτυπική αλλαγή.



## 2. Ανεξαρτησία από αυξητικούς παράγοντες.

Τα φυσιολογικά κύτταρα βρίσκονται σε φάση ηρεμίας (quiescence) και για να εισέλθουν στον κύκλο πρέπει να λάβουν το ανάλογο μήνυμα από συγκεκριμένες ομάδες μορίων. Τα μόρια αυτά, που χαρακτηρίζονται ως αυξητικοί παράγοντες (epidermal growth factor: EPGF, fibroblast growth factor: FGF, insulin growth factor: IGF, tumor growth factor: TGF), διεγείρουν το κύτταρο προς πολλαπλασιασμό με την πρόσδεσή τους στους ομόλογους υποδοχείς επιφανείας που φέρουν τα φυσιολογικά κύτταρα. Αντιθέτως, ένα εξαλλαγμένο κύτταρο ανεξαρτητοποιείται από ένα τέτοιο ερέθισμα, είτε μέσω μεταβολής των επιπέδων των υποδοχέων που εκφράζει, είτε μέσω τροποποίησης των υπολοίπων μορίων και δευτερευόντων μηνυμάτων που μετέχουν στο μονοπάτι μεταγωγής του σήματος.

## 3. Έλλειψη ανταπόκρισης σε αντιπολλαπλασιαστικά μηνύματα.

Σε φυσιολογικές συνθήκες λειτουργούν μηχανισμοί που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ώστε να διατηρείται ισορροπία μέσα σε έναν ιστό. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν αντιπολλαπλασιαστικά μηνύματα που διατηρούν τα κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας (G0) ή τα προωθούν σε τελική διαφοροποίηση. Το σύνολο σχεδόν των μηνυμάτων αυτών μεταδίδονται μέσα από το μονοπάτι της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (RB) και ομολόγων της. Στο καρκινικό κύτταρο όμως, τα αντιπολλαπλασιαστικά μηνύματα δεν επιτυγχάνουν να ενεργοποιήσουν την πρωτεΐνη Rb αφού κάποιο από τα μονοπάτια της είναι απορυθμισμένο, είτε λόγω έκτοπης ενεργοποίησης κυκλινών που την καθιστούν ανενεργή, είτε λόγω μεταβολής των επιπέδων υποδοχέων επιφανείας που επίσης την απενεργοποιούν.

## 4. Διαφυγή από την απόπτωση.

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος που ονομάζεται απόπτωση, είναι ένας θεμελιώδης μηχανισμός ελέγχου του κυτταρικού πληθυσμού. Πρόκειται για ένα αυστηρά ελεγχόμενο φαινόμενο στο οποίο ενέχονται πολλά διαφορετικά μονοπάτια, με



προ-αποπτωτική και αντι-αποπτωτική δράση. Σε ένα καρκινικό κύτταρο κάποιο ή κάποια από τα μόρια που μετέχουν σε ένα τέτοιο μονοπάτι εκφράζεται έκτοπα ή αδρανοποιείται με αποτέλεσμα να απορυθμίζεται ο μηχανισμός και το κύτταρο να ξεφεύγει από τη διαδικασία της απόπτωσης, παρά τα μηνύματα θανάτου που λαμβάνει.

#### 5. Πρώθηση της αγγειογένεσης.

Τα αγγεία αποτελούν πηγή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών, απαραίτητων για την κυτταρική επιβίωση. Η διαδικασία της αγγειογένεσης ελέγχεται από σειρά μορίων, το πιο γνωστό από τα οποία είναι ο VEGF (: vascular epithelial growth factor). Έτσι, κατά την ανάπτυξη ενός οργανισμού, η αύξηση της κυτταρικής μάζας ενός ιστού συνοδεύεται από το σχηματισμό τριχοειδών αγγείων για την υποστήριξή του, η οποία βέβαια σταματά με την ολοκλήρωση του σχηματισμένου οργάνου. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να επάγουν εκ νέου την ανάπτυξη αγγείων που χρειάζονται για να επιβιώσει η συνεχώς αυξανόμενη καρκινική κυτταρική μάζα, εκφράζοντας έκτοπα τα απαραίτητα μόρια.

#### 6. Διήθηση και μετάσταση.

Ορισμένα καρκινικά κύτταρα αποκτούν την ικανότητα να ξεφεύγουν από τον πρωτογενή όγκο, να διηθούν τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς και να μετακινούνται σε απομακρυσμένες θέσεις, στις οποίες εγκαθιδρύουν μια νέα, δευτερογενή εστία όγκου, που χαρακτηρίζεται ως μετάσταση. Η ικανότητα αυτή μπορεί να οφείλεται σε αλλαγές της δομής ή των επιπέδων έκφρασης, συνεπώς της λειτουργίας μιας σειράς μορίων που εμπλέκονται στη φυσική σύνδεση και συνοχή των κυττάρων μεταξύ τους και με το μικροπεριβάλλον τους, όπως η οικογένεια των καντχερινών και των ιντεγκρινών. Αυτή η ιδιότητα, που είναι και η πιο καταστροφική για τον οργανισμό, αποτελεί βασική διαφορά μεταξύ ενός όγκου κακοήθη (malignant: μεταστατικός) και μη κακοήθη (benign: μη μεταστατικός).



Μετά από δεκαετίες μελέτης και πολλές προσπάθειες κατανόησης των μηχανισμών της νεοπλασίας, είναι γενικά αποδεκτό ότι όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά αποκτώνται σταδιακά και στα πλαίσια μακροχρόνιων διεργασιών, με τη συσσώρευση πληθώρας γενετικών ή/και επιγενετικών αλλαγών που τελικά προσδίδουν στο κύτταρο τον καρκινικό φαινότυπο. Η πολυσταδιακή εξέλιξη της νόσου γίνεται αντιληπτή ακόμη και από τη φαινοτυπική μελέτη του αναπτυσσόμενου όγκου. Έτσι, διακρίνονται τα στάδια:

- Έναρξης: όπου συμβαίνουν οι πρώτες γενετικές αλλαγές που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό μικρού αριθμού κυττάρων.
- Επέκτασης: όπου αυξάνεται ο αριθμός των κυττάρων που φέρει αυτές τις πρώτες γενετικές αλλαγές κι έτσι δημιουργείται μιας καλοήθους αλλοίωσης.
- Μετατροπής σε κακοήθεια: όπου τα κύτταρα της καλοήθους αλλοίωσης αποκτούν κακοήθη χαρακτηριστικά με τη συσσώρευση νέων, επικρατούντων μεταλλάξεων και
- Διήθησης: όπου καρκινικά κύτταρα της πρωτογενούς εστίας εισβάλουν σε άλλους, υγιείς ιστούς και εγκαθιδρύουν νέες εστίες του καρκίνου.

Η σαφής σταδιοποίηση της δημιουργίας και εξέλιξης του καρκίνου δεν έχει αποδοθεί ικανοποιητικά με κάποιο μοντέλο για τον καρκίνο του μαστού. Ένα ικανοποιητικό μοντέλο που περιγράφει πλήρως τόσο τις φαινοτυπικές όσο και τις γενετικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα κατά την καρκινογένεση έχει δοθεί για τον καρκίνο του παχέως εντέρου από τον Vogelstein [6].



## 4 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

### 4.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο συχνά απαντώμενος τύπος καρκίνου στις γυναίκες (22% όλων των καρκίνων του έτους 2000 και δεύτερη (2<sup>η</sup>) – μετά τον καρκίνο των πνευμόνων – αιτία θανάτου στις γυναίκες: 15% των θανάτων) [7, 8]. Υπολογίζεται ότι, σε ετήσια βάση, παρατηρούνται ένα εκατομμύριο κρούσματα, ενώ από αυτά, οι 200000 είναι στις Ηνωμένες Πολιτείες (περίπου το 27% όλων των κρουσμάτων στις γυναίκες) και περίπου 320000 περιπτώσεις στην Ευρώπη (31% των περιπτώσεων). Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 2 δεκαετιών, η συχνότητα των κρουσμάτων στις Ηνωμένες Πολιτείες συνεχώς αυξάνει [9, 10, 11]. Παρόλα αυτά, τα τελευταία 10–15 χρόνια η θνησιμότητα από καρκίνο του μαστού μειώθηκε κατά 2,3% ανά έτος, λόγω πολλών παραγόντων ανάμεσα στους οποίους οι βελτιωμένες τεχνικές διάγνωσης και οι πιο αποτελεσματικές θεραπευτικές αγωγές [8].

Με βάση επιδημιολογικές μελέτες που έγιναν σε πολλούς πληθυσμούς, υπάρχουν σήμερα επιβεβαιωμένοι και πιθανολογούμενοι παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού [12, 13, 14, 15, 16].

### 4.2 ΑΙΤΙΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Η συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του μαστού είναι πολύ χαμηλή (< 1/10.000) στην ηλικία κάτω των 25 ετών και αυξάνει μέχρι και 100 φορές στην ηλικία άνω των 45 ετών [12, 17].

Η αιτιολογία του καρκίνου του μαστού είναι πολυπαραγοντική και περιλαμβάνει δίαιτα, αναπαραγωγικούς παράγοντες και σχετιζόμενες ορμονικές διαταραχές. Από περιγραφικά επιδημιολογικά στοιχεία φαίνεται





ότι ο καρκίνος του μαστού είναι βασικά μια ασθένεια των εύπορων κοινωνιών που έχουν αποκτήσει τον τρόπο ζωής του δυτικού κόσμου, ο οποίος χαρακτηρίζεται από διαιτολόγιο πολλών θερμίδων, πλούσιο σε ζωικά λίπη και πρωτεΐνες σε συνδυασμό με έλλειψη σωματικής άσκησης.

Περιοχές που έχουν υιοθετήσει αυτόν τον τρόπο ζωής για μεγάλο χρονικό διάστημα (Βόρειος Αμερική, Βόρεια Ευρώπη, Αυστραλία) έχουν φτάσει σε ένα πλατώ συχνότητας εμφάνισης της νόσου, το οποίο είναι 70–90 νέες περιπτώσεις για κάθε 100.000 πληθυσμού ανά έτος. Ενώ, χώρες που έχουν γίνει βιομηχανικές και εύπορες πιο πρόσφατα δείχνουν μια αξιοσημείωτη αύξηση της συχνότητας εμφάνισης της νόσου και της θνησιμότητας. Ο λεγόμενος δυτικός τρόπος ζωής αποτελεί παράγοντα που αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης όχι μόνο του καρκίνου του μαστού, αλλά και άλλων τύπων, όπως του προστάτη, του παχέως εντέρου και του ενδομητρίου.

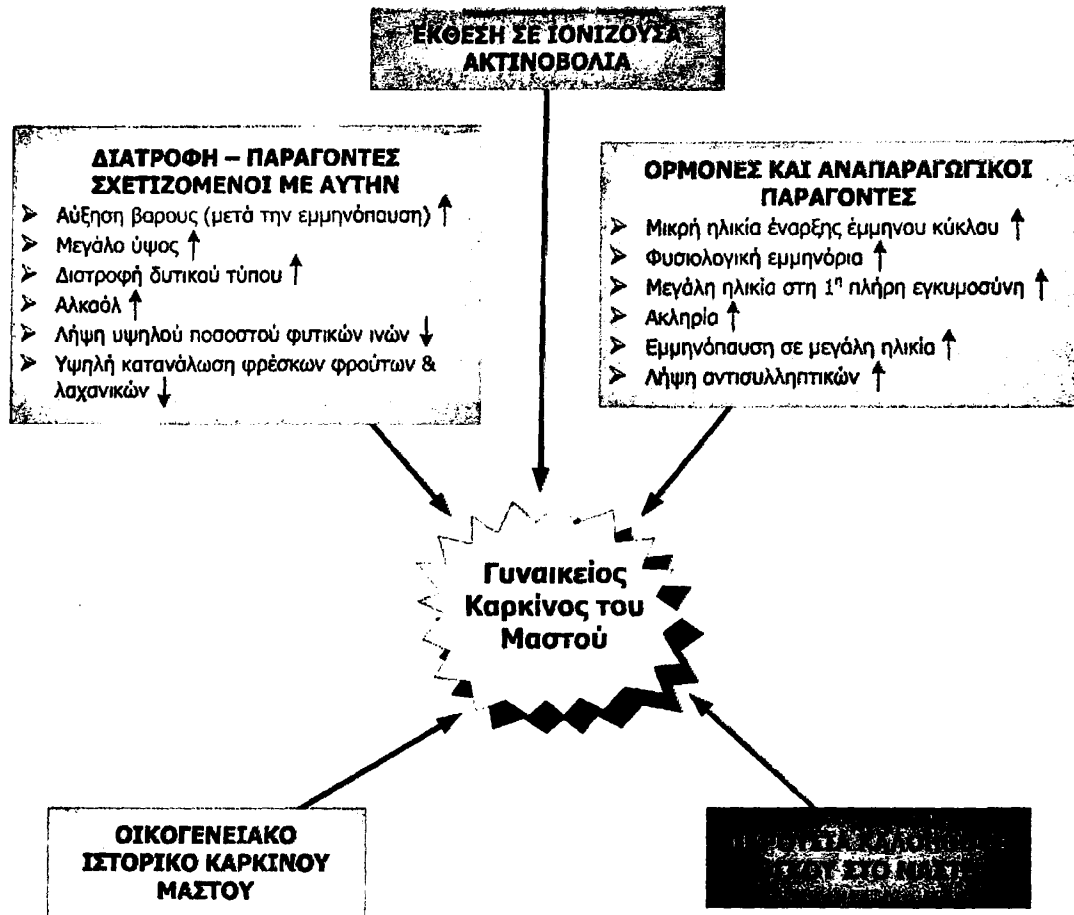
Ειδικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η ακτινοβολία, το αλκοόλ και οι εξωγενείς ορμόνες, έχουν επίσης ενοχοποιηθεί ότι παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού (Εικόνα 2).

Περισσότερο από άλλους τύπους καρκίνου, ο καρκίνος του μαστού συχνά παρουσιάζει οικογενή συσσώρευση. Έχουν ταυτοποιηθεί δύο γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας (τα BRCA1/2), τα οποία αυξάνουν πολύ τις πιθανότητες εμφάνισης της νόσου. Όμως, υπάρχει η άποψη ότι πολυγενετικά χαρακτηριστικά παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην κληρονομούμενη προδιάθεση για εμφάνιση του καρκίνου του μαστού.



## Εικόνα 2

## Αιτιογόνοι παράγοντες του καρκίνου του μαστού



Διαγραμματική απεικόνιση των αιτιογόνων του καρκίνου του μαστού στις γυναίκες.

↑ : παράγοντες που συνδέονται με την αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού.

↓ : παράγοντες που συνδέονται με τη μείωση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού [17].

### 4.3 ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Τα καρκινώματα του μαστού είναι κακοήθη επιθηλιακά νεοπλασμάτα που θεωρείται ότι προέρχονται από τα τελικά σωληνοειδή (ducts) του μαστικού αδένα. Πρόκειται για εξαιρετικά ετερογενείς όγκους από ιστολογική άποψη [18]. Ο πιο συνηθισμένος τύπος είναι το διηθητικό πορωγενές καρκίνωμα. Υπάρχουν βέβαια και αρκετοί άλλοι μορφολογικοί τύποι, λιγότερο συχνοί, όπως το φαγεσωρικό, σωληνοειδές, μυελοειδές, βλεννώδες, θηλώδες, παρακρινικό, εκκριτικό, μεταπλαστικό [19, 20, 21].

Μια ξεχωριστή ιστοπαθολογική κατηγορία αποτελεί το διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα, το οποίο θεωρείται ότι ξεκινά από πιο διαφοροποιημένες τελικές σωληνοειδείς-λοβιακές δομές. Όχι σπάνια, διάφορες περιοχές μέσα στον ίδιο όγκο παρουσιάζουν διαφορετικούς συνδυασμούς αυτών των ιστοπαθολογικών τύπων [21]. Ο μετασχηματισμός των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων του μαστού σε καρκινικά κύτταρα πιθανά συμβαίνει μέσω πολλαπλών βημάτων αλλά τα αρχικά στάδια και η ακριβής αλληλουχία των γεγονότων είναι πολύ λιγότερο καθορισμένα στο μαστό από ότι σε άλλα όργανα, όπως για παράδειγμα στον καρκίνο του παχέως εντέρου [22].

Υπάρχει μια μορφολογική συνέχεια μεταξύ της υπερπλαστικής νόσου του μαστού (proliferative breast disease) μέχρι τα καρκινώματα *in situ* και τελικά τους διηθητικούς όγκους με ικανότητα μετάστασης, αλλά οι αποδείξεις ότι οι συνηθισμένοι καρκίνοι του μαστού περνάνε από όλα αυτά τα στάδια, είναι περιστασιακές [23, 24].

Ασθενείς με άτυπη υπερπλασία (atypic proliferative breast disease), ειδικά στην περίπτωση οικογενούς καρκίνου του μαστού, ή με καρκίνωμα *in situ* (τύπου λοβιακό ή σωληνοειδές), έχουν υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης μεταστατικής νόσου (invasive disease) [23, 24].

Το καρκίνωμα *in situ* έχει παρατηρηθεί ότι εξελίσσεται / δημιουργείται μέσα ή πολύ κοντά σε εστίες με άτυπη υπερπλασία του επιθηλίου (atypic epithelial hyperplasia). Το διηθητικό καρκίνωμα του μαστού έχει δείχτει ότι αναπτύσσεται στην ίδια θέση στην οποία είχε προηγούμενα διαγνωσθεί με βιοψία καρκίνωμα *in situ* [25].



Πάντως, το σωληνοειδές καρκίνωμα *in situ* δεν θεωρείται από τους περισσότερους ερευνητές υποχρεωτικά ως προγονικό στάδιο, ενώ η υπερπλασία και το λοβιακό καρκίνωμα *in situ* θεωρούνται ως ενδείξεις κινδύνου κυρίως και όχι ως πρώιμα στάδια ενός μελλοντικού διηθητικού καρκινώματος του μαστού [25, 26, 27].

## 4.4 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

### 4.4.1 Χρωμοσωμικές ανακατατάξεις στον καρκίνο του μαστού

Περισσότερα από 1.000 καρκινώματα του μαστού έχουν μελετηθεί κυτταρογενετικά, το μεγαλύτερο τμήμα των οποίων από τον *Pandis* και τους συνεργάτες του [28]. Τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών έδειξαν ότι οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες οι οποίες ανιχνεύονται στα καρκινώματα του μαστού όχι μόνον δεν είναι τυχαίες, αλλά επαναλαμβανόμενες δημιουργούν διακριτές κυτταρογενετικές ομάδες, στις οποίες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν [29]. Συχνότερα ανιχνευόμενες χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι οι  $der(1;16)(q10;p10)$ ,  $i(1)(q10)$  και οι εσωτερικές ελλείψεις του χρωμοσώματος  $del(3)(p12-13p14-21)$ . Οι επαναλαμβανόμενες χρωμοσωμικές ανωμαλίες των διαφόρων κυτταρογενετικών ομάδων δεν συνδέονται ιδιαίτερα με κάποιο συγκεκριμένο ιστοπαθολογικό τύπο καρκινώματος αλλά διατρέχουν όλες τις κατηγορίες αν και με διαφορετική συχνότητα [30].

Προσπάθειες συσχέτισης των χρωμοσωμικών ανωμαλιών με τα κλινικοπαθολογικά στοιχεία των καρκινωμάτων του μαστού αναφέρονται από διάφορους ερευνητές με πιο εκτεταμένη μελέτη του *Pandis et al.* [31], σύμφωνα με την οποία ο χρωμοσωμικός αριθμός συνδέεται με τον βαθμό της κυτταρικής διαφοροποίησης και τον μιτωτικό δείκτη με στατιστική σημαντικότητα. Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα ευρήματα της χρωμοσωμικής ανάλυσης είναι ο εντοπισμός στο 40% των όγκων, πολυκλωνικότητας, μη σχετιζόμενων κυτταρογενετικά κλώνων. Το γεγονός αυτό εντοπίστηκε το 1993 από τους *Pandis et al.* [32] και επιβεβαιώθηκε από μεταγενέστερες κυτταρογενετικές μελέτες άλλων



καθώς και στη τωρινή μελέτη του Going [33], γεγονός που ερμηνεύει την ήδη παρατηρηθείσα intra-tumor ετερογένεια των όγκων του μαστού και υποδεικνύει ότι τουλάχιστον ένα μέρος των όγκων του μαστού συνάδει ως προς την καρκινογένεση, μάλλον με τη θεωρία του καρκινικού πεδίου, παρά με την μονοκλωνική θεωρία ανάπτυξης του καρκίνου.

#### 4.4.2 Γονιδιακές αλλαγές στον καρκίνο του μαστού

Πλήθος μελετών καρκινωμάτων του μαστού έχουν αποκαλύψει ότι υπάρχει ένας αριθμός γονιδίων των οποίων οι αλλαγές συνδέονται με τη δημιουργία και την ανάπτυξη αυτού του όγκου [2]. Τα σημαντικότερα από αυτά είναι:

**c-myc:** Αλλαγές του γονιδίου αυτού έχουν ανιχνευτεί στον σποραδικό καρκίνο του μαστού από διάφορες ερευνητικές ομάδες σε ποσοστά που ποικίλουν από 4%–40%, με μέσο όρο το 15%, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία και το εξεταζόμενο δείγμα. Η κυρίαρχη αλλαγή που παρατηρείται είναι η γονιδιακή επέκταση, υπάρχουν όμως και αρκετές περιπτώσεις όπου διαπιστώνεται υπερέκφραση του c-myc χωρίς να υπάρχει γονιδιακή επέκταση, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη επιπλέον μηχανισμών ενεργοποίησης του γονιδίου αυτού. Συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί ενεργοποίηση του c-myc λόγω πολυσωμίας στο χρωμόσωμα 8, όπου εδράζεται, ή λόγω άλλης χρωμοσωμικής ανακατάταξης, όπως μετάθεση. Η υπερέκφραση του c-myc συσχετίζεται με κακή πρόγνωση σε αρκετές μελέτες.

**c-ErbB-2 (HER2/neu):** Έχει διαπιστωθεί η γονιδιακή του επέκταση και η υπερέκφρασή του στο 30% περίπου των καρκινωμάτων του μαστού. Εκτός, όμως από την επέκταση, ογκογονική ενεργοποίηση του γονιδίου αυτού έχει διαπιστωθεί και λόγω σημειακών μεταλλάξεων που επιφέρουν τροποποίηση της λειτουργικότητας του υποδοχέα. Το ERBB2 υπερεκφράζεται σε υψηλά ποσοστά στα DCIS υψηλού grade, και η υπερέκφραση του αποτελεί σημαντικό δείκτη δυσμενούς πρόγνωσης. Η ποιοτική και ποσοτική σημασία του στον καρκίνο του μαστού. οδήγησαν



στη δημιουργία φαρμάκου (μονοκλωνικό αντίσωμα trastuzumab), το οποίο σήμερα χρησιμοποιείται ευρύτατα [34].

**CYCLIN D1:** Μελέτες αναφέρουν την υπερέκφραση της πρωτεΐνης αυτής στο 35% των καρκίνων μαστού χωρίς να συνοδεύεται πάντα από επέκταση του γονιδίου CCND1. Με ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχει διαπιστωθεί καλή συσχέτιση της ανίχνευσης της CD1 και των οιστρογονικών υποδοχέων, οπότε η CD1 χρησιμοποιείται ως δείκτης για την επιλογή θεραπευτικού σχήματος [35].

**P53:** Τροποποιήσεις του ογκοκατασταλτικού αυτού γονιδίου είναι οι πιο συχνά αναφερόμενες γενετικές ανακατατάξεις στον καρκίνο του μαστού. Έτσι, ανάλογα με το στάδιο της νόσου και την τεχνική προσέγγιση ανίχνευσης έχει διαπιστωθεί κάποια αλλαγή στο γονίδιο αυτό στο 15–50% των εξεταζόμενων καρκίνων του μαστού. Με τη χρήση τεχνικών ανοσοϊστοχημείας και αλληλουχοποίησης (sequencing) έχουν διαπιστωθεί αρκετές σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο p53 οι οποίες συσχετίζονται με επιθετικά χαρακτηριστικά του καρκίνου, όπως η απουσία υποδοχέων οιστρογόνων. Επίσης, φαίνεται ότι το προφίλ των ανιχνευόμενων μεταλλάξεων διαφέρει σημαντικά ανάμεσα σε καρκίνους με μεταστατικούς λεμφαδένες και καρκίνους με μη μεταστατικούς λεμφαδένες. Έχει βρεθεί επίσης ότι η λειτουργικά τροποποιημένη (λόγω κάποιας μετάλλαξης) p53 πρωτεΐνη επηρεάζει την ανταπόκριση του ασθενούς σε θεραπευτικά σχήματα ακτινοβολίας και χημειοθεραπείας, προφανώς λόγω της εμπλοκής της στην κυτταρική απόκριση σε βλάβες του DNA [36].

**BRCA1 & BRCA2:** Σημειακές μεταλλάξεις και ευρύτερες γενωμικές ανακατατάξεις αυτών των γονιδίων θεωρούνται υπεύθυνες για τα 2/3 περίπου των περιπτώσεων του κληρονομούμενου καρκίνου του μαστού, ενώ πιο σπάνια παρουσιάζονται στον σποραδικό καρκίνο. Γυναίκες φορείς μεταλλάξεων αυτών των γονιδίων έχουν περισσότερο από 80% πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του μαστού κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Γενετικές αναλύσεις κατά τις οποίες ανιχνεύονται μεταλλάξεις αυτών των δύο γονιδίων χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πράξη με σκοπό την πρόληψη και την αντιμετώπιση της κληρονομικής μορφής του καρκίνου του μαστού [37, 38, 39].



Εκτός του συνδρόμου μαστού/ωσθηκών για το οποίο ενοχοποιούνται τα BRCA1&2, υπάρχουν και άλλα 30 περίπου καρκινικά κληρονομικά σύνδρομα στα οποία ο μαστός είναι συστατικό μέρος. Σε αρκετά από αυτά έχουν βρεθεί άλλα γονίδια των οποίων οι μεταλλάξεις είναι υπεύθυνες για την κληρονομική προδιάθεση. Τέτοια γονίδια είναι το p53 στο σύνδρομο Li-Fraumeni, το PTEN στο σύνδρομο Cowden [40], το ATM στο σύνδρομο της Αταξίας-Τελαγγειεκτασίας [41] κλπ. Τα γονίδια αυτά, όλα μαζί, καλύπτουν το υπόλοιπο 1/3 της κληρονομικής μορφής του καρκίνου του μαστού. Τα περισσότερα είναι χαμηλής διεισδυτικότητας, δεν παύουν όμως να είναι σημαντικά για την θεωρητική και πρακτική αντιμετώπιση του καρκίνου.

## 5 ΤΟ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΟ *c-myc* – ΔΟΜΗ & ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

### 5.1 ΓΕΝΙΚΑ

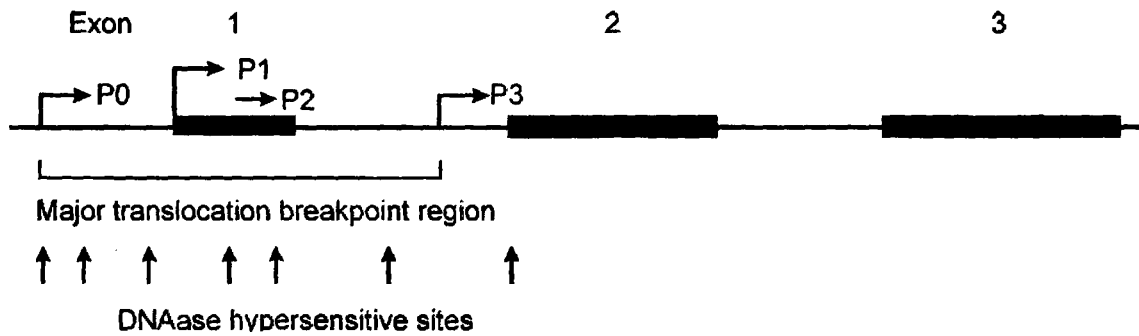
Το πρωτο-ογκογονίδιο *c-myc* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Myc που είναι ένας βασικός μεταγραφικός παράγοντας. Το *c-myc* ταυτοποιήθηκε πρώτη φορά ως το κυτταρικό ομόλογο γονίδιο του ιϊκού ογκογονιδίου *v-myc* του ρετροϊού AML (avian myelocytomatosis retrovirus).

Μέσα στο γονίδιο του *c-myc* – που αποτελείται συνολικά από 3 εξώνια – υπάρχουν πολλαπλές θέσεις έναρξης της μεταγραφής, επιτρέποντας έτσι το σχηματισμό τεσσάρων μεταγράφων, με την αντίστοιχη δραστηριότητα των 4 διαφορετικών υποκινητών (P0, P1, P2, και P3 με μεγέθη 3.1, 2.4, 2.25 και 2.0 kb αντίστοιχα). Το μετάγραφο που κυριαρχεί είναι το P2 και φέρει ένα 5'-UTR μεγέθους περίπου 400 νουκλεοτιδίων. Τα εξώνια 2 και 3 είναι κατά 70 και 90% όμοια μεταξύ των ειδών, ενώ το 1 είναι κατά 70% συντηρημένο μεταξύ ανθρώπου και ποντικού. Η περιοχή στο 5' άκρο περιέχει σταθερές και ιστο-ειδικές θέσεις με υπερευαισθησία σε επίδραση DNase I (ένδειξη μεταγραφικά



ενεργούς χρωματίνης). Επομένως, η περιοχή αυτή συμμετέχει στη ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου, μέσω αλληλεπίδρασης με *cis* ενισχυτικά στοιχεία, όπως περιγράφεται σε επόμενη παράγραφο [2] (Εικόνα 3).

**Εικόνα 3**  
**Διαγραμματική αναπαράσταση της δομής του ανθρώπινου γονιδίου *c-myc***



Στο διάγραμμα φαίνονται τα τρία εξώνια που δομούν το ανθρώπινο γονίδιο *c-myc* καθώς και οι τέσσερις εναλλακτικοί υποκινητές (P0, P1, P2 και P3). Επίσης, διακρίνονται οι περιοχές που υπάρχουν οι θέσεις υπερευαισθησίας σε DNAase και είναι γνωστό ότι αποτελούν βασικά *cis* ρυθμιστικά στοιχεία [2].

Πολύ νωρίς διαπιστώθηκε ότι η υπερέκφραση του *c-myc* στα λεμφοκύτταρα είναι βασική αιτία του λεμφώματος Burkitt στον άνθρωπο, η οποία οφείλεται σε χρωμοσωμική μετάθεση μεταξύ του χρωμοσώματος 8 (όπου εδράζεται το *c-myc*) και ενός από τα τρία χρωμοσώματα που περιέχουν τα γονίδια των ανοσοσφαιρινών. Στη συνέχεια, η απορυθμισμένη έκφρασή του ανιχνεύτηκε σε μια ποικιλία τύπων καρκίνου στον άνθρωπο και συσχετίστηκε με όγκους αδιαφοροποίητους και επιθετικούς. Τέτοιοι όγκοι είναι του μαστού, του εντέρου, το οστεοσάρκωμα, το γλοιοβλάστωμα, το μελάνωμα και οι μυελογενείς λευχαιμίες.

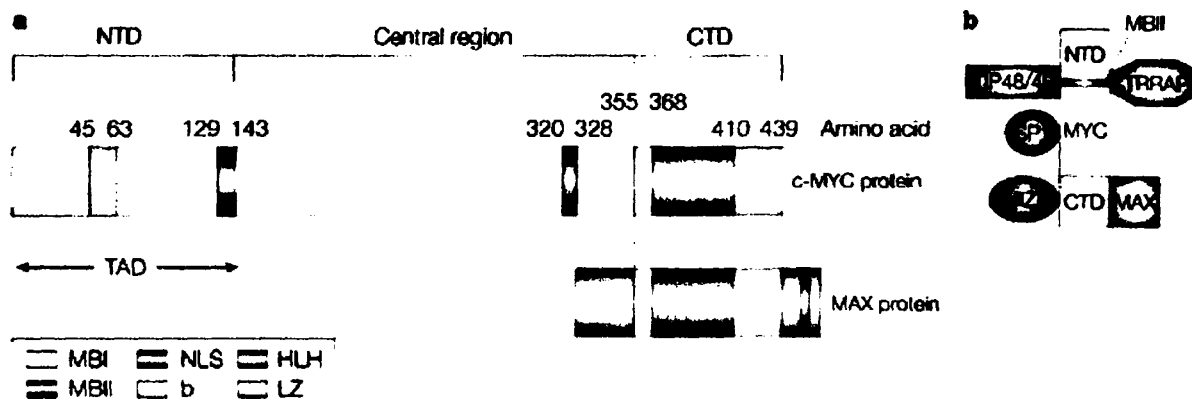


## 5.2 ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ C-MYC ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΗΣ

Η πρωτεΐνη C-MYC είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που επηρεάζει την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού διαφορετικών γονιδίων. Το μόριο αποτελείται από τη χαρακτηριστική δομή φερμουάρ-λευκίνης (leucine-zipper) και στο καρβοξυ-τελικό άκρο του έχει τη δομή φουρκέτας: έλικα-θηλειά-έλικα (Εικόνα 4). Με τη δομή αυτή αλληλεπιδρά με ανάλογη δομή του μορίου MAX σχηματίζοντας ετεροδιμερή. Τα ετεροδιμερή αυτά έχουν την ικανότητα πρόσδεσης σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA που χαρακτηρίζονται ως E-box, όπως η CACGTG. Τα τελευταία 150 αμινοξικά κατάλοιπα του μορίου περιέχουν δύο υψηλά συντηρημένες περιοχές που χαρακτηρίζονται ως MYC Box I και II και είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση με το DNA. Μεταλλάξεις που επηρεάζουν είτε την περιοχή αυτή είτε τη δομή της φουρκέτας καθιστούν το μόριο ανενεργό [42, 43].

Εικόνα 4

### Δομή της ανθρώπινης πρωτεΐνης c-myc



Nature Reviews | Cancer

a) Το καρβοξυ-τελικό άκρο (CTD) του μορίου περιλαμβάνει τη βασική δομή έλικας-θηλειάς-έλικας (HLH), δομή απαραίτητη για το διμερισμό με το MAX μόριο και την πρόσδεση, στη συνέχεια, του διμερούς στο DNA. Το αμινο-τελικό άκρο (NTD) περιλαμβάνει τις διατηρημένες αλληλουχίες που καλούνται MYC Boxes I και II, τα οποία είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων του συμπλόκου.

b) Πρωτεΐνες που μπορεί να αλληλεπιδρούν ταυτόχρονα στο C-MYC μόριο. Ανάμεσα τους, η πρωτεΐνη TRAP (Transformation/Transcription Domain Associated Protein), η οποία δρα ως ακέτυλ-τρανσφεράση και συμμετέχει στην αλλαγή της δομής της χρωματίνης. Μόρια που επίσης συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία είναι τα Tip48/49, με δράση υδρολάσης. Άλλα, όπως το MIZ1, επιδρούν στη δράση του συμπλόκου σαν μεταγραφικού παράγοντα [42].



Η πρωτεΐνη MAX υπό τη μορφή ομοδιμερών αναγνωρίζει τις ίδιες αλληλουχίες με τα ετεροδιμερή c-MYC/MAX. Η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών επηρεάζεται άμεσα από τις πρωτεΐνες μιας άλλης οικογένειας, της MAD/MXII. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τους μεταγραφικούς καταστολείς MAD1, MXII, MAD3 και MAD4, πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να ετεροδιμερίζονται με τη MAX, δρώντας έτσι ανταγωνιστικά για το c-MYC. Τα ετεροδιμερή αυτά που σχηματίζουν οι MAD/MXII με την MAX καταστέλλουν την μεταγραφή, καθώς τα σύμπλοκα τροποποιούν τη χρωματίνη μέσω πρόσδεσης στα E-boxes των γονιδίων-στόχων τους, επομένως δρουν ανταγωνιστικά στα σύμπλοκα c-MYC/MAX. Είναι επίσης γνωστό ότι το ετεροδιμερές MAD/MAX προσδένεται σε μόρια της τάξης I των απο-ακετυλασών των ιστονών (HDAC1 και HDAC2), γεγονός που οδηγεί στην αποακετυλίωση των ιστονών τοπικά και έτσι τη μειωμένη πρόσδεση σε αυτές τις θέσεις των διαφόρων trans-ενεργοποιητικών παραγόντων. Ανταγωνιστικά για το c-MYC δρα και άλλη μια πρωτεΐνη, η Mnt, η οποία σχηματίζει με τη MAX ετεροδιμερή που επιδρούν στα ίδια γονίδια-στόχους με τα σύμπλοκα c-MYC/MAX, έχοντας όμως το αντίθετο αποτέλεσμα, καταστέλλοντας δηλαδή τη μεταγραφή τους.

Συνοπτικά, έχει βρεθεί ότι σε φυσιολογικές συνθήκες μέσα στο κύτταρο, τα επίπεδα των MAX πρωτεϊνικών μορίων διατηρούνται σταθερά, ενώ, τα επίπεδα της c-MYC πρωτεΐνης είναι υψηλά όταν παρατηρείται έντονος πολλαπλασιασμός και χαμηλή διαφοροποίηση και αντίθετα, οι MAD πρωτεΐνες αυξάνονται όταν μειώνεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και προάγεται η κυτταρική διαφοροποίηση. Όλες αυτές οι αλλαγές δημιουργούν έναν ροοστάτη που ρυθμίζεται από τα επίπεδα των διαφόρων συνεργατών της MAX πρωτεΐνης. Συνεπώς, η δραστηριότητα του c-MYC ως μεταγραφικού παράγοντα, δηλαδή ο σχηματισμός c-MYC/MAX ετεροδιμερών που αποτελούν τη δραστική μορφή του, εξαρτάται από το σχετικό ισοζύγιο όλων αυτών των πρωτεϊνικών μορίων που προαναφέρθηκαν και τα οποία δρουν ανταγωνιστικά για το c-MYC τόσο στο σχηματισμό ετεροδιμερών όσο και στην αλληλεπίδραση στα γονίδια στόχους.

Σε φυσιολογικές καταστάσεις, το c-myc εκφράζεται ευρέως κατά την εμβρυογένεση ενώ στον ενήλικα μόνο σε συγκεκριμένους ιστούς με



υψηλή αυξητική ικανότητα, όπως είναι η επιδερμίδα και ο γαστρεντερικός σωλήνας. Η έκφρασή του σχετίζεται άμεσα με την πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων [44, 45]. Σε καλλιέργεια, η έκφραση του *c-myc* επάγεται άμεσα σε απόκριση επίδρασης μιτογόνων παραγόντων, αν και λίγα από τα μονοπάτια που επάγουν την έκφραση του έχουν πλήρως διαλευκανθεί έως σήμερα. Ταυτόχρονα με την προαγωγή της κυτταρικής αύξησης και του πολλαπλασιασμού, το *c-Myc* αναστέλλει την τελική διαφοροποίηση των περισσότερων κυτταρικών τύπων και ευαισθητοποιεί τα κύτταρα στην απόπτωση. Αυτή η τελευταία ιδιότητά του έχει προκαλέσει το έντονο ενδιαφέρον λόγω του πιθανού ρόλου του στην ογκοκαταστολή. Η πιο ευρέως αποδεκτή άποψη για την απόπτωση που επάγεται από ογκοπρωτεΐνες όπως η *c-MYC*, είναι ότι καθώς αυτές προάγουν την είσοδο στον κυτταρικό κύκλο, κάνουν τα κύτταρα πιο ευαίσθητα στην απόπτωση. Όμως, το αποπτωτικό μονοπάτι καταστέλλεται όσο οι απαραίτητοι παράγοντες επιβίωσης μεταφέρουν στο κύτταρο το αντι-αποπτωτικό μήνυμα. Με δεδομένο αυτό, το τελικό αποτέλεσμα αυτών των διαδικασιών εξαρτάται από την διαθεσιμότητα των παραγόντων επιβίωσης.

Σημαντικές πληροφορίες για τη δράση του *c-myc* προέκυψαν από γενετικά τροποποιημένα ποντίκια στα οποία η έκφραση ή η ενεργοποίηση ενός ογκογονιδίου μπορεί να επαχθεί ή να ανασταλεί πλήρως *in vivo*. Αυτά τα συστήματα μελέτης έχουν αποδειχτεί πολύτιμα αφού μας δίνουν πληροφορίες για το φυσιολογικό ρόλο των ογκογονιδίων μέσα στο πραγματικό περιβάλλον ενός ολόκληρου, ενηλικίου οργανισμού. Χρησιμοποιώντας ένα τέτοιο σύστημα μελέτης είναι δυνατή η απάντηση ερωτημάτων που αφορούν την επικοινωνία των καρκινικών και των φυσιολογικών κυττάρων καθώς και την πορεία του αρχικού όγκου όταν αναστέλλεται ή επάγεται η έκφραση του ογκογονιδίου. Μερικά από τα πιο σημαντικά συμπεράσματα που προέκυψαν από τέτοιου είδους μελέτες αναφέρονται στη συνέχεια.



### 5.2.1 c-MYC και κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Μια από τις βασικές λειτουργίες του c-MYC είναι η προαγωγή του κυτταρικού κύκλου [46, 47]. Σε μη πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα *in vitro* το c-MYC είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμο. Με την επίδραση ενός μιτογόνου ερεθίσματος επάγονται γρήγορα τόσο το *c-myc* mRNA όσο και η πρωτεΐνη και τα κύτταρα εισέρχονται στην G1 φάση του κύκλου. Από αυτό το σημείο και μετά, τα επίπεδα του c-MYC μειώνονται σημαντικά αλλά παραμένουν ανιχνεύσιμα και διατηρούνται σταθερά. Εάν το μιτογόνο ερέθισμα σταματήσει, τα επίπεδα του c-MYC γίνονται μη ανιχνεύσιμα και τα κύτταρα σταματούν να διαιρούνται.

Η κατευθυνόμενη απενεργοποίηση και των δύο αλληλομόρφων του *c-myc* σε ποντίκια οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο κατά τις εμβρυϊκές μέρες 9,5–10,5. Το γεγονός αυτό τονίζει το βασικό ρόλο του *c-myc* στον έλεγχο της φυσιολογικής αύξησης κατά την ανάπτυξη των θηλαστικών. Μετάγραφα του *c-myc* ανιχνεύονται σε μεγάλο αριθμό ιστών κατά την ανάπτυξη. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ποντικού, η αυξημένη έκφραση του *c-myc* σχετίζεται με τον ενεργό πολλαπλασιασμό ενώ η μείωσή του συνοδεύεται από αναστολή της μίτωσης και επαγωγή της διαφοροποίησης [48].

Πιο πρόσφατα πειράματα σε κυτταρική σειρά ινοβλαστών αρουραίου, όπου είχαν απενεργοποιηθεί και τα δύο αλληλία του *c-myc*, έδειξαν ότι τα κύτταρα είχαν ιδιαίτερα χαμηλούς ρυθμούς πολλαπλασιασμού με έντονα προβλήματα στην G1 φάση. Σε αυτά περιλαμβάνεται και η καθυστέρηση στη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb του ρετινοβλαστώματος [49]. Ακόμη πιο σημαντική και μη αναμενόμενη ήταν η παρατήρηση ότι τα κύτταρα ουσιαστικά σταματούσαν να αυξάνονται και μάλιστα μειωνόταν συνεχώς η κυτταρική μάζα, το ολικό mRNA και η πρωτεϊνική σύνθεση. Επιπλέον, η παρατήρηση ότι η φωσφορυλίωση του ρετινοβλαστώματος πραγματοποιείται τελικά όταν η συνολική κυτταρική μάζα των τροποποιημένων κυττάρων φθάσει στα ίδια επίπεδα με αυτή των μη τροποποιημένων κυττάρων-μαρτύρων, υποδηλώνει ότι η καθυστερημένη κυτταρική αύξηση καθυστερεί και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.



Η πρώτη ένδειξη ότι το c-Myc επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο ήρθε από τη συσχέτιση των επιπέδων του και της έκφρασης των παραγόντων eIF4E και eIF2a, που αποτελούν παράγοντες έναρξης της μετάφρασης και τα επίπεδα ουσιαστικά ρυθμίζουν τη διαδικασία. Σήμερα έχει πια αποδειχτεί ότι τα δύο αυτά γονίδια αποτελούν άμεσο στόχο του c-Myc [50, 51].

Εξάλλου, υπερέκφραση του c-Myc στα Β λεμφοκύτταρα Em-Myc διαγονιδιακών ποντικών επιφέρει κυτταρική αύξηση χωρίς προώθηση του κυτταρικού κύκλου. Παρόλα αυτά, είναι μάλλον απίθανο ότι ο πρωταρχικός ρόλος του c-Myc είναι η ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης [52].

Μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι το c-Myc προάγει τον κυτταρικό κύκλο λόγω της ιδιότητάς του να ενεργοποιεί ή να καταστέλλει γονίδια στόχους του που εμπλέκονται άμεσα στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου.

Η μετάβαση των ευκαρυωτικών κυτάρων από τη φάση G1 στην S ελέγχεται από σύμπλοκα κινασών εξαρτώμενα από κυκλίνες (CDK) και συγκεκριμένα από τα σύμπλοκα των D-CDK4 και E-CDK2 κυκλινών. Έχει αποδειχτεί ότι το γονίδιο τόσο της CDK4 όσο και της CDK2 είναι άμεσοι στόχοι του c-Myc. Επάγοντας την έκφρασή τους, ξεκινά ενεργοποίηση μιας σειράς άλλων μορίων που καταλήγουν στην υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος και τελικά την απελευθέρωση του μεταγραφικού παράγοντα E2F. Αν και είναι γνωστό ότι η κυκλίνη D2 είναι ένας βασικός στόχος του c-Myc, μέσω της οποίας προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, οι κυκλίνες D δε φαίνεται να είναι απαραίτητες στην επαγόμενη από το c-Myc απόπτωση. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το γονίδιο αυτό πιθανά επάγει τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση μέσω διαφορετικών κυτταρικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος.

Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι το c-Myc επηρεάζει γενικά τον κυτταρικό κύκλο καταστέλλοντας την έκφραση πολλών γονιδίων. Για παράδειγμα, τα γονίδια *INK4B* [53] και *WAF1* [54], που είναι γνωστοί αναστολείς των κυκλινών και άρα σχετίζονται με την παύση του κυτταρικού κύκλου, απενεργοποιούνται έμμεσα από τα ετεροδιμερή MYC-MAX.

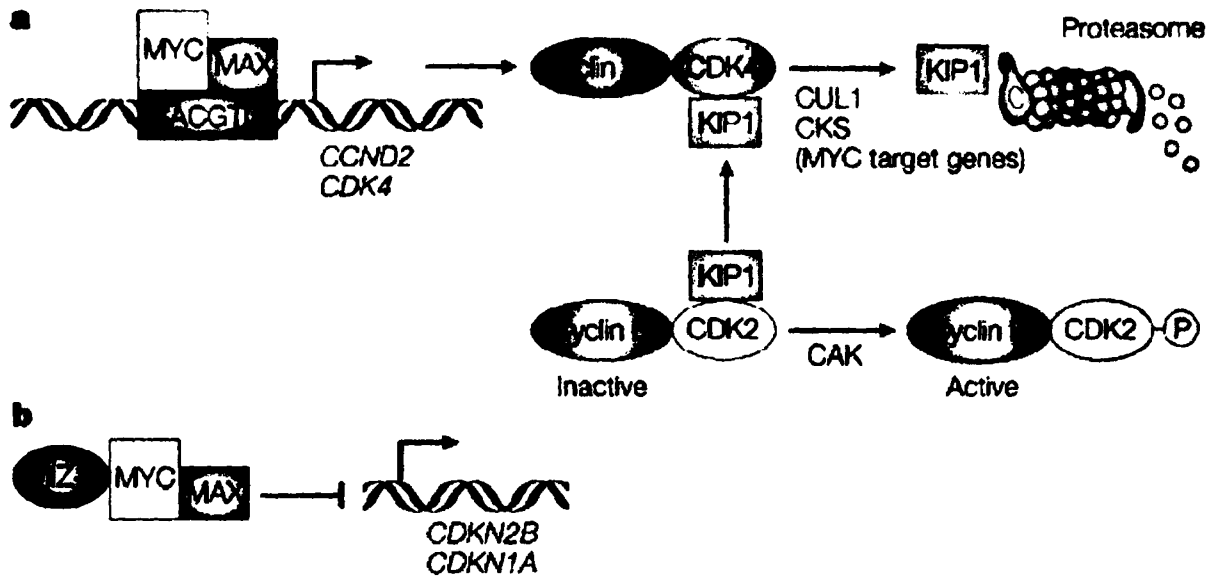


Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα δεδομένα που υποδεικνύουν ότι τα ετεροδιμερή MYC-MAX ρυθμίζουν την ενεργοποίηση πολλών γονιδίων μέσω της αναδόμησης της χρωματίνης. Διαπιστώθηκε ότι το c-Myc συσχετίζεται με τον ενεργοποιητή TRRAP (transformation/transcription domain associated protein) που είναι συστατικό ενός μεγάλου συμπλόκου, το οποίο έχει ενεργότητα ακετυλ-τρανσφεράσης της ιστόνης (HAT). Ο Bouchard και οι συνεργάτες του [51] έδειξαν ότι όταν το c-MYC προσδέεται στον υποκινητή ενός γονιδίου, επάγει επιλεκτικά την ακετυλίωση της ιστόνης H4 του συγκεκριμένου νουκλεοσώματος (μέσω της TRRAP), μεταβάλλοντας έτσι τη δομή της χρωματίνης. Με αυτόν τον τρόπο διευκολύνεται η πρόσβαση του συμπλόκου MYC-MAX στην περιοχή του γονιδίου και επομένως ενεργοποιείται η μεταγραφή του [55, 56, 57] (Εικόνα 5).



Εικόνα 5

Το c-MYC προάγει τη μετάβαση του κυττάρου από την G1 στην S φάση ενεργοποιώντας και καταστέλλοντας την έκφραση διαφόρων γονιδίων.



Nature Reviews | Cancer

A. Ετεροδιμερή MYC-MAX ενεργοποιούν το γονίδιο-στόχος CCND2 (το οποίο κωδικοποιεί την κυκλίνη D2) και την κυκλινεξαρτώμενη κινάση 4 (CDK4), που δεσμεύει τον αναστολέα κινασών KIP1 (γνωστός και ως p27) σε σύμπλοκα. Με την ενεργοποίηση δύο ακόμη γονιδίων-στόχων του c-myc επιτυγχάνεται η καταστροφή των μορίων του KIP1, οπότε το σύμπλοκο της κυκλίνης E και της CDK2 ενεργοποιείται και προάγεται ο κύκλος.

B. Ετεροδιμερή MYC-MAX καταστέλλουν τα γονίδια των αναστολέων κυκλινών INK4B (γνωστό και ως p15, κωδικοποιείται από το γονίδιο CDKN2B) και WAF1 (γνωστό και ως p21, κωδικοποιείται από το γονίδιο CDKN1A), οι οποίοι ενέχονται στο σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου [42].



### 5.2.2 Το c-MYC αναστέλλει την κυτταρική διαφοροποίηση

Η ενεργοποίηση του *c-myc* και η επακόλουθη είσοδος του κυττάρου στον κύκλο είναι γενικά ασύμβατη με την τελική διαφοροποίηση. Ταυτόχρονα όμως, έχει δείχτεί ότι η ικανότητα του *c-Myc* να αναστέλλει την τελική διαφοροποίηση δεν συνοδεύεται πάντα από επαγωγή του κυτταρικού κύκλου. Πολυάριθμες μελέτες έχουν τονίσει τη σημασία του δικτύου των πρωτεϊνών MYC/MAX/MAD στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης [58, 59]. Γενικά, η έκφραση των πρωτεϊνών MAD/MXII συμπίπτει με μειωμένη έκφραση του *c-Myc*, οπότε τα κύτταρα βγαίνουν από τον κυτταρικό κύκλο οδηγούνται σε τελική διαφοροποίηση.

Υπάρχουν βέβαια και κάποιες εξαιρέσεις [60, 61, 62], όπως ιστοί που παρουσιάζουν τοπική διαμερισματοποίηση όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. Τέτοιοι ιστοί είναι οι κρύπτες του γαστρεντερικού συστήματος και το πλακώδες επιθήλιο του δέρματος. Σε αυτούς τους ιστούς η πρωτεΐνη *c-Myc* ανιχνεύεται στα ανώριμα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, ενώ οι πρωτεΐνες MAD περιορίζονται στα μετά-μιτωτικά κύτταρα που διαφοροποιούνται. Δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο εάν η μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης *c-Myc* αποτελεί το έναυσμα για διαφοροποίηση ή τη συνέπεια της προκαθορισμένης πορείας του κυττάρου. Υπάρχουν μελέτες που υποδεικνύουν ότι η πορεία της διαφοροποίησης δεν προϋποθέτει πάντα διακοπή του κυτταρικού κύκλου, οπότε η πρωτεΐνη *c-Myc* μπορεί να είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση των κυττάρων προς τα τελικά στάδια της επιδερμικής ή της αιμοποιητικής σειράς. Μένει όμως ακόμη αδιευκρίνιστο εάν η κυτταρική αύξηση και ο μεταβολισμός που επάγει το *c-Myc* είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για την δέσμευση των κυττάρων σε μια συγκεκριμένη γραμμή διαφοροποίησης.

Η μεγάλη σημασία του αυστηρού ελέγχου της έκφρασης του *c-myc* από τις MAD πρωτεΐνες φάνηκε από το φαινότυπο των *Mad1-* και *Mxi1-* knock-out ποντικών που κατασκευάστηκαν από τους Foley και Eisenman [59]. Αν και υπήρχαν βασικές διαφορές μεταξύ των δύο φαινοτύπων των πειραματοζώων, το κοινό τους χαρακτηριστικό ήταν η ικανότητα των



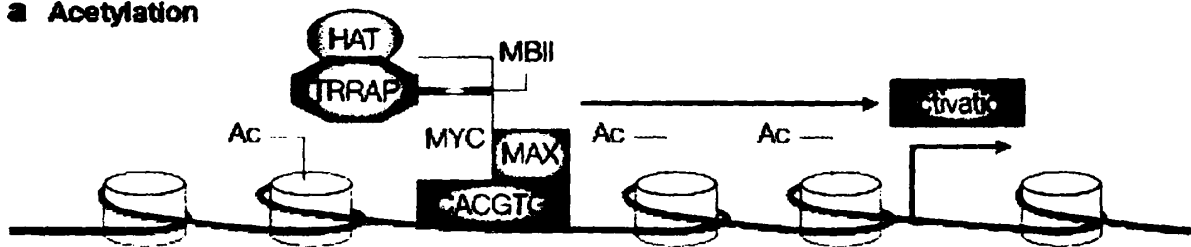


κυττάρων για αυξημένο πολλαπλασιασμό. Η έλλειψη του *Mxi1* συνοδεύεται από υπερπλασία σε πολλούς ιστούς και ογκογένεση, ενώ η έλλειψη του *Mad1* επηρεάζει την διαφοροποίηση των πολυμορφοπύρηνων κυττάρων και μείωνε σαφώς την κυτταρική επιβίωση. Προφανώς, στη δεύτερη περίπτωση, η έλλειψη του *Mad1* εξισορροπείται από τη λειτουργία των άλλων πρωτεϊνών της οικογένειας MAD. Από τα παραπάνω πειράματα συμπεραίνει κανείς ότι το *Mxi1* θα μπορούσε να λειτουργεί ογκοκατασταλτικά στον άνθρωπο (Εικόνα 6).

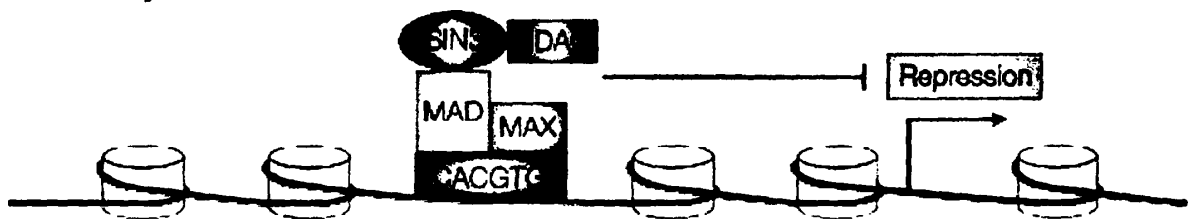
Εικόνα 6

Τα σύμπλοκα MYC-MAX και MAD-MAX ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση μέσω αλλαγής της δομής της χρωματίνης.

**a Acetylation**



**b Deacetylation**



Nature Reviews | Cancer

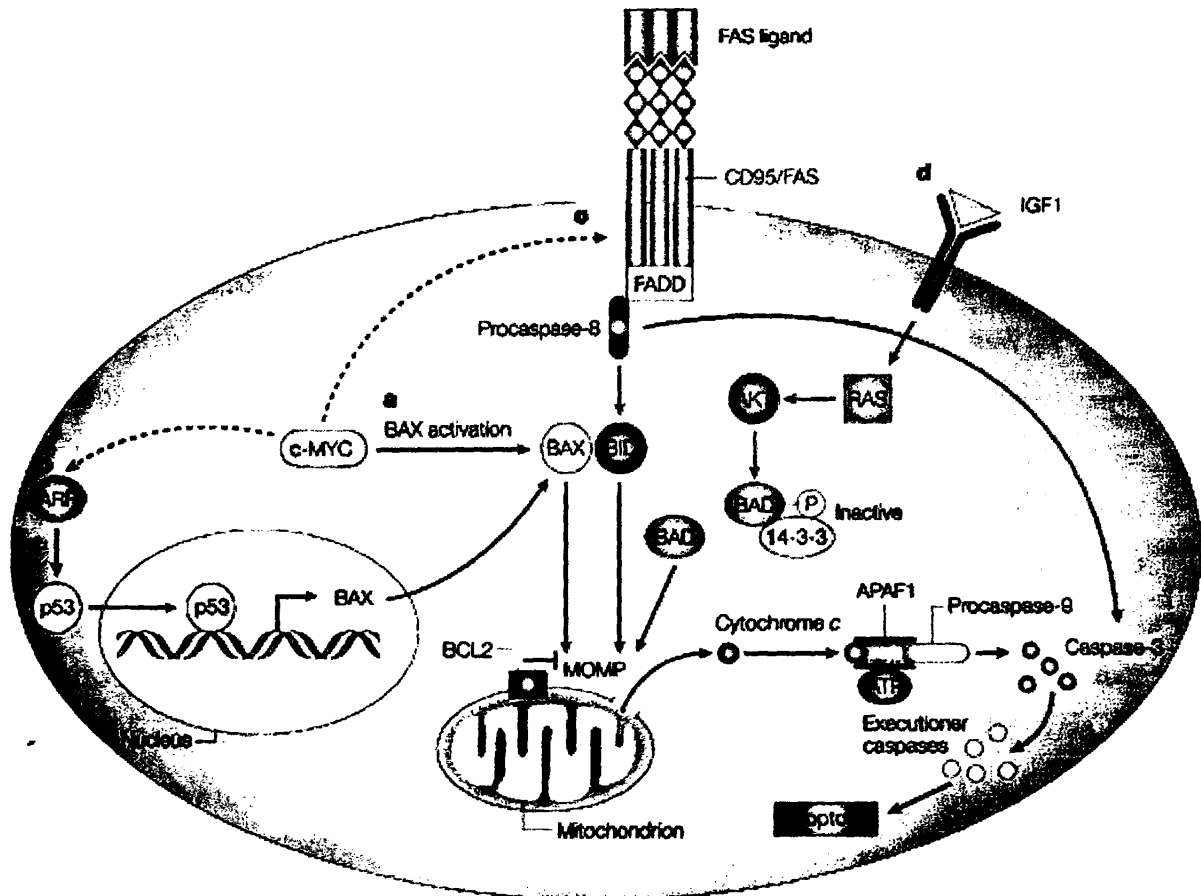
A. Ετεροδιμερή MYC-MAX προσδένονται στις αλληλουχίες των E-boxes κοντά στον υποκινητή των γονιδίων-στόχων του *c-myc*. Μέρια της πρωτεΐνης TRRAP δεσμεύονται από το MYC και ακετυλιώνουν την ιστόνη H4 στο κοντινό νουκλεόσωμα, γεγονός που προκαλεί αλλαγή της δομής της χρωματίνης τοπικά και συνεπώς ενεργοποίηση των γονιδίων.

B. Επαγωγή του MAD κατά την τελική διαφοροποίηση των κυττάρων, οδηγεί στη δέσμευση ετεροδιμερών MAD-MAX σε E-box αλληλουχία ενός γονιδίου-στόχου του *c-myc*. Σε αυτό δεσμεύεται και η πρωτεΐνη SIN3 καθώς και αποακετυλάσες που προκαλούν τοπική αποακετυλίωση των ιστονών και καταστολή της γονιδιακής έκφρασης [42].



## Εικόνα 7

## Μονοπάτια της απόπτωσης που εμπλέκεται το c-myc



Nature Reviews | Cancer

Το c-myc ευαισθητοποιεί τα κύτταρα σε μια μεγάλη ποικιλία προ-αποπτωτικών ερεθισμάτων. Μέσω ενεργοποίησης του BAX, το c-myc επάγει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα. Έτσι, ενεργοποιείται η πρωτεΐνη APAF1 και η κασπάση 9, μόρια που ενεργοποιούν με τη σειρά τους έναν καταρράκτη κασπασών που οδηγεί τελικά στην καταστροφή του κυττάρου.

Η επαγόμενη από το c-myc απελευθέρωση του κυτοχρώματος c ενεργοποιεί άμεσα ή έμμεσα και άλλα μονοπάτια, όπως του p53, του CD95 υποδοχέα θανάτου κλπ. [42].



Η πρώτη πληροφορία για το μηχανισμό δράσης του c-Myc κατά την επαγόμενη απόπτωση, ήρθε από μελέτες των Juin *et al.* [78], οι οποίοι έδειξαν ότι το c-Myc επάγει την απελευθέρωση στο κυτταρόπλασμα του κυτοχρώματος c, το οποίο με τη σειρά του, ενώνεται με την πρωτεΐνη APAF1 (apoptotic protease-activating factor 1) και σχηματίζει το λεγόμενο αποπτώσωμα. Παρουσία ATP ή ADP, το αποπτώσωμα ενεργοποιεί την προκασπάση-9 η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί μια σειρά κασπασών (2, 3, 6, 7, 8, 10) με αποτέλεσμα τη διάλυση του κυττάρου.

Η απελευθέρωση στο κυτταρόπλασμα του κυτοχρώματος c προϋποθέτει τη μεταβολή της διαπερατότητας της μεμβράνης των μιτοχονδρίων. Επιπλέον, δείχθηκε ότι οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 έχουν θεμελιώδη ρόλο στη ρύθμιση αυτού του φαινομένου, ακόμη όμως δεν είναι πλήρως γνωστό με ποιο τρόπο αλληλεπιδρά το c-Myc με τις πρωτεΐνες αυτού του μηχανισμού [79]. Μια υπόθεση είναι ότι ενεργοποιείται η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη BAX. Αυτή η πρωτεΐνη σε φυσιολογικές συνθήκες είναι ένα ανενεργό μονομερές μόριο. Κατά την απόπτωση όμως, σχηματίζει ολιγομερή τα οποία μεταναστεύουν από το κυτταρόπλασμα προς τη μιτοχονδριακή μεμβράνη υπό την επίδραση διαφόρων άλλων πρωτεϊνικών μορίων – μελών της οικογένειας Bcl-2, τα οποία αλληλεπιδρούν με τους πόρους και υποβοηθούν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως το Bcl2 και το Bcl-X<sub>L</sub> βρίσκονται πάντα στην εξωτερική πλευρά της μιτοχονδριακής μεμβράνης και παρεμποδίζουν τη δράση της πρωτεΐνης BAX. Η διατάραξη της ισορροπίας αυτής μέσα σε ένα κύτταρο που έχει ενεργοποιηθεί από το c-Myc, λόγω της παρουσίας αντι-αποπτωτικών ή προ-αποπτωτικών μορίων, καθορίζει εάν το κύτταρο αυτό θα ζήσει ή θα πεθάνει.

Πειράματα σε *in vitro* συστήματα έχουν δείξει ότι ο παράγοντας επιβίωσης IGF-1 (insulin like growth factor 1) αναστέλλει την επαγόμενη από το c-Myc απόπτωση μπλοκάροντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c [78]. Μηνύματα επιβίωσης που μεταφέρονται από τον υποδοχέα IGF-1 ή ενεργοποίηση του RAS οδηγούν σε ενεργοποίηση της κινάσης AKT/PKB, η οποία φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη BAD (ανήκει



στην οικογένεια Bcl-2) με συνέπεια την απενεργοποίηση των πρωτεϊνών που θα υποβοηθούσαν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c.

Άλλοι μηχανισμοί μέσω των οποίων το c-Myc φαίνεται ότι μπορεί να επάγει απόπτωση, σχετίζονται με την έμμεση ενεργοποίηση των παραγόντων p53 και ARF, καθώς και τη μείωση της έκφρασης μορίων πρόσδεσης (cell adhesion molecules) όπως η E-καντερίνη [80, 81]. Οι μηχανισμοί αυτοί δεν έχουν ακόμη μελετηθεί πλήρως.

Είναι πλέον ξεκάθαρο ότι οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η πρωτεΐνη c-Myc, μπορεί να ωθήσει ένα κύτταρο να αποπέσει είναι πολλοί και διαφορετικοί. Το ποιος είναι ο μηχανισμός που λειτουργεί κάθε φορά εξαρτάται από δύο βασικές παραμέτρους: από τον κυτταρικό και ιστολογικό τύπο και από την παρουσία ή απουσία επιπλέον μεταλλάξεων σε άλλα προ- και αντι-αποπτωτικά γονίδια.

#### 5.2.4 Έκτοπη έκφραση του c-myc σε ανθρώπινους όγκους

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ως έκτοπη έκφραση του c-myc χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε έκφραση της ογκοπρωτεΐνης διαφέρει από το φυσιολογικό και αυστηρά ελεγχόμενο πρότυπο έκφρασης που συναντάται σε κάθε κυτταρικό τύπο. Μέχρι πρόσφατα βέβαια, ήταν πολύ δύσκολη η διάκριση μεταξύ των κυτάρων που φέρουν φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης και αυτών που εκφράζουν έκτοπα το ογκογονίδιο αυτό. Στα φυσιολογικά διαιρούμενα κύτταρα η έκφραση του c-MYC διατηρείται σε σχετικά σταθερά, ενδιάμεσα επίπεδα, καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου. Στην ογκογονική κατάσταση, το c-myc μπορεί να εκφράζεται συνεχώς σε ποικίλα επίπεδα, από πολύ χαμηλά μέχρι πολύ υψηλά, τα οποία δεν ανταποκρίνονται σε κανένα εξωτερικό μήνυμα, και τα οποία υπερβαίνουν τα αντίστοιχα φυσιολογικά επίπεδα για το συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο [42] (Εικόνα 8).

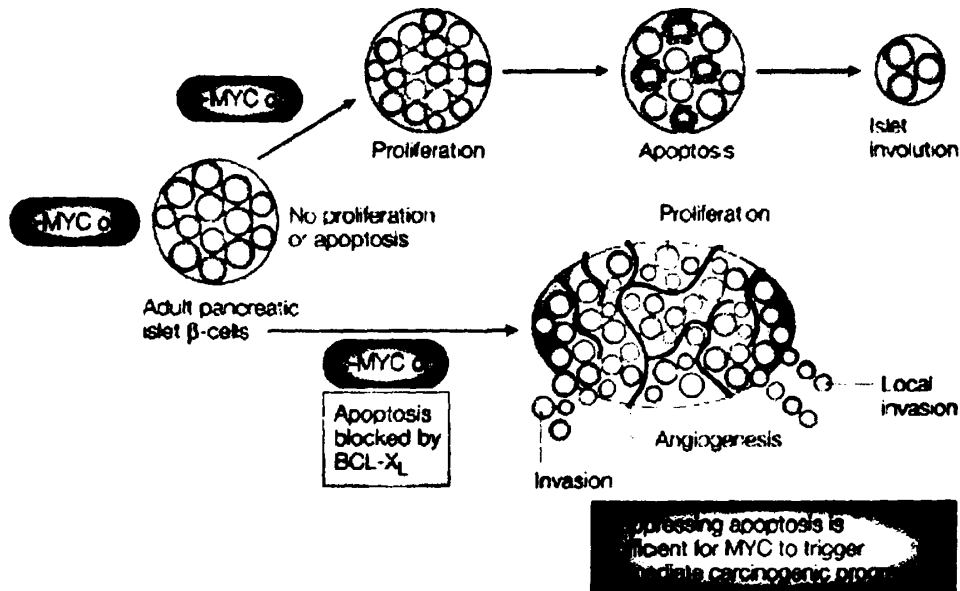
Σήμερα είναι γνωστό ότι η έκτοπη έκφραση του c-myc μπορεί να προκληθεί από πολλούς μηχανισμούς. Μέχρι όμως πριν λίγες δεκαετίες, οι μοριακοί παθολόγοι μπορούσαν να εκτιμήσουν μόνο χρωμοσωμικές αλλαγές μεγάλης κλίμακας, όπως η χρωμοσωμική μετάθεση ή η



χρωμοσωμική επέκταση περιοχών που εμπεριέχουν το γονίδιο του *c-myc*, με αποτέλεσμα να υποτιμάται ο πραγματικός αριθμός ανθρώπινων όγκων στους οποίους το *c-myc* έχει απορυθμιστεί.

### Εικόνα 8

Καταστολή της επαγόμενης από το *c-myc* απόπτωσης και ανάδειξη της ογκογονικής δράσης της πρωτεΐνης αυτής.



Nature Reviews | Cancer

Αυξημένα επίπεδα έκφρασης του *c-myc* σε κύτταρα παγκρέατος από διαγονιδιακά ποντίκια οδηγεί σε απόπτωση και συρρίκνωση του ιστού. Όμως, παρεμπόδιση της απόπτωσης—μέσω αύξησης των επιπέδων του BCL-X<sub>L</sub> οδηγεί τελικά στη δημιουργία όγκου και την προαγωγή της καρκινογένεσης [42].

Το γεγονός ότι το *c-myc* βρίσκεται απορυθμισμένο σε μια μεγάλη ποικιλία καρκίνων στον άνθρωπο και συχνά συσχετίζεται με κακή πρόγνωση της ασθένειας, υποδεικνύει ότι η λεπτομερής μελέτη και κατανόηση των μηχανισμών και των συνεπειών της απορύθμισης του ογκογονιδίου αυτού αποτελούν πληροφορίες που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην καλύτερη αντιμετώπιση της νεοπλασίας. Απενεργοποίηση του *c-myc* ή γονιδίων-στόχων του θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Φυσικά, η μεγαλύτερη πρόκληση για ένα επιτυχημένο τέτοιο θεραπευτικό πρωτόκολλο είναι η κατευθυνόμενη απενεργοποίηση του ογκογονιδίου αποκλειστικά στο καρκινικό κύτταρο, αφήνοντας ανέπαφα τα φυσιολογικά



κύτταρα ώστε να αποφεύγονται οι γνωστές παρενέργειες που χαρακτηρίζουν τα περισσότερα θεραπευτικά πρωτόκολλα που ακολουθούνται μέχρι στιγμής.

## 5.2.5 Απορύθμιση της έκφρασης του *c-myc* στον καρκίνο

### 5.2.5.1 Χρωμοσωμική μετάθεση:

Οι πιο διαδεδομένες περιπτώσεις αφορούν μεταθέσεις στις οποίες ενέχονται τα γονίδια των ανοσοσφαιρινών *Ig* και οι οποίες συσχετίζονται με συγκεκριμένους τύπους καρκίνου, όπως είναι το λέμφωμα Burkitt στον άνθρωπο. Σε αυτό, το ογκογονίδιο του *c-myc* έρχεται κοντά στη γονιδιακή θέση των *Ig* με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του και τη δημιουργία μεγάλων Β κυτταρικών πληθυσμών, δηλαδή Β λευχαιμίες. Αντίστοιχα, μετάθεση του γονιδίου *c-myc* σε άλλη θέση πάνω στο ίδιο χρωμόσωμα, σε περιοχή που κωδικοποιεί έναν ειδικό υποδοχέα των Τ κυτάρων (T cell Receptor: TCR) προκαλεί Τ λευχαιμίες. Οι πιο συνηθισμένες μεταθέσεις αυτού του τύπου αφορούν το χρωμόσωμα 8, στο οποίο εδράζεται το *c-myc*, και τα χρωμοσώματα 14 ή 22 όπου εδράζονται γονίδια των κ και λ αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών [82].

### 5.2.5.2 Γονιδιακή επέκταση:

Έχει διαπιστωθεί ότι η περιοχή 8q24, όπου εδράζεται το *c-myc* παρουσιάζει γονιδιακή επέκταση που κυμαίνεται ανά μελέτη από 20% έως 50% των περιστατικών καρκίνου του μαστού.

Ανεξάρτητα από το μηχανισμό μέσω του οποίου προκλήθηκε η αλλαγή στο γονίδιο του *c-myc* σε κάθε περίπτωση, το κοινό χαρακτηριστικό όλων των περιπτώσεων είναι τα αυξημένα επίπεδα έκφρασής του κατά 2–10 φορές. Η συσχέτιση μεταξύ του καρκινικού φαινοτύπου και της αυξημένης έκφρασης του *c-myc* υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη αυτή είναι ογκογόνος. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε με



πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία έφεραν το φυσιολογικό *c-myc* αλλά υπό τον έλεγχο κατάλληλου ενεργοποιητή [83, 84].

Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι οι συνέπειες της έκτοπης έκφρασης του *c-myc* ποικίλουν ανάλογα με τον τύπο του υποκινητή που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά. Έτσι, όταν ο υποκινητής ήταν ο IgH (ειδικός των Β λεμφοκυττάρων), οι όγκοι που δημιουργήθηκαν παρουσίαζαν τόσο ανώριμα όσο και ώριμα Β λεμφοκύτταρα, υποδηλώνοντας ότι η υπερέκφραση του *c-myc* επηρεάζει όλη τη σειρά των Β λεμφοκυττάρων. Αντίθετα, όταν ο ενεργοποιητής ήταν ο MMTV (από έναν ογκογόνο ιό που παρουσιάζει ειδικότητα στα κύτταρα του μαστού του ποντικίου) αναπτύχθηκαν όγκοι στους μαστικούς αδένες. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η υπερέκφραση του *c-myc* μπορεί να οδηγήσει σε μετασχηματισμό το κύτταρο στο οποίο συμβαίνει, δίνοντας έτσι τον αντίστοιχο όγκο.

#### 5.2.5.3 Σημειακές μεταλλάξεις:

Έχουν διαπιστωθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο του *c-myc* οι οποίες τροποποιούν τη πρωτεΐνη με τέτοιο τρόπο ώστε να παρεμποδίζεται η αποικοδόμηση του μορίου μέσω του μηχανισμού της ουμπικουτίνης. Αυτό, συνεπάγεται συσσώρευση του πρωτεϊνικού προϊόντος μέσα στο κύτταρο [85, 86, 87].

#### 5.2.6 Σύγκριση της ογκογονικής δράσης του *c-MYC* *in vitro* και *in vivo*

Ενώ, λοιπόν, το *c-myc* εκφράζεται κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού κυτταρικού πολλαπλασιασμού σαν απάντηση σε εξωκυτταρικά σήματα – όπως πρόσδεση παραγόντων αύξησης στους υποδοχείς τους – η συνεχής και έκτοπη έκφρασή του συχνά συσχετίζεται με τον καρκίνο. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα, τα καρκινικά δεν χρειάζονται πλέον εξωγενή μιτογόνα ερεθίσματα από το μικροπεριβάλλον τους για να πολλαπλασιαστούν ενώ έχουν διαταραχθεί και οι φυσιολογικοί



περιορισμοί που υπάρχουν σε έναν ιστό για να περιορίσουν την υπερβολική αύξηση.

Προκαταρκτικά πειράματα *in vitro* έδειξαν ότι η συνεχής υπερέκφραση του *c-Myc* μπορούσε να κάνει αθάνατους τους ινοβλάστες αρουραίου και να εμποδίσει την έξοδό τους από τον κυτταρικό κύκλο [88]. Όμως, η ογκογόνος ενεργοποίηση του *c-myc* δεν είναι αρκετή για να προκαλέσει τον μετασχηματισμό *in vitro*, αλλά απαιτείται και ένα ακόμη ογκογονικό γεγονός. Αυτό διαπιστώθηκε με πειράματα σε πρωτογενείς ινοβλάστες από έμβρυο αρουραίου, όπου εκφραζόταν έκτοπα και το ογκογονίδιο *ras* ή το ιικό *abl* [89, 90, 91].

Η μοριακή βάση των γεγονότων που οδηγούν στο φαινότυπο που χαρακτηρίζουμε σήμερα ως κλασικό μετασχηματισμό *in vitro*, δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητή. Είναι όμως κοινώς αποδεκτό ότι *in vitro* απαιτείται η συνύπαρξη αρκετών μεταλλάξεων, ίσως πολύ περισσότερων από ότι απαιτείται *in vivo*, για την εξέλιξη ενός όγκου.

Η απορυθμισμένη έκφραση του *c-myc* σχετίζεται συχνά με επιθετικούς και αδιαφοροποίητους όγκους. Επειδή όμως οι περισσότεροι ανθρώπινοι όγκοι, βρίσκονται ήδη σε προχωρημένο στάδιο όταν ανακαλύπτονται και έχουν συσσωρεύσει πολλές γενετικές αλλαγές, είναι δύσκολο να επιβεβαιώσουμε σε ποιο ακριβώς στάδιο εξέλιξης του όγκου συνέβη η ενεργοποίηση του *c-myc*. Τα περισσότερα *in vitro* και *in vivo* δεδομένα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι ο κυρίαρχος ρόλος του απορυθμισμένου *c-myc* στη δημιουργία και εξέλιξη του όγκου *in vivo* είναι να επιφέρει ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ταυτόχρονα να εμποδίζει την τελική διαφοροποίηση. Βέβαια, μαζί με αυτή τη δράση υποθέτουμε ότι και άλλα καρκινικά χαρακτηριστικά μπορεί να συσχετίζονται με τη δράση του *c-Myc*, όπως η αγγειογένεση μέσα στη μάζα του αναπτυσσόμενου όγκου. Αυτά όμως είναι δύσκολο να προσδιοριστούν πλήρως μέσα σε μια καλλιέργεια ή ακόμη και στα διαγονιδιακά ζώα.

Ακόμη όμως και οι μελέτες στα διαγονιδιακά ζώα αμφισβητήθηκαν από πολλούς, λόγω του ότι η ενεργοποίηση ενός ογκογονιδίου σε αυτά γίνεται από την αρχή της ζωής τους, γεγονός που διαφοροποιεί πολύ τα συστήματα αυτά από τον ανθρώπινο όγκο, στον οποίο οι περισσότερες



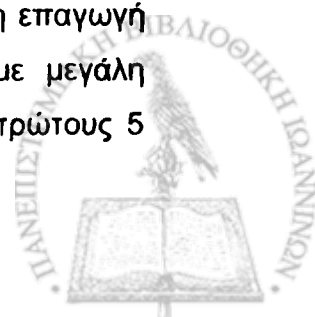


μεταλλάξεις εμφανίζονται σποραδικά κατά την ανάπτυξη και εξέλιξη του. Αυτό το μειονέκτημα αντιμετωπίστηκε με μια νέα γενιά «ρυθμιζόμενων» πειραματοζώων, στα οποία η έκφραση του ογκογονιδίου που μελετάται βρίσκεται κάτω από πλήρη έλεγχο, επάγεται και αναστέλλεται σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές και κατ' επιλογήν. Ένα τέτοιο σύστημα επιτρέπει τη μελέτη των συνεπειών της δράσης ενός ογκογονιδίου, όταν αυτό ενεργοποιείται σε διάφορες φάσεις της ζωής του πειραματοζώου. Τέτοια συστήματα χρησιμοποιήθηκαν πρόσφατα για να διερευνηθεί η επίδραση της επαγωγής της έκφρασης του *c-myc* σε διαφορετικούς ιστούς ενήλικου ατόμου και ακόμη πιο συγκεκριμένα να αξιολογηθεί ποια από τις πολλές κυτταρικές αποκρίσεις που αποδίδονται στο *c-myc* κυριαρχεί *in vivo* και εάν διαφέρει από τον ένα ιστό στον άλλο.

Ένα ακόμη ερώτημα που αντιμετωπίστηκε με τέτοιο σύστημα μελέτης είναι εάν η συνεχής έκφραση του *c-myc* είναι απαραίτητη για τη διατήρηση ενός ήδη σχηματισμένου όγκου [83, 92]. Τα συμπεράσματα από σειρά πειραμάτων έδειξαν ότι οι συνέπειες της υπερέκφρασης του *c-myc* διαφέρουν πλήρως από ιστό σε ιστό. Έτσι, υπερέκφραση στα κύτταρα της βασικής μεμβράνης της επιδερμίδας οδήγησε σε υπερπλασία και τοπική δυσπλασία με έντονη αγγειογένεση. Αντίθετα, στα β-κύτταρα των νησίδων του παγκρέατος παρουσιάζεται αρχικά έντονος κυτταρικός πολλαπλασιασμός και αφού ολοκληρωθούν μερικοί κύκλοι, τα κύτταρα ωθούνται σε απόπτωση, γεγονός που υποδηλώνει ότι στο συγκεκριμένο ιστό το *c-Myc* δρα ογκοκατασταλτικά.

**ΥΠΟΧΩΡΗΣΗ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ:** Πολλά συστήματα με διαγονιδιακά ποντίκια έχουν χρησιμοποιηθεί για να διαπιστωθεί εάν μια μετάλλαξη σε ένα συγκεκριμένο ογκογονίδιο είναι απαραίτητη για τη συντήρηση ενός όγκου. Δηλαδή εάν ένας όγκος υποχωρεί μόλις απενεργοποιηθεί το αρχικό ογκογονικό τμήμα του.

Οι Felsner και Bishop [93] πρόσφατα διερεύνησαν την πιθανότητα της υποχώρησης του T λεμφώματος και της οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας που επάγει η ελεγχόμενη έκφραση του *c-myc* επιλεκτικά στο αιμοποιητικό σύστημα πειραματοζώων. Σε αυτό το σύστημα, η επαγωγή της έκφρασης του *c-myc* επέφερε τη δημιουργία όγκων με μεγάλη διεισδυτικότητα και τελικά το θάνατο των ζώων μέσα στους πρώτους 5

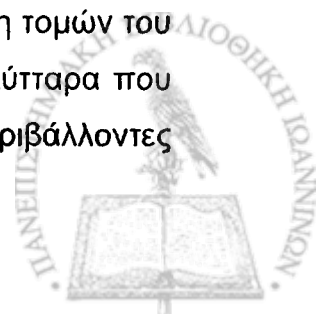


μήνες ζωής τους. Με την καταστολή της έκφρασής του η μάζα των όγκων μειώθηκε σημαντικά μέσα στις 3 πρώτες ημέρες και μέσα σε 6 εβδομάδες τα περισσότερα ποντίκια έδειχναν αξιοσημείωτη υποχώρηση της ασθένειας για περισσότερο από 30 εβδομάδες. Όμως, το 10% των πειραματοζώων εμφάνισε εκ νέου όγκους και τελικά πέθανε.

Αν και δεν είναι ξεκάθαρο γιατί μερικοί όγκοι ξέφυγαν από την εξάρτησή τους από την έκφραση του *c-myc*, μια πιθανή εξήγηση είναι ότι στην πορεία της εξέλιξής τους, οι όγκοι αυτοί απέκτησαν γενετικά χαρακτηριστικά που υποκατέστησαν το ρόλο του *c-myc*. Το πιο αξιοσημείωτο όμως είναι ότι με την απενεργοποίηση του *c-myc*, τα λευχαιμικά κύτταρα άρχισαν να διαφοροποιούνται προς ώριμα λεμφοκύτταρα, οπότε να αποκαθίσταται σε μεγάλο βαθμό η αιμοποίηση και παράλληλα, ένας μεγάλος αριθμός καρκινικών κυττάρων εξαφανίστηκαν γιατί οδηγήθηκαν σε απόπτωση.

Εξίσου εντυπωσιακά ήταν τα αποτελέσματα από πειραματοζώα που έφεραν στερεούς όγκους δέρματος λόγω της υπερέκφρασης του *c-myc*. Με την αναστολή της έκφρασής του, παρατηρήθηκε η πλήρης υποχώρηση του όγκου μέσα σε 3 εβδομάδες, αφού μειώθηκε σημαντικά ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων, εξαφανίστηκαν τα νέα αγγεία που υπήρχαν στην περιοχή του όγκου και τα επιδερμικά κύτταρα διαφοροποιήθηκαν κανονικά.

Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα από ένα τρίτο μοντέλο, αυτό του καρκίνου των  $\beta$ -κυττάρων παγκρέατος. Η αναστολή της έκφρασης του *c-myc* επέφερε γρήγορη υποχώρηση του τοπικού δικτύου αιμάτωσης και άμεσο θάνατο της περίσσειας των  $\beta$ -κυττάρων. Παράλληλα, παρατηρείται πλήρης διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων προς φυσιολογικά νησίδια με αποκατεστημένη την κυτταρική επαφή αφού αρχίζει η επανέκφραση της E-καντερίνης. Επιπλέον, η υποχώρηση του όγκου συνοδεύεται από έντονη διήθηση από κύτταρα του ανοσοποιητικού, ο ρόλος των οποίων προφανώς είναι να φαγοκυτταρώσουν και να καθαρίσουν την περιοχή από τα αποπτωτικά και νεκρωτικά υπολείμματα. Η λεπτομερής ιστολογική ανάλυση τομών του παγκρέατος των πειραματοζώων έδειξε ότι ακόμα και τα  $\beta$ -κύτταρα που είχαν διηθήσει τους πόρους, τα αγγεία και τους περιβάλλοντες



λεμφαδένες, εξαφανίζονται μερικές εβδομάδες μετά την απενεργοποίηση του *c-myc*. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι πολλά πειραματόζωα παρέμειναν υγιή για πολλούς μήνες μετά.

Ακόμη πιο μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα δύο άλλων μοντέλων. Στο ένα, που αφορούσε διηθητικό αδενοκαρκίνωμα μαστού επαγόμενο από υπερέκφραση του *c-myc*, η αναστολή της έκφρασής του δεν συνοδεύτηκε με υποχώρηση όλων των όγκων. Βρέθηκε όμως ότι οι όγκοι που δεν υποχώρησαν είχαν αποκτήσει επιπλέον μεταλλάξεις στο γονίδιο RAS [94]. Πρόσφατες μελέτες επιβεβαιώνουν ότι η έκφραση του *c-myc* προκαλεί γενομική αστάθεια, γεγονός που φυσικά συνεισφέρει πολύ στην επαγόμενη από το *c-myc* νεοπλασία [95, 96].

Το δεύτερο μοντέλο περιελάμβανε διαγονιδιακά ποντίκια με κακοήθες οστεοσάρκωμα [97]. Σε αυτό, διαπιστώθηκε ότι με την παροδική αναστολή της έκφρασης του *c-myc*, τα καρκινικά κύτταρα διαφοροποιούνταν σε φυσιολογικά οστεοκύτταρα και σχημάτιζαν φυσιολογικά οστά, ενώ η επανέκφραση του *c-myc* δεν αποκαθιστούσε τη νεοπλασία αλλά, αντιθέτως, οδηγούσε σε απόπτωση. Αν κάτι τέτοιο διαπιστωθεί και σε άλλα καρκινικά μοντέλα, η παροδική ή και η πλήρης απενεργοποίηση ενός ογκογονιδίου – ανάλογα την περίπτωση – θα μπορούσε να αποτελεί μια αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση του καρκίνου, χωρίς σημαντικές τοξικές παρενέργειες.



## 6 ΕΠΙΠΕΔΑ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ *c-myc*

### 6.1 ΓΕΝΙΚΑ

Είναι ξεκάθαρο από όσα προαναφέρθηκαν ότι το πρωτο-ογκογονίδιο *c-myc* ενέχεται σε πολλές, σημαντικές και διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες που βρίσκονται σε λεπτή ισορροπία μέσα σε ένα φυσιολογικό κύτταρο, όπως η αύξηση, η διαφοροποίηση, η απόπτωση και ο μετασχηματισμός.

Πλειάδα εργασιών έχει δείξει ότι η απορυθμισμένη έκφραση του *c-myc* επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την αύξηση, το μεταβολισμό και τη διαφοροποίηση. Επιπλέον, μελέτες σε πειραματόζωα έχουν πια αποδείξει την αιτιακή σχέση του *c-myc* με την πορεία και την εξέλιξη του καρκίνου. Μέχρι πρόσφατα όμως δεν είχαν ταυτοποιηθεί τα γονίδια-στόχοι του μεταγραφικού αυτού παράγοντα με σαφήνεια. Μέσα στα τελευταία χρόνια όμως, κυρίως με πειράματα ανάλυσης μικροσυστοιχιών (microarrays) έχει διαφανεί ότι το *c-Myc* επηρεάζει άμεσα την έκφραση εκατοντάδων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες εμπλεκόμενες πρακτικά σε «κάθε μείζον βιοχημικό και ρυθμιστικό μονοπάτι» [98].

Δεν είναι παράδοξο λοιπόν ότι η έκφρασή του βρίσκεται κάτω από αυστηρό έλεγχο, που ασκείται σε πολλαπλά επίπεδα.

- Μεταγραφή του γονιδίου.
- Μετα-μεταγραφική ρύθμιση: σταθερότητα του μηνύματος και μεταφρασιμότητά του.
- Σταθερότητα του πρωτεϊνικού προϊόντος.



## 6.2 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ

### 6.2.1 Έναρξη της μεταγραφής

Η παρουσία στη χρωματίνη περιοχών υπερευαίσθητων στην επίδραση DNase I έχει συνδεθεί με ρυθμιστικό ρόλο αυτών των περιοχών οι οποίες συνήθως εντοπίζονται στα άκρα των γονιδίων. Συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί η υπερευαισθησία σε κάποιες συγκεκριμένες αλληλουχίες συμπίπτει με ενεργοποίηση του γονιδίου ενώ σε κάποιες άλλες με καταστολή. Η ιδιότητα αυτή δηλαδή η υπερευαισθησία σε νουκλεάσες (DNase I, DNase II, S1, micrococcal nuclease κλπ) υποδηλώνει ότι η περιοχή αυτή του DNA δεν προστατεύεται από σύμπλοκα ιστονών ή ακόμη ότι είναι τοπικά τροποποιημένη η δομή της δίκλωνης έλικας. Οι δομικές αυτές αλλαγές έχουν αποδοθεί στην πρόσδεση ρυθμιστικών πρωτεϊνών συνεπώς οι περιοχές αυτές θεωρούνται *cis* ρυθμιστικές αλληλουχίες [82, 99].

Στην αλληλουχία του *c-myc* γονιδίου στον άνθρωπο έχουν εντοπισθεί οι εξής περιοχές υπερευαισθησίας (DH) : α. πριν τον P1 υποκινητή (+1), η DH I (-1850bp), η DH II1 (-1380bp), η DH II2 (-750bp), και η DH III1 (-130bp), β. ανάμεσα στους P1 και P2 η DH III2 90bp μετά τον P1 και γ. δύο περιοχές υπερευαισθησίας μέσα στο πρώτο ιντρόνιο , η DH IV 800bp και η DH V 1800bp μετά τον P1 υποκινητή. Επιπλέον, δύο περιοχές ευαίσθητες στην S1 έχουν εντοπιστεί 1400bp και 115bp πριν από τον P1 υποκινητή (Εικόνα 3).

Η δράση θετικών ή αρνητικών για τη μεταγραφή του γονιδίου ρυθμιστικών πρωτεϊνών (trans acting factors) συνδέεται με την επαγωγή ή την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου. Συνεπώς, η παρουσία ή μη περιοχών υπερευαισθησίας της χρωματίνης αντανακλά τον ενδεχόμενο πιθανό θετικό ή αρνητικό ρόλο των περιοχών αυτών στη γονιδιακή έκφραση, ως θέσεων πρόσδεσης των ρυθμιστικών πρωτεϊνών.

Η υπερευαισθησία σε DNase I της περιοχής DH I ενισχύεται σε συνθήκες καταστολής της έκφρασης του *c-myc* και έχει έτσι υποτεθεί ότι αυτή αποτελεί θέση πρόσδεσης κάποιου καταστολέα. Ανάλογα, η υπερευαισθησία τη DH II εξαφανίζεται όταν καταστέλλεται η έκφραση του



υποκινητή. Επίσης, η υπερευαισθησία των DH III1 και DH III2 εξαφανίζεται όταν καταστέλλεται η έκφραση του *c-myc* κατά την τελική διαφοροποίηση της HL-60 κυτταρικής σειράς.

Επιπρόσθετα, έχουν εντοπισθεί δύο περιοχές απαραίτητες για την έναρξη της μεταγραφής από τους P1 και P2 υποκινητές. Αυτές οι περιοχές εντοπίζονται αντίστοιχα από -60 έως -37 bp του P1 για τη μεταγραφή από αυτόν και από -66 έως -56 bp του P2 για τη μεταγραφή από αυτόν. Σε αυτές τις περιοχές διαπιστώθηκε ότι περιέχονται τα TATA πλαίσια (boxes) και από ένα εξανουκλεοτίδιο CCGCCC και GGCGGG αντίστοιχα. Οι αλληλουχίες αυτές μοιάζουν με τις αλληλουχίες που αναγνωρίζει ο SP1 παράγοντας μεταγραφής.

Τα δεδομένα που υπάρχουν δείχνουν ότι οι δύο κύριοι υποκινητές της μεταγραφής P1 και P2 ελέγχονται ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλον.

Σήμερα έχουν βρεθεί θέσεις μέσα στην αλληλουχία του γονιδίου του *c-myc* όπου φαίνεται ότι προσδένονται διάφοροι παράγοντες με θετικό ή αρνητικό ρυθμιστικό ρόλο. Μερικοί τέτοιοι είναι ο πυρηνικός παράγοντας 1 (NF1), η πρωτεΐνη που δεσμεύεται στη ρυθμιστική περιοχή FUSE (FBP), οι MSSP-1/MSSP-2, η πρωτεΐνη CNBP που δεσμεύεται σε νουκλεϊκά οξέα, η pRb, η E2F, η p55, η MBP1, η MYB και πολλοί άλλοι.

Εξάλλου, για τους διάφορους αυξητικούς παράγοντες και τις κυτοκίνες που έχει διαπιστωθεί ότι επιδρούν στην έκφραση του *c-myc*, μόνο για δύο έχουν εντοπισθεί ειδικές αλληλουχίες για τη δράση τους. Συγκεκριμένα, η περιοχή +36 έως +100 σε σχέση με το P1 ενισχύουν 3 έως 5 φορές τη μεταγραφή του γονιδίου, παρουσία του PDGF ενώ η -71 έως +100 είναι απαραίτητες για την κατασταλτική δράση του TGF- $\beta$  [99].

### 6.2.2 Ολοκλήρωση της μεταγραφής

Το *c-myc* ήταν το πρώτο ευκαρυωτικό κυτταρικό γονίδιο για το οποίο περιγράφηκε ρύθμιση στο στάδιο της επιμήκυνσης της μεταγραφής [100]. Διαπιστώθηκε ότι η μείωση των επιπέδων του *c-myc* mRNA κατά τη διαφοροποίηση ορισμένων κυτταρικών σειρών οφείλεται στη μείωση του αριθμού των RNA πολυμερασών που μπορούν να



συνεχίσουν τη μεταγραφή πέρα από ορισμένα σημεία τερματισμού που βρίσκονται μέσα στο πρώτο εσόνιο. Η καταστολή της μεταγραφικής επιμήκυνσης συμπίπτει με την ενίσχυση της ευαισθησίας της DH IV περιοχής υπερευαισθησίας της χρωματίνης. 24 με 48 ώρες ή 7 μέρες (ανάλογα με τον παράγοντα) μετά την επαγωγή για διαφοροποίηση, καταστέλλεται και η έναρξη της μεταγραφής, γεγονός που συμβαδίζει με τη μείωση της ευαισθησίας στις DH II2, III1 και III2 περιοχές υπερευαισθησίας [101]. Αντίστροφα, η αύξηση των επιπέδων του *c-myc* mRNA μετά από επαγωγή για πολλαπλασιασμό οφείλεται κατά ένα μέρος σε άρση του μηχανισμού καταστολής της επιμήκυνσης της μεταγραφής. Εξάλλου, διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν διαπιστώσει ότι περιοχές στα όρια πρώτου εσονίου-πρώτου ιντρονίου καθώς και άλλες πριν τον P2 υποκινητή είναι ικανές να προκαλέσουν πρόωρο τερματισμό της μεταγραφής όταν βρίσκονται μπροστά από ορισμένους –όχι όμως όλους– τους υποκινητές της μεταγραφής [102].

Με βάση όλα τα σχετικά δεδομένα έχει προταθεί ότι ο βασικός ρυθμιστικός έλεγχος στο *c-myc* γίνεται όχι στο στάδιο του σχηματισμού του συμπλόκου RNA πολυμεράσης II – DNA αλλά στο στάδιο μετά την έναρξη της μεταγραφής, δηλαδή στην επιμήκυνση, με την απελευθέρωση των μορίων του ενζύμου που ακινητοποιούνται στην περιοχή του P2 υποκινητή [103, 104]. Κατ' αναλογία με το μηχανισμό τερματισμού των προκαρυωτικών οργανισμών μπορεί να υποτεθεί και στην περίπτωση του *c-myc* η παρουσία *trans* παραγόντων τερματισμού ή (και) αντιτερματισμού παρότι δεν υπάρχουν ακόμα πειραματικά δεδομένα που να αποδίδουν σε κάποιους παράγοντες αυτόν τον ρόλο.



### 6.3 ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ: ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ mRNA ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΡΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΟΥ

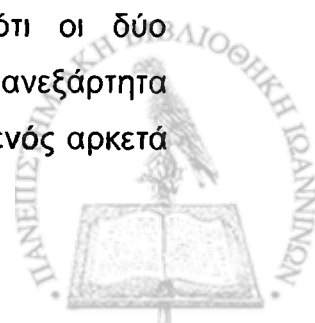
#### 6.3.1 Ρύθμιση της ημιζωής του μηνύματος του *c-myc*

Το μήνυμα του *c-myc* περιέχει στο 3' UTR άκρο μια περιοχή πλούσια σε A-U (: ARE) , κοινό χαρακτηριστικό πολλών ασταθών μορίων mRNA που κωδικοποιούν κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες ή ογκογονίδια [105, 106, 107, 108]. Ποικίλες πειραματικές προσεγγίσεις, όπως δημιουργία ελλείψεων, εκτενών μεταλλάξεων ή και κλωνοποιήσεις της περιοχής 3' UTR ασταθών μηνυμάτων σε γονίδια αναφοράς, ανέδειξαν το σημαντικό ρόλο αυτών των AREs αλληλουχιών ως δομές αποσταθεροποίησης των mRNAς. Οι δομές αυτές αποτελούν θέσεις που αναγνωρίζονται από ειδικές πρωτεΐνες που καλούνται AU-BP [109, 110, 111]. Η hnRNP D είναι μια πρωτεΐνη αυτής της οικογένειας που αναγνωρίζει και αποσταθεροποιεί το μήνυμα του *c-myc* [112].

Πειραματικά όμως, διαπιστώθηκε ότι η απομάκρυνση αυτής της αλληλουχίας από το μήνυμα του *c-myc* είχε μικρή επίδραση στη σταθερότητά του. Αυτό αποτέλεσε ένδειξη για την παρουσία και κάποιων άλλης αποσταθεροποιητικής περιοχής μέσα σε αυτό το mRNA.

Μελετώντας το χρόνο ημιζωής υβριδικών μηνυμάτων που περιείχαν τμήματα της κωδικής περιοχής του *c-myc* mRNA, αναγνωρίστηκε ένα επιπλέον στοιχείο αποσταθεροποίησης που ονομάστηκε CRD (: coding region destabilizing element) [113, 114]. Η απομάκρυνση αυτής της περιοχής από το μήνυμα του *c-myc* σταθεροποιεί το μόριο ενώ η εισαγωγή του CRD μέσα στο πλαίσιο ανάγνωσης του μηνύματος της  $\beta$ -γλοβίνης αποσταθεροποιεί το μήνυμα αυτό. Επιπλέον, η παρουσία του είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ρύθμιση των επιπέδων του *c-myc* σε ηπατοκύτταρα ποντικού που βρίσκονται σε φάση αναγέννησης του ήπατος ή σε μυοβλάστες που διαφοροποιούνται.

Από τα προηγούμενα εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι δύο αποσταθεροποιητικές περιοχές, η ARE και η CRD, δρουν ανεξάρτητα καθώς και ότι ο χρόνο ημιζωής του *c-myc* ρυθμίζεται μέσω ενός αρκετά





πολύπλοκου μηχανισμού σε απόκριση του κυττάρου σε εξωτερικά ερεθίσματα.

Ποικιλία μεθοδολογικών προσεγγίσεων έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των μονοπατιών αποδόμησης των ευκαρυωτικών mRNA μορίων. Για τα περισσότερα από αυτά, τόσο τα σταθερά όσο και τα ασταθή, το πρώτο βήμα που πραγματοποιείται πριν αρχίσει η αποδόμηση του κυρίως τμήματος του μηνύματος, είναι η σταδιακή απομάκρυνση της poly(A) ουράς που οδηγεί στη δημιουργία ενός ενδιάμεσου, ολιγοαδενυλιωμένου μορίου. Στα ασταθή μόρια όμως, αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται με διαφορετικές κινητικές σε σχέση με τα σταθερά μόρια. Οι αλληλουχίες AREs των ασταθών μηνυμάτων – που διακρίνονται σε τρεις τάξεις (I, II και III), βάσει δομικών και λειτουργικών κριτηρίων – προωθούν τη γρήγορη αποδόμηση των ασταθών μορίων [115].

Οι τάξης II AREs, που συνήθως βρίσκονται κυρίως σε μηνύματα κυτοκινών, προκαλούν την ασύγχρονη αποαδενυλίωση και την άμεση αποδόμηση του ασταθούς μηνύματος. Αντίθετα, οι τάξης I και III AREs, που συναντώνται κυρίως στα άμεσα επαγόμενα γονίδια (*early response genes*) όπως το *c-fos* και το *c-myc*, κατευθύνουν την αποδόμηση σε δύο φάσεις. Στην πρώτη, όλα τα μόρια αποαδενυλιώνονται ταυτόχρονα, χωρίς να αποδομηθούν και στη δεύτερη πραγματοποιείται η ταχεία αποδόμηση τους. Τα ολιγοαδενυλιωμένα αυτά ενδιάμεσα μόρια μπορεί να έχουν μεγάλο χρόνο ημιζωής, μεγαλύτερο ακόμη και από αυτό που έχουν τα αντίστοιχα πολυαδενυλιωμένα μηνύματα. Αυτό ακριβώς συμβαίνει και με το μήνυμα του *c-myc*, όπως έχει διαπιστωθεί σε προηγούμενες μελέτες [116] όπου το *c-myc* mRNA που συντίθεται παρουσία αναστολέα της πολυαδενυλίωσης μεταφράζεται για όσο υπάρχει μέσα στο κύτταρο [117].

Μελέτες σε κύτταρα της σειράς HL-60 έδειξαν ότι το μήνυμα του *c-myc* μπορεί να ακολουθεί και εναλλακτική οδό αποδόμησης [118]. Αυτό επιβεβαιώθηκε αργότερα, με *in vitro* δημιουργία κολοβωμένων μηνυμάτων του *c-myc* με ελλιπές το 5' άκρο και αδενυλιωμένο το 3' άκρο – υπό την επίδραση ιντερφερόνης-α – που ήταν γνωστό ότι ρυθμίζει το χρόνο ημιζωής του *c-myc* mRNA [117]. Τα μόρια αυτά δημιουργήθηκαν με ενδονουκλεόλυση στην 3'UTR μέσω μηχανισμού που δεν προϋπέθετε



την απομάκρυνση της poly(A) ουράς. Αργότερα διαπιστώθηκε ότι η περιοχή αυτή λειτουργεί ως στόχος για την ενδοριβονουκλεάση G3BP η οποία συνεργάζεται με τη πρωτεΐνη Ras-GAP [119, 120, 121]. Η πρωτεΐνη αυτή φέρει στο καρβοξυ-τελικό άκρο της την κλασική RRM δομή μέσω της οποίας γίνεται η αναγνώριση του μορίου στόχου και η δέσμευση σε συγκεκριμένες, συντηρημένες αλληλουχίες. Από *in vitro* μελέτες φάνηκε ότι η G3BP ρυθμίζει το χρόνο ημιζωής του *c-myc* mRNA μέσω του μονοπατιού Ras-GAP, σε απάντηση κατάλληλων εξωτερικών ερεθισμάτων.

Σε *in vitro* σύστημα μελέτης της αποδόμησης του mRNA, οι Bernstein *et al.* (1992) [114] ανέφεραν για πρώτη φορά ότι η περιοχή αστάθειας CRD του μηνύματος του *c-myc* θα μπορούσε να λειτουργεί ως στόχος για εναλλακτική ενδονουκλεόλυση. Από αυτά τα πειράματα ήρθαν οι πρώτες ενδείξεις ότι η περιοχή αυτή αποτελεί θέση πρόσδεσης για μια ή περισσότερες πρωτεΐνες οι οποίες προστατεύουν το μήνυμα από ενδονουκλεόλυση. Τελικά, ταυτοποιήθηκε μια πρωτεΐνη που αναγνωρίζει ειδικά και δεσμεύεται στην περιοχή αυτή του *c-myc* mRNA, ονομάστηκε CRD-BP, καθαρίστηκε και κλωνοποιήθηκε [122, 123].

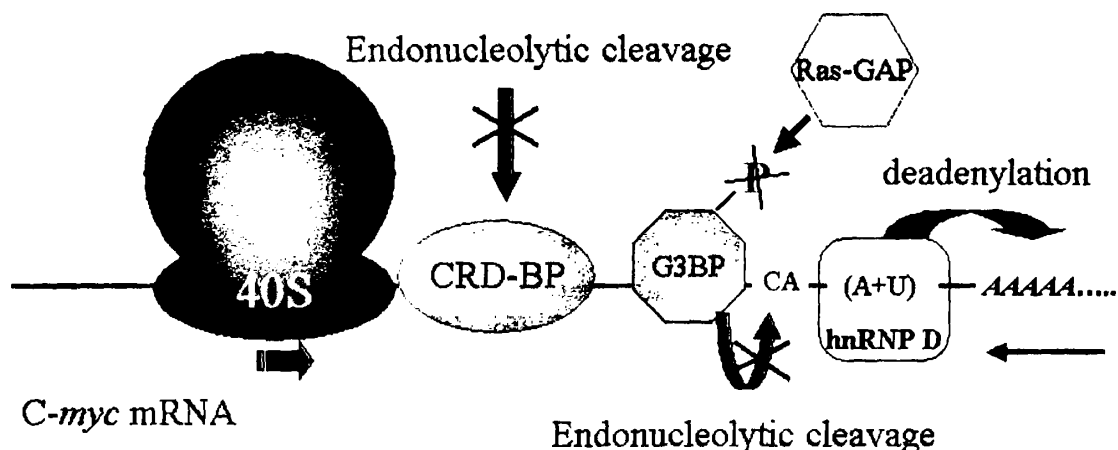
Έτσι διαφαίνεται ότι η CRD περιοχή αστάθειας του *c-myc* mRNA αποτελεί έναν ευαίσθητο στόχο ενδονουκλεόλυσης και μπορεί να είναι το υπόβαθρο για εναλλαγή μεταξύ των δύο διακριτών μηχανισμών αποδόμησης του μηνύματος (της αποδόμησης λόγω αποαδενυλίωσης ή λόγω ενδονουκλεόλυσης μέσα στην CRD).

Με βάση την παρατήρηση ότι η CRD περιοχή του *c-myc* μηνύματος είναι ιδιαίτερα πλούσια σε σπάνια κωδικόνια, προτάθηκε το εξής μοντέλο: όταν παροδικά το ριβόσωμα σταματά στο 5' άκρο της CRD αφήνει εκτεθειμένο στις ενδονουκλεάσες το 3' άκρο της, εκτός αν αυτό προστατεύεται από τη δεσμευμένη εκεί CRD-BP. Διαγραμματική αναπαράσταση της διαδικασίας και των παραγόντων που εμπλέκονται φαίνεται στην εικόνα 9.



Εικόνα 9

### Μηχανισμοί καταστροφής του μηνύματος του *c-myc* και ρυθμιστικές πρωτεΐνες



Το *c-myc* mRNA περιέχει μια ARE τάξης I περιοχή (A+U) μέσω της οποίας καταστρέφεται το μήνυμα σε δύο φάσεις. Πριν τη διάσπαση του βασικού τμήματος του μορίου, το μήνυμα αποαδενυλιώνεται. Έτσι προκύπτουν μόρια με μικρού μεγέθους αδενυλική ουρά των οποίων ο χρόνος ημιζωής μπορεί να είναι και διπλάσιος των πολυαδενυλιωμένων. Η πρωτεΐνη hnRNP D προσδένεται στην ARE περιοχή και προάγει τη διάσπαση του mRNA σε *in vitro* σύστημα. Το μήνυμα του *c-myc* όμως μπορεί να καταστραφεί και με ενδονουκλεολυτική διάσπαση, χωρίς να έχει προηγηθεί αποαδενυλίωσή του [126].

Σε αυτόν τον εναλλακτικό μηχανισμό, βασικό ρόλο παίζουν δύο αλληλουχίες, στην 3' UTR και στη κωδική του περιοχή (CRD). Στην πρώτη προσδένεται και δρα ειδικά η G3BP ενδοριβονουκλεάση και στη δεύτερη προσδένεται ειδικά η CRD-BP/IMP1 παρεμποδίζοντας τη δράση ριβονουκλεασών. Έτσι, η πρόσδεση της πρωτεΐνης αυτής προστατεύει το *c-myc* mRNA και αυξάνει το χρόνο ημιζωής του.

### 6.3.2 Ρύθμιση της μετάφρασης

Μέσα στα πλαίσια του αυστηρού ελέγχου που ασκείται στο γονίδιο αυτό, το μήνυμά του είναι εξαιρετικά ασταθές μόριο, με μικρό χρόνο ημιζωής που έχει υπολογιστεί στα 30 λεπτά.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, ο βασικός έλεγχος της μετάφρασης γίνεται στο στάδιο της έναρξης του μηχανισμού σάρωσης που περιλαμβάνει το σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης. Το σύμπλοκο αυτό δημιουργείται με πρόσδεση του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης 4F (eIF4F) στη δομή της καλύπτρας, στη θέση της 7-μεθυλ-γουανίνης και εν συνεχεία την προσέλκυση της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας.

Ο eIF4F είναι ένα σύμπλοκο δομούμενο από (α') τον παράγοντα eIF4E (η πρωτεΐνη που δένεται στην καλύπτρα), (β') τον παράγοντα



eIF4G (ένα μεγάλο πρωτεϊνικό μόριο που λειτουργεί ως σκελετός για να φέρει κοντά και να στηρίξει τα υπόλοιπα μόρια που πρέπει να αλληλεπιδράσουν, με θέσεις πρόσδεσης για όλους τους παράγοντες έναρξης αλλά και για την poly(A)-δεσμευόμενη πρωτεΐνη) και (γ') τον eIF4A (μια RNA ελικάση). Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία αυτή, το σύμπλοκο αρχίζει τη σάρωση και ανάγνωση του μηνύματος μέχρι να βρει την πρώτη AUG τριπλέτα στη σωστή βέβαια θέση [124].

Μεγάλο μέρος του ελέγχου της έναρξης της μεταγραφής ασκείται μέσω αλλαγών των επιπέδων φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών που δομούν τον eIF4F καθώς και όσων αλληλεπιδρούν με αυτές [125].

Τα ώριμα μόρια mRNAs εκτός από ότι μεταφέρουν τη γενετική πληροφορία, συχνά περιέχουν και πληροφορίες σχετικά με την μετάφραση, τον κυτταρικό εντοπισμό και την αποδόμησή τους [126]. Αυτή η πληροφορία εμπεριέχεται σε ειδικές αλληλουχίες ή και σε ειδικές δομές μέσα στις διακριτές περιοχές των άκρων του μηνύματος, οι οποίες δεν μεταφράζονται, τα 5'- και 3'- UTRs, αλλά και μέσα στην ίδια την κωδική περιοχή. Υπάρχουν πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν ειδικά περιοχές ή δομές επάνω σε ένα μήνυμα και άλλες που έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται μη ειδικά επάνω στο RNA, παρεμποδίζοντας τυχόν λάθος αναδίπλωση του μορίου ή βοηθώντας διαδικασίες όπως η μεταγραφή, η ωρίμανση, η μεταφορά του από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, η μετάφραση ή η αποδόμησή του.

Μια σειρά ευρημάτων υποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο αυτών των RNA-δεσμευτικών πρωτεϊνών στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης τόσο στο πυρηνικό όσο και στο κυτταροπλασματικό διαμέρισμα.

Στο κυτταρόπλασμα, οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί που επηρεάζουν τη μοίρα των ώριμων μορίων mRNA ελέγχουν κυρίως το χρόνο ημιζωής τους καθώς και τη θέση και τη χρονική στιγμή της μετάφρασης ενός συγκεκριμένου μετάγραφου, παίζοντας καίριο ρόλο στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση αλλά και στην ομαλή τέλεση άλλων φυσιολογικών κυτταρικών διεργασιών.

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός ενός μηνύματος RNA εμπεριέχει πολλά βήματα που περιλαμβάνουν : 1) σχηματισμό RNP σωματιδίων με



τη σύνδεση των πρωτεϊνών στις ειδικές αλληλουχίες (κυρίως μέσα στην 3'UTR περιοχή), 2) μεταφραστική καταστολή, 3) ενεργό μεταφορά κατά μήκος του κυτταροσκελετού και δέσμευση σε περιοχές πλούσιες σε ακτίνη και τέλος 4) έναρξη της μετάφρασης.

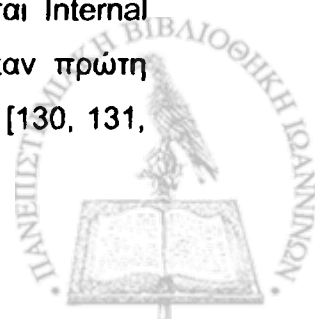
Στην εξέλιξη, η ρύθμιση της μετάφρασης των μητρικής προέλευσης mRNA μορίων έχει σκοπό να περιορίσει την ενεργότητά τους τόσο στο χρόνο όσο και στο χώρο. Και τα δύο επίπεδα ρύθμισης είναι εξαιρετικής σημασίας για τη φυσιολογική ανάπτυξη, όπως διαφαίνεται από τη μελέτη του μηχανισμού καθορισμού πρόσθιας-οπίσθιας πολικότητας στο έμβρυο της *Drosophila*.

Πέρα όμως από τους κλασικούς μηχανισμούς ρύθμισης που ασκεί το κύτταρο σε κάθε γονίδιο, όσον αφορά στην μεταγραφή του στο *c-myc* υπάρχει ένας επιπλέον μηχανισμός ρύθμισης της μεταγραφής του αλλά και της μετα-μεταγραφικής ενεργότητάς του μέσω των ιδιοτήτων που έχουν μη κωδικές περιοχές του μηνύματός του.

Όπως συμβαίνει και με πολλά άλλα γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, το *c-myc* mRNA φέρει στο 5'-άκρο του μια μη κωδική περιοχή με περίπλοκη στερεοδομή, που χαρακτηρίζεται ως 5'Untranslated Region ή για συντομία, 5'-UTR, περιοχή που εμπεριέχεται στο εξώνιο 1 [127].

Διατυπώθηκε η άποψη ότι mRNAs που φέρουν μεγάλα 5'-UTRs με έντονη τριτοταγή δομή μεταφράζονται σε χαμηλά επίπεδα λόγω της στερεοδιατακτικής δυσκολίας που έχει ο παράγοντας eIF4F να προσδεθεί στην περιοχή της καλύπτρας. Πράγματι, έχει διαπιστωθεί ότι σε *in vitro* σύστημα μετάφρασης, ελεύθερο κυττάρων, το μήνυμα του *c-myc* μεταφράζεται σε χαμηλά σχετικά επίπεδα [128, 129].

Διαπιστώθηκε όμως ότι σε μερικά mRNAs, ιικής κυρίως προέλευσης, η ύπαρξη στο 5'-άκρο περιοχής μεγάλου μήκους και υψηλής στερεοδιατακτικής ικανότητας, παίζει ακριβώς τον αντίθετο ρόλο, καθώς αποτελεί μια εσωτερική θέση πρόσδεσης του ριβοσώματος και επομένως μια εναλλακτική θέση έναρξης της μετάφρασης, ανεξάρτητα από το μηχανισμό της καλύπτρας. Τέτοιες δομές ονομάζονται Internal Ribosome Entry Sites, ή για συντομία IRES και ανιχνεύτηκαν πρώτη φορά στο μήνυμα ενός ιού της οικογένειας των picornaviruses [130, 131,



132]. Από τότε διαπιστώθηκε η ύπαρξη τέτοιων δομών σε αρκετά μηνύματα, ακόμη και σε ευκαρυωτικά mRNAs. Το *c-myc* είναι το πρώτο ογκογονίδιο για το οποίο αναφέρθηκε η ύπαρξη IRES, το 1997 [133].

Μελέτες σε αυτόν τον ιό στον οποίο ανακαλύφθηκε η ύπαρξη του IRES, έδειξαν ότι ο μηχανισμός της έναρξης της μετάφρασης από αυτή τη δομή περιλαμβάνει και απαιτεί τη συμμετοχή πολλών *trans-acting* παραγόντων, ο κυριότερος από τους οποίους και πιο καλά μελετημένος είναι η PTB ( Polypyrimidine Tract Binding protein ) η οποία παίζει και σημαντικό ρόλο στη διαδικασία του ματίσματος. Έτσι, οι δομές αυτές μπορούν να θεωρηθούν ενισχυτές της μετάφρασης που επιτρέπουν την έκφραση αυστηρά ελεγχόμενων γονιδίων, μέσω της επίδρασης παραγόντων που και αυτοί με τη σειρά τους ενεργοποιούνται σε απόκριση προς συγκεκριμένα ερεθίσματα.

Η ύπαρξη τέτοιων δομών όπως ήδη αναφέρθηκε, ταυτοποιήθηκε πρώτη φορά στο mRNA των *picornaviruses*. Είναι γνωστό ότι κατά τη διάρκεια μιας ιϊκής μόλυνσης ο ευκαρυωτικός μηχανισμός μετάφρασης σταματά να μεταφράζει τα ευκαρυωτικά μηνύματα και μεταφράζει σχεδόν αποκλειστικά τα ιϊκά μετάγραφα. Σε μερικούς από αυτούς τους ιούς αυτό επιτυγχάνεται εν μέρει, με την πρωτεόλυση του eIF4G σε δύο τμήματα, το καρβοξύ- και το αμινοτελικό, το καθένα από τα οποία δεσμεύει αντίστοιχα τον eIF 4E και τον eIF 4A. Αυτό το καρβοξυτελικό τμήμα αρκεί για να στηρίξει τη μετάφραση που γίνεται με μηχανισμό ανεξάρτητο από τον κλασικό της καλύπτρας, απουσία του eIF4E [134]. Το γεγονός αυτό δίνει μια λογική εξήγηση για την προτίμηση με την οποία το ευκαρυωτικό κύτταρο μεταφράζει τα ιϊκά mRNAs, μιας και αυτά φέρουν IRES και επομένως, μπορούν να μεταφραστούν με τον εναλλακτικό μηχανισμό.

Σήμερα γνωρίζουμε ότι τέτοιες δομές υπάρχουν σε αρκετά ευκαρυωτικά μηνύματα, τα περισσότερα από τα οποία μάλιστα σχετίζονται με πρωτεΐνες που ενέχονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Τέτοια παραδείγματα είναι τα γονίδια *FGF-2*, *PDGF*, *VEGF* και το *c-myc* [133, 135, 136, 137].

Ένα από τα βασικά ερωτήματα που διατυπώθηκαν κατά τη μελέτη των ευκαρυωτικών IRESs αφορά τις συνθήκες που απαιτούνται για να ενεργοποιηθεί ο μηχανισμός μετάφρασης μέσω του IRES, ειδικά μάλιστα



από τη στιγμή που κάποια από τα ευκαρυωτικά μηνύματα μπορούν να μεταφραστούν τόσο με τον ένα όσο και με τον άλλον τρόπο.

Με δεδομένο ότι το ιϊκό IRES χρησιμοποιείται κατά την ιϊκή μόλυνση όπου ο κλασικός μηχανισμός μετάφρασης μέσω της καλύπτρας είναι σχεδόν απενεργοποιημένος, υποθέτουμε ότι κάτι ανάλογο συμβαίνει και κατά την ενεργοποίηση του IRES ενός ευκαρυωτικού μηνύματος.

Σε συμφωνία με αυτήν την υπόθεση, το IRES του VEGF είναι λειτουργικό σε φάση υποξίας όπου αναστέλλεται η πρωτεϊνοσύνθεση [138]. Ανάλογα, το IRES του PDGF είναι ενεργό κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαφοροποίησης, όπου επίσης μειώνονται οι ρυθμοί της συνολικής πρωτεϊνοσύνθεσης [136].

Το IRES του *c-myc* βρίσκεται στην περιοχή μετά τον υποκινητή P2, από τον οποίο καθοδηγείται η σύνθεση περίπου του 75–90% των μεταγράφων του γονιδίου αυτού. Αυτό σημαίνει ότι η πλειοψηφία των μεταγράφων του *c-myc* έχουν τη δυνατότητα να μεταφραστούν τόσο μέσω του κλασικού μηχανισμού της καλύπτρας, όσο και μέσω του εναλλακτικού μηχανισμού του IRES. Το IRES του *c-myc* φαίνεται ότι είναι λειτουργικό στις συνθήκες εκείνες που παρεμποδίζεται για κάποιο λόγο ο κλασικός μηχανισμός έναρξης της μεταγραφής από την καλύπτρα. Πράγματι, πειραματικά δεδομένα [139] αποδεικνύουν ότι το IRES χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, όταν η μετάφραση μέσω της καλύπτρας καθίσταται αδύνατη λόγω της πρωτεόλυσης του παράγοντα eIF4G. Μελέτες σε κύτταρα HeLa, ανθρώπινης σειράς καρκίνου του τραχήλου, επιμολυσμένα με ρολιόνιγus έδειξαν ότι η ιϊκή επιμόλυνση προκαλεί πρωτεόλυση του παράγοντα eIF4G και δέσμευση του eIF4E με συνέπεια τη σημαντική μείωση της μετάφρασης μέσω της καλύπτρας. Παρόλα αυτά όμως διαπιστώνεται ότι ένας μεγάλος αριθμός μορίων *c-myc* mRNAs παραμένει προσδεμένο με βαριά πολυσώματα δηλαδή συνεχίζει να μεταφράζεται. Πάντως, επειδή υπάρχουν ενδείξεις ότι το ίδιο μήνυμα μπορεί να μεταφράζεται και με τους δύο μηχανισμούς, μέχρι σήμερα δεν έχει γίνει ξεκάθαρο σε ποιο βαθμό συνεισφέρει ο καθένας από τους δύο μηχανισμούς μετάφρασης στο ποσό της *c-Myc* πρωτεΐνης που συντίθεται τελικά.

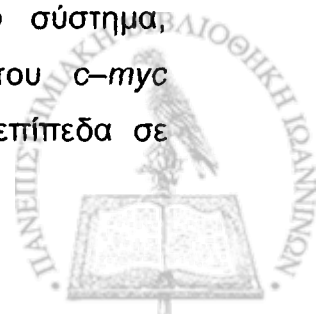


Οι Stoneley *et al.* [140] απέδειξαν σε *in vitro* σύστημα ότι το P2 μετάγραφο του *c-myc* περιέχει δομή IRES μέσω της οποίας γίνεται μετάφραση, σε χαμηλότερα όμως επίπεδα, όταν μπλοκάρεται τεχνητά ο μηχανισμός της καλύπτρας. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η δομή του IRES δεν είναι το ίδιο αποτελεσματική σε όλες τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν για την *in vitro* μετάφραση. Χρησιμοποιώντας όμως χιμαιρικά γονίδια που έφεραν το 5'-UTR του *c-myc*, διαπίστωσαν ότι το mRNA του γονιδίου αναφοράς μεταφράζεται με την ίδια σχεδόν αποτελεσματικότητα, είτε υπάρχει το IRES είτε όχι.

Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, προτάθηκε από την ομάδα ότι τα μετάγραφα του *myc* που δημιουργούνται από τον P2 υποκινητή έχουν την ικανότητα να μεταφράζονται ταυτόχρονα, τόσο μέσω του IRES όσο και μέσω της καλύπτρας. Η υπόθεση αυτή ενδυναμώθηκε από δύο επιπλέον παρατηρήσεις. Πρώτον, το χιμαιρικό γονίδιο με το 5'-UTR του *c-myc* μεταφράζεται αποτελεσματικά, ακόμη και σε κυτταρικές σειρές που είχε προηγουμένα δειχτεί ότι το IRES δεν είναι αρκετά ή και καθόλου λειτουργικό. Δεύτερον, P2 μετάγραφα μεταφράζονται με τρόπο πλήρως εξαρτώμενο από την καλύπτρα όταν χρησιμοποιείται ελεύθερο κυττάρων σύστημα *in vitro* μετάφρασης από ερυθροκύτταρα, στο οποίο έχει δειχτεί ότι το IRES δεν είναι καθόλου λειτουργικό [141].

Βάσει των παραπάνω δεδομένων αλλά και άλλων, προτάθηκε ότι η έναρξη της μετάφρασης του *c-myc* γίνεται με ένα διπλό μηχανισμό. Σε συνθήκες που η μετάφραση από την καλύπτρα παρεμποδίζεται, γίνεται αυτόματα μια μεταστροφή και ενεργοποιείται η μετάφραση μέσω του IRES. Αυτό ακριβώς διαπιστώθηκε ότι ισχύει κατά την απόπτωση, όπου η πρωτεΐνη *c-Myc* συνεχίζει να συντίθεται (μέσω του IRES) παρόλο που το σύνολο της πρωτεϊνοσύνθεσης παρεμποδίζεται σημαντικά, καθώς και υπό την επίδραση στρεσογόνων παραγόντων ή κατά τη μετάβαση από την G<sub>2</sub> στην M φάση του κύκλου [139, 142].

Πληθώρα πρόσφατων πειραματικών δεδομένων αποδεικνύει ότι η ενεργότητα του IRES του *c-myc* υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση. Οι Creancier *et al.* [143] έδειξαν σε *in vitro* και *in vivo* σύστημα, χρησιμοποιώντας διαγονιδιακά ποντίκια, ότι το IRES του *c-myc* παρουσιάζει ενεργότητα που ποικίλλει από πολύ υψηλά επίπεδα σε





όλους τους εξεταζόμενους εμβρυϊκούς ιστούς μέχρι εξαιρετικά χαμηλά ή και μηδενικά σε πολλούς ιστούς ενηλίκων και κυτταρικές σειρές. Οι Kobayashi *et al.* [144] έδειξαν ότι αιμοποιητικοί παράγοντες, όπως ο GM-CSF και η IL-3, επάγουν την αυξημένη σύνθεση της πρωτεΐνης c-Myc, ενεργοποιώντας ακριβώς την μετάφραση του μηνύματος του μέσω του IRES, παρόλο που ο μηχανισμός της καλύπτρας παραμένει ενεργός. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε τους συγγραφείς στην υπόθεση ότι η ύπαρξη της δομής του IRES δεν αποτελεί απλά έναν εναλλακτικό μηχανισμό μετάφρασης που προστατεύει το κύτταρο σε συνθήκες που η καλύπτρα απενεργοποιείται, αλλά έναν ρυθμιστικό μηχανισμό που αυστηρά και επιλεκτικά επιτρέπει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων τα προϊόντα των οποίων είναι απαραίτητα για να αντιμετωπίσει το κύτταρο συγκεκριμένες φάσεις της ζωής του, ακόμη και αν η καλύπτρα παραμένει ενεργή. Η επιλεκτικότητα με την οποία λειτουργεί αυτός ο μηχανισμός εξάλλου, αυξάνεται ακόμη περισσότερο, αφού για να ενεργοποιηθεί το IRES απαιτείται η ειδική δέσμευση σε αυτό πρωτεϊνών που διαφέρουν για το κάθε ευκαρυωτικό μήνυμα [145].

Οι Kim *et al.* [146], μελέτησαν τις κυτταρικές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το IRES του c-myc και διαπίστωσαν ότι η ετερογενής πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη C (hnRNP C) αναγνωρίζει και δεσμεύεται ειδικά στην επταμερή αλληλουχία U που βρίσκεται μέσα στο IRES, μεταξύ των δύο εναλλακτικών κωδικωνίων έναρξης της μετάφρασης CUG και AUG που υπάρχουν. Μάλιστα, δείχθηκε ότι η hnRNP C, που καθ' όλη τη διάρκεια της μεσόφασης περιορίζεται κυρίως στα πυρηνικά διαμερίσματα, κατά τη μετάβαση από την G2 στην M φάση μετακινείται έντονα στο κυτταρόπλασμα, πιθανά για να προωθήσει την μετάφραση του mRNA του c-myc.



## 7 ΓΕΝΙΚΑ ΤΩΝ RNA ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η βαρύτητα της μετα-μεταγραφικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στοιχειοθετήθηκε και τεκμηριώθηκε με εκτενείς μελέτες.

Ένα από τα πρώτα συστήματα μετα-μεταγραφικής ρύθμισης που μελετήθηκαν ήταν αυτό των ιστονών [147]. Διαπιστώθηκε η παρουσία ρυθμιστικής περιοχής στο 3' άκρο του μηνύματος η οποία αναγνωρίζεται ειδικά από την Stem Loop Binding protein (: SLBP). Η πρόσδεση αυτής της πρωτεΐνης επιδρά δραματικά σε όλα τα στάδια του μεταβολισμού του συγκεκριμένου μηνύματος. Η έκφραση της SLBP περιορίζεται στην S φάση του κύκλου, οπότε είναι και απαραίτητη η αυξημένη παραγωγή και σταθεροποίηση του μηνύματος των ιστονών.

Ένα άλλο καλά μελετημένο σύστημα μετα-μεταγραφικής ρύθμισης αφορά το μεταβολισμό του σιδήρου σε κύτταρα θηλαστικών. Το μήνυμα του υποδοχέα της τρανσφερίνης (ο οποίος εισάγει το σίδηρο στα κύτταρα) σταθεροποιείται όταν τα ενδοκυττάρια επίπεδα του σιδήρου πέσουν πολύ χαμηλά (οπότε αυξάνεται η παραγωγή μορίων υποδοχέα για την αποκατάσταση της συγκέντρωσης του σιδήρου). Η σταθεροποίηση αυτή επιτυγχάνεται με την πρόσδεση δύο πρωτεϊνών, της IRP1 και IRP2 σε μια ειδική stem-loop δομή του μηνύματος που καλείται Iron Responsive Element (IRE). Οι πρωτεΐνες αυτές ρυθμίζουν κι άλλα μηνύματα των οποίων τα προϊόντα συμμετέχουν σε διάφορα στάδια του μεταβολισμού του σιδήρου [148].

Πέραν της ρύθμισης της σταθερότητας, οι RNA-δεσμευτικές πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία ασυμμετριών κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Η κρισιμότητα του εντοπισμού μιας πρωτεΐνης μέσα στο κυτταρόπλασμα έχει διαπιστωθεί σε πληθώρα κυτταρικών τύπων, όπως τα αναπτυσσόμενα ωκύτταρα, οι νευρώνες, τα ολιγοδενδροκύτταρα, τα μυοκύτταρα και οι ινοβλάστες.



## 7.1 RNA-ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΑ

Εξαιτίας της κρισιμότητας του μετα-μεταγραφικού ελέγχου για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, η μη φυσιολογική εκτέλεση των μηχανισμών αυτών μπορεί να οδηγήσει σε ανώμαλη γονιδιακή έκφραση και κατά συνέπεια στην κυτταρική δυσλειτουργία και την ασθένεια.

Μια μελετημένη ασθένεια που σχετίζεται με δυσλειτουργία μιας RNA-δεσμευτικής πρωτεΐνης είναι το Σύνδρομο του εύθραυστου-Χ που αποτελεί την πιο κοινή μορφή κληρονομούμενης διανοητικής καθυστέρησης. Στο σύνδρομο αυτό, το γονίδιο που κωδικοποιεί για την RNA-δεσμευτική πρωτεΐνη FMRP έχει υποστεί μεταλλάξεις που την καθιστούν ανενεργή. Η πρωτεΐνη αυτή θεωρείται ότι εμπλέκεται στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση πολλών μορίων σημαντικών για την αναπτυξιακή και συναπτική νευροβιολογία [149, 150, 151].

Η α-θαλασσαιμία είναι μια ακόμη γενετική ασθένεια που σχετίζεται με κακή λειτουργία των RNA-δεσμευτικών πρωτεϊνών. Στην περίπτωση αυτή, το μήνυμα της α-γλοβίνης είναι εξαιρετικά ασταθές με αποτέλεσμα την απώλεια έκφρασης της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Η αστάθεια αυτή προκαλείται γιατί μια σημειακή μετάλλαξη στο μήνυμα της μεταβάλλει το 3' άκρο της με αποτέλεσμα να μην αναγνωρίζεται από τις δύο στενά συγγενικές πρωτεΐνες α-CP1 και 2, οι οποίες σε φυσιολογικές συνθήκες δεσμεύονται στο μήνυμα αυτό [152, 153, 154, 155].

Δυσλειτουργία RNA-δεσμευτικών πρωτεϊνών έχει διαπιστωθεί και σε πολλές κακοήθειες όπου θεωρείται ότι μπορεί να σχετίζεται με τη διαδικασία της καρκινογένεσης ή με κάποια από τα καρκινικά χαρακτηριστικά. Μια τέτοια περίπτωση αποτελεί η πρωτεΐνη HuR η οποία έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται στον καρκίνο του παχέως εντέρου και των ωοθηκών. Ανάμεσα στα μηνύματα που επηρεάζει η πρωτεΐνη αυτή είναι και του COX-2, το οποίο παίζει βασικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου του παχέως εντέρου [156].

Άλλο παράδειγμα αποτελεί η υπερπαραγωγή IL-10 από τα μελανωματικά κύτταρα. Το γεγονός αυτό θεωρείται ότι οφείλεται στην τροποποιημένη έκφραση της AUF1, μιας RNA-δεσμευτικής πρωτεΐνης η



οποία αποσταθεροποιεί το μήνυμα της κυτοκίνης. Τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν την πρωτεΐνη αυτή μόνο μέσα στον πυρήνα, κατά συνέπεια ο χρόνος ημιζωής του μηνύματος της IL-10 δεκαπλασιάζεται με αποτέλεσμα την αυξημένη έκκρισή της, γεγονός που θεωρείται ότι βοηθά τα καρκινικά κύτταρα να ξεγελάσουν το ανοσοποιητικό σύστημα [157].

Η CRD-BP/IMP1 είναι μια ακόμη RNA-δεσμευτική πρωτεΐνη που σε φυσιολογικές συνθήκες εκφράζεται κυρίως στην εμβρυογένεση. Σωρεία πληροφοριών σήμερα υποδεικνύουν ότι η *de novo* ενεργοποίησή της σχετίζεται άμεσα με τη δημιουργία και εξέλιξη πολλών τύπων καρκίνου.

## 7.2 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ CRD-BP/IMP1 ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ

Η CRD-BP/IMP1 αναγνωρίστηκε από το J Ross και τους συνεργάτες του ως μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται σε ειδική αλληλουχία του μηνύματος του *c-myc* – στο Coding Region Determinant (CRD-Binding Protein) – η οποία επηρεάζει τη σταθερότητά του [158]. Η πρόσδεση της πρωτεΐνης αυτής στη συγκεκριμένη θέση προστατεύει το μήνυμα από ενδονουκλεολυτική αποδόμηση κι έτσι αυξάνει το χρόνο ημιζωής του έως και 8 φορές. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η CRD-BP/IMP1 παίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης του *c-myc*. Οι Nielsen *et al.* [159] κλωνοποίησαν ανεξάρτητα το ίδιο γονίδιο και το ονόμασα IMP1, σαν μέλος της IMP πρωτεϊνικής οικογένειας, που έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται στο 5'UTR του μηνύματος του leader 3' *IGFII*. Η ίδια ερευνητική ομάδα έδειξε ότι η πρωτεΐνη CRD-BP/IMP1 δεσμεύεται και στο RNA μόριο *H19*, του οποίου ο ρόλος δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Πρόσφατα δείχθηκε ότι η CRD-BP/IMP1 αναγνωρίζει επίσης το *tau* mRNA, το οποίο εντοπίζεται στο άξονα των αναπτυσσόμενων νευρώνων.

Η ανώμαλη έκφραση τριών από τους τέσσερις προαναφερθέντες στόχους της CRD-BP/IMP1 συναντάται συχνά στη νεοπλασία.



### 7.2.1 RNA στόχοι της CRD–BP/IMP1

Η CRD–BP/IMP1 όπως προαναφέρθηκε, εκτός από το μήνυμα του *c-myc* αναγνωρίζει ειδικά και δεσμεύεται και σε δύο ακόμη μόρια, το *IGFII* leader 3' mRNA και το RNA μόριο *H19*. Οι μηχανισμοί έκφρασης των δύο αυτών μορίων είναι στενά συνδεδεμένοι καθώς υπόκεινται σε αμοιβαίο imprinting και παρουσιάζουν το ίδιο χωροχρονικό μοτίβο έκφρασης. Για αυτό θεωρείται ότι τα δύο αυτά γονίδια συνδέονται και λειτουργικά. Μια περιοχή 2.4Kb του γονιδιώματος ρυθμίζει την έκφραση του ενός από τα δύο αλληλία για το κάθε γονίδιο, στα σωματικά κύτταρα. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω μεθυλίωσης του DNA και απενεργοποίησης του υποκινητή στο μητρικής προέλευση χρωμόσωμα για τον *IGFII* και στο πατρικής προέλευσης για το *H19*.

#### 7.2.1.1 *H19*

Το προϊόν του γονιδίου *H19* είναι ένα μόριο RNA μεγέθους 12.3Kb, το οποίο υφίσταται διαδικασία ματίσματος και αδενυλίωσης. Το γονίδιο που μεταγράφεται τόσο στον άνθρωπο όσο και στο ποντίκι αποτελείται από πέντε εξώνια που διαχωρίζονται από πολύ μικρά εσώνια. Μέχρι σήμερα δεν έχει ανιχνευθεί πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου αυτού, παρόλο που τουλάχιστον στο ανθρώπινο μόριο υπάρχει μια περιοχή που θα μπορούσε να λειτουργήσει ως ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame) και αυτό θα έδινε μια πρωτεΐνη μεγέθους 26KD.

Το *H19* RNA είναι ένα ογκο–εμβρυϊκό RNA που εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον πλακούντα και σε κάποιους εμβρυϊκούς ιστούς. Μετά τη γέννηση τα επίπεδα έκφρασης του μειώνονται και τελικά γίνονται μη ανιχνεύσιμα στους περισσότερους ιστούς με εξαίρεση το σκελετικό μυ, την καρδιά και τα κύτταρα του μαστικού αδένου [160]. Επανεκφρασή του έχει ανιχνευθεί σε όγκους που προέρχονται από εμβρυϊκό ιστό. Μέχρι σήμερα δεν έχει αποδοθεί συγκεκριμένη λειτουργία στο προϊόν του γονιδίου *H19*, το οποίο φαίνεται ότι παίζει το ρόλο του με τη μορφή του RNA. Η απώλεια ή η απενεργοποίηση του αλληλίου μητρικής προέλευσης – το οποίο σε φυσιολογικές συνθήκες είναι το λειτουργικό – έχει βρεθεί να



συσχετίζεται με διάφορους όγκους, όπως αυτός του Wilms. Η *de novo* ενεργοποίησή του σε κάποιους όγκους καθώς επίσης και η απενεργοποίησή του σε άλλους όγκους, υποδηλώνουν ότι το γονίδιο αυτό μπορεί να έχει ογκοκατασταλτικό ρόλο [161, 162, 163].

#### 7.2.1.2 IGFII leader 3'

Ο IGFII είναι ένας εμβρυϊκός αυξητικός παράγοντας με αυτοκρινή και παρακρινή δράση [164]. Μπορεί να δρα ως παράγοντας επιβίωσης, ως μιτογόνος παράγοντας ή να τροποποιεί το μεταβολισμό. Πειράματα σε διαγονιδιακά ζώα έδειξαν ότι η έλλειψη του παράγοντα αυτού δεν έχει ορατές συνέπειες στους απογόνους, ενώ η υπερέκφρασή του συχνά προκαλεί δυσανάλογη αύξηση, διόγκωση της καρδιάς, οίδημα και θάνατο του εμβρύου [165].

Στον άνθρωπο, αυξημένα επίπεδα του παράγοντα IGFII σχετίζονται με το Σύνδρομο Beckwith–Wiedemann, το οποίο χαρακτηρίζεται από δυσανάλογη αύξηση του εμβρύου και δυσμορφίες [166, 167]. Επιπλέον, υπερέκφραση του IGFII παρατηρείται συχνά σε όγκους, όπου έχει αυτοκρινή δράση [168].

Η έκφραση του παράγοντα IGFII ελέγχεται αυστηρά και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Το ανθρώπινο γονίδιο του παράγοντα αυτού έχει ιδιαίτερα περίπλοκη δομή και περιλαμβάνει τέσσερις υποκινητές οι οποίοι είναι ενεργοί με τρόπο που εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο του οργανισμού και από τον ιστό. Έτσι παράγονται διάφορα μετάγραφα με μεγέθη που ποικίλουν από 2.2 kb έως 6.0kb. Τα ποικίλα αυτά μετάγραφα διαφέρουν στις αλληλουχίες του 5' άκρου τους και στη μεταφρασιμότητά τους. Ένα από τα μετάγραφα αυτά, το leader 4', το οποίο φέρει μια περιοχή 5'UTR μήκους 100 νουκλεοτιδίων, μεταφράζεται μόνιμως. Το μετάγραφο εκείνο που υπάρχει σε μεγαλύτερη αφθονία μέσα στο κύτταρο είναι αυτό του leader 3' το οποίο περιέχει ένα 5'UTR εξαιρετικά πλούσιο σε κυτοσίνες, μεγέθους 1170 νουκλεοτιδίων. Το μετάγραφο αυτό βρίσκεται πάντα μέσα σε 100S δομές (κλάσματα καθίζησης



υπερφυγοκέντρωσης) αλλά δε μεταφράζεται παρά μόνο σε κύτταρα που περνούν αυξητική φάση [169].

Το ομόλογο μετάγραφο στο ποντίκι παύει να μεταφράζεται μεταξύ της 11.5 και 12.5 ημέρας ζωής του εμβρύου. Η CRD-BP/IMP1 δεσμεύεται ειδικά στο 5'UTR του ανθρώπινου μηνύματος του leader 3' IGFII μεγέθους 6.0kb και η υπερέκφρασή της έχει βρεθεί ότι προκαλεί καταστολή της μετάφρασης του γονιδίου αναφοράς σε χιμαιρικό όχημα *in vivo* [159].

### 7.2.1.3 *tau* mRNA

Το μήνυμα αυτό κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία σχετίζεται με τους μικροσωληνίσκους (Microtubule Associated Protein: MAP), και εντοπίζεται κυρίως στο σώμα και τον άξονα των νευρώνων. Οι νευρώνες είναι κύτταρα που παρουσιάζουν εξαιρετικά έντονη πολικότητα τόσο μορφολογική – με τους διακριτούς δενδρίτες και άξονες – όσο και ποιοτική που αφορά τη δομή των μικροσωληνίσκων και τις MAPs. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο προ-εντοπισμός των διαφόρων mRNAs παίζει σημαντικότατο ρόλο στη δημιουργία αυτών των ασυμμετριών. Έτσι, τα διάφορα μηνύματα ταξιδεύουν μέσα στο κύτταρο με τη μορφή των RNPs (σωματίδια RNA και πρωτεΐνης) κατά μήκος δενδριτών και άξονα και μεταφράζονται τοπικά σε απόκριση του κυττάρου σε κάποιο εξωτερικό ερέθισμα [170, 171].

Το *tau* mRNA ταξιδεύει εξαρτώμενο από τους μικροσωληνίσκους, ξεκινώντας από το σώμα του νευρώνα προς μακρινά τμήματα του άξονα, στους αναπτυσσόμενους νευρώνες. Ο εντοπισμός του στον άξονα ρυθμίζεται από ένα στοιχείο *cis* που βρίσκεται στο 3'-UTR του μηνύματος και το οποίο είναι γνωστό ως axon localization signal (: ALS) [172]. Στην αλληλουχία αυτή προσδένεται η πρωτεΐνη HuD, η οποία ανήκει στην κατηγορία των πρωτεϊνών Elav, και είναι γνωστό ότι σταθεροποιεί πολλά μηνύματα των νευρικών κυττάρων. Στην προστασία του *tau* mRNA μαζί με την πρωτεΐνη HuD βρέθηκε ότι συμμετέχουν η CRD-BP/IMP1 και η



G3BP. Οι τρεις αυτές πρωτεΐνες συνεργάζονται μόνο παρουσία του κατάλληλου RNA μορίου, όπως διαπιστώθηκε πειραματικά [173].

### 7.3 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΓΓΕΝΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΤΗΣ CRD-BP/IMP1

Η CRD-BP/IMP1 είναι μέλος μιας υψηλά συντηρημένης οικογένειας RNA-δεσμευτικών πρωτεϊνών, η οποία στον άνθρωπο αντιπροσωπεύεται από τρία ομόλογα μόρια, τη CRD-BP/IMP1, την IMP2 και την IMP3/KOC. Άλλα γνωστά μέλη της οικογένειας αυτής είναι η πρωτεΐνη Vg1-RBP/Vera στο *Xenopus*, η οποία προσδέεται στο μήνυμα του Vg1 και η πρωτεΐνη cZBP-1 στο κοτόπουλο, η οποία δεσμεύεται στο 3'UTR του μηνύματος της β-ακτίνης.

Οι πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια και ομολογία που κυμαίνεται στο 70-95% της αμινοξικής τους αλληλουχίας. Στα σπονδυλωτά-με προφανή την εξαίρεση του *Xenopus*-υπάρχουν τρία μέλη της οικογένειας αυτής τα οποία θα μπορούσαν να έχουν δημιουργηθεί από δύο γονιδιακούς διπλασιασμούς λίγο πριν το διαχωρισμό τους κατά την εξέλιξη [123, 174].

Η κλωνοποίηση του cDNA της CRD-BP/IMP1 [123, 159] έδωσε πρόβλεψη για ένα πρωτεϊνικό προϊόν με 577 αμινοξικά κατάλοιπα που περιέχει τρεις δομές χαρακτηριστικές για την πρόσδεση σε RNA μόρια: (1) τέσσερις KH δομές (hrRNP K homology) στο καρβόξυ-τελικό άκρο της, (2) ένα RGG στοιχείο και (3) δύο RRM (: RNA recognition motif) στο αμινο-τελικό άκρο της.

Η δομή KH συναντάται σε πολλές RNA δεσμευόμενες πρωτεΐνες και υποδεικνύει προτίμηση για μονόκλωνο RNA ως υπόστρωμα [175].

Η δομή RGG αναγνωρίστηκε πρώτη φορά στην πρωτεΐνη hnRNP U και χαρακτηρίζει επίσης RNA δεσμευόμενες πρωτεΐνες. Αποτελείται από επαναλήψεις των αμινοξέων Arg-Gly-Gly.





Η RRM δομή αποτελείται από περίπου 90 αμινοξέα, και περιέχει δύο μικρές αλληλουχίες, τις RNP1 και 2. Οι αλληλουχίες αυτές έχει δειχθεί ότι είναι οι υπεύθυνες για τη δέσμευση επάνω στο μόριο RNA [109].

Με πειράματα EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assays) διαπιστώθηκε ότι οι τέσσερις KH δομές είναι αρκετές για τη δέσμευση στο RNA μόριο ενώ οι δύο RRM όχι. Επίσης, η δεσμευτική ικανότητα χάνεται αν απουσιάζει κάποια KH δομή. Με ανάλογα πειράματα διαπιστώθηκε ότι η παρουσία των δύο στοιχείων RRM αυξάνει τη συγγένεια προς το μόριο-στόχο RNA, δηλ χαμηλώνει την τιμή  $K_D$  [122, 159, 175, 176].

Εξάλλου, σε πειράματα με ποικίλα, συνθετικά μόρια RNA έχει φανεί ότι η ικανότητα πρόσδεσης της CRD-BP/IMP1 στους στόχους της είναι απόλυτα ειδική. Μέχρι σήμερα, δεν έχει διαπιστωθεί σημαντική ομοιότητα στην αλληλουχία των περιοχών των μορίων RNA όπου δεσμεύεται η πρωτεΐνη CRD-BP/IMP1 κι έτσι δεν είναι δυνατό να γίνει πρόβλεψη για άλλους πιθανούς στόχους της πρωτεΐνης αυτής. Υπάρχει όμως η άποψη ότι η ειδικότητα στην αναγνώριση του RNA στόχου βασίζεται σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης - πρωτεΐνης - πρωτεΐνης με RNA η οποία βασίζεται σε μια σειρά παρατηρήσεων, όπως: (1) οι KH δομές έχουν την ικανότητα να ολιγομερίζονται και να βοηθούν τις αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνικών μορίων [178]. (2) κάποιοι από τους στόχους της CRD-BP/IMP1 φέρουν πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης της. (3) άλλα μέλη της οικογένειας IMP έχουν την ικανότητα πρόσδεσης στα ίδια τμήματα αυτών των RNA στόχων. (4) άλλες πρωτεΐνες, εκτός των IMPs προσδέονται στις ίδιες ή παραπλήσιες περιοχές. Έτσι, απουσία του *tau* mRNA, δεν παρατηρείται καμιά αλληλεπίδραση της CRD-BP/IMP1 με τη HuD και τη πρωτεΐνη G3BP, ενώ έχει παρατηρηθεί RNA εξαρτώμενη αλληλεπίδρασή των δύο πρώτων μορίων σε κυτταρικό σύστημα που δεν εκφράζει το *tau* mRNA [173].



#### 7.4 ΠΙΘΑΝΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΟ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CRD-BP/IMP1

Οι Prockircaik *et al* [122] απομόνωσαν την πρωτεΐνη CRD-BP/IMP1 από πολυσώματα που προέρχονταν από την ερυθρολευχαιμική κυτταρική σειρά K562 και μετά από πειράματα σε *in vitro* σύστημα αποδόμησης RNA πρότειναν ότι η πρωτεΐνη αυτή ρυθμίζει την αποδόμηση του *c-myc* mRNA.

Οι Nielsen *et al.* [159] την απομόνωσαν ταυτόχρονα από ανθρώπινη σειρά ραβδομυοσαρκώματος και έδειξαν ότι η υπερέκφρασή της παρεμποδίζει την έκφραση του *IGFII* leader 3', όχι όμως και του leader 4'.

Ενδείξεις για πιθανούς εναλλακτικούς ρόλους της πρωτεΐνης αυτής ήρθαν όταν περιγράφηκε η λειτουργία άλλων μελών της ίδιας πρωτεϊνικής οικογένειας, όπως οι πρωτεΐνες Vg1-RBP/Vera και cZBP-1.

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι η CRD-BP/IMP1 είναι κυρίως κυτταροπλασματική και είτε συγκεντρώνεται γύρω από τον πυρήνα και τα λαμελιπόδια είτε βρίσκεται διάχυτη [159].

Οι Nielsen *et al.* [178] χρησιμοποίησαν φθορίζοντα χιμαιρικά μόρια CRD-BP/IMP1 (της φυσιολογικής πρωτεΐνης αλλά και κολοβωμένων μορίων) για να μελετήσουν τον υποκυτταρικό εντοπισμό της. Έτσι, διαπίστωσαν ότι απουσία ερεθίσματος στα NIH3T3 κύτταρα, η CRD-BP/IMP1 δεν παρουσίαζε κανένα εντοπισμό. Όταν τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον λαμίνης – που τους δίνει το ερέθισμα να μεταναστεύσουν – παρατηρήθηκε ανακατανομή των μορίων της CRD-BP/IMP1 με χαρακτηριστική κίνηση τους προς την προεξέχουσα άκρη των λαμελιποδίων που σχηματίστηκαν και συσχετισμός τους με τους μικροσωληνίσκους. Από τα κολοβωμένα μόρια, αυτά που στερούνταν των KH1 ή KH4 δομών στερούνταν και της ικανότητας πρόσδεση στους μικροσωληνίσκους και μετακίνησης.

Αν και ανοσοϊστοχημικές μελέτες έδειξαν ότι η CRD-BP/IMP1 εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, εντούτοις, οι παρακάτω παρατηρήσεις αποτελούν ενδείξεις ότι μπορεί να κυκλοφορεί και στον



πυρήνα: 1) σε κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με το γονίδιο της και υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη αυτή, μόρια της ανιχνεύονται ανοσοϊστοχημικά και στον πυρήνα και 2) η CRD-BP/IMP1 ανιχνεύεται και στον πυρήνα των σπερματικών κυττάρων του ανθρώπινου ενήλικου ιστού των όρχεων [179]. Σε αυτήν την υπόθεση συνηγορούν και οι παρατηρήσεις ότι το μόριο της CRD-BP/IMP1 περιέχει δύο αλληλουχίες που θα μπορούσαν να είναι σήματα εξόδου από τον πυρήνα ( Nuclear Export Signals: NES) καθώς και μια πιθανή αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal : NLS), γεγονός που υποδηλώνει ότι οι αλληλουχίες αυτές διευκολύνουν την κυκλοφορία της πρωτεΐνης αυτής από και προς τον πυρήνα.

Με πειράματα κατευθυνόμενων μεταλλάξεων και FRAP ανάλυση [179], διαπιστώθηκε ότι μεταλλαγμένη CRD-BP/IMP1 πρωτεΐνη που εμφανίζει υψηλό πυρηνικό εντοπισμό έχει μικρή ικανότητα RNA δέσμησης. Βάσει αυτής της παρατήρησης διατυπώθηκε η θεωρία ότι η CRD-BP/IMP1 μπορεί να δεσμεύεται επάνω στα RNA-στόχους της μέσα στον πυρήνα και να εξέρχεται μαζί με αυτά, καθορίζοντας έτσι την τύχη τους μέσα στο κυτταρόπλασμα.

Σε όλους τους οργανισμούς που έχουν μέχρι σήμερα μελετηθεί, η έκφραση της CRD-BP/IMP1 έχει βρεθεί να περιορίζεται κυρίως σε εμβρυϊκούς ιστούς, ενώ έχει ανιχνευθεί και σε σπερματικά κύτταρα στον ενήλικα άνθρωπο. Οι Hansen *et al.* [180], ανέφεραν την ανίχνευση εξαιρετικά χαμηλών επιπέδων CRD-BP/IMP1 σε φυσιολογικά κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα ενηλίκων ποντικών.

Ανάλυση του ολικού RNA από έμβρυο ποντικού έδειξε ότι η έκφραση της CRD-BP/IMP1 φθάνει στα υψηλότερα επίπεδα στην ημέρα E 12.5, μετά από την οποία αρχίζει η συνεχής μείωσή της έως την εξαφάνισή της στα νεογέννητα ποντίκια. Την ημέρα E12.5 αρχίζει να ανιχνεύεται τόσο το μήνυμα του IGFII όσο και του H19, που παίρνουν τις μέγιστες τιμές τους γύρω στην ημέρα E17.5. Επιπλέον, περίπου την ίδια χρονική στιγμή, το *c-myc* γίνεται απαραίτητο για την ομαλή ανάπτυξη του εμβρύου, καθώς ποντίκια με ομόζυγη έλλειψη στο γονίδιο του πεθαίνουν περίπου την ημέρα E10.5 [48].



Μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια [180] που έφεραν το γονίδιο της CRD-BP/IMP1 με εισαγωγή της β-γαλακτοσιδάσης – ώστε να παρακολουθείται οπτικά το χιμαιρικό πρωτεϊνικό προϊόν – έδειξαν ότι στην ημέρα E10 η πρωτεΐνη εντοπίζεται στο πρόσθιο και οπίσθιο τμήμα του εγκεφάλου, στο ρύγχος, στα βρογχιακά τόξα, στις απαρχές των πλευρών και στην ουρά. Στην ημέρα E12.5 η έκφρασή της αυξάνεται και εξαπλώνεται και στον νευρικό σωλήνα, στα αναπτυσσόμενα μάτια, τη γλώσσα, την καρδιά, τους πνεύμονες και το ήπαρ. Στην E14.5 εντοπίζεται μόνο στη θέση των μελλοντικά σχηματιζόμενων τενόντων των πλευρών και τελικά στην E17.5 η έκφραση της γενικά μειώνεται, με εξαίρεση τα εσωτερικά όργανα του γαστρεντερικού, τους αναπτυσσόμενους νεφρικούς σωλήνες και το ήπαρ. Η έκφραση της ανιχνεύτηκε τόσο σε κύτταρα του μεσεγχύματος όσο και του παρεγχύματος.

Μελέτες εξάλλου σε ποντίκια με ομόζυγη έλλειψη του γονιδίου της CRD-BP/IMP1 έδειξαν ότι η απουσία της πρωτεΐνης αυτής προκαλεί νανισμό και υψηλά ποσοστά περιγενετικού θανάτου. Μόνο το 40% των ομόζυγων ζώων επέζησαν, έχοντας σώμα κατά 40% μικρότερο σε μέγεθος σε σχέση με τα φυσιολογικά άγριου τύπου ή τα ετερόζυγα. Από την E17.5 άρχισε να φαίνεται εντονότερα η καθυστέρηση της αύξησης. Το μικρό μέγεθος των ομόζυγων ζώων οφείλεται σε υποπλασία όπως διαπιστώθηκε από τα μειωμένα επίπεδα του Proliferating Cell Nuclear Antigen (:PCNA) στα αναπτυσσόμενα όργανα καθώς και από το μειωμένο ρυθμό πολλαπλασιασμού ινοβλαστών που απομονώθηκαν από αυτά τα ζώα. Εκτός όμως από την έντονη επίδραση της απουσίας της πρωτεΐνης αυτής στο μέγεθος, διαπιστώθηκαν έντονες ιστολογικές ανωμαλίες κυρίως στο γαστρεντερικό σωλήνα. Το λεπτό έντερο ήταν υποπλασμένο, με λάχνες μικρού μεγέθους, οι κρύπτες του παχέως εντέρου ήταν κοντές και ακανόνιστες και τα νεφρά είχαν ανώριμο φαινότυπο. Διαπιστώθηκε επίσης ότι τα μηνύματα τόσο του leader 3' όσο και του leader 4' *IGFII* βρίσκονταν κυρίως σε RNPs, δηλαδή παρουσίαζαν μειωμένη μεταφρασιμότητα. Με ανάλυση του συνολικού προφίλ έκφρασης με μικροσυστοιχίες τέλος, διαπιστώθηκε η μειωμένη έκφραση πολλών γονιδίων του εντέρου, που κωδικοποιούν κυρίως πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας.



## 7.5 CRD–BP/IMP1 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η CRD–BP/IMP1 αρχικά αναγνωρίστηκε και απομονώθηκε από καρκινικές κυτταρικές σειρές. Στην πορεία των σχετικών μελετών διαπιστώθηκε ότι εκφράζεται πρακτικά σε όλες τις εγκαθιδρυμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Εξαιτίας του κρίσιμου ρόλου του *c-myc* στην καρκινογένεση, της αυτοκρινής δράσης του IGFII σε πολλούς τύπους καρκίνου και της απορυθμισμένης έκφρασης του H19 σε κάποιους άλλους καρκίνους, πολλές ερευνητικές ομάδες διερεύνησαν πιθανή απορύθμιση της έκφρασης της CRD–BP/IMP1 σε ιστό πρωτοπαθούς καρκίνου.

Αρχικά, διαπιστώθηκε η γονιδιακή επέκταση της θέσης 17q21.3 σε 14 από τους 40 όγκους καρκίνου του μαστού που εξετάστηκαν [181], χωρίς αυτή να συνυπάρχει ή να συσχετίζεται με την γονιδιακή επέκταση του *Her2/neu* γονιδίου – το οποίο βρίσκεται πολύ κοντά και αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες γενετικές ανωμαλίες στον καρκίνο του μαστού.

Εν συνεχεία, πολλές ερευνητικές ομάδες διαπίστωσαν την *de novo* έκφραση της CRD–BP/IMP1 σε πολλούς τύπους καρκίνου και σε ποικίλα ποσοστά, που κυμαίνονται από 12.5% στον προστάτη μέχρι 80% στον καρκίνο του παχεώς εντέρου [177, 182, 183, 184].

Οι μελέτες αυτές υποδεικνύουν ότι στον καρκίνο μπορεί να υπάρχουν και άλλοι, εναλλακτικοί μηχανισμοί απορύθμισης της έκφρασης της CRD–BP/IMP1 πέραν της γονιδιακής επέκτασης, αφού τα ποσοστά των όγκων που φέρουν τη σχετική χρωμοσωμική ανωμαλία είναι πολύ μικρότερα από αυτά των όγκων που εκφράζουν τη CRD–BP/IMP1.

Στον καρκίνο των ωοθηκών, τα επίπεδα έκφρασης της CRD–BP/IMP1 είναι εξαιρετικά υψηλά σε σύγκριση με του φυσιολογικού ιστού και επιπλέον, φαίνεται αυτό να συσχετίζεται με προχωρημένο στάδιο του καρκίνου και κακή πρόγνωση [183].

Οι Tessier *et al.* [185] έδειξαν με διαγονιδιακά ποντίκια που εξέφραζαν CRD–BP/IMP1 επιλεκτικά στο μαστικό αδένα, κατά την κύηση και το θηλασμό, ότι το γονίδιο αυτό μπορεί να δράσει ως ογκογονίδιο. Από τα πειράματά τους απομονώθηκαν δύο σειρές ζώων, μια που



εξέφραζε πολύ υψηλά επίπεδα CRD-BP/IMP1 και μια άλλη με χαμηλά επίπεδα CRD-BP/IMP1. Και στις δύο σειρές, παρουσιάστηκαν χειροπιαστοί όγκοι στους μαστικούς αδένες, αλλά με διαφορετικές συχνότητες. Το 95% των ζώων της πρώτης σειράς και το 60% των ζώων της δεύτερης ανέπτυξαν όγκους περίπου στην ηλικία της 53-60 εβδομάδας, γεγονός που υποδεικνύει ότι η *de novo* ενεργοποίηση της CRD-BP/IMP1 στον ενήλικο μαστικό αδένα είναι ικανή να προκαλέσει καρκινογένεση. Εξάλλου, δε διαπιστώθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της CRD-BP/IMP1 και του ιστολογικού τύπου του καρκίνου, αφού παρατηρήθηκαν όλοι οι τύποι, από το καρκίνωμα *in situ* έως και το αναπλαστικό αδenoκαρκίνωμα.

Επίσης, τα περισσότερα ζώα εμφάνισαν ένα μόνο όγκο σε ένα μαστικό αδένα αλλά όλοι οι μαστικοί αδένες των ζώων εμφάνιζαν περιοχές υπερπλασίας. Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η έκφραση της CRD-BP/IMP1 έχει ανιχνευθεί και σε καλοήθεις όγκους, όπως grade I μνηγιγίωματα, καλοήθεις μεσεγγυματικής προέλευσης και καλοήθεις νευροεπιθηλιακής προέλευσης, στηρίζουν την υπόθεση ότι η *de novo* ενεργοποίηση της CRD-BP/IMP1 πιθανά επηρεάζει το φυσιολογικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό και έτσι προσφέρει έδαφος πάνω στο οποίο επιπλέον γενετικές αλλαγές επάγουν τον κακοήθη μετασχηματισμό. Βάσει αυτής της υπόθεσης μπορεί να εξηγηθεί τόσο το γεγονός ότι η κακοήθεια εμφανίζεται σε σχετικά μεγάλη ηλικία στα διαγονιδιακά ζώα όσο και το ότι εμφανίζεται μόνο μια εστία σε ένα μαστικό αδένα, παρά τη γενικευμένη υπερπλασία.

Ανάλυση των επιπέδων των γνωστών μηνυμάτων στόχων της CRD-BP/IMP1 στους ιστούς των διαγονιδιακών ζώων την δωδέκατη ημέρα της πρώτης εγκυμοσύνης – δηλ πολύ πριν την εμφάνιση της κακοήθειας – αποκάλυψε μια αύξηση 100 φορές των επιπέδων του *IGFII* mRNA και 8 φορές των επιπέδων του H19 RNA. Καμιά αλλαγή δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα του μηνύματος ή της πρωτεΐνης του c-Myc ούτε και στα ενδοκυττάρια πρωτεϊνικά επίπεδα του IGFII. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε πιθανά να σημαίνει ότι η CRD-BP/IMP1 δεν επηρεάζει την έκφραση του *c-myc* στο μαστικό αδένα ή ότι ακόμη κι αν το επηρεάζει, οι



τυχόν αλλαγές που προκαλεί υπερκαλύπτονται από τη δράση άλλων μεταγραφικών ή μετα-μεταγραφικών ρυθμιστικών μηχανισμών.

Όλα τα προηγούμενα υποδεικνύουν ότι η δράση της CRD-BP/IMP1 επάνω στους στόχους της είναι πολύ πιο περίπλοκη διαδικασία από ότι είχε αρχικά θεωρηθεί. Η συνεχής συσσώρευση πληροφοριών αποδίδει σε αυτήν την πρωτεΐνη ένα κύριο ρόλο σχετιζόμενο με την κυκλοφορία των RNAs μορίων μέσα στο κύτταρο – όπως συμβαίνει με άλλα μόρια της ίδιας οικογένειας – και τον κυτταρικό εντοπισμό, ρόλος βέβαια που εμπεριέχει τόσο την προστασία από την αποδόμηση όσο και την μεταφραστική καταστολή κατά τη διάρκεια της μεταφοράς στο προκαθορισμένο σημείο. Αυτοί όμως οι ρόλοι ίσως είναι δευτερεύοντες και έρχονται ως συνέπεια του κύριου ρόλου, δηλ του κυτταρικού εντοπισμού.



## ΣΚΟΠΟΣ

Όπως περιγράφηκε αναλυτικά σε προηγούμενα κεφάλαια, το ογκογονίδιο c-myc είναι ένα γονίδιο που εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες και έχει διαπιστωθεί ότι αλλαγές που επηρεάζουν τη φυσιολογική λειτουργία του σχετίζονται με την εμφάνιση πολλών ανθρώπινων νεοπλασιών. Λόγω του σημαντικού του ρόλου έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών μελετών από τις οποίες πλήθος πληροφοριών έχει εξαχθεί που αφορά τους μηχανισμούς ρύθμισης και απορρύθμισης του c-myc.

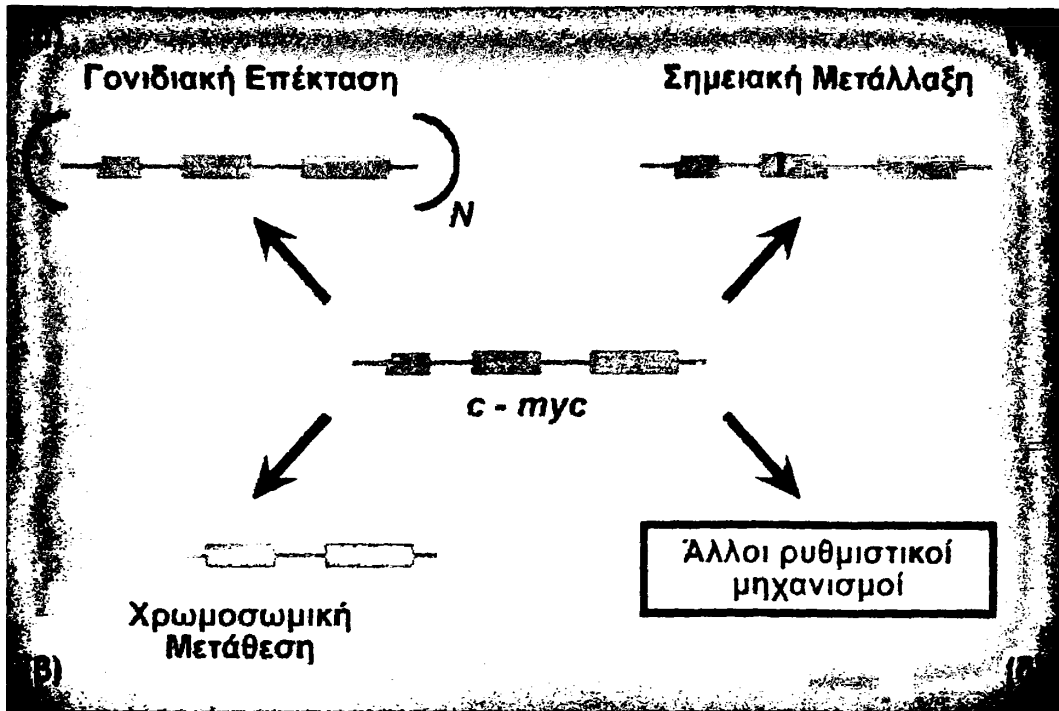
Ιδιαίτερα η απορρύθμιση του γονιδίου c-myc μέσω χρωμοσωμικών μεταθέσεων, σημειακών μεταλλάξεων και γονιδιακής επέκτασης έχουν μελετηθεί σε ικανοποιητικό βαθμό. Παρά το γεγονός ότι ήδη υπάρχουν ορισμένες πρόσφατες μελέτες [105, 106, 107, 112, 113, 114, 121, 127, 139, 140, 142] για το θέμα των μηχανισμών στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο, εντούτοις, οι μελέτες αυτές είναι περιορισμένες (σε σύγκριση με τη σωρεία εργασιών που αφορούν τους άλλους μηχανισμούς) και σημαντικά ζητήματα αυτών παραμένουν αδιευκρίνιστα (Εικόνα 10).





## Εικόνα 10

Μηχανισμοί απορύθμισης του γονιδίου *c-myc* που έχουν καταγραφεί στον καρκίνο



Οι γενετικές αλλαγές που επηρεάζουν την έκφραση του *c-myc* είναι:

- α) η γονιδιακή επέκταση,
- β) η χρωσωμική μετάθεση και
- γ) σημειακές μεταλλάξεις.

Ο ρόλος των ρυθμιστικών περιοχών του μηνύματος και πρωτεϊνικών παραγόντων που αναγνωρίζουν το *c-myc* mRNA είναι ακόμη υπό διερεύνηση (δ)

Η μελέτη αυτών των μηχανισμών λόγω της σημασίας που μπορεί να έχουν στον καρκίνο του μαστού επιλέχθηκε ως ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Η επίτευξη αυτού του σκοπού κρίθηκε σκόπιμο να προσεγγισθεί μέσω τριών βασικών στόχων, οι οποίοι είναι:

1. Μελέτη, σε *in vitro* σύστημα, των ρυθμιστικών περιοχών των άκρων (5'- και 3'-UTR) του μηνύματος του *c-myc*, για τα οποία βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν ότι μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταφρασιμότητα ενός μηνύματος.
2. Διερεύνηση των μηχανισμών που ενέχονται στην απορύθμιση του ογκογονιδίου *c-myc* σε πρωτοπαθή καρκινώματα του μαστού. Τα καρκινώματα αυτά θα μελετηθούν (α) για την παρουσία γενετικών ανωμαλιών στον γενετικό τόπο 8q24 που περιλαμβάνει το *c-myc*

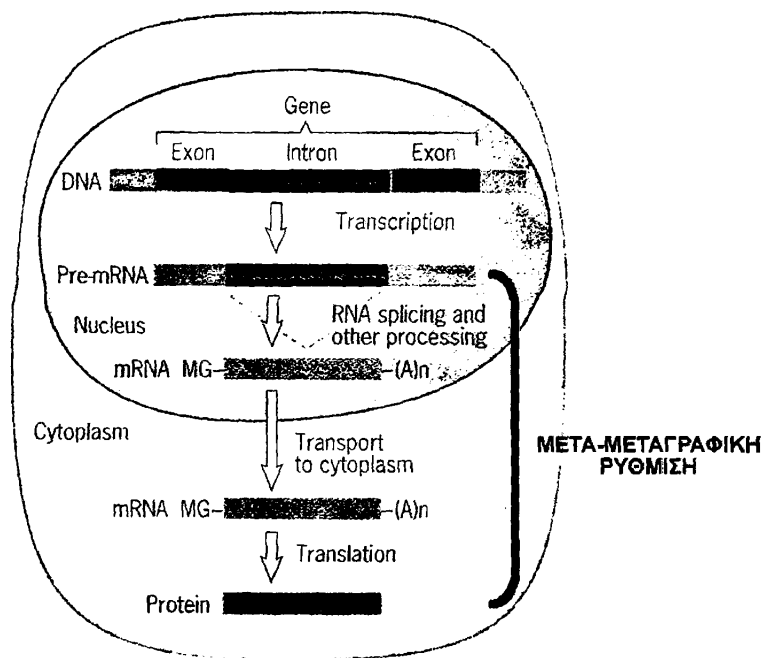


γονίδιο και (β) για την έκφραση του CRD-BP/IMP1 γονιδίου, το οποίο προτείνεται από αρκετές μελέτες ότι ενέχεται, όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή, στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση του *c-myc*.

3. Διερεύνηση της σχέσης της έκφρασης του γονιδίου CRD-BP/IMP1 με τα επίπεδα έκφρασης του *c-myc* σε ένα ελεγχόμενο σύστημα. Μελέτη στο σύστημα αυτό, της επίδρασης της παρεμπόδισης της έκφρασης του CRD-BP/IMP1 στα επίπεδα των μηνυμάτων του *c-myc* και του *IGF-II* που είναι δύο από τους ως τώρα γνωστούς στόχους της CRD-BP/IMP1 πρωτεΐνης και των οποίων η ανώμαλη έκφραση συνδέεται με την ογκογένεση.

Εικόνα 11

**Επίπεδα ελέγχου της γονιδιακής έκφραση στο ευκαρυωτικό κύτταρο**



Η μετα-μεταγραφική πορεία ενός μηνύματος ρυθμίζεται στα στάδια του ματίσματος, της πολυαδενυλίωσης, της προσθήκης της καλύπτρας, της μεταφοράς του από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, της σταθερότητας και της μεταφρασιμότητας του. Στα τελευταία δύο στάδια της μετα-μεταγραφικής ρύθμισης του *c-myc* εστιάζεται η παρούσα εργασία.

Αναλυτικά η μεθοδολογική προσέγγιση αυτών των τριών επιμέρους στόχων περιγράφεται στα αντίστοιχα κεφάλαια.



Y. GONNOR (2) ...

[Faint, mostly illegible text in the upper middle section]

[Faint, mostly illegible text in the lower middle section]

[Faint, mostly illegible text in the lower section]



## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την επίτευξη των στόχων της παρούσας εργασίας ακολουθήθηκαν τρεις βασικές μαθοδολογικές προσεγγίσεις:

A. Κατασκευή τεσσάρων ανασυνδυασμένων πλασμιδίων στα οποία θα κλωνοποιηθούν οι περιοχές του μηνύματος του *c-myc* (5'- και 3'- UTR) και τα οποία θα χρησιμοποιηθούν σε πειράματα παροδικής επιμόλυνσης κυττάρων για τη μελέτη της επίδρασης της παρουσίας των ρυθμιστικών περιοχών στα επίπεδα της παραγόμενης από το γονίδιο αναφοράς πρωτεΐνης.

B. Μελέτη πρωτογενών καρκινωμάτων του μαστού για την ύπαρξη ανωμαλιών που αφορούν την έκφραση του *c-myc*.

Γ. Μελέτη της επίδρασης της έκφρασης της CRD-BP/IMP1 στα επίπεδα έκφρασης του *c-myc* σε ένα *in vitro* πλήρως ελεγχόμενο σύστημα.

Στη συνέχεια περιγράφονται λεπτομερώς οι μέθοδοι και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.



# 1 ΜΕΡΟΣ Α΄: ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ ΜΗΝΥΜΑΤΟΣ ΤΟΥ *c-myc*

## 1.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΥΠΟΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ DNA

### 1.1.1 Πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Κάθε πέψη πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε στη θερμοκρασία και τις συνθήκες που συνιστώνται από την παρασκευάστρια εταιρεία. Οι γενικές αρχές που ακολουθήθηκαν συνοψίζονται στα εξής: για κάθε ένα  $\mu\text{g}$  DNA χρησιμοποιήθηκε 1 Unit ενζύμου και η τελική συγκέντρωσή του δεν ξεπερνούσε το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης. Πέψεις με δύο ένζυμα πραγματοποιούνται σε δύο στάδια – αν αυτό καθίσταται απαραίτητο, λόγω διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων – με πρώτη αυτήν την αντίδραση που απαιτεί ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής αλατότητας και δεύτερη αυτήν που απαιτεί υψηλή αλατότητα με ανάλογη αναγωγή του όγκου.

### 1.1.2 Απομόνωση τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζη

Για το διαχωρισμό και την απομόνωση τμημάτων DNA μετά από τις πέψεις χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα αγαρόζης, κατάλληλης συγκέντρωσης κάθε φορά. Μετά την ανάπτυξη του ηλεκτροφορήματος, κόπηκε το κομμάτι του πηκτώματος που περιείχε το DNA επιθυμητού μοριακού βάρους και καθαρίστηκε με το QiaQuick Gel Extraction Kit της Qiagen, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά, το κομμάτι της αγαρόζης διαλυτοποιείται με σύντομο βρασμό παρουσία κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος και ακολουθεί καθαρισμός του.



Τελικά, το DNA προσδένεται σε ειδικό φίλτρο από το οποίο εκλούεται με τη χρήση διαλύματος κατάλληλης αλατότητας.

### 1.1.3 Επανασύνδεση των τμημάτων DNA και μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli*

#### Διαλύματα

LB medium (Luria-Bertani): 950ml ddH<sub>2</sub>O

10gr bacto-tryptone,

5gr bacto-yeast extract

10gr NaCl

pH 7.0

LB medium-agar: 950ml ddH<sub>2</sub>O

10gr bacto-tryptone,

5gr bacto-yeast extract

10gr NaCl

15gr agar

SOC medium: 950ml ddH<sub>2</sub>O

20gr bacto-tryptone

5gr bacto-yeast

0,5gr NaCl

10ml 20mM KCl

5ml 2M MgCl<sub>2</sub>

20mM glucose

Για τα πειράματα υποκλωνοποίησης που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκε η T4 DNA ligase (Fermentas). Σε κάθε αντίδραση αναμειγνύονται οι κατάλληλες ποσότητες των διαλυμάτων των μορίων DNA που επιθυμούμε να συνδέσουμε, έτσι ώστε να είναι ίδια η μοριακότητά τους. Προστίθεται η κατάλληλη



ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος που συνίσταται από την παρασκευάστρια εταιρεία, 0,1 Weiss units ενζύμου και ποσότητα διπλά απεσταγμένου H<sub>2</sub>O για την αναγωγή του τελικού όγκου στα 20μl. Το μείγμα επωάζεται για 16h σε 14<sup>0</sup>C.

Για τα πειράματα μετασχηματισμού που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν τα MAX Efficiency DH10B Competent Cells (Gibco BRL) και ακολουθήθηκε το συνιστώμενο από την εταιρεία πρωτόκολλο. Συνοπτικά, ποσότητα των κυττάρων μεταφέρεται από τους -70<sup>0</sup>C όπου φυλάσσονται, σε πάγο και αφού υγροποιηθούν, 100μl από αυτά μεταφέρονται σε κατάλληλο δοκιμαστικό σωλήνα πολύ-προπυλενίου (Falcon) που βρίσκεται ήδη στον πάγο και αναμειγνύεται με 5μl από την αντίδραση επανασύνδεσης. Το μείγμα επωάζεται για 30 min στον πάγο, εμβαπτίζεται για 45sec σε υδατόλουτρο στους 42<sup>0</sup>C και επαναφέρεται στον πάγο για 2 min. Στη συνέχεια προστίθεται 800 μl θρεπτικού υλικού SOC Medium και η καλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί για 1h στους 37<sup>0</sup>C με έντονη ανάδευση. Μετά το πέρας της επώασης αυτής, 100 μl από την υγρή καλλιέργεια απλώνονται σε τρυβλία Petri που περιέχουν το θρεπτικό υλικό Luria Bertani-agar και το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής (αμπικικιλίνη 50μg/ml τελική συγκέντρωση). Στα περιγραφέντα πειράματα αυτό ήταν η αμπικικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 50μg/ml. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37<sup>0</sup>C και περίπου 24h μετά επιλέγονται μεμονωμένες αποικίες και αναπτύσσονται σε μικρής κλίμακας υγρή καλλιέργεια, για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA και τη μελέτη της δομής του.

#### 1.1.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Για τον έλεγχο του επιτυχημένου μετασχηματισμού των βακτηρίων και της ποιότητας του κλωνοποιημένου πλασμιδίου, επιλέχθηκαν αποικίες που αναπτύχθηκαν σε μικρής κλίμακας υγρές καλλιέργειες και το πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε με τη χρήση του QIAGEN plasmid mini kit (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Συνοπτικά, η υγρή καλλιέργεια φυγοκεντρείται στους 4<sup>0</sup>C στις 5000rpm για 10min. Το ίζημα αναδιαλύεται σε σειρά διαλυμάτων για τη λύση των κυττάρων και



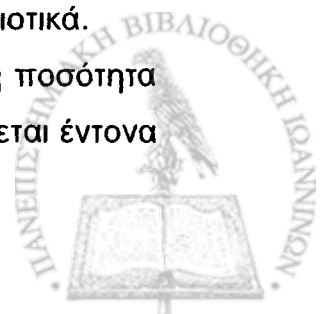
την εξουδετέρωση των RNase ενζύμων. Μετά από φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση των κατακερματισμένων μεμβρανών και των άλλων υποκυτταρικών υπολειμμάτων, το υπερκείμενο φορτώνεται σε κολώνα όπου συγκρατείται ειδικά το πλασμιδιακό DNA ενώ τα υπόλοιπα μόρια εκκλύονται. Η κολώνα πλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα και το DNA εκκλύεται με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.

Για τα πειράματα επιμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων το πλασμιδιακό DNA που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας, ελεύθερο από τυχόν βακτηριακές τοξίνες που επηρεάζουν τη φυσιολογία τους. Για το σκοπό αυτό, για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων υψηλής καθαρότητας πλασμιδιακού DNA το χρησιμοποιήθηκε EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Τα βήματα του προτεινόμενου πρωτοκόλλου είναι ανάλογα αυτών που ήδη περιγράφηκαν, αλλά τα χρησιμοποιούμενα διαλύματα απομακρύνουν τις βακτηριακές τοξίνες πλήρως.

### 1.1.5 Επιμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων (transfection)

Για την παροδική επιμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το Effectene Transfection Reagent (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο σχηματισμό συμπλόκων μεταξύ των μορίων του πλασμιδιακού DNA και των λιπιδίων που περιέχονται μέσα στο διάλυμα Effectene Transfection Reagent που προάγει την αυξημένη πρόσληψη τους από την ευκαρυωτική μεμβράνη. Συνοπτικά, τα στάδια κάθε πειράματος επιμόλυνσης περιλαμβάνουν τα παρακάτω:

- 24h πριν την επιμόλυνση, τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται σε συγκέντρωση  $0,7 \times 10^6$  κύτταρα /  $10 \text{ cm}^2$ .
- Μια ώρα πριν την επιμόλυνση αντικαθίσταται το καλλιεργητικό μέσο με 2,5ml φρέσκου, χωρίς πρωτεΐνες ορού και αντιβιοτικά.
- 0,6μg πλασμιδιακού DNA αναμειγνύονται με κατάλληλη ποσότητα Effectene Reagent σε αναλογία 1:25. Το μείγμα αναδεύεται έντονα





για λίγα δευτερόλεπτα και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min ώστε να σχηματιστούν τα σύμπλοκα. Έπειτα προστίθεται στάγδην στην καλλιέργεια και τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο κυτταροκαλλιεργειών.

- 8h μετά την επιμόλυνση, το καλλιεργητικό μέσο αντικαθίσταται με φρέσκο που περιέχει 20% FCS.
- 48h μετά την επιμόλυνση τα κύτταρα συλλέγονται και αναλύονται.

### 1.1.6 Λουμινομετρικός προσδιορισμός των επιπέδων της *renilla*- και της *firefly*-*luciferase*

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων των πρωτεϊνών *renilla*-*luciferase* και *firefly*-*luciferase* στα επιμολυσμένα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Η αρχή στην οποία βασίζεται το σύστημα αυτό στηρίζεται στις ιδιότητες των δύο ενζύμων να εκλύουν φθορισμό όταν επιδρούν στα υποστρώματά τους, ο οποίος μπορεί να μετρηθεί σε κατάλληλο όργανο (λουμινόμετρο 1253, BIO-ORBIT). Συγκεκριμένα, η *firefly*-*luciferase* καταλύει την οξείδωση της beetle luciferin και η *renilla*-*luciferase* καταλύει την οξείδωση της coelenterate-luciferin ελευθερώνοντας φωτόνια με την ολοκλήρωση των αντιδράσεων.

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν ακολουθήθηκε το προτεινόμενο πρωτόκολλο που συνοψίζεται στα παρακάτω βήματα:

Απομακρύνεται το καλλιεργητικό μέσο και το ταπήτιο των κυττάρων πλένεται τρεις φορές με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS). Στη συνέχεια προστίθεται κατάλληλη ποσότητα διαλύματος λύσης των κυττάρων και η καλλιέργεια αναδεύεται έντονα για 15min σε θερμοκρασία δωματίου. Ποσότητα από το διάλυμα που προκύπτει από τη λύση των κυττάρων μεταφέρεται σε ειδικό σωλήνα πολυπροπυλενίου-σιλικόνης, προστίθεται ποσότητα διαλύματος με το υπόστρωμα της *firefly*-*luciferase* και μετράται η ενεργότητά της. Στη συνέχεια προστίθεται δεύτερο διάλυμα που εξουδετερώνει το φθορισμό



της προηγούμενης αντίδρασης και ταυτόχρονα περιέχει το υπόστρωμα της renilla-luciferase και μετράται η ενεργότητα αυτής.

## **2 ΜΕΡΟΣ Β΄: ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΠΟΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ C-MYC ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

### **2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΓΚΩΝ**

Μελετήθηκαν 118 πρωτογενείς όγκοι του μαστού από ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Odense της Δανίας και του Όσλο της Νορβηγίας κατά το χρονικό διάστημα 1991–1995. Επιπλέον, εξετάστηκαν 14 δείγματα που προέρχονταν από ασθενείς του νοσοκομείου «Αγ Σάββας» και είχαν χαρακτηριστεί ως καλοήθεις όγκοι, καθώς και 28 καρκινώματα του μαστού από ασθενείς που χειρουργήθηκαν στο νοσοκομείο «Έλενα Βενιζέλου», κατά την περίοδο 1999–2001.

Σε όλες τις περιπτώσεις, τα δείγματα συλλέχτηκαν κατά τη διάρκεια του χειρουργείου και φυλάχτηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι την επεξεργασία τους.

### **2.2 ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΥΛΙΚΟΥ**

Κάθε δείγμα ιστού χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση γενομικού DNA, ολικού RNA και πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Έτσι, κάθε κομμάτι ιστού χωρίστηκε με τη βοήθεια μαχαιριδίου, μέσα σε στείρο τρυβλίο τοποθετημένο σε πάγο, σε 3 κομμάτια. Οι χειρισμοί έγιναν σε όσο το δυνατό μικρότερο χρονικό διάστημα ώστε να αποφευχθεί τυχόν αλλοίωση από ανεπιθύμητη δράση ενζύμων.



## 2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΑΓΩΜΕΝΟ ΙΣΤΟ

Η απομόνωση έγινε σύμφωνα με το κλασικό πρωτόκολλο απομόνωσης DNA από κύτταρα θηλαστικών, όπως αυτό περιγράφεται στο σύγγραμμα των Sambrook, Fritsch και Maniatis [186], με μικρές τροποποιήσεις.

Τα βασικά στάδια της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε περιλαμβάνουν τα παρακάτω:

Μικρό τεμάχιο ιστού αναμειγνύεται με κατάλληλο όγκο τεμαχίζονται με μαχαιρίδιο και αναμειγνύονται με 1X TNE (10mM EDTA, 50mM Tris-HCL pH 7.5, διατηρώντας την αναλογία σε 900μl ρυθμιστικού διαλύματος), όπου και ομογενοποιούνται μέσα σε σωληνάριο. Έπειτα προστίθενται 25μl διαλύματος SDS 20% ώστε η τελική συγκέντρωσή του να είναι 0,5% μέσα στο ομογενοποίημα και 20μl πρωτεϊνάσης K ώστε η τελική της συγκέντρωση να είναι 200μg/ml. Το μείγμα αναδεύεται έντονα και επωάζεται στους 37<sup>0</sup> C για 24 ώρες.

Ακολουθεί μια σειρά εκχυλίσεων με οργανικούς διαλύτες, όπου το ομογενοποίημα αναμειγνύεται κατά σειρά με ίσο όγκο φαινόλης (με pH 7.8), έπειτα με μείγμα φαινόλης : χλωροφορμίου 1:1 και τέλος με χλωροφόρμιο. Σε κάθε ένα από τα παραπάνω βήματα, μετά την προσθήκη του οργανικού διαλύτη το μείγμα αναδεύεται έντονα, αφήνεται για 5min σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα φυγοκεντρείται στα 12000rpm για 5min. Μετά από κάθε φυγοκέντρηση λαμβάνεται η άνω υδατική στιβάδα που περιέχει το DNA και αναμειγνύεται με τον οργανικό διαλύτη του επόμενου βήματος.

Να σημειωθεί ότι το χλωροφόρμιο που χρησιμοποιείται σε αυτό το πρωτόκολλο πρέπει να είναι εξισορροπημένο σε αναλογία 24:1 σε ισοαμλική αλκοόλη.

Μετά την τρίτη εκχύλιση, η υδατική φάση που λαμβάνεται μεταφέρεται σε απόλυτη, παγωμένη αιθανόλη και το DNA αφυδατώνεται και γίνεται ορατό με γυμνό μάτι. Με τη βοήθεια βελόνας «ψαρεύεται» και μεταφέρεται σε μικροσωληνάριο όπου και πλένεται σε διάλυμα 75% αιθανόλης με φυγοκέντρηση στα 7500rpm για 5min. Το ίζημα αφήνεται να



στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου, αναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 1X TE και φυλάσσεται στους 4<sup>0</sup> C.

## 2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΙΣΤΟ

Για την απομόνωση ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε το TRI Reagent (Sigma) και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Σύμφωνα με αυτό, περίπου 50–100mg ιστού ομογενοποιούνται με τη χρήση ομογενοποιητή Polytron μέσα σε μικροσωληνάρια πολυπροπυλενίου και με την προσθήκη 1ml διαλύματος TRI Reagent.

Το ομογενοποίημα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5min ώστε να επιτευχθεί ο πλήρης διαχωρισμός των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων και έπειτα αναμιγνύεται με 0,2ml χλωροφόρμιο, αναδεύεται έντονα για 15sec και επωάζεται πάλι σε θερμοκρασία δωματίου για 15min. Στη συνέχεια, το μείγμα φυγοκεντρείται στα 12000rpm, στους +4<sup>0</sup>C για 15min. Η φυγοκέντρηση διαχωρίζει το μείγμα σε 3 φάσεις, εκ των οποίων, η κατώτερη κόκκινη περιέχει το πρωτεϊνικό κλάσμα, η θολή ενδιάμεση το DNA και η ανώτερη άχρωμη φάση είναι η υδατική που περιέχει το RNA. Αυτή η υδατική φάση μεταφέρεται σε καθαρό μικροσωλήνα και αναμιγνύεται με 0,5ml ισοπροπανόλης με έντονη ανάδευση. Το νέο μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10min και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 12000rpm, στους +4<sup>0</sup>C για 10min. Το RNA κατακρημνίζεται σχηματίζοντας στον πυθμένα του μικροσωλήνα. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα πλένεται μια φορά με προσθήκη 1ml δ/τος αιθανόλης 75% και φυγοκέντρηση στα 7500rpm, στους +4<sup>0</sup>C για 5min.

Το ίζημα στεγνώνει για 5–15min σε θερμοκρασία δωματίου, αναδιαλύεται σε 20μl RNAse–DNAse free νερό και φυλάσσεται στους –80<sup>0</sup>C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία του.



## 2.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ

Τμήμα του όγκου βάρους περίπου 50–100mg, τεμαχίζεται με μαχαιρίδιο και ομογενοποιείται με ομογενοποιητή Polytron (Sorval), μέσα σε 0,5ml ρυθμιστικού διαλύματος 10mM Tris pH 7.4, 1.5mM EDTA, 5mM Na-molybdate, 5mM DTT. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται στα 16000rpm για 1 ώρα στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέγεται και φυλάσσεται στους –80°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

## 2.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Η εκτίμηση της συγκέντρωσης του γενωμικού DNA και του ολικού RNA που απομονώνεται γίνεται με σπεκτροφωτομετρία. Συγκεκριμένα, μετράται η απορρόφηση OD του δείγματος στα 260nm και στα 280nm. Η πρώτη τιμή δίνει την απόλυτη ποσότητα (για το DNA: 1 OD = 50μg/ml ενώ για το RNA: 1 OD = 40μg/ml), ενώ το πηλίκο των δύο αυτών τιμών χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της καθαρότητας του δείγματος. Εάν το παρασκεύασμα δεν περιέχει πρωτεϊνικές προσμείξεις, τότε ο λόγος  $OD_{260}:OD_{280} = 2$ . Αν υπάρχουν τέτοιες, ο λόγος αυτός μειώνεται.

## 2.7 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ

Χρησιμοποιήθηκε το Dc Protein Assay (Biorad), το οποίο αποτελεί μια βελτιωμένη εκδοχή της κλασικής μεθοδολογίας Lowry, ώστε να επιτρέπεται η μέτρηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης ακόμα και παρουσία απορρυπαντικών, όπως είναι το SDS.

Προετοιμάζονται αραιώσεις του προτύπου διαλύματος αλβουμίνης ορού (BSA) που καλύπτουν το εύρος τιμών 0.2mg/ml έως 1.5mg/ml (από τρεις έως πέντε ανά μέτρηση), οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν για την



κατασκευή της καμπύλης αναφοράς. Για κάθε μέτρηση αναμειγνύονται 100μl από το δείγμα μας ή από το πρότυπο διάλυμα με 500μl αντιδραστηρίου A, το οποίο είναι αλκαλικό διάλυμα τρυγικού χαλκού και με 4ml αντιδραστηρίου B, το οποίο είναι φολίνη. Το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15min και στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση του στα 750nm σε φωτόμετρο.

## **2.8 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ ΓΕΝΟΜΙΚΟΥ DNA**

Σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% κ.ό. σε ρυθμιστικό διάλυμα 1 x TBE, που περιέχει τη χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml, ηλεκτροφορούμε 10μl από το κάθε δείγμα γενομικού DNA, το οποίο έχει αναμειχθεί με 3μl διαλύματος μπλε της βρωμοφαινόλης και γλυκερόλης. Όπως είναι γνωστό, το βρωμιούχο αιθίδιο δεσμεύεται ειδικά στο δίκλωνο DNA και το κάνει ορατό στο υπεριώδες φως. Εξάλλου, το μείγμα του μπλε της βρωμοφαινόλης και γλυκερόλης χρησιμοποιείται για να προσδώσει βάρος στο δείγμα του DNA και να το κατανείμει ομοιόμορφα μέσα στο «πηγαδάκι» του πηκτώματος ώστε το ηλεκτροφόρημα να αναπτυχθεί κανονικά. Το πήκτωμα βυθίζεται μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα 1 x TBE και εφαρμόζεται σε αυτό ηλεκτρικό πεδίο (η τάση του οποίου εξαρτάται από το μέγεθος του πηκτώματος και κυμαίνεται συνήθως στα 4V/cm πηκτώματος).

## **2.9 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ ΟΛΙΚΟΥ RNA**

Περίπου 3μl δείγματος ολικού RNA αναμειγνύεται με τριπλάσιο όγκο διαλύματος που περιέχει μπλε της βρωμοφαινόλης και φορμαμίδιο (RNA loading buffer, SIGMA) και το μείγμα θερμαίνεται στους 65–70°C για 10min ώστε να αποδιαταχθεί πλήρως το RNA. Στη συνέχεια,



χρησιμοποιούμε πήκτωμα αγαρόζης πυκνότητας 1,2% σε 1 x TBE με βρωμιούχο αιθίδιο και ηλεκτροφορούμε τα δείγματα μας για τουλάχιστον 30min. Το αποτέλεσμα αναλύεται σε τράπεζα υπεριώδους φωτός. Η παρουσία 2 διακριτών ζωνών που προέρχονται από το ριβοσωμικό RNA αποτελεί ένδειξη της καλής ποιότητας του απομονωμένου υλικού.

## 2.10 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ- ΣΥΝΘΕΣΗ COMPLEMENTARY DNA

Η μέθοδος στηρίζεται στη μοναδική ικανότητα του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης των ρετροϊών να συνθέτει μόρια DNA με μήτρα μόρια RNA.

Περίπου 1μg ολικού RNA χρησιμοποιείται για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) με τη χρήση του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript II RNase H(-) Reverse Transcriptase (Invitrogen). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή, το RNA αναμιγνύεται με 0,5μg oligo(dT)<sub>12-18</sub> εκκινητές και 1μl δ/τος dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, συγκέντρωσης 10mM το καθένα) και συμπληρώνεται με DEPC νερό μέχρι τελικού όγκου 11μl. Το μείγμα επωάζεται στους 65°C για 5min, ώστε να αποδιαταχθούν τυχόν δίκλωνες RNA δομές και να υβριδιστούν οι εκκινητές και στη συνέχεια τοποθετείται στον πάγο για λίγο, ώστε οι εκκινητές που έχουν υβριδιστεί να σταθεροποιηθούν. Έπειτα, προστίθενται 4μl ρυθμιστικού διαλύματος (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), 2μl DTT 0,1 M, 1μl αναστολέα των ριβονουκλεασών RNaseOUT (40U/μl) και 1μl ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript II RNase H(-) (200U). Το μείγμα επωάζεται στους 42°C για 60min και ακολουθεί απενεργοποίηση του ενζύμου με επώαση στους 75°C για 15min. Τα cDNAs φυλάσσονται στους -20°C έως ότου χρησιμοποιηθούν.



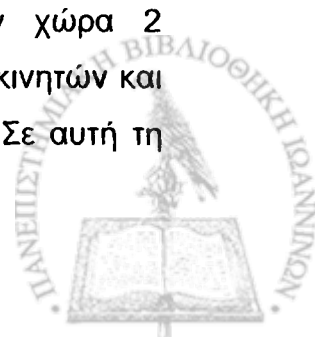
## 2.11 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CRD-BP ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION) – NESTED PCR

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι πλέον μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους Μοριακής Βιολογίας. Η βασική της αρχή στηρίζεται στη συμπληρωματικότητα των βάσεων του DNA και στην ικανότητα του ενζύμου Taq DNA Polymerase να προσθέτει νουκλεοτίδια κατά τη φορά 5'-3', με μήτρα τη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA. Έτσι, επιλέγοντας κατάλληλους εκκινητές, συμπληρωματικούς για την αλληλουχία που επιθυμούμε, και ακολουθώντας ένα απλό θερμικό πρωτόκολλο, μπορούμε να πάρουμε τελικά πολλά αντίτυπα της γονιδιακής περιοχής του ενδιαφέροντός μας, είτε αυτή είναι τμήμα γονιδίου είτε είναι τμήμα μηνύματος RNA.

Οι εφαρμογές της συγκεκριμένης τεχνικής είναι σήμερα πάρα πολλές. Μια από τις πιο βασικές ίσως είναι η χρήση της για την ανίχνευση μηνυμάτων και άρα για τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* συστήματα. Η ευρεία χρήση της σε αυτό το πεδίο βασίζεται σε δυο χαρακτηριστικά της:

- μεγάλη ευαισθησία, γιατί μπορεί να ανιχνεύσει και να πολλαπλασιάσει και αλληλουχίες που βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες μέσα στο δείγμα μας
- μεγάλη αξιοπιστία, γιατί ο υβριδισμός των εκκινητών βασίζεται στη συμπληρωματικότητα των αζωτούχων βάσεων του DNA, οπότε ο «στόχος» αναγνωρίζεται με μεγάλη ειδικότητα.

Επιπλέον, για να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το nested-PCR. Σε αυτό, λαμβάνουν χώρα 2 αντιδράσεις pcr. Στην πρώτη, χρησιμοποιούμε ένα ζευγάρι εκκινητών και το προϊόν της το χρησιμοποιούμε ως μήτρα για τη δεύτερη. Σε αυτή τη





δεύτερη όμως, χρησιμοποιούμε εκκινητές επιλεγμένους με βάση την αναμενόμενη αλληλουχία του προϊόντος της πρώτης. Οι εκκινητές αυτοί χαρακτηρίζονται ως «εσωτερικοί» των πρώτων. Μετά το τέλος και των δύο διαδοχικών αντιδράσεων η αλληλουχία-στόχος έχει πολλαπλασιαστεί παρά πολλές φορές οπότε είναι πλέον εφικτή η ανίχνευσή της (θεωρητικά ο αριθμός των μορίων που έχουν παραχθεί είναι  $2^n$ , αφού κάθε κύκλος δίνει 2 αλυσίδες και όπου  $n$  = ο αριθμός των κύκλων που έχουν πραγματοποιηθεί).

Έχοντας υπ' όψιν μας όλα τα παραπάνω, εφαρμόσαμε την τεχνική του nested-PCR για τη μελέτη της έκφρασης της CRD-BP. Με μήτρα το cDNA των δειγμάτων που συνθέσαμε όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο, ακολουθεί η Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction), με εκκινητές (primers) ειδικούς για το mRNA της CRD-BP.

Η ακριβής αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν

F1: 5'-CAT GCC CTG AAG GTC TCC TA-3' και

R1: 5'-ATG TCT CGG ATC TTC CGT TG-3'

Η αντίδραση στήθηκε με τις εξής συνθήκες: 2μl cDNA αναμιγνύονται με 1μl από κάθε εκκινητή (50pmoles/μl), 5μl ρυθμιστικού δ/ματος 10mM Tris pH 9.0, 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub> και 0.1% TritonX-100, 5μl δ/τος dNTPs 2mM το καθένα, 5Units Taq DNA Polymerase (Fermentas), σε τελικό όγκο 50μl.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή της MJ Research με θερμικό πρωτόκολλο που αποτελείται από 30 κύκλους που περιλαμβάνουν: 1min στους 94°C, 1min στους 60°C και 1:30min στους 72°C.

Με μήτρα 2μl από το προϊόν της παραπάνω αντίδρασης προχωράμε σε δεύτερο κύκλο πολλαπλασιασμού (nested PCR), με εσωτερικούς εκκινητές, η αλληλουχία των οποίων είναι η ακόλουθη:

F2: 5'-GAG CAG ATA GCA CAG GGA CC-3' και

R2: 5'-TGG CAT AGA AAT GTC CGA TG-3'

Όλες οι υπόλοιπες συνθήκες της αντίδρασης παραμένουν όμοιες με τον πρώτο κύκλο.



Παράλληλα με τις παραπάνω αντιδράσεις, ίση ποσότητα από το cDNA κάθε δείγματος χρησιμοποιείται ως μήτρα για τον πολλαπλασιασμό του μηνύματος της β-ακτίνης με τους εκκινητές

F: 5'-ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG-3'

και

R: 5'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-3'

(Clontech, Human beta-actin control panel) στις ίδιες συνθήκες με τις παραπάνω. Το προϊόν χρησιμοποιείται για να βεβαιωθεί η ακεραιότητα του cDNA.

Όλα τα προϊόντα των παραπάνω αντιδράσεων αναλύονται σε 1,2% πήκτωμα αγαρόζης που περιέχει τη χρωστική Gel Star (FMC BioProducts) η οποία δεσμεύεται επιλεκτικά και μη αναστρέψιμα σε δίκλινα μόρια νουκλεϊκών οξέων τα οποία οπτικοποιούνται σε τράπεζα υπεριώδους φωτός. Το αποτέλεσμα αξιολογήθηκε μόνο όταν υπήρχε ακέραιο προϊόν ακτίνης μεγέθους 730bp. Ως θετικά αξιολογήθηκαν τα δείγματα τα οποία έδωσαν μετά το δεύτερο κύκλο PCR ένα και μόνο προϊόν ειδικό για τη CRD-BP/IMP1, μεγέθους 980bp.

## 2.12 ΣΧΕΤΙΚΗ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΝΥΜΑΤΟΣ ΤΟΥ C-MYC ΣΤΟΥΣ ΟΓΚΟΥΣ

Τα επίπεδα του μηνύματος του c-myc στα δείγματα των όγκων προσδιορίστηκαν με τη χρήση του Human C-MYC Relative RT-PCR kit (Ambion). Η βασική αρχή, στην οποία στηρίζεται η λογική του συγκεκριμένου πειράματος, είναι ο ταυτόχρονος πολυμερισμός τόσο του μηνύματος που μας ενδιαφέρει (εδώ το *c-myc*), όσο και του μηνύματος ενός γονιδίου αναφοράς, η έκφραση του οποίου δε μεταβάλλεται αξιοσημείωτα, στο συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο και βάσει της φυσιολογίας του. Έτσι, εκτιμάται το ποσό του προϊόντος του c-myc σε σχέση με το προϊόν του γονιδίου αναφοράς για το κάθε δείγμα, δηλαδή η ποσοτικοποίηση είναι έμμεση και σχετική. Ως γονίδιο αναφοράς στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το ριβοσωμικό RNA.



Επιπλέον, επειδή το μήνυμα του ριβοσωμιού RNA υπάρχει συνήθως μέσα στο κύτταρο σε πολύ μεγάλες ποσότητες, ιδίως σε σύγκριση με το μήνυμα του γονιδίου-στόχου, ο πολυμερισμός των δύο μηνυμάτων θα γίνεται με ιδιαίτερα άνισο ρυθμό. (Γνωρίζουμε ότι η PCR είναι μια κλασική ενζυμική αντίδραση κι επομένως το προϊόν της είναι ανάλογο της ποσότητας των αντιδρώντων, για συγκεκριμένες συνθήκες). Κάτι τέτοιο θα οδηγούσε γρήγορα σε εξάντληση τόσο των ικανοτήτων του ενζύμου, όσο και των άλλων συμπαραγόντων της αντίδρασης. Κυρίως όμως, θα οδηγούσε την αντίδραση του πολυμερισμού πολύ σύντομα σε φάση πλατώ, οπότε θα χανόταν η αναλογικότητα των δύο αντιδράσεων. Για τους λόγους αυτούς, στο μείγμα της αντίδρασης προστίθενται και ειδικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία δρουν ως ανταγωνιστές των εκκινήτων για το μήνυμα του ριβοσωμιού RNA (αφού δεσμεύονται στις ίδιες θέσεις με αυτούς, χωρίς όμως να επιτρέπουν τον πολυμερισμό και την παραγωγή προϊόντος), σε αναλογία τέτοια που να διατηρείται η αντίδραση του πολυμερισμού μέσα στους ίδιους ρυθμούς με τους οποίους πολυμερίζεται και το μήνυμα του γονιδίου στόχου.

Έχοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω, προχωρήσαμε, σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου, στη σύνθεση cDNA από περίπου 1μg ολικό RNA, με εκκινήτες τυχαία εξανουκλεοτίδια (random hexamers, Promega) και το ένζυμο Super Script II Rnase H (-) Reverse Transcriptase, ακολουθώντας το πρωτόκολλο που αναφέρεται σε προηγούμενη παράγραφο.

Δύο μl από αυτό το cDNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε μια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τους ειδικούς εκκινήτες για το c-myc mRNA. Συγκεκριμένα, το μείγμα της αντίδρασης περιέχει: 4μl c-myc primers (50pM), 4μl primers ειδικούς για το rRNA (50pM) σε αναλογία 2:8 με ανταγωνιστές, 5μl ρυθμιστικού δ/ματος (10mM Tris pH 9.0, 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub> και 0.1% TritonX-100), 5μl δ/τος dNTPs 2mM το καθένα, 5Units Taq DNA Polymerase (Fermentas), σε τελικό όγκο 50μl. Το θερμικό πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε περιελάμβανε 29 κύκλους των 30sec στους 94<sup>0</sup>C, 30sec στους 59<sup>0</sup>C και 30sec στους 72<sup>0</sup>C.

Στους 29 κύκλους το προϊόν του πολυμερισμού είναι αρκετά αυξημένο αλλά βρίσκεται ακόμη μέσα στη γραμμική φάση πολυμερισμού,



όπως διαπιστώθηκε σε προκαταρκτικά πειράματα, κατά τα οποία μικρό δείγμα της αντίδρασης λαμβανόταν σε διάφορα χρονικά σημεία της αντίδρασης πολυμερισμού. Σε μια ανάλογη σειρά προκαταρκτικών πειραμάτων δοκιμάστηκαν πολλές αναλογίες των ειδικών για το rRNA εκκινητών και των ανταγωνιστών τους για να επιλεγθεί η αναλογία του 2:8. Έτσι μπορούμε να διαπιστώσουμε διαφορές στην παραγόμενη ποσότητα προϊόντος που αντικατοπτρίζουν διαφορές των επιπέδων του αντίστοιχου μηνύματος δυνατότητα που δεν θα είχαμε αν η αντίδραση είχε φτάσει σε πλατό. Πέντε μl από το κάθε προϊόν της παραπάνω αντίδρασης αναλύεται σε 1,2% πήκτωμα αγαρόζης που περιέχει τη χρωστική Gel Star (FMC BioProducts) και οπτικοποιείται με τη βοήθεια υπεριώδους φωτός. Το πήκτωμα φωτογραφίζεται από ψηφιακή κάμερα και η εικόνα αναλύεται με τη βοήθεια ειδικού προγράμματος (Gel Analyzer program Biosure RT, Athens, Greece). Οι τιμές που λαμβάνονται από τις μετρήσεις αυτές αποδίδονται στη συνέχεια ως λόγοι c-myc/rRNA για κάθε δείγμα και βάσει των λόγων αυτών συγκρίνονται τα δείγματα μεταξύ τους.

## 2.13 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ PCNA ΣΤΟ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ

Χρησιμοποιήθηκε το PCNA Elisa kit (Qiagen). Πρόκειται για μια κλασική elisa, δηλαδή μια ανοσοενζυμική μέθοδο «σάντουιτς», που περιλαμβάνει τρία αντισώματα. Επίσης, περιλαμβάνεται καθαρή ανθρώπινη πρωτεΐνη PCNA, γνωστής συγκέντρωσης, με διαδοχικές αραιώσεις της οποίας φτιάχνονται πρότυπα δείγματα για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς.

Στην επιφάνεια των 96 πηγαδιών της μικροπλάκας υπάρχουν ακινητοποιημένα μόρια πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού έναντι της ανθρώπινης πρωτεΐνης PCNA. 50μl από το δείγμα ή από το πρότυπο διάλυμα και 50μl βιοτυνιλιωμένου μονοκλωνικού αντισώματος ποντικού έναντι της PCNA (κλώνος PC10) προστίθεται σε κάθε πηγαδάκι και επωάζονται για 2 ώρες. Ακολουθούν 3 διαδοχικά πλυσίματα με διάλυμα



PBS (200mM) για την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων μορίων. Έπειτα προστίθεται ένα τρίτο πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του μονοκλωνικού που χρησιμοποιήθηκε στο προηγούμενο στάδιο, το οποίο είναι συνδεδεμένο με υπεροξειδάση και το μείγμα επwάζεται εκ νέου. Ακολουθεί και πάλι απομάκρυνση των μη δεσμευμένων μορίων με πλύσιμο και τέλος προστίθεται το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης, η άχρωμη τετραμεθυλ-βενζιδίνη (TMB). Με την οξείδωσή της από την υπεροξειδάση παράγεται μπλε χρώμα και με την προσθήκη θειικού οξέος για τον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης το χρώμα γίνεται κίτρινο. Αυτό μετράται σε φωτόμετρο οπότε η απορρόφηση – που είναι ανάλογη των μορίων της PCNA πρωτεΐνης που περιείχε το κάθε πηγαδάκι – μεταφράζεται σε μονάδες OD/mg πρωτεΐνης  $10^{-1}$  με βάση τη συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης που περιείχε το κάθε δείγμα.

## 2.14 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ C-ERBB2 ΣΤΟ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ

Χρησιμοποιήθηκε το « c-erbB2 Elisa kit» (Qiagen). Πρόκειται πάλι για μια ανοσοενζυμική μέθοδο «σάντουιτς», που περιλαμβάνει 2 αντισώματα και ένα διάλυμα καθαρής ανθρώπινης πρωτεΐνης c-erbB2, γνωστής συγκέντρωσης, με διαδοχικές αραιώσεις της οποίας φτιάχνονται πρότυπα δείγματα για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς.

Το ένα μονοκλωνικό αντίσωμα – έναντι της c-erbB2 πρωτεΐνης – είναι ακινητοποιημένο στον πυθμένα των πηγαδιών της μικροπλάκας. Σε αυτά προστίθεται το δείγμα ή το διάλυμα αναφοράς (100μl) και επwάζεται για 2 ώρες. Απομακρύνονται τα μη δεσμευμένα μόρια με πλυσίματα και προστίθεται το δεύτερο μονοκλωνικό, στο οποίο είναι προσδεδεμένα μόρια υπεροξειδάσης. Μετά την επwαση και το πλύσιμο, προστίθεται το άχρωμο υπόστρωμα του ενζύμου, το TMB και παράγεται χρώμα ακριβώς με την ίδια λογική που αναλύθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, για την elisa του PCNA. Η μικροπλάκα φωτομετράται στα 450/595nm και το



αποτέλεσμα, που είναι ανάλογο της περιεχόμενης ποσότητας πρωτεΐνης c-erbB2, εκφράζεται σε μονάδες OD/mg πρωτεΐνης  $10^{-1}$ .

## 2.15 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ (COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION)

Πρόκειται για μια από τις μεθόδους Μοριακής Γενετικής που χρησιμοποιούνται για να μελετηθούν συνολικές αλλαγές του γονιδιώματος, όπως είναι οι γονιδιακές ελλείψεις και οι γονιδιακές επεκτάσεις. Η ευαισθησία της είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή της απλής καρυοτύπησης ενώ η εξαγόμενη πληροφορία είναι πολύ περισσότερη – αν και πιο γενική – από αυτήν που παίρνουμε από άλλες κυτταρογενετικές μεθόδους, όπως το FISH και το M-FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization και Multicolor Fluorescence *In Situ* Hybridization αντίστοιχα).

Η βασική της αρχή έχει να κάνει με την ικανότητα των DNA μορίων να υβριδίζονται μεταξύ τους. Γενικά, δύο διαφορετικά δείγματα DNA που τοποθετούνται πάνω στα χρωμοσώματα μιας φυσιολογικής μετάφασης έχουν τις ίδιες πιθανότητες να υβριδιστούν ομοιόμορφα σε όλες τις θέσεις. Αν αυτά τα δύο δείγματα είναι σημασμένα με χρώμα, το αποτέλεσμα του υβριδισμού μπορεί να παρατηρηθεί σε κατάλληλο μικροσκόπιο. Αν τώρα το κάθε δείγμα DNA είναι σημασμένο με διαφορετικό χρώμα – έστω το ένα με κόκκινο και το άλλο με πράσινο – τότε το αποτέλεσμα του ισότιμου υβριδισμού τους θα δίνει στη μικροσκοπική παρατήρηση ένα χρώμα πορτοκαλί. Αν σε κάποια περιοχή ενός χρωμοσώματος παρατηρηθεί ότι υπερτερεί το ένα χρώμα, αυτό σημαίνει ότι το DNA που είχε σημασθεί με αυτό έχει πολλές κόπιες για τη συγκεκριμένη περιοχή, ή ότι το άλλο DNA έχει πολύ λιγότερες ή και καθόλου κόπιες. Στην περίπτωση που το ένα δείγμα DNA που χρησιμοποιούμε προέρχεται από φυσιολογικό ιστό – οπότε αναμένεται να κατανέμεται ισότιμα σε όλα τα χρωμοσώματα – τότε οποιαδήποτε αλλαγή στην ένταση του χρώματος μπορεί να μας πληροφορήσει για τυχόν γενετικές αλλαγές στο υπό εξέταση DNA.



Το DNA που απομονώνεται από τους όγκους όπως περιγράφηκε σε προηγούμενη παράγραφο, εξετάζεται με αναφορά το DNA που απομονώνεται από τα κύτταρα περιφερικού αίματος υγιούς θηλυκού ατόμου. Τα βασικά βήματα της μεθοδολογίας περιλαμβάνουν σήμανση του DNA του όγκου και του DNA-αναφοράς, υβριδισμό τους στις μεταφάσεις, μικροσκοπική παρατήρηση και ανάλυση των μεταφάσεων και τέλος εκτίμηση των αποτελεσμάτων.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη περιγράφεται κυρίως από τους Kallionemi *et al.* με τροποποιήσεις από τους Kraggerud *et al.* [187, 188].

- Η σήμανση του DNA αναφοράς αλλά και των δειγμάτων γίνεται με τη μεθοδολογία του nick translation. Αυτή βασίζεται στη διπλή ιδιότητα του ενζύμου της *E.coli*, DNA πολυμεράση I, να δρα σαν 5'-3' εξωνουκλεάση και ταυτόχρονα να προσθέτει νουκλεοτίδια στο 3'-5' άκρο της αλυσίδας του DNA. Για να δράσει βέβαια το ένζυμο πρέπει το γενωμικό DNA να έχει υποστεί μερική πέψη ώστε να είναι τεμαχισμένο. Για αυτό το λόγο, πριν την αντίδραση του nick translation, το DNA επώαζεται με την ενδονουκλεάση HindIII (New England Biolabs). Στη συνέχεια, το τεμαχισμένο DNA αναμειγνύεται, μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα με DNA πολυμεράση I και μείγμα dNTPs μέσα στα οποία περιέχεται και κάποιο φθοριούχο νουκλεοτίδιο. Για τη σήμανση του DNA του όγκου χρησιμοποιήθηκε MaqFITC-12dCTP και FITC-12dUTP, ενώ για αυτό της αναφοράς χρησιμοποιήθηκε Texas Red-6dCTP και Texas Red-6dUTP (New England Nuclear, Boston). Η αντίδραση πραγματοποιείται με επώαση για 2 ώρες στους 15°C και τερματίζεται με θέρμανση στους 75°C για 10min. Το προϊόν καθαρίζεται με 75% αιθανόλη (φυγοκέντρηση 12000rpm, 4°C, 15min) ώστε να απομακρυνθούν τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια και φυλάσσεται στους -20°C μέχρι τη χρήση του. Μέρος του ιχνηθέτη που προκύπτει από την παραπάνω διαδικασία ηλεκτροφορείται σε 1.2% πήκτωμα αγαρόζης με βρωμιούχο αιθίδιο



για να επιβεβαιωθεί η ποιότητά του. Οι ιχνηθέτες που προκύπτουν έχουν μέγεθος που κυμαίνεται από 300 έως 200bp.

- Ίση ποσότητα από το σημασμένο DNA του όγκου και της αναφοράς (περίπου 400ng από το καθένα) αναμειγνύονται και προστίθενται 10ng μη σημασμένου εμπορικού γενωμικού DNA από φυσιολογικό ιστό, το Cot-1 (Life Technologies, Rockville, MD). Η χρήση του Cot-1 σκοπό έχει να υποβοηθήσει την ομαλή υβριδοποίηση του μείγματος του σημασμένου DNA, αλλά και να μπλοκάρει την πληθώρα των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που υπάρχουν στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Το μείγμα κατακρημνίζεται με προσθήκη αιθανόλης και φυγοκέντρηση (12000rpm, 4°C, 15min). Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για λίγα λεπτά και αναδιαλύεται σε 10μl διαλύματος υβριδοποίησης (Vysis Downers Grove, IL). Οι φυσιολογικές μεταφάσεις που χρησιμοποιούνται για το επόμενο βήμα, υποβάλλονται σε διαδικασία αφυδάτωσης, καθώς βυθίζονται διαδοχικά σε γυάλινα δοχεία που περιέχουν 70%, 90% και 100% αιθανόλη και βρίσκονται μέσα σε υδατόλουτρο στους 70°C. Στη συνέχεια, τα πλακάκια στεγνώνουν στον αέρα, υποβάλλονται σε διαδικασία αποδιάταξης με βύθιση σε διάλυμα 70% φορμαμίδιο/2XSSC για 3min στους 75°C και επαναλαμβάνεται η διαδικασία αφυδάτωσης. Μετά από αυτή, οι πλάκες επωάζονται με πρωτεΐνάση K για 30min σε θερμοκρασία δωματίου και επαναλαμβάνεται η διαδικασία αφυδάτωσης. Αφού ολοκληρωθούν όλα τα προηγούμενα βήματα, τα πλακάκια στεγνώνουν ελαφρά στους 37°C. Στο μεταξύ, το μείγμα του DNA που έχει αναδιαλυθεί στο διάλυμα υβριδισμού, θερμαίνεται στους 75°C για 5min και έπειτα μεταφέρεται στην αντικειμενοφόρο, επάνω στην περιοχή της μετάφασης. Αυτή καλύπτεται με καλυπτρίδα, κλείνεται περιμετρικά με ειδική κόλλα και τοποθετείται σε ειδικό κουτί υβριδισμού το οποίο δεν είναι διαπερατό στο φως και προστατεύει από την αφυδάτωση. Ο υβριδισμός γίνεται με επώαση των αντικειμενοφόρων για 3 μέρες στους 37°C. Στη συνέχεια, απομακρύνονται οι καλυπτρίδες, πλένονται τα παρασκευάσματα





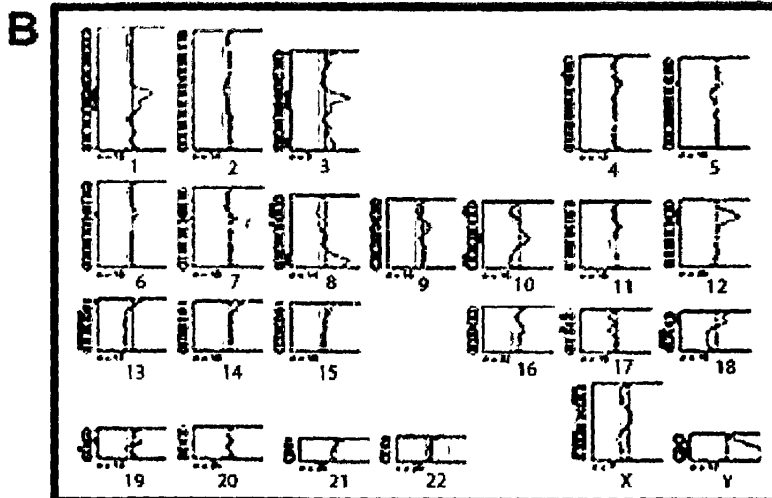
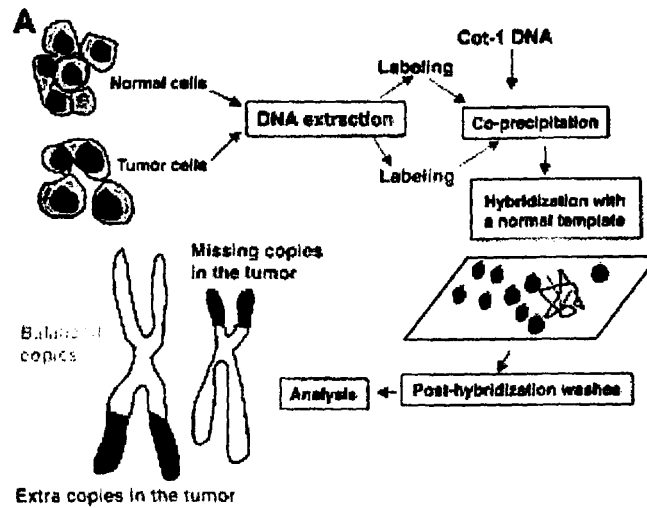
διαδοχικά σε διαλύματα 50%φορμαμίδιο/2 x SSC και σκέτο 2 x SSC, προστίθενται 10μl χρωστικής DAPI II (Vectashield Vector laboratories, Burlingame, CA), και είναι έτοιμα για μικροσκοπική παρατήρηση (Zeiss Axioplan fluorescence microscope).

- Κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση επιλέγονται και αναλύονται τουλάχιστον 10 μεταφάσεις από κάθε περιστατικό. Για την ανάλυση των μεταφάσεων χρησιμοποιήθηκε το ειδικό σύστημα Isis Metasystems. Τα χρωμοσώματα αναγνωρίζονται βάσει της ανεστραμμένης εικόνας τους με τη χρώση DAPI II και στη συνέχεια το σύστημα εκτιμά την ένταση του κόκκινου και του πράσινου χρώματος στην έκταση κάθε χρωμοσώματος και εξάγει μια αναλογία ενδεικτική για την ύπαρξη η όχι χρωμοσωμικής ανωμαλίας σε αυτό. Για την εκτίμηση των αυξήσεων (γονιδιακή επέκταση) χρησιμοποιείται ως οριακή τιμή το 1.25 ενώ για την εκτίμηση ελλείψεων η τιμή 0.75. Να σημειωθεί ότι σε κάθε πείραμα υβριδισμού, μαζί με τα υπό μελέτη δείγματα, χρησιμοποιήθηκαν το DNA από υγιές άτομο ως αρνητικός μάρτυρας και το DNA από την κυτταρική σειρά LOVO η οποία φέρει γνωστές γενετικές ανωμαλίες ως θετικός μάρτυρας. Ο συνολικός αριθμός αλλαγών που εντοπίστηκαν για κάθε περιστατικό περιγράφηκαν με βάση τους κανόνες της ISCN [189].



## Εικόνα 12

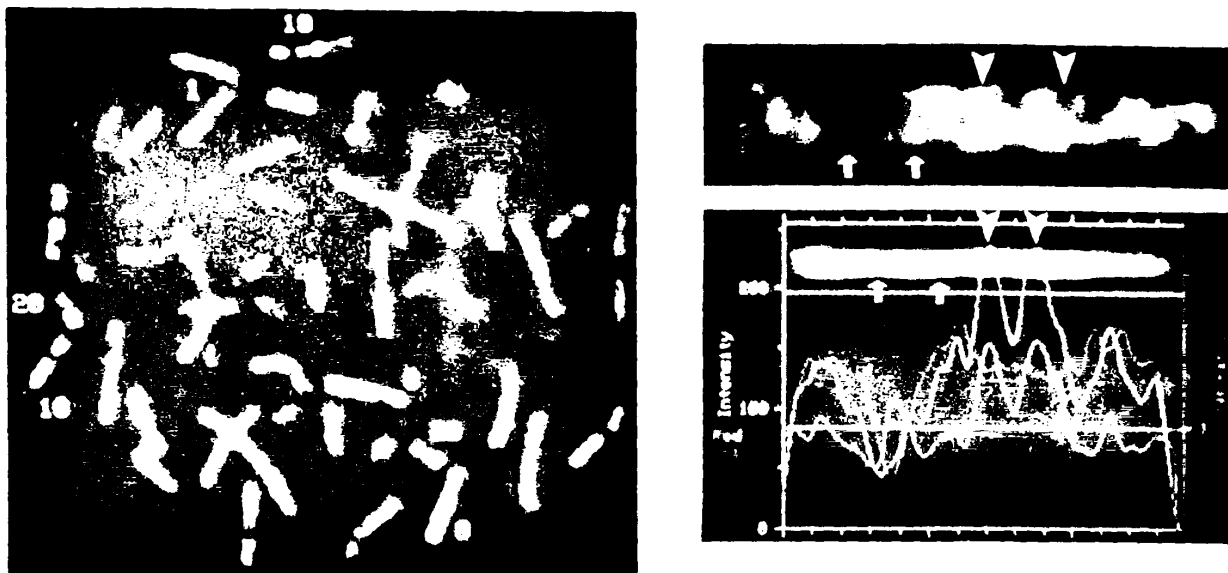
## Σχηματική απεικόνιση των βημάτων της τεχνικής CGH



(Α) Υβριδισμός με DNA από ένα πρωτογενές καρκίνωμα μαστού (σημασμένο με πράσινη χρωστική) και φυσιολογικό DNA αναφοράς θηλυκού ατόμου (σημασμένο με κόκκινη χρωστική) επάνω σε χρωμοσώματα μιας φυσιολογικής μετάφασης. Τα χρωμοσώματα βάφονται με την ειδική χρωστική DAPI II πριν τη μικροσκοπική παρατήρηση.

(Β) Το ειδικό λογισμικό που χρησιμοποιείται για τη CGH ανάλυση ποσοτικοποιεί το λόγο της έντασης πράσινου προς κόκκινου χρώματος κατά μήκος των 2 ομολόγων χρωμοσωμάτων για κάθε ζεύγος. Έτσι, για κάθε χρωμόσωμα εξάγεται ένα διάγραμμα που οπτικοποιεί αυτόν τον λόγο.

### Εικόνα 13 Συγκριτικός Γενωμικός Υβριδισμός



Στην εικόνα αριστερά φαίνεται μια μετάφαση στην οποία έχει γίνει υβριδισμός με DNA από ένα πρωτογενές καρκίνωμα μαστού (σημασμένο με πράσινη χρωστική) και φυσιολογικό DNA αναφοράς θηλυκού ατόμου (σημασμένο με κόκκινη χρωστική). Στις περιοχές που υπερισχύει το πράσινο χρώμα υπάρχει περίσσεια γενετικού υλικού στο DNA που προέρχεται από το καρκίνωμα ενώ στις περιοχές που υπερισχύει το κόκκινο χρώμα υπάρχει έλλειψη γενετικού υλικού στο DNA του καρκινώματος.

Ενδεικτικά αναφέρεται το χρωμόσωμα 8 όπου υπερισχύει το πράσινο χρώμα, γεγονός που σημαίνει ότι στην περιοχή αυτή ανιχνεύεται στο καρκίνωμα περίσσεια γενετικού υλικού.

Στην εικόνα δεξιά παρουσιάζεται σε μεγέθυνση ένα χρωμόσωμα της ίδιας μετάφασης όπως φθορίζει μετά τον υβριδισμό. Τα βέλη δείχνουν τις δύο περιοχές όπου υπερισχύει το κόκκινο χρώμα γεγονός που υποδηλώνει την έλλειψη γενετικού υλικού στο DNA που προέρχεται από το καρκίνωμα που εξετάστηκε. Στο διάγραμμα που παρουσιάζεται από κάτω απεικονίζεται ο τρόπος με τον οποίο το λογισμικό οπτικοποιεί το λόγο των φθορίζουσών χρωστικών.

### **3 ΜΕΡΟΣ Γ΄: ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΚΑΙ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CRD–BP/IMP1**

#### **3.1 ΘΕΩΡΙΑ ΤΗΣ ΑΡΧΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΗΣ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΩΝ ΔΙΚΛΩΝΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA (siRNA)**

Τα siRNAs αποτελούν σήμερα ένα από τα πιο καινούρια και ευρέως χρησιμοποιούμενα εργαλεία για την ανάλυση της λειτουργίας συγκεκριμένων γονιδίων. Ο ακριβής μοριακός μηχανισμός μέσω του οποίου ασκούν τη δράση τους βρίσκεται ακόμη υπό μελέτη καθώς είναι πολλά τα σημεία που μένουν αδιευκρίνιστα.

Τα πρώτα σχετικά πειράματα ξεκίνησαν στις αρχές της προηγούμενης δεκαετίας. Το όλο φαινόμενο που λαμβάνει χώρα με τη συμμετοχή των siRNAs καλείται RNA interference και θεωρείται σήμερα μια μορφή μεταγραφικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης (Posttranscriptional Gene Silencing ή PTGS) η οποία μάλιστα εμπεριέχει μηχανισμούς εξελικτικά συντηρημένους που σκοπεύουν στην παρεμπόδιση της έκφρασης ξένης ή «εαυτής» γενετικής πληροφορίας.

Τα siRNAs είναι δίκλινα μόρια RNA μεγέθους 21–25 bp που φέρουν στο 3΄-άκρο τους μια προεξοχή 2 νουκλεοτιδίων. Τέτοια μόρια παράγονται και ενδογενώς μέσα στο κύτταρο με την επίδραση σε δίκλινα μόρια RNA μεγαλύτερου μεγέθους (500 bp) ενός ενζύμου που λέγεται Dicer και είναι μια ATP–εξαρτώμενη ενδονουκλεάση.

Τα μικρά αυτά μόρια RNA έχουν δράση μόνο έναντι σε mRNAs με την αλληλουχία των οποίων έχουν πλήρη συμπληρωματικότητα και θεωρείται ότι δρουν σαν οδηγοί που φέρουν κοντά τα μόρια–στόχους (τα



μηνύματα που πρόκειται να καταστραφούν) με το ειδικό ενδονουκλεολυτικό σύμπλοκο.

Κάθε μόριο siRNA συσχετίζεται με ένα με ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που καλείται RISC (RNA-induced silencing complex), τμήμα του οποίου δρα σαν RNA-ελικάση και επιτρέπει τη σύνδεση μεταξύ της αντίστροφης αλυσίδας του siRNA και της συμπληρωματικής αλυσίδας του mRNA-στόχου. Αυτή η σύνδεση προκαλεί την ενδονουκλεολυτική πέψη του μορίου-στόχου, αφήνοντας δύο τμήματα που το ένα στερείται της poly(A) ουράς (αφού περιλαμβάνει το 5' άκρο του μηνύματος) και το άλλο της δομής της καλύπτρας (αφού περιλαμβάνει το 3' άκρο του μηνύματος). Τέτοιες δομές αναγνωρίζονται και καταστρέφονται από την ενδονουκλεολυτική μηχανή του κυττάρου. Μετά την καταστροφή αυτού του μορίου-στόχου, το σύμπλοκο siRNA-RISC μένει ελεύθερο για να στοχεύσει ένα άλλο μήνυμα.

### 3.2 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ siRNA

Για το σχεδιασμό ενός siRNA μορίου που να στοχεύει ένα συγκεκριμένο γονίδιο, ακολουθούνται κάποιοι βασικοί κανόνες που συνοψίζονται στα παρακάτω:

1. μέγεθος μορίου 21–25 bp, συνήθως
2. αποφεύγουμε να σχεδιάσουμε μόρια που στοχεύουν τις περιοχές στην αρχή και το τέλος του μηνύματος (100 βάσεις)
3. αποφεύγουμε τις αλληλουχίες των εσωνίων
4. αποφεύγουμε δομές με 4 ή περισσότερες συνεχόμενες αδενίνες ή γουανίνες (AAAA ή GGGG)
5. αποφεύγουμε περιοχές με περιεχόμενο σε GC <30% ή >60%. Το επιθυμητό είναι περίπου 50%.
6. αποφεύγουμε περιοχές με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες.
7. αποφεύγουμε περιοχές που τυχόν παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με αλληλουχίες άλλων μηνυμάτων
8. προτιμούμε η επιλεγμένη αλληλουχία να ξεκινά με AA.



Με βάση τις παραπάνω αρχές σχεδιάστηκαν από εμάς και συντέθηκαν (Xeragon Inc) δύο δίκλινα μόρια RNA μεγέθους 21 νουκλεοτιδίων το καθένα και στόχο το μήνυμα του CRD-BP/IMP1. Η sense και antisense αλληλουχία του siCRD-BP-1 είναι:

r(CCUGGCUGCUGUAGGUCUU)dTT

και r(AAGACCUACAGCAGCCAGG)dTT,

ενώ του siCRD-BP-2 είναι:

r(GCUGGAGACCCACAUAAGGU)dTT

και r(ACGUAUGUGGGUCUCCAGC)dTT.

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε στα πειράματά μας ως μάρτυρας ένα siRNA του εμπορίου (Xeragon Inc., Cat. n. 80-1132) που δεν στοχεύει κάποιο συγκεκριμένο γονίδιο, αλλά είναι συνδεδεμένο με φλουορεσκίνη και μετά την εισαγωγή του στα κύτταρα, αυτά φθορίζουν. Με τη χρήση αυτού του μορίου, είναι εφικτός ο άμεσος προσδιορισμός των ποσοστών των κυττάρων που επιμολύνθηκαν επιτυχώς με ανάλυση FACS, όπως περιγράφεται σε παρακάτω παράγραφο. Τέλος, ένα εμπορικό μόριο siRNA (Ambion Inc., cat. n. 4604), που δεν στοχεύει κανένα γνωστό μήνυμα γονιδίων θηλαστικών, χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Όλα τα μόρια siRNAs διαλύθηκαν σε 100 mM οξικού καλίου, 30 mM HEPES-KOH, pH 7.4 και 2 mM οξικού μαγνησίου, σε μια τελική συγκέντρωση των 20 μM και αποθηκεύτηκαν στους -70° C μέχρι τη χρήση τους.

### 3.3 ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ siRNA

Για την επιμόλυνση κυττάρων της σειράς MCF-7 χρησιμοποιήθηκε το siPORT lipid Transfection Agent (Ambion Inc.), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται και εδώ στο σχηματισμό συμπλόκων μεταξύ των μορίων siRNA και των λιπιδίων που περιέχονται μέσα στο διάλυμα siPORT, ο οποίος προάγει την αυξημένη πρόσληψη τους από την ευκαρυωτική μεμβράνη. Το φθορίζων siRNA



χρησιμοποιήθηκε όπως προαναφέρθηκε σε μια σειρά αρχικών πειραμάτων για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών, όσον αφορούσε την κυτταρική πυκνότητα της καλλιέργειας, τη συγκέντρωση των μορίων siRNA αλλά και την ποσότητα του siPORT lipid agent.

Συνοπτικά, τα βασικά σημεία της ακολουθούμενης πειραματικής διαδικασίας ήταν τα εξής:

- τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται τακτικά για να διατηρούνται σε λογαριθμική φάση αύξησης
- 24 ώρες πριν την επιμόλυνση τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται σε συγκέντρωση  $\sim 4.5 \times 10^5$  κύτταρα /  $10 \text{ cm}^2$ .
- Δύο ώρες πριν την επιμόλυνση, το καλλιεργητικό μέσο αντικαθίσταται με ειδικό μέσο καλλιέργειας, χαμηλού πρωτεϊνικού φορτίου (OPTI-MEM, Gibco BRL), χωρίς ορό και αντιβιοτικό.
- 5 μl του siPORT lipid αναμιγνύονται με κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος siRNA ώστε η τελική συγκέντρωση του στην καλλιέργεια να είναι 100 nM, και προστίθεται στα κύτταρα.
- 24 και 48 ώρες μετά την επιμόλυνση, συλλέγονται τα κύτταρα που έχουν προσλάβει το φθορίζον siRNA και προσδιορίζεται το ποσοστό επιτυχίας της επιμόλυνσης με FACS ανάλυση, όπως περιγράφεται σε παρακάτω παράγραφο.

48 ώρες μετά την επιμόλυνση, τα κύτταρα συλλέγονται και ακολουθεί απομόνωση ολικού RNA και ανάλυση τους με RT-Real Time PCR, όπως περιγράφεται σε άλλες παραγράφους του κεφαλαίου «Υλικά και Μέθοδοι». Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε σε 6-well plate, επιμολύνοντας 2 διαφορετικά wells με κάθε μόριο si. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν τρεις φορές για τη στατιστική επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.



### 3.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

#### 3.4.1 Βασική αρχή λειτουργίας του FACS

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί σήμερα μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο για τη μελέτη και το χαρακτηρισμό κυτταρικών πληθυσμών [190]. Πρόκειται για μια τεχνολογία που συνδυάζει παραμέτρους υδραυλικής, ηλεκτρονικής, υπολογιστών και οπτικής και βασίζεται σε όργανα που έχουν την ικανότητα να σαρώνουν κάθε κύτταρο που βρίσκεται μέσα σε διάλυμα καθώς αυτό περνά από ειδικές πηγές διέγερσης. Τα κύτταρα διαχωρίζονται κυρίως βάσει των σκεδαστικών ιδιοτήτων τους, δηλαδή του μεγέθους και της επιφανειακής πολυπλοκότητάς τους, αλλά και του φθορισμού τους. Ο φθορισμός αυτός μπορεί να παράγεται είτε από σημασμένα αντισώματα ή συνδεδετικά μόρια που πιάνονται ειδικά σε αντιγόνα επιφανείας των κυττάρων, είτε να παράγεται ενδογενώς από αυτά.

Η πιο εξελιγμένη μορφή κυτταρομετρίας ροής σήμερα χρησιμοποιεί όργανα που όχι μόνο μελετούν τα κύτταρα βάσει των ιδιοτήτων τους, αλλά έχουν και την ικανότητα να τα διαχωρίζουν.

Η πιο διαδεδομένη τεχνική προσέγγιση είναι η χρώση των κυττάρων με φθορίζοντα αντισώματα (ανοσοφθορισμός). Μερικές από τις πιο συνηθισμένες φθορίζουσες χρωστικές είναι οι: FITC (fluorescein), PE (phycoerythrin) και APC (allophycocyanin). Ο ανοσοφθορισμός στοχεύει κυρίως σε ανίχνευση επιφανειακών αντιγόνων, αλλά είναι δυνατή και η ανίχνευση ενδοκυττάρων μορίων, με τη χρήση ειδικών πρωτοκόλλων που καθιστούν τις κυτταρικές μεμβράνες διαπερατές στα φθορίζοντα μόρια.





### 3.4.2 Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής στα MCF-7 κύτταρα μετά την επιμόλυνση με τα siRNAs

Όπως προαναφέρθηκε, τα κύτταρα 24 και 48 ώρες μετά την επιμόλυνση τους με τα siRNAs, συλλέγονται, πλένονται με ισοτονικό διάλυμα 0,9% NaCl και στη συνέχεια αναδιαλύονται σε διάλυμα παραφορμαλδεύδης, 1%, σε συγκέντρωση περίπου 10<sup>6</sup> κύτταρα / ml. Το διάλυμα αυτό αναλύεται στον κυτταρομετρητή ροής και με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού, υπολογίζεται το % ποσοστό των κυττάρων που φθορίζουν στην περιοχή μήκους κύματος όπου φθορίζει η χρωστική FITC με την οποία είναι συνδεδεμένο το siRNA που έχουμε χρησιμοποιήσει.

## 3.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ MRNA ΤΩΝ CRD-BP/IMP1, *c-myc* ΚΑΙ *IGFII* ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΟΥ REAL TIME RT-PCR

### 3.5.1 Βασική αρχή λειτουργίας του Real Time PCR

Για την εκτίμηση των σχετικών επιπέδων mRNA των CRD-BP/IMP1, *c-myc* και *IGFII* χρησιμοποιήσαμε την τεχνολογία της ποσοτικής ανάλυσης νουκλεϊνικών οξέων Real time PCR σε θερμικό κυκλοποιητή Rotor-Gene 3000 (CORBET).

Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η τεχνολογία αυτή εμπεριέχει την αρχή λειτουργίας του απλού PCR με κύρια διαφορά την ποσοτικοποίηση του προϊόντος στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης, ανιχνεύοντας ειδικό φθορισμό που εκλύεται από το συντιθέμενο προϊόν. Όπως είναι γνωστό με το συμβατικό PCR ανιχνεύουμε το τελικό προϊόν το οποίο δεν είναι ανάλογο του ποσού της αρχικής μήτρας αφού συνήθως η αντίδραση πολυμερισμού φτάνει σε plateau.

Αντίθετα στο Real Time PCR σε κάθε αντίδραση προστίθεται ειδικό μόριο με την ιδιότητα να εκλύει φθορισμό όταν παράγεται προϊόν. Ο φθορισμός αυτός, που ανιχνεύεται από ειδικό εξάρτημα του θερμικού κυκλοποιητή, έχει έντασή ανάλογη της ποσότητας του προϊόντος που έχει



συντεθεί. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η ποσότητα του προϊόντος είναι ανάλογη του ποσού της μήτρας που αρχικά υπήρχε στο κάθε δείγμα, προσδιορίζεται το επίπεδο της συγκεκριμένης μήτρας μέσα στο δείγμα. Έτσι, υπολογίζεται το ποσό του συντιθέμενου προϊόντος στο τέλος του κάθε κύκλου.

Ένα από τα πιο διαδεδομένα φθοριοχρώματα που χρησιμοποιούνται είναι το SYBR Green, μια χρωστική με την ιδιότητα να δεσμεύεται στο δίκλωνο DNA και να εκλύει φθορισμό. Το μειονέκτημα του φθοριοχρώματος αυτού είναι ότι δεσμεύεται μη ειδικά, με συνέπεια να εκλύεται φθορισμός όχι μόνο από το ειδικό προϊόν αλλά και από οποιαδήποτε δίκλινη δομή νουκλεϊνικού οξέος. Η μη ειδική του σύνδεση απαιτεί επιπρόσθετα στάδια ανάλυσης για τον προσδιορισμό αποκλειστικά του ειδικού σήματος.

Το μειονέκτημα αυτό ξεπεράστηκε με τη χρήση ειδικών ιχνηθετών, σημασμένων με το κατάλληλο φθοριόχρωμα. Οι ιχνηθέτες αυτοί σχεδιάζονται με αλληλουχία συμπληρωματική αυτής του προϊόντος του PCR και έχουν την ιδιότητα να εκλύουν φθορισμό μόνο εάν και εφόσον υβριδιστούν πλήρως στην αλληλουχία-στόχος. Σήμερα υπάρχει στο εμπόριο πληθώρα τέτοιων ιχνηθετών που διαφέρουν μεταξύ τους κυρίως στη χημεία του φθορισμού που φέρουν (TaqMan Probes, Beacons, κτλ). Πρόσφατα σχεδιάστηκε μια τρίτη εκδοχή της παραπάνω τεχνικής: το φθοριόχρωμα βρίσκεται δεσμευμένο πάνω στον ένα από τους δυο εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση και εκλύεται μόνο κατά το στάδιο του πολυμερισμού (LUX primers).

### 3.5.2 Προσδιορισμός των επιπέδων του CRD-BP/IMP1 mRNA

Για τον προσδιορισμό του μηνύματος του CRD-BP/IMP1 χρησιμοποιήσαμε ως εκκινητές LUX primers, ο ένας εκ των οποίων ήταν σημασμένος με ένα φθοριόχρωμα FAM στο 3' άκρο του με δομή «φουρκέτας» (Invitrogen). Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές: CRDFLUX: 5'-cat cgg acg agc act ggg cga g-3' και CRDR: 5'-ttt ggg cac cga atg ttc aa-3'.



Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl με μήτρα 2 μl cDNA, χρησιμοποιώντας το Platinum qPCR SuperMix UDG (Invitrogen) το οποίο περιέχει το ένζυμο της DNA πολυμεράσης, μίγμα των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) και MgCl<sub>2</sub> σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Η τελική συγκέντρωση των εκκινητών ήταν 1pmol/μl. Το θερμικό πρωτόκολλο περιελάμβανε 50 κύκλους ο καθένας από τους οποίους αποτελούνταν από: 15sec στους 95°C (αποδιάταξη), 30sec στους 60°C (υβριδισμός), 30sec στους 72°C (επιμήκυνση) και μέτρηση του φθορισμού.

Για τον προσδιορισμό της β2-μικρογλοβουλίνης χρησιμοποιήθηκαν επίσης οι LUX εκκινητές FAM labeled Human B2M-Certified LUX Primer Set (Invitrogen), ακολουθώντας το ίδιο θερμικό πρωτόκολλο στις ίδιες συνθήκες.

Για να επιβεβαιώσουμε την ειδικότητα του μετρούμενου φθορισμού, στο τέλος κάθε πειράματος, πραγματοποιούσαμε ανάλυση καμπύλης τήξης.

### 3.5.3 Προσδιορισμός των επιπέδων του IGF-II mRNA

Για τον προσδιορισμό του μηνύματος του *IGF-II* χρησιμοποιήσαμε το φθοριόχρωμα SYBR Green και τους παρακάτω εκκινητές: 5'-ctg gag acg tac tgt gct acc ccc-3' και 5'-gtg tca tat tgg aag aac ttg ccc-3'.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl με μήτρα 2 μl cDNA, χρησιμοποιώντας το Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen) το οποίο περιέχει όλα προαναφέρθηκαν καθώς και το φθοριόχρωμα. Η τελική συγκέντρωση των εκκινητών ήταν 1pmol/μl. Το θερμικό πρωτόκολλο περιελάμβανε 50 κύκλους που αποτελούνταν από 15sec στους 95°C (αποδιάταξη), 30sec στους 65°C (υβριδισμός), 30sec στους 72°C (επιμήκυνση), θέρμανση στους 83°C για 2sec και μέτρηση του φθορισμού.

Παράλληλα στα ίδια δείγματα προσδιορίσαμε και τα επίπεδα της β2-μικρογλοβουλίνης όπως προαναφέρθηκε.



### 3.5.4 Προσδιορισμός των επιπέδων του *c-myc* mRNA

Για τον προσδιορισμό του μηνύματος του *c-myc* χρησιμοποιήσαμε το Real Time PCR for Human *c-Myc* Gene Expression Primer and Probe Set (Maxim Biotech Inc.) που περιέχει έναν ιχνηθέτη FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) με FAM φθοριόχρωμα. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, σε τελικό όγκο 25μl με μήτρα 2μl cDNA. Το θερμικό πρωτόκολλο περιελάμβανε 3 κύκλους που αποτελούνταν από 30 sec στους 95°C και 60sec στους 55°C και στη συνέχεια 50 κύκλους που αποτελούνταν από 45sec στους 95°C, 60sec στους 55°C και μέτρηση του φθορισμού.

Παράλληλα στα ίδια δείγματα προσδιορίσαμε και τα επίπεδα της β2-μικρογλοβουλίνης όπως προαναφέρθηκε.

## 3.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΟΥ IGFII

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του IGFII χρησιμοποιήθηκε το Active Non-Extraction IGF-II ELISA kit (Diagnostic System Laboratories, Inc) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πρόκειται για μια κλασική elisa, δηλαδή μια ανοσοενζυμική μέθοδο «σάντουιτς», που περιλαμβάνει δύο αντισώματα. Συνοπτικά, υπερκείμενα από τις καλλιέργειες MCF-7 κυττάρων που είχαν επιμολυνθεί με τα δύο siRNA μόρια έναντι της CRD-BP/IMP1 ή με το Cont-si, συμπυκνώθηκαν 10 φορές και επωάστηκαν σε μικροπλάκα που έφερε στον πυθμένα ακινητοποιημένο ένα αντίσωμα ειδικό για τον IGFII. Μετά την επώαση, η πλάκα πλύθηκε με κατάλληλο διάλυμα και επωάστηκε με δεύτερο αντίσωμα επίσης ειδικό για τον IGFII, το οποίο ήταν σημασμένο με μόρια υπεροξειδάσης (horseradish peroxidase, HRP). Μετά τη δεύτερη επώαση και πλυσίματα, προστέθηκε το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης, η άχρωμη τετραμεθυλ-βενζυδίνη (TMB). Με την οξείδωσή της από την υπεροξειδάση παράγεται μπλε χρώμα και με την προσθήκη θειικού οξέος για τον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης το χρώμα γίνεται κίτρινο. Αυτό μετράται σε



φωτόμετρο οπότε η απορρόφηση είναι ανάλογη της ποσότητας του IGFII που υπήρχε στο κάθε υπερκείμενο. Η μετάφραση των τιμών απορρόφησης σε ποσότητες πρωτεΐνης γίνεται με τη χρήση καμπύλης αναφοράς που παράγεται από δείγματα-μάρτυρες γνωστής συγκέντρωσης που περιέχονται στο kit.

### **3.7 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΟΥ WESTERN BLOT**

#### **3.7.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-PAGE**

Η ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε συνθήκες αποδιάταξης σύμφωνα με τη γενική μέθοδο, όπως περιγράφεται στο βιβλίο των Sambrook, Fritsch και Maniatis [188], σε συσκευή mini ProteanII (Biorad). Το πήκτωμα που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από τη φάση στοιβαξης με σύσταση 3,9% acylamide-bisacrylamide (29:1) σε διάλυμα 125mM Tris-HCl pH 6.8 και 0.1% SDS και τη φάση διαχωρισμού με σύσταση 10% acylamide-bisacrylamide (29:1) σε διάλυμα 375mM Tris-HCl pH 8.8 και 0.1% SDS.

Ίση ποσότητα πρωτεΐνης από κάθε δείγμα ανάγεται σε τελικό όγκο 30μL με ανάμειξη της με SDS-PAGE sample buffer (Biorad). Τα δείγματα βράζονται για 5 λεπτά και ηλεκτροφορούνται αρχικά στα 80V-50mA για να διέρθουν τη φάση στοιβαξης και έπειτα στα 150V-60mA όσο διέρχονται τη φάση διαχωρισμού, για 2-3 ώρες.



### 3.7.2 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη

Η μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη γίνεται με ηλεκτρομεταφορά, χρησιμοποιώντας κατάλληλη συσκευή (Bio-rad), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Χρησιμοποιούνται μεμβράνες Immobilon-P (Millipore) οι οποίες μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς φυλάσσονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  έως ότου χρησιμοποιηθούν για ανοσοσύτωση.

### 3.7.3 Ανοσοπροσδιορισμός των ακινητοποιημένων στη μεμβράνη πρωτεϊνών με τη χρήση χημειοφωταύγειας

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ειδική αντίδραση της πρωτεΐνης που μελετάται (αντιγόνο) με ειδικό μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό αντίσωμα που την αναγνωρίζει (1<sup>ο</sup> αντίσωμα). Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζεται από άλλο μη ειδικό αντίσωμα (2<sup>ο</sup> αντίσωμα) το οποίο φέρει προσδεμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης (horseradish peroxidase). Το ένζυμο αυτό καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης, αντίδραση που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή χημειοφωταύγειας η οποία ανιχνεύεται με τη βοήθεια ειδικών ευαίσθητων film.

Για τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα ειδικά αντιδραστήρια ECL Western Blotting Detection (Amersham) και τα βήματα που ακολουθήθηκαν διαγραμματικά παρατίθενται παρακάτω.

Η μεμβράνη με τις ακινητοποιημένες πρωτεΐνες επωάζεται για 10–16 ώρες σε διάλυμα Blotto/Tween ( 5% BSA fraction V, 0.1% Tween 20 σε PBS), στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Έτσι, μπλοκάρονται όλες οι κενές θέσεις της μεμβράνης για να αποτραπεί η μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων. Ακολουθεί πλύσιμο της μεμβράνης για 1x15' και 2x5' με διάλυμα PBS–0.1% Tween 20. Στη συνέχεια προστίθεται το πρώτο αντίσωμα (ειδικό για κάθε αντιγόνο που μελετάται, σε κατάλληλη αραιώση, μέσα σε διάλυμα PBS–0.1% Tween 20). Η μεμβράνη επωάζεται με αυτό για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα πλένεται όπως προαναφέρθηκε. Ακολουθεί η προσθήκη του δεύτερου, μη ειδικού αντισώματος επίσης σε διάλυμα PBS–0.1% Tween 20 και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία



δωματίου. Η μεμβράνη πλένεται ξανά για 1x15' και 4x5' με διάλυμα PBS-0.1% Tween 20 και έπειτα προστίθεται η λουμινόλη και ενισχυτικά της αντίδρασης, για 1' σε θερμοκρασία δωματίου. Η παραγωγή χημειοφωταύγειας αποτυπώνεται σε ειδικό φιλμ (Hyperfilm-ECL, Amersham).

Στον πίνακα που ακολουθεί παρατίθενται τα ειδικά και μη ειδικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε αυτό το τμήμα της παρούσας μελέτης, καθώς και οι ακριβείς συνθήκες των υβριδισμών.

1ο ANTISΩΜΑ	2ο ANTISΩΜΑ
Anti-c-myc, rabbit polyclonal, N-262, sc764, Santa Cruz Biotechnology	Donkey anti-rabbit HRP NA9310
Anti-IGFII, goat monoclonal, F-20 sc7435, Santa Cruz Biotechnology	Bovine anti-goat HRP sc-2350
Anti- p21 WAF/CIP1 , clone 70, 610234, BD Transduction Labs	Sheep anti-mouse HRP NA9340
Anti-GAPDH mouse monoclonal MAB 374, Chemicon	Sheep anti-mouse HRP NA9340

Το σήμα της παραγόμενης χημειοφωταύγειας που έχει αποτυπωθεί σε φωτογραφικά φιλμ, στη συνέχεια σαρώνεται και, με τη βοήθεια ειδικού λειτουργικού προγράμματος (Image 1.4), ποσοτικοποιείται η ένταση του σήματος για κάθε δείγμα και για κάθε πρωτεΐνη που έχει μελετηθεί. Σαν μάρτυρας της ποσότητας και της ποιότητας του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος κάθε δείγματος, μετράται και η GAPDH πρωτεΐνη. Έτσι, οι τιμές που προσδιορίζονται στη συνέχεια για την πρωτεΐνη που εξετάζεται, διαιρούνται με την αντίστοιχη τιμή της GAPDH. Οι λόγοι που εξάγονται με αυτήν την διαδικασία αναλύονται με Student's t-test.



### 3.8 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΜΕ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ $^3\text{H}$ -ΘΥΜΙΔΙΝΗΣ

Η αρχή στην οποία βασίζεται η μέθοδος αυτή είναι το γεγονός ότι όταν τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται, συνθέτουν DNA – αφού πριν από κάθε διαίρεση, διπλασιάζουν το γενετικό τους υλικό. Κατά τη σύνθεση DNA, ενσωματώνουν θυμιδίνη από το περιβάλλον τους [190]. Έτσι, χρησιμοποιώντας  $^3\text{H}$ -θυμιδίνη, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί ο ρυθμός πολλαπλασιασμού ενός κυτταρικού πληθυσμού, μετρώντας το ποσό  $\gamma$ -ακτινοβολίας που αυτά εκλύουν με τη λύση τους.

Κύτταρα της σειράς MCF-7 ανακαλλιεργούνται σε 96-well flat plate, σε πυκνότητα  $1 \times 10^4$  κύτταρα/well. Εικοσιτέσσερις ώρες μετά η ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται επιμόλυνση των κυττάρων με τα si μόρια, όπως περιγράφεται σε προηγούμενη παράγραφο, διατηρώντας τις ίδιες τελικές συγκεντρώσεις των si μορίων και του si-PORT Lipid.

Τα κύτταρα επωάζονται με το Cont-si (αρνητικός μάρτυρας), το MYC-si (θετικός μάρτυρας), το CRD-si1 ή το CRD-si2 για 24, 48 ή 72 ώρες και στη συνέχεια επωάζονται για 6 ώρες με  $2 \mu\text{Ci/well}$   $^3\text{H}$ -θυμιδίνης (30–40 Ci/mmol, Amersham).

Ακολουθεί συλλογή των κυττάρων και λύση τους και μέτρηση του ποσού της ενσωματωμένης  $^3\text{H}$ -θυμιδίνης σε ειδικό μετρητή  $\beta$ -ραδιενέργειας (microbeta counter, Wallac, PerkinElmer Inc.). Οι μετρήσεις εκφράζονται σε κτύπους ανά λεπτό (counts per minute: cpm). Σε κάθε πείραμα αναλύθηκαν έξι wells ανά si μόριο και το όλο πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις φορές. Οι λαμβανόμενες cpm τιμές αναλύθηκαν στατιστικά με το Students t-test και θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές οι τιμές  $p < 0.05$ .





## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1 ΜΕΡΟΣ Α΄: ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ ΜΗΝΥΜΑΤΟΣ ΤΟΥ *c-myc*

#### 1.1 ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Σκοπός των πειραμάτων αυτού του τμήματος της εργασίας είναι η μελέτη των ρυθμιστικών περιοχών των άκρων του μηνύματος του *c-myc*. Συγκεκριμένα, της αλληλουχίας που βρίσκεται στο 5'-άκρο του και αναφέρεται στο εξής ως 5'-UTR και αυτής που βρίσκεται στο 3'-άκρο του και αναφέρεται ως 3'-UTR. Οι περιοχές αυτές κλωνοποιήθηκαν με γονίδιο αναφοράς αυτό της *renilla-luciferase*.

Για την κατασκευή των χιμαιρικών γονιδίων χρησιμοποιήσαμε ως φορέα-όχημα το πλασμίδιο pBIL (Clontech) και για ενδιάμεσα στάδια υποκλωνοποίησης το pRLnull (Promega). Όλα τα ανασυνδυασμένα οχήματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματά μας τελικά έφεραν το σκελετό του πρώτου.

Η επιλογή του πλασμιδίου pBIL έγινε με βάση δύο χαρακτηριστικά του. Το πρώτο ότι φέρει ρυθμιστική περιοχή (TRE:Tet responsive element), στην οποία προσδένεται η πρωτεΐνη "Tet-off", προϊόν του πλασμιδίου pTetoff (Clontech) το οποίο φέρουν στο γονιδίωμα τους οι κυτταρικές σειρές με τις οποίες πραγματοποιήθηκαν όλα τα πειράματα επιμόλυνσης στα πλαίσια αυτής της εργασίας. Η πρόσδεση αυτής της πρωτεΐνης στην προαναφερθείσα αλληλουχία παρεμποδίζει την μεταγραφή του πλασμιδίου. Υπό την επίδραση τετρακυκλίνης ή του



χημικού αναλόγου της δοξουκυκλίνης, η πρωτεΐνη αυτή αλλάζει στερεοδομή και αποδεσμεύεται από την αλληλουχία TRE, επιτρέποντας έτσι τη μεταγραφή του πλασμιδίου. Η χρησιμοποίηση λοιπόν, του περιγραφέντος συστήματος επιτρέπει την πλήρως ελεγχόμενη και κατευθυνόμενη έκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων.

Επιπλέον, το πλασμίδιο pBIL φέρει δύο υποκινητές μεταγραφής με αντίθετη φορά ανάγνωσης. Κάτω από τον έλεγχο του ενός από αυτούς είναι το γονίδιο της firefly-luciferase, η έκφραση του οποίου γίνεται ανεξάρτητα από αυτήν του χιμαιρικού κλωνοποιημένου γονιδίου μας και χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας – εσωτερική αναφορά της απόδοσης του κάθε πειράματος επιμόλυνσης που πραγματοποιήθηκε.

## 1.2 ΣΤΑΔΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ

Για τη μελέτη μας κατασκευάστηκαν τέσσερα ανασυνδυασμένα πλασμίδια όπως φαίνονται διαγραμματικά στην εικόνα 1. Τα βασικά βήματα που ακολουθήθηκαν για την κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων περιλαμβάνουν τα παρακάτω στάδια:

### 1.2.1 Κατασκευή του pBITRluc

Το πλασμίδιο pBIL πέπτεται με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRV (Gibco BRL) και Sall (Gibco BRL) (σε θέσεις που αυτές αναγνωρίζουν μέσα στο περιοχή πολλαπλής υποκλωνοποίησης Multiple Cloning Site). Ακολουθεί επώαση με φωσφατάση (Gibco BRL) για την αποφωσφορυλίωση των 2 άκρων του ευθύγραμμου DNA ώστε να παρεμποδιστεί η επανασύνδεσή τους. Τα προϊόντα των πέψεων διαχωρίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% και λαμβάνεται τμήμα DNA με μοριακό βάρος 6,1Kb το οποίο καθαρίζεται από την αγαρόζη με το QiaQuick Gel Extraction Kit (Qiagen).



Εν συνεχεία, επωάζουμε το pRLnull με την περιοριστική ενδονουκλεάση XbaI (Gibco BRL), με το ένζυμο DNA polymerase I Klenow fragment (Gibco BRL) και τέλος με την ενδονουκλεάση Sall(Gibco BRL). Με τα τρία αυτά βήματα αποκόπηκε από το πλασμίδιο αυτό το γονίδιο της renilla-luciferase φέροντας άκρα συμπληρωματικά με αυτά του τμήματος του DNA που λάβαμε από το προηγούμενο βήμα πέψεων του οχήματος pBIL. Τα προϊόντα των πέψεων διαχωρίζονται και πάλι σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% και λαμβάνεται τμήμα DNA με μοριακό βάρος 1,2Kb η οποία καθαρίζεται από την αγαρόζη με το QiaQuick Gel Extraction Kit (Qiagen).

Για την κατασκευή λοιπόν του πρώτου από τα τρία ανασυνδυασμένα πλασμίδια, του pBITRluc (Σχήμα 6), ακολουθεί αντίδραση ένωσης των δύο αυτών τμημάτων DNA παρουσία του ενζύμου DNA λιγάσης (Fermentas).

### 1.2.2 Κατασκευή του pBITMRluc

Για την κατασκευή του δεύτερου πλασμιδίου, του pBITMRluc (Σχήμα 6), χρειαζόμαστε την αλληλουχία του 5'-UTR του *c-myc*. Για τη σύνθεσή του χρησιμοποιήσαμε την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) με εκκινητές ειδικούς για την περιοχή αυτή του μηνύματος. Επιπλέον, κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών εισαγάγαμε στην αλληλουχία τους θέσεις πέψης ενδονουκλεασών για τη διευκόλυνση των περαιτέρω χειρισμών κλωνοποίησης. Συγκεκριμένα, εισαγάγαμε στο 5'-άκρο του 5'-3' εκκινητή θέση δράσης της EcoRI (Gibco BRL) και στο 3'-άκρο του 3'-5' εκκινητή θέση δράσης της PstI (Gibco BRL).

Ακολούθησε η αντίδραση του PCR με μήτρα cDNA και στο προϊόν επιδράσαμε με τις προαναφερθείσες ενδονουκλεάσες. Με τις ίδιες ενδονουκλεάσες επιδράσαμε και στο όχημα pRLnull. Τα προϊόντα των παραπάνω πέψεων αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% από όπου πήραμε δύο τμήματα DNA, το ένα μεγέθους 340bp (5'-UTR του *c-myc*) και το άλλο 3,3Kb ( το πλασμίδιο pRLnull σε γραμμική μορφή). Τα DNAs καθαρίστηκαν (QiaQuick Gel Extraction Kit) και ακολούθησε αντίδραση



σύνδεσής τους με DNA λιγάση. Το προϊόν αυτής της διαδικασίας είναι το πλασμίδιο pRLnull που φέρει κλωνοποιημένη την αλληλουχία του 5'-UTR του *c-myc* πριν ακριβώς την αλληλουχία του γονιδίου της *renilla-luciferase* (:pRLnull- 5'-UTR). Σε αυτό επιδράσαμε στη συνέχεια – κατά σειρά – με τα ένζυμα *Xba*I, DNA polymerase I Klenow fragment και *Sall*.

Το προϊόν των πέψεων ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% και ελήφθη τμήμα DNA μοριακού βάρους 1530bp το οποίο περιλαμβάνει το 5'-UTR του *c-myc* μαζί με το γονίδιο της *renilla-luciferase*. Ακολούθησε καθαρισμός (QiaQuick Gel Extraction Kit) και ένωση του με το όχημα pBIL(*Sall*-*EcoRV*) – το οποίο κατασκευάστηκε όπως έχει περιγραφεί προηγούμενα – παρουσία DNA λιγάσης. Το προϊόν της αντίδρασης αυτής είναι το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pBITMRlucM.

### 1.2.3 Κατασκευή του pBITMRlucM

Για την κατασκευή του τρίτου πλασμιδίου, του pBITMRlucM (Σχήμα 6), πρέπει να κατασκευάσουμε το 3'-UTR του *c-myc*. Για να γίνει αυτό ακολουθήθηκε διαδικασία ανάλογη με αυτήν που περιγράφηκε προηγούμενα για τη σύνθεση του 5'-UTR. Συγκεκριμένα, σχεδιάστηκαν εκκινητές ειδικοί για την αλληλουχία του 3'-UTR, με τις εξής τροποποιήσεις: στο 5'-άκρο του 5'-3' εκκινητή εισήχθη θέση δράσης της *Xba*I (Gibco BRL) και στο 3'-άκρο του 3'-5' εκκινητή θέση δράσης της *Bam*HI (Gibco BRL) και εσωτερικά αυτής, θέση δράσης της *Sma*I (Gibco BRL). Ακολούθησε η αντίδραση του PCR και στο προϊόν αυτής επιδράσαμε με τις ενδονουκλεάσες *Xba*I και *Bam*HI. Με τα ίδια ένζυμα επιδράσαμε και στο pRLnull-5'-UTR, το οποίο έχουμε ήδη κατασκευάσει σε προηγούμενα στάδια όπως προαναφέρθηκε.

Τα προϊόντα των πέψεων ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης και λαμβάνονται δύο τμήματα DNA μοριακού βάρους 540bp και 3410bp που είναι αντίστοιχα το 3'-UTR του *c-myc* και το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pRLnull-5'-UTR σε γραμμική μορφή, και τα δύο με συμπληρωματικά άκρα. Ακολούθησε καθαρισμός τους (QiaQuick Gel Extraction Kit) και ένωσή τους σε αντίδραση με DNA λιγάση. Το



προϊόν επομένως αυτής της αντίδρασης είναι ένα πλασμίδιο που περιέχει την 5'-UTR περιοχή του *c-myc* κλωνοποιημένη στο 5'-άκρο του γονιδίου της *renilla-luciferase* και στο 3'-άκρο του το 3'-UTR του *c-myc*.

Σε αυτό, στη συνέχεια επιδράσαμε με τα ένζυμα *Sall* και *SmaI* και το προϊόν της διπλής πέψης ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης από όπου απομονώθηκε και καθαρίστηκε (*QiaQuick Gel Extraction Kit*) τμήμα DNA μοριακού βάρους 2,1Kb. Το τμήμα αυτό αποτελείται από το 5'-UTR του *c-myc*, το γονίδιο της *renilla-luciferase* και το 3'-UTR του *c-myc* και έχει άκρα συμπληρωματικά με το πλασμίδιο *pBIL* που έχουμε κάνει γραμμικό από τα πρώτα στάδια των πειραμάτων μας, επιδρώντας με τα ένζυμα *Sall* και *EcoRV*.

Έτσι, προχωρήσαμε στην ένωση αυτών των δύο τμημάτων και την κατασκευή του τρίτου πλασμιδίου, του *pBITMRLucM*.

#### 1.2.4 Κατασκευή του *pBITRLucM*

Για την κατασκευή του τέταρτου πλασμιδίου (Σχήμα 6) πρέπει να απομακρυνθεί από το *pBITMRLucM* η ρυθμιστική περιοχή του 5'-UTR του *c-myc*. Για να το επιτύχουμε αυτό, επιδράσαμε στο πλασμίδιο αυτό διαδοχικά με δύο ενδονουκλεάσες, την *Nhe I* και την *Nsi I* (*Gibco BRL*), οι οποίες αναγνωρίζουν και δρούν σε μια μοναδική θέση η καθεμιά, εκατέρωθεν του 5'-UTR του *c-myc*.

Στη συνέχεια, επειδή τα άκρα του πλασμιδίου μετά την επίδραση των δύο αυτών ενδονουκλεασών δεν είναι συμπληρωματικά, επιδράσαμε με το ένζυμο DNA polymerase I Klenow fragment (*Gibco BRL*) και δημιουργήσαμε τυφλά άκρα (*blunt end*) ώστε να διευκολύνουμε την ένωσή τους.

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του προϊόντος των παραπάνω αντιδράσεων σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, από όπου απομονώθηκε και καθαρίστηκε τμήμα DNA μεγέθους 7,8Kb. Μετά τον καθαρισμό, επιδράσαμε με DNA λιγάση για την επανακυκλοποίηση του πλασμιδίου. Έτσι, κατασκευάστηκε το τέταρτο πλασμίδιο *pBITRLucM*, το οποίο περιέχει μόνο τη μια ρυθμιστική περιοχή, το 3'-UTR του *c-myc*.



### 1.3 ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ MCF-7 ΤΕΤ-OFF ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Όλα τα πειράματα παροδικής επιμόλυνσης πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στη σχετική παράγραφο του κεφαλαίου «Υλικά και Μέθοδοι».

48 ώρες μετά από κάθε επιμόλυνση τα κύτταρα συλλέγονταν και ακολουθούσε προσδιορισμός των επιπέδων ενεργότητας των δύο ενζύμων σε λουμινόμετρο, όπως περιγράφηκε.

Οι τιμές της F-Luciferase που προσδιορίστηκαν σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερική αναφορά της αποτελεσματικότητας του κάθε πειράματος επιμόλυνσης. Έτσι, για κάθε δείγμα, η μετρούμενη απόλυτη τιμή της ενεργότητας της R-Luciferase διαιρούνταν με την αντίστοιχη τιμή της F-Luciferase. Το πλασμίδιο εκείνο που δεν περιέχει καμία ρυθμιστική περιοχή (pBITRLuc) αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα. Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις φορές.

### 1.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Στο διάγραμμα 1Α παρουσιάζονται οι σχετικές τιμές που μετρήθηκαν και υπολογίστηκαν για τα τέσσερα πλασμίδια όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως % ποσοστά βάσει των τιμών που μετρήθηκαν για το πλασμίδιο pBITRLuc, το οποίο για την παρούσα φάση θεωρήθηκε ως μάρτυρας, καθώς δεν περιέχει καμιά από τις ρυθμιστικές περιοχές που μελετώνται.

Βάσει αυτής της ανάλυσης φαίνεται ότι η παρουσία του 5'-UTR του *c-myc* επιφέρει μια μικρή αύξηση των επιπέδων του γονιδίου



αναφοράς του πλασμιδίου  $\rho\text{BITMRluc}$ , της τάξης του 25% περίπου, η οποία δεν είναι στατιστικά σημαντική ( $p > 0,05$ ). Αντίθετα, η παρουσία του 3'-UTR στο πλασμίδιο  $\rho\text{BITRlucM}$  φαίνεται να προκαλεί πολύ σημαντική μείωση των επιπέδων της λουσιφεράσης, της τάξης του 90%, με στατιστική σημαντικότητα  $p < 0,001$ . Τέλος, η ταυτόχρονη παρουσία τόσο του 5'-UTR όσο και του 3'-UTR στο πλασμίδιο  $\rho\text{BITMRlucM}$ , φαίνεται να αναστρέφει μερικώς την μείωση των επιπέδων του γονιδίου αναφοράς που είδαμε στο  $\rho\text{BITRlucM}$ , επαναφέροντας τις τιμές στο 50% περίπου των τιμών του πλασμιδίου-μάρτυρα.

Με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι το 3'-UTR του *c-myc* είναι μια από τις περιοχές του μηνύματος που ενέχονται στη ρύθμιση του χρόνου ημιζωής του, μειώνοντας τη σταθερότητά του, θεωρήθηκε ότι η ανάλυση των αποτελεσμάτων θα ήταν πιο αντιπροσωπευτική εάν διαχωρίζαμε τα πλασμίδια σε δύο κατηγορίες βάσει της παρουσίας ή όχι αυτής της ρυθμιστικής περιοχής. Έτσι, προχωρήσαμε σε ανάλυση των τιμών μας ανά ζεύγη, τα οποία διέφεραν μόνο όσον αφορά στην παρουσία του 5'-UTR. Έτσι, στη μια κατηγορία συγκρίνουμε τα πλασμίδια  $\rho\text{BITRluc}$  και  $\rho\text{BITMRluc}$  και στην άλλη τα  $\rho\text{BITRlucM}$  και  $\rho\text{BITMRlucM}$ .

Με αυτήν τη ανάλυση όπως φαίνεται στο διάγραμμα 1B, διαπιστώθηκε ότι η ταυτόχρονη παρουσία του 5'-UTR και του 3'-UTR αυξάνει τα επίπεδα της λουσιφεράσης κατά 8 φορές σε σχέση με το πλασμίδιο που φέρει μόνο το 3'-UTR, αύξηση με στατιστική σημαντικότητα  $p = 0,002$ .

Αυτά τα πρώτα αποτελέσματα υποδεικνύουν μια συνεργιστική δράση μεταξύ των δύο κλωνοποιημένων UTRs που επιφέρει σημαντική αύξηση των ολικών επιπέδων του γονιδίου αναφοράς, τα οποία είχαν σχεδόν μηδενιστεί από την παρουσία του 3'-UTR μόνο.

Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι το 5'-UTR του *c-myc* εμπεριέχει αλληλουχίες οι οποίες εμπλέκονται σε έναν εναλλακτικό μηχανισμό έναρξης της μετάφρασης που ενεργοποιείται / λειτουργεί σε συνθήκες όπου η κλασική οδός του μηχανισμού της καλύπτρας είναι απενεργοποιημένη. Καθώς στο σύστημά μας δεν είχαμε τη δυνατότητα να διαχωρίσουμε τότε λειτουργεί ο κάθε μηχανισμός - αφού δεν



μπορούσαμε να αποκλείσουμε τη μετάφραση μέσω καλύπτρας – χρησιμοποιήσαμε χημικές ουσίες που είναι γνωστό ότι διακόπτουν τη μετάφραση που εξαρτάται από την καλύπτρα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν η σταυροσπορίνη – ουσία που προκαλεί τη διάσπαση του παράγοντα έναρξης eIF4G, απαραίτητου για τη δημιουργία του συμπλόκου έναρξης – και τη μιτομικίνη, η οποία ενσωματώνεται στη διπλή έλικα του DNA και προκαλεί βλάβες που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο [142, 191].

Έτσι, παρουσία σταυροσπορίνης, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 2, η ύπαρξη του 5'-UTR του *c-myc* στο pBITMRluc αυξάνει τα επίπεδα της λουσιφεράσης κατά περίπου 25% σε σχέση με τον αντίστοιχο μάρτυρα pBITRluc, αύξηση που δεν παρουσιάζει στατιστική σημαντικότητα. Αντίθετα, η ταυτόχρονη παρουσία και των δύο ρυθμιστικών περιοχών του *c-myc* στο pBITMRlucM αυξάνει κατά 8 φορές τα επίπεδα του γονιδίου αναφοράς σε σχέση με το μάρτυρα pBITRlucM ( $p < 0,001$ ).

Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα που έγιναν παρουσία μιτομικίνης, όπου και πάλι η ταυτόχρονη παρουσία των δύο ρυθμιστικών περιοχών του *c-myc* στο pBITMRlucM αύξησε κατά 9 φορές τα επίπεδα της λουσιφεράσης σε σχέση με το pBITRlucM, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3 ( $p < 0,001$ ).

Τέλος, μελετήθηκαν τα επίπεδα λουσιφεράσης παρουσία κορδουσεπίνης, ουσία που είναι βιβλιογραφικά γνωστό ότι παρεμποδίζει την προσθήκη της poly(A) ουράς στα συντιθέμενα μηνύματα με αποτέλεσμα να μειώνει τη σταθερότητά τους. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 4, στις συγκεκριμένες συνθήκες τα ολικά επίπεδα του pBITMRluc είναι χαμηλότερα σε σχέση με το μάρτυρα pBITRluc κατά περίπου 35%. Αντίθετα, φαίνεται ότι η ταυτόχρονη παρουσία του 5'-UTR και του 3'-UTR του *c-myc* στο pBITMRlucM επιφέρουν αύξηση στα επίπεδα του γονιδίου αναφοράς κατά 7.5 φορές σε σχέση με το pBITRlucM που φέρει μόνο το 3'-UTR ( $p = 0,002$ ).

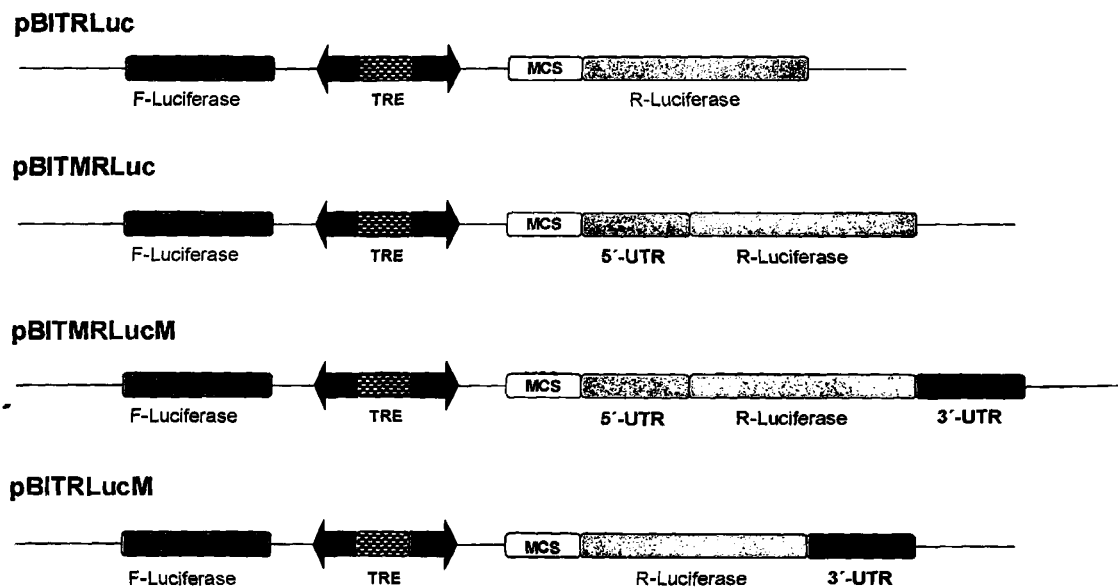
Συνοψίζοντας τα αποτελέσματά των παραπάνω πειραμάτων, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι η παρουσία του 5'-UTR επιφέρει μικρές αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς σε όλες τις συνθήκες που μελετήθηκαν. Η παρουσία του 3'-UTR μειώνει δραματικά





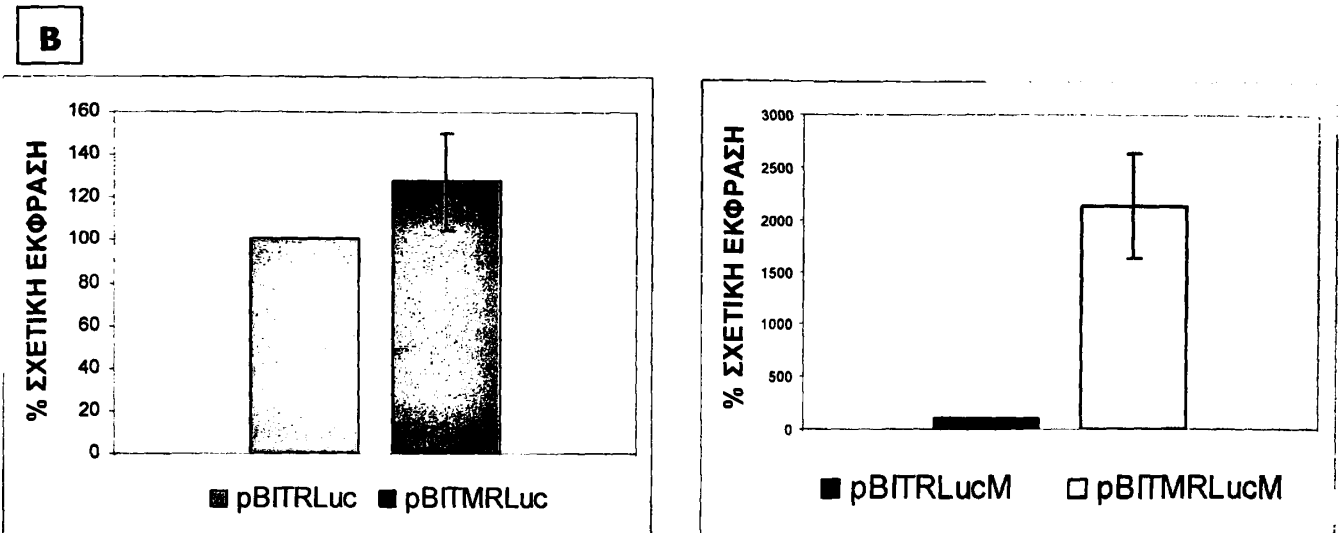
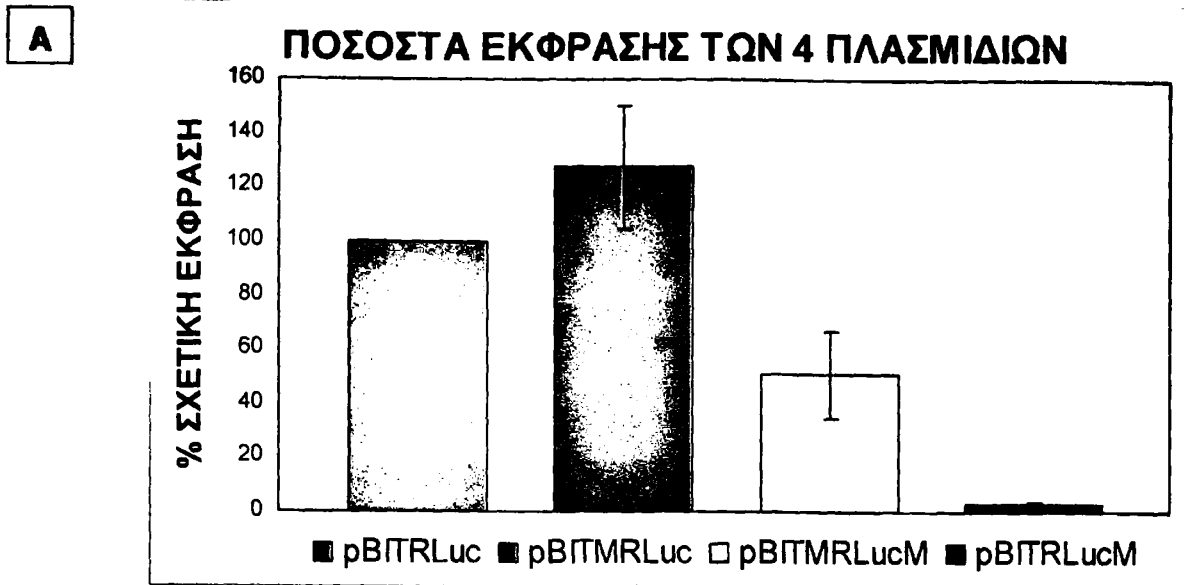
τα επίπεδα έκφρασης. Η συνύπαρξη όμως και των δύο ρυθμιστικών περιοχών επιφέρει σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης, γεγονός που υποδηλώνει μια συνεργασία μεταξύ των δύο αυτών περιοχών για τη ρύθμιση της μεταφρασιμότητάς του.

Εικόνα 14



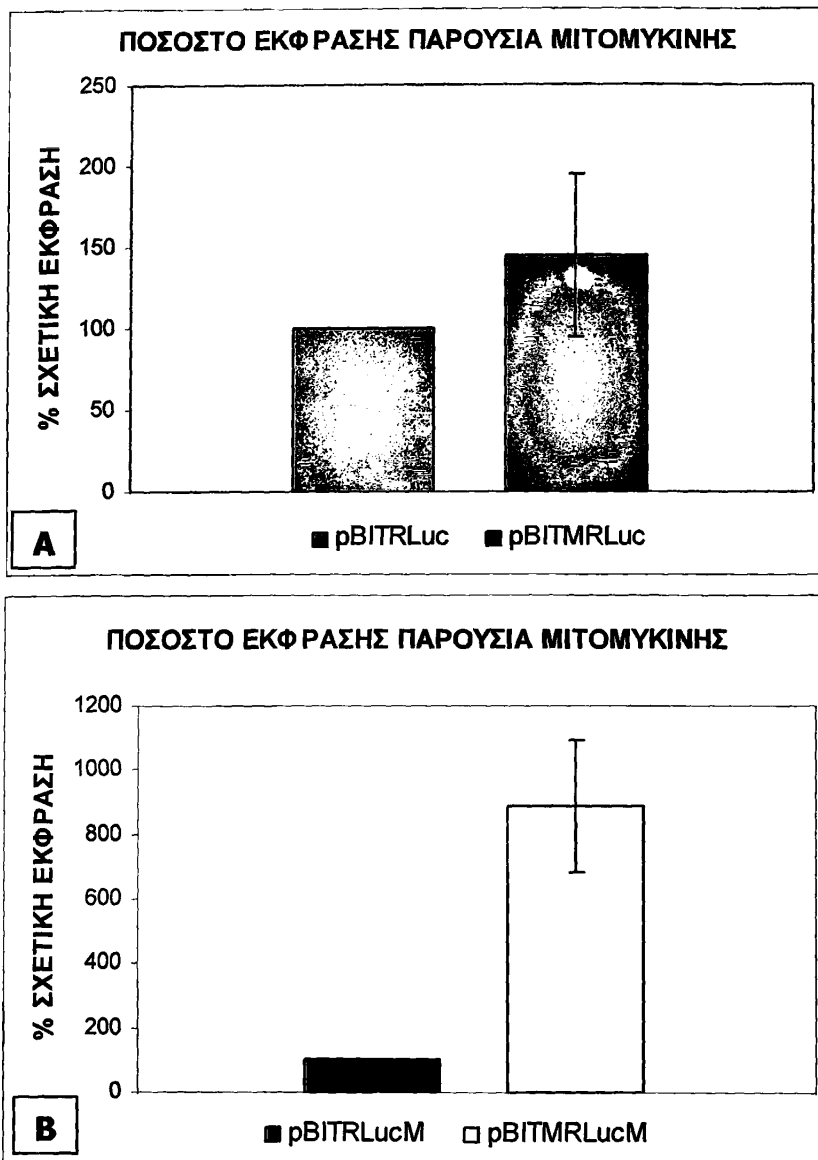
Σχηματική αναπαράσταση της δομής των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που κατασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των ρυθμιστικών περιοχών του μηνύματος του *c-myc*

Διάγραμμα 1



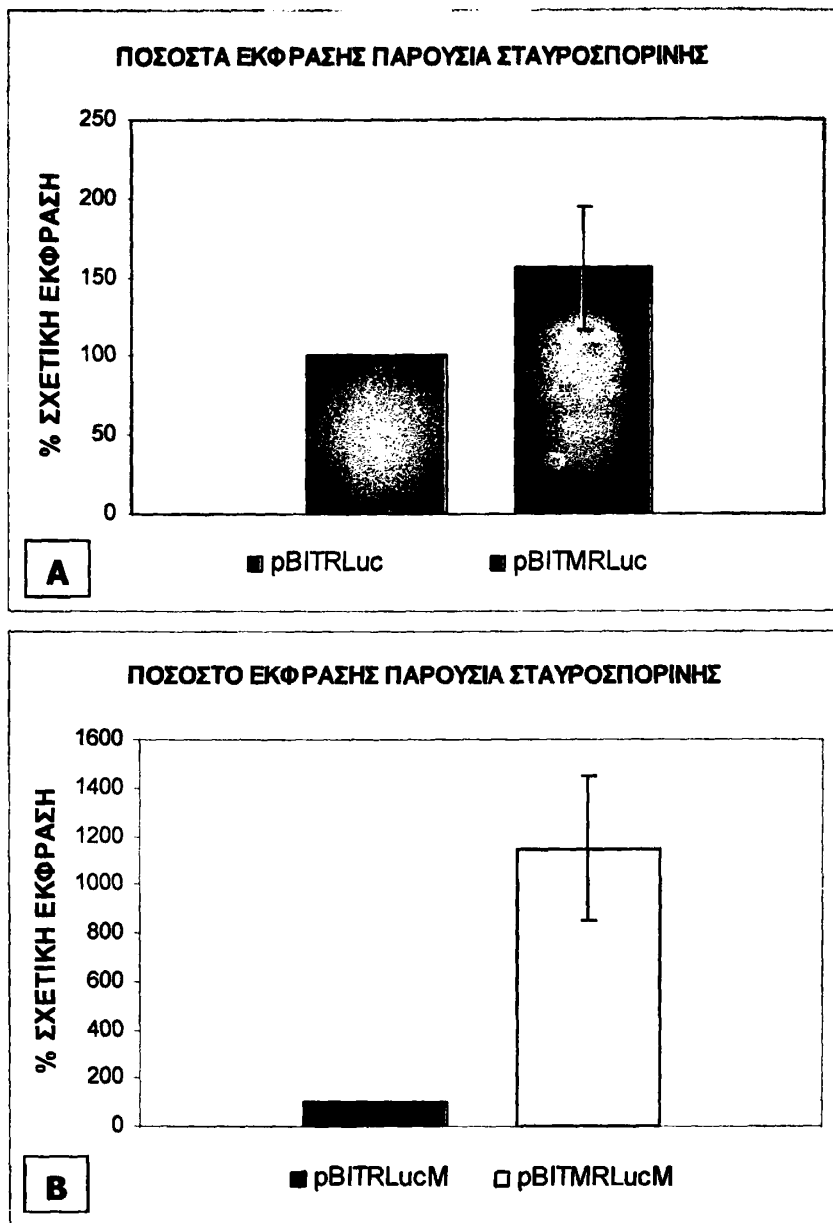
Η παρουσία του 5'-UTR του *c-myc* φαίνεται να επιφέρει μια μικρή αύξηση των επιπέδων του γονιδίου αναφοράς του πλασμιδίου pBITMRLuc, της τάξης του 25% περίπου, η οποία δεν είναι στατιστικά σημαντική ( $p > 0,05$ ). Αντίθετα, η παρουσία του 3'-UTR στο πλασμιδίο pBITRLucM φαίνεται να προκαλεί πολύ σημαντική μείωση των επιπέδων της λουσιφεράσης, της τάξης του 90%, με στατιστική σημαντικότητα  $p < 0,001$ . Τέλος, η ταυτόχρονη παρουσία τόσο του 5'-UTR όσο και του 3'-UTR στο πλασμιδίο pBITMRLucM, φαίνεται να αναστρέφει μερικώς την μείωση των επιπέδων του γονιδίου αναφοράς που είδαμε στο pBITRLucM, επαναφέροντας τις τιμές στο 50% περίπου των τιμών του πλασμιδίου - μάρτυρα ( $p < 0,05$ , επάνω διάγραμμα). Όπως φαίνεται στα κάτω διαγράμματα, η ταυτόχρονη παρουσία του 5'-UTR και του 3'-UTR αυξάνει τα επίπεδα της λουσιφεράσης κατά 8 φορές σε σχέση με το πλασμιδίο που φέρει μόνο το 3'-UTR, αύξηση με στατιστική σημαντικότητα  $p = 0,002$ .

Διάγραμμα 2



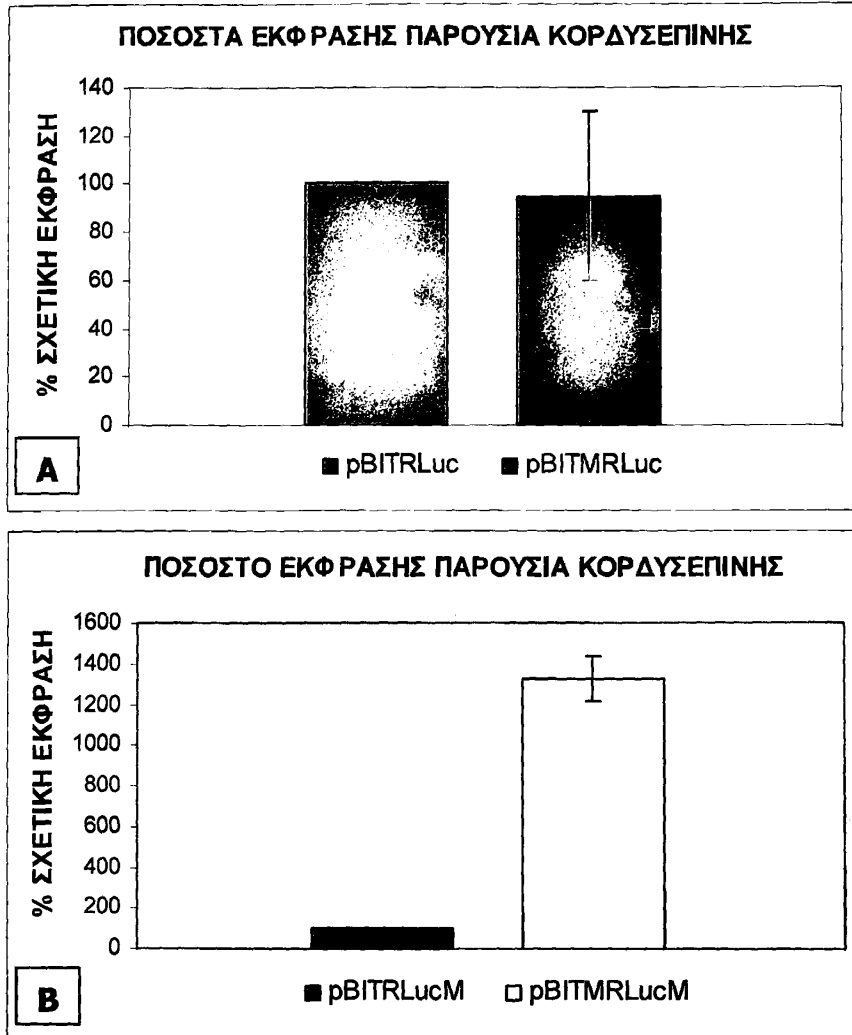
Παρουσία μιτομυκίνης (παράγοντα που επάγει την απόπτωση), το 5'-UTR του *c-myc* φαίνεται να επιφέρει μια μικρή αύξηση των επιπέδων του γονιδίου αναφοράς του πλασμιδίου pBITMRLuc, της τάξης του 30% περίπου, η οποία δεν είναι στατιστικά σημαντική ( $p > 0,05$ , επάνω διάγραμμα). Αντίθετα, η ταυτόχρονη παρουσία των δύο ρυθμιστικών περιοχών του *c-myc* στο pBITMRLucM αύξησε κατά 9 φορές τα επίπεδα της λουσιφεράσης σε σχέση με το pBITRLucM ( $p < 0,001$ , κάτω διάγραμμα).

## Διάγραμμα 3



Παρουσία σταυροσπορίνης (παράγοντα που επάγει τα κύτταρα σε απόπτωση), η ύπαρξη του 5'-UTR του *c-myc* στο pBITMRLuc (επάνω διάγραμμα) αυξάνει τα επίπεδα της λουσιφεράσης κατά περίπου 25% σε σχέση με τον αντίστοιχο μάρτυρα pBITRLuc, αύξηση που δεν παρουσιάζει στατιστική σημαντικότητα. Αντίθετα, η ταυτόχρονη παρουσία και των δύο ρυθμιστικών περιοχών του *c-myc* στο pBITMRLucM αυξάνει κατά 8 φορές τα επίπεδα του γονιδίου αναφοράς σε σχέση με το μάρτυρα pBITRLucM ( $p < 0,001$ , κάτω διάγραμμα).

Διάγραμμα 4



Παρουσία κορδυσεπίνης (ουσία που είναι γνωστό ότι παρεμποδίζει την προσθήκη της poly(A) ουράς στα συντιθέμενα μηνύματα με αποτέλεσμα να μειώνει τη σταθερότητά τους), τα ολικά επίπεδα του pBITMRLuc είναι χαμηλότερα σε σχέση με το μάρτυρα pBITRLuc κατά περίπου 30%, διαφορά όμως που δεν είναι στατιστικά σημαντική (επάνω διάγραμμα). Αντίθετα, φαίνεται ότι η ταυτόχρονη παρουσία του 5'-UTR και του 3'-UTR του *c-myc* στο pBITMRLucM επιφέρουν αύξηση στα επίπεδα του γονιδίου αναφοράς κατά 7.5 φορές σε σχέση με το pBITRLucM που φέρει μόνο το 3'-UTR ( $p=0,002$ , κάτω διάγραμμα).

## 2 ΜΕΡΟΣ Β΄ : ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΠΟΡΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ *c-myc* ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

### 2.1 ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Σκοπός της μελέτης που περιγράφεται σε αυτήν την ενότητα ήταν η διερεύνηση των μηχανισμών που ενέχονται στην απορύθμιση του ογκογονιδίου *c-myc* σε πρωτοπαθή καρκινώματα του μαστού. Για το λόγο αυτό, εξετάσαμε μια σειρά δειγμάτων που προέρχονται από βιοψίες καρκίνου του μαστού : (1) Για την παρουσία γενετικών ανωμαλιών στον γενετικό τόπο- 8q24- που περιλαμβάνει το *c-myc* γονίδιο (στα πλαίσια ευρύτερης διερεύνησης με την μεθοδολογία του CGH, ποσοτικών αλλαγών στο γενετικό υλικό των συγκεκριμένων όγκων) και (2) διερευνήσαμε στους όγκους αυτούς την έκφραση του CRD-BP/IMP1 γονιδίου το οποίο προτείνεται ότι ενέχεται όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή, στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση του *c-myc*. Στη συνέχεια, συσχετίστηκαν τα δεδομένα που προέκυψαν με κλινικοπαθολογικά και βιολογικά στοιχεία των όγκων σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί πιθανή συσχέτιση τους με χαρακτηριστικά του καρκινικού φαινοτύπου.

Να σημειωθεί ότι για τα κλινικοπαθολογικά δεδομένα των πρωτογενών όγκων χρησιμοποιήθηκε κατάταξη κατά WHO [17] ενώ για τα γενετικά ευρήματα η ανάλυση κατά ISCN [189].

### 2.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται συνοπτικά κάποια βασικά στοιχεία και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των 116 όγκων που εξετάστηκαν στα πλαίσια αυτού του τμήματος της εργασίας.



Η ηλικία των ασθενών κυμαίνεται από 31–95 ετών και το μέγεθος του όγκου από 5mm έως 9cm. Από αυτούς, 7 όγκοι ήταν grade I (ποσοστό 8,75%), 28 όγκοι ήταν grade II (ποσοστό 35%), 45 όγκοι ήταν grade III (ποσοστό 56,25%), ενώ για τους 36 δεν υπάρχουν στοιχεία. Η ύπαρξη μετάστασης στους επιχώριους λεμφαδένες διαπιστώθηκε σε 46 από αυτούς τους όγκους (ποσοστό 40,4%), ενώ η διήθηση σε άλλους ιστούς σε 61 όγκους, ποσοστό 59,2%.

Το 48,5% των όγκων αυτών βρέθηκε θετικό για υποδοχείς οιστρογόνων ενώ το 36,4% θετικό για υποδοχείς προγεστερόνης. Η παρουσία υποδοχέων προσδιορίστηκε ανοσοϊστοχημικά κατά την φάση της παθολογο–ανατομικής αξιολόγησης του υλικού. Σημειώνεται ότι θετικός ως προς τους υποδοχείς χαρακτηρίστηκε κάθε όγκος με παρουσία υποδοχέων > 10%.

Τέλος, η πλειονότητα των όγκων ανήκε στις ιστολογικές κατηγορίες: 1) πορώδη διηθητικά μη ειδικού τύπου (40%) 2) φαγεσωρικά (17%) και 3) λοβιακά (7%), ενώ η συχνότητα των υπόλοιπων τύπων ήταν εξαιρετικά χαμηλή και κυμαίνεται από 4,1% (μικτά πορογενή–λοβιακά) έως και 0,7% (μυελογενή).

### **2.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CRD–BP/IMP1 ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ**

Εξετάστηκαν συνολικά 116 όγκοι μαστού και 69 από αυτούς βρέθηκαν να εκφράζουν CRD–BP/IMP1 (ποσοστό 58,5%). Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα ποσοστά των θετικών για έκφραση CRD–BP/IMP1 σε σχέση με τα διάφορα κλινικοπαθολογικά στοιχεία των όγκων.

Όπως φαίνεται και στον πίνακα, υπήρχαν διαφορές στην ανίχνευση της έκφρασης του CRD–BP/IMP1 μεταξύ των τριών κατηγοριών στις οποίες χωρίστηκαν οι όγκοι με βάση την ηλικία του ασθενούς. Στη πρώτη και τρίτη κατηγορία (ασθενείς <50 ετών και >65) τα ποσοστά έκφρασης ήταν ίδια σχεδόν, με το 50% των δειγμάτων να είναι



θετικά). Αντίθετα, στη δεύτερη κατηγορία (ηλικία 50–65 ετών), το 75% των δειγμάτων είναι θετικά για το γονίδιο αυτό, χωρίς όμως η διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική.

Διαφορές παρατηρήθηκαν και σε σχέση με το μέγεθος του όγκου. Έτσι, ανάμεσα στους όγκους που είχαν μέγεθος μικρότερο των 20mm το 57,6% ήταν θετικοί για CRD–BP/IMP1 ενώ το ποσοστό αυξήθηκε στο 63,1% στους όγκους με μέγεθος μεγαλύτερο των 20mm. Ούτε αυτή η διαφορά όμως ήταν στατιστικά σημαντική.

Ανάλογες ήταν και οι παρατηρήσεις σχετικά με την ανίχνευση διηθημένων λεμφαδένων. Έτσι, μεταξύ των όγκων όπου υπήρχαν διηθημένοι λεμφαδένες, το 65% εξέφραζαν CRD–BP/IMP1, ενώ μεταξύ αυτών που δεν είχαν διηθημένους λεμφαδένες το ποσοστό μειωνόταν στο 51%, χωρίς όμως να είναι και αυτό στατιστικά σημαντικό.

Διαπιστώθηκε επίσης, ότι το 58,5% των όγκων που δεν εξέφραζαν CRD–BP/IMP1 παρουσίαζε διήθηση σε άλλο ιστό, ενώ το ποσοστό αυτό ήταν 60,65% στους θετικούς για CRD–BP/IMP1 όγκους, διαφορά πολύ μικρή που όπως ήταν αναμενόμενο δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $p=0,83$ ).

Επίσης, καμιά στατιστική συσχέτιση δεν διαπιστώθηκε σε σχέση με τον ιστολογικό τύπο του όγκου ή τις τρεις παραμέτρους που καθορίζουν το score του όγκου, δηλ το μιτωτικό δείκτη ( $p=0,18$ ), τον πυρηνικό πλειομορφισμό ( $p=0,11$ ) και το σχηματισμό μικροσωληνίσκων ( $p=0,39$ ).

Για να μελετήσουμε την έκφραση της CRD–BP/IMP1 ανάμεσα στις τρεις κατηγορίες στις οποίες διαχωρίστηκαν οι όγκοι βάσει του βαθμού κακοήθειας τους, εξετάστηκαν μαζί οι όγκοι grade I και grade II, οι οποίοι θεωρούνται καλής και μεσαίας διαφοροποίησης, έναντι των όγκων grade III, που θεωρούνται χαμηλής διαφοροποίησης. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι το 60% των όγκων που ήταν grade I ή II εξέφραζε το γονίδιο αυτό, ενώ στην κατηγορία των grade III ήταν το 69%. Οι διαφορές αυτές παρουσίασαν οριακή στατιστική σημαντικότητα ( $p=0,054$ ).





### 2.3.1 Συσχέτιση της έκφρασης του CRD–BP/IMP1 με βιολογικές παραμέτρους χαρακτηριστικές για τον καρκίνο του μαστού

Στη συνέχεια της μελέτης μας διερευνήθηκε η σχέση της έκφρασης του CRD–BP/IMP1 και της παρουσίας υποδοχέων ορμονών που αποτελούν ένα από τους καθιερωμένους δείκτες πρόγνωσης για τον καρκίνο του μαστού. Διαπιστώθηκε μια πολύ σημαντική αρνητική στατιστική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του CRD–BP/IMP1 και της παρουσίας υποδοχέων οιστρογόνων. Συγκεκριμένα, το 76,5% των όγκων που κρίθηκαν αρνητικοί για τους υποδοχείς οιστρογόνων εξέφραζαν το γονίδιο ενώ το ποσοστό αυτό μειώθηκε στο 40,6% στους θετικούς για υποδοχείς όγκους ( $p=0,003$ ). Αντιθέτως, καμία συσχέτιση δεν διαπιστώθηκε μεταξύ της έκφρασης του CRD–BP/IMP1 και της παρουσίας στους όγκους υποδοχέων προγεστερόνης (πίνακας 3).

Έπειτα, διερευνήσαμε την πιθανή σχέση της ανίχνευσης της έκφρασης του CRD–BP/IMP1 με τα πρωτεϊνικά επίπεδα του PCNA και του c–erbB2, καθώς το πρώτο είναι ένας δείκτης πολλαπλασιασμού και το δεύτερο αποτελεί δείκτη πρόγνωσης και στόχο θεραπείας για τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 3, όπου αναγράφονται οι μέγιστες και οι ελάχιστες τιμές των πρωτεϊνικών επιπέδων του PCNA και του c–erbB2, όπως μετρήθηκαν στους όγκους που διαχωρίζονται σε θετικούς και αρνητικούς για CRD–BP/IMP1, καθώς και οι μέσες τιμές τους. Σημειώνεται ότι οι μετρήσεις των δύο αυτών πρωτεϊνών εκφράζονται σε μονάδες OD/mg  $10^{-1}$  πρωτεΐνης και κυμαίνονται από 0,00 έως 12,20 για το πρώτο και από 0,20 έως 13,70 για το δεύτερο.

Όπως διαπιστώθηκε, η μέση τιμή τόσο για τη μια παράμετρο όσο και για την άλλη, δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους θετικούς και αρνητικούς για CRD–BP/IMP1 όγκους.



### 2.3.2 Συσχέτιση των γενετικών ανωμαλιών των πρωτογενών όγκων με την έκφραση του CRD-BP/IMP1

Σε 60 από τους όγκους έγινε μελέτη των γενετικών ανωμαλιών με την τεχνική του συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού (CGH). Το σύνολο των γενετικών ανακατατάξεων που ανιχνεύτηκαν σε κάθε όγκο αναγράφονται στον πίνακα 4.

Από την ανάλυση αυτή διαπιστώθηκε ότι 29 από τους 60 όγκους (ποσοστό 48,3%) έφεραν επέκταση της ζώνης 8q24, όπου και εντοπίζεται η γονιδιακή θέση του *c-myc*, και 11 όγκοι (ποσοστό 18,3%) έφεραν επέκταση της ζώνης 17q21.3-q22 όπου εντοπίζεται η γονιδιακή θέση του CRD-BP/IMP1.

## 2.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΠΕΚΤΑΣΗΣ ΤΟΥ 8q24 ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ

Όπως διακρίνεται στον πίνακα 5, η παρουσία επέκτασης στη θέση 8q24 δεν παρουσίασε καμιά στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ηλικία του ασθενούς, τον ιστολογικό τύπο και το μέγεθος του όγκου.

Επίσης, τα ποσοστά των όγκων που έφεραν την γονιδιακή επέκταση και είχαν διηθημένους λεμφαδένες ή όχι ήταν 45% και 55% αντίστοιχα, χωρίς η διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική.

Εξάλλου, το ποσοστό των όγκων που έφεραν ή όχι την επέκταση και παρουσίαζαν διήθηση άλλων ιστών παρουσίασε μικρές διαφορές (44,4% και 55,6% αντίστοιχα) χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα.

Συγκρίνοντας τους όγκους καλής και μεσαίας διαφοροποίησης (grade I και II) με τους χαμηλής διαφοροποίησης (grade III), διαπιστώθηκε ότι το 76% των όγκων της πρώτης κατηγορίας δεν είχαν γονιδιακή επέκταση στη θέση 8q24 ενώ το 75% της δεύτερης κατηγορίας είχαν την επέκταση. Με άλλα λόγια, η παρουσία της γονιδιακής επέκτασης στη θέση 8q24 συσχετίζεται με χαμηλή διαφοροποίηση ( $p=0,001$ ).

Στατιστικά σημαντική ( $p=0,004$ ) ήταν και η συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας των επιμέρους ιστολογικών παραμέτρων που



χρησιμοποιούνται για τον ιστολογικό χαρακτηρισμό ενός όγκου, οι οποίες είναι ο μιτωτικός δείκτης (1–3), ο σχηματισμός σωληνίσκων (1–3) και ο πυρηνικός πλειομορφισμός (1–3). Για κάθε μια από αυτές τις παραμέτρους, ομαδοποιήσαμε τους όγκους με τιμές 1 ή 2 σε μια κατηγορία και στη συνέχεια τους αντιπαραβάλαμε με τους όγκους που είχαν τιμές 3 και συσχέτισαμε με την ύπαρξη γονιδιακής επέκτασης στη θέση 8q24. Διαπιστώθηκε ότι το 81% των όγκων που έφερε την επέκταση είχε υψηλό μιτωτικό δείκτη ( $p=0,038$ ). Τέτοιες στατιστικά σημαντικές διαφορές δεν παρατηρήθηκαν για τις άλλες δύο παραμέτρους.

#### 2.4.1 Συσχέτιση της επέκτασης του 8q24 με βιολογικές παραμέτρους

Στη συνέχεια της μελέτης μας εξετάσαμε τις πιθανές συσχετίσεις της παρουσίας επέκτασης στη θέση 8q24 και βασικών βιολογικών δεικτών, όπως φαίνονται στον πίνακα 6. Έτσι διαπιστώσαμε ότι ανάμεσα στους όγκους που ήταν αρνητικοί για υποδοχείς οιστρογόνων, το 63,2% έφερε τη γονιδιακή επέκταση ενώ μόνο το 44% όσων είχαν υποδοχείς έφεραν τη επέκταση. Ανάλογα ήταν τα ποσοστά και για τους υποδοχείς προγεστερόνης (56% και 47,4% αντίστοιχα), χωρίς όμως αυτές οι διαφορές να είναι στατιστικά σημαντικές (πίνακας 6).

Με βάση τα δεδομένα του CGH υπολογίστηκε για κάθε όγκο ο συνολικός αριθμός των γενετικών ενισχύσεων ή επεκτάσεων και των απωλειών που εντοπίστηκαν, προσδιορίστηκε δηλαδή η γενετική πολυπλοκότητα κάθε όγκου. Διαπιστώθηκε ότι η μέση τιμή γενετικής πολυπλοκότητας στους όγκους που δεν έφεραν επέκταση της θέσης 8q24 ήταν  $4,52 \pm 4,6$  ενώ σε αυτούς που έφεραν την επέκταση ήταν  $12,50 \pm 9,99$ . Οι διαφορές αυτές δείχνουν πολύ σημαντική συσχέτιση ( $p=0,002$ ) μεταξύ της παρουσίας γονιδιακής επέκτασης στη θέση 8q24 και των αυξημένων γενετικών ανακατατάξεων.

Επιπρόσθετα στους 60 όγκους που αναλύθηκαν με CGH προσδιορίστηκαν και τα επίπεδα έκφρασης του *c-myc* mRNA όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι». Διαπιστώθηκε έτσι, ότι



υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του μηνύματος και της παρουσίας της επέκτασης 8q24 ( $p=0,022$ ).

Στον πίνακα 6 επιπλέον, παρατίθενται οι μέσες τιμές όπως μετρήθηκαν για c-erbB2 και το PCNA στις δυο κατηγορίες των όγκων, βάσει της παρουσίας ή όχι γονιδιακής επέκτασης στη θέση 8q24. Έτσι, οι μέση τιμή του c-erbB2 υπολογίστηκε σε  $5,75\pm 3,13$  στους όγκους που έφεραν την επέκταση 8q24 και  $5,52\pm 2,79$  σε αυτούς που δεν την έφεραν. Η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Οι αντίστοιχες τιμές του PCNA είναι  $4,66\pm 2,75$  στην πρώτη κατηγορία και  $2,91\pm 1,89$  στη δεύτερη και δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

## 2.5 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΕΠΕΚΤΑΣΗΣ 17q21.3–q22 ΜΕ ΆΛΛΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ

Όπως προαναφέρθηκε, 11 από τους όγκους έφεραν επέκταση που περιελάμβανε τη γονιδιακή θέση του CRD–BP/IMP1. Το χαρακτηριστικό αυτό όμως δεν παρουσίασε καμιά συσχέτιση με άλλες παραμέτρους. Μάλιστα, 3 από τους όγκους που έφεραν την επέκταση αυτή δεν εξέφραζαν το γονίδιο.

## 2.6 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ

Συγκρίναμε τα επίπεδα του μηνύματος του c-myc διαχωρίζοντας τους όγκους βάσει της έκφρασης ή όχι του CRD–BP/IMP1. Στους θετικούς όγκους η μέση τιμή ήταν  $1,11\pm 0,55$  ενώ στους αρνητικούς ήταν  $1,45\pm 1,4$  χωρίς όμως αυτή η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική.

Αντίθετα, συγκρίνοντας τις τιμές του μηνύματος του c-myc και τα πρωτεϊνικά επίπεδα του PCNA διαπιστώσαμε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ τους ( $p=0,001$ ).



Καμία άλλη συσχέτιση δεν έδωσε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

## 2.7 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΤΟΥΣ

Για να μελετήσουμε την πιθανή επίδραση της ταυτόχρονης έκφρασης του CRD-BP και της παρουσίας επέκτασης στη θέση 8q24, κατατάξαμε τους όγκους σε 4 κατηγορίες με βάση αυτά τα δύο χαρακτηριστικά. Έτσι, διακρίνουμε:

- κατηγορία 1: όγκοι που δεν εκφράζουν CRD-BP ούτε φέρουν επέκταση της θέσης 8q24.
- κατηγορία 2: όγκοι που εκφράζουν CRD-BP χωρίς να φέρουν την επέκταση.
- κατηγορία 3: όγκοι που φέρουν επέκταση της θέσης 8q24 χωρίς να εκφράζουν το γονίδιο του CRD-BP.
- κατηγορία 4: όγκοι που έχουν και τα δύο χαρακτηριστικά.

### 2.7.1 Συσχέτιση των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών στις τέσσερις κατηγορίες των όγκων

Στον πίνακα 7 φαίνεται η κατανομή των όγκων των 4 κατηγοριών με βάση τα διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους.

Πολύ σημαντική συσχέτιση παρουσιάστηκε μεταξύ της κατάταξης ενός όγκου σε μια από τις κατηγορίες και της μέσης ηλικίας του ασθενούς. Με άλλα λόγια, όσο προχωράμε από τη κατηγορία 1 προς την 4 παρουσιάζεται μείωση του μέσου όρου της ηλικίας των ασθενών, από 61,55 έτη στην κατηγορία 1 στα 58,21 έτη στην κατηγορία 4 ( $p=0,004$ ).

Αντίθετα, δεν διαπιστώθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της κατάταξης ενός όγκου σε μια από τις τέσσερις κατηγορίες και



το μέγεθός του ή την παρουσία διήθησης σε παρακείμενους λεμφαδένες ή σε άλλους ιστούς.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η σχέση των τιμών των παραμέτρων του βαθμού κακοήθειας μέσα στις 4 κατηγορίες των όγκων. Διαπιστώθηκε, όπως φαίνεται και από τον πίνακα 7, ότι το ποσοστό των όγκων που είχε υψηλές τιμές για το σχηματισμό σωληνίσκων και για τον πυρηνικό πλειομορφισμό, δε διέφερε σημαντικά μέσα στις 4 κατηγορίες. Αντίθετα, το ποσοστό των όγκων με υψηλό μιτωτικό δείκτη αυξάνεται όσο προχωράμε από 11,1%, στην κατηγορία 1, σε 53,3% στην 4, διαφορά στατιστικά σημαντική ( $p=0,008$ ). Ανάλογες είναι οι παρατηρήσεις για τους βαθμούς του score, αφού η πλειονότητα των όγκων της κατηγορίας 4 έχει το μέγιστο βαθμό ( $=9, p=0,001$ ).

Τέλος, συγκρίναμε τα ποσοστά των όγκων που έχουν χαρακτηριστεί χαμηλής διαφοροποίησης (grade III) στις τέσσερις κατηγορίες, σε αντιπαράβολή με τους όγκους grade I και II μαζί. Διαπιστώσαμε ότι τα ποσοστά των όγκων grade III αυξάνονται σημαντικά όσο προχωράμε από την κατηγορία 1 (όπου το ποσοστό είναι 10%) στην κατηγορία 4 (όπου το ποσοστό είναι 66,7%). Η διαφορά αυτή παρουσιάζει εξαιρετικά υψηλή στατιστική σημαντικότητα  $p=0,001$ .

### **2.7.2 Μελέτη της επίδρασης της ταυτόχρονης παρουσίας της έκφρασης του CRD-BP/IMP1 και της επέκτασης στη θέση 8q24 στον βαθμό κακοήθειας ενός όγκου**

Χρησιμοποιώντας τη στατιστική ανάλυση παλινδρόμησης για την πρόβλεψη πιθανοτήτων (best exact logistic regression model, SPSS), μελετήσαμε τη συμπεριφορά των όγκων των τεσσάρων κατηγοριών σε σχέση με την κατάταξή τους στις τρεις κατηγορίες του grade. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι οι πιθανότητες ενός όγκου να είναι χαμηλής διαφοροποίησης (grade III έναντι grade I και II) τείνουν να αυξάνονται όσο προχωράμε από την πρώτη κατηγορία στις επόμενες ( $p=0,002$ ) (Σχήμα 7). Όπως φαίνεται στον πίνακα 8, οι πιθανότητες ενός όγκου της κατηγορίας 4 να είναι grade III είναι 19,6 φορές μεγαλύτερες από αυτές



ενός όγκου της κατηγορίας 1. Ανάλογα, οι πιθανότητες για τους όγκους των κατηγοριών 3 και 2 ήταν αντίστοιχα 6,4 και 3,0 φορές μεγαλύτερες των πιθανοτήτων των όγκων της πρώτης κατηγορίας.

Με τη βοήθεια του ελέγχου του  $\chi^2$  αυτού του μοντέλου διαπιστώθηκε η γραμμικότητα της σχέσης αυτής. Αυτό σημαίνει ότι καθώς προχωράμε διαδοχικά μεταξύ των κατηγοριών, παρατηρείται μια σταθερή, γραμμική αύξηση των πιθανοτήτων ενός όγκου να παρουσιάζει υψηλό βαθμό κακοήθειας και χαμηλή διαφοροποίηση. Τέλος, βάσει αυτού του μοντέλου διαπιστώνεται ότι αύξησης της ηλικίας του ασθενούς κατά ένα έτος συνεπάγεται μείωση κατά 5% των πιθανοτήτων του όγκου να ανήκει στην κατηγορία των grade III (χαμηλής διαφοροποίησης).

### **2.7.3 Συσχέτιση της κατάταξης ενός όγκου στις τέσσερις κατηγορίες και βασικών βιολογικών δεικτών.**

Στη συνέχεια της μελέτης μας διερευνήσαμε τη σχέση μεταξύ της κατάταξης ενός όγκου σε μια από τις τέσσερις κατηγορίες και βασικών βιολογικών δεικτών (πίνακας 9).

Έτσι, διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό των όγκων που αξιολογήθηκαν ως αρνητικοί για υποδοχείς οιστρογόνων, υπολογίζεται σε 68,75% στην κατηγορία 4, ενώ είναι σημαντικά χαμηλότερος στις άλλες κατηγορίες (κατηγορία 1:25%, κατηγορία 2:44% και κατηγορία 3:14%). Με άλλα λόγια παρουσιάζεται μια στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της κατάταξης ενός όγκου στην τέταρτη κατηγορία και της παρουσίας υποδοχέων οιστρογόνων ( $p=0,038$ ). Αντίθετα, καμιά διαφοροποίηση δεν παρουσιάστηκε σε σχέση με την παρουσία των υποδοχέων προγεστερόνης.

Παρατηρήσαμε επίσης, ότι ο συνολικός αριθμός γενετικών αλλαγών, δηλαδή η γενετική πολυπλοκότητα των όγκων, όπως προσδιορίστηκε από την ανάλυσή τους με CGH, παρουσιάζει διαφορές ανάμεσα στις κατηγορίες, αφού στην πρώτη οι όγκοι φέρουν κατά μέσο όρο 5,6 αλλαγές, στη δεύτερη 3,17, στην τρίτη 8,00 και στην κατηγορία 4 φέρουν 14,75 αλλαγές. Δηλαδή οι όγκοι της τέταρτης κατηγορίας



παρουσιάζουν στατιστικά περισσότερες γενετικές αλλαγές από τους υπόλοιπους ( $p=0,002$ ).

Τέλος, υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές των επιπέδων του *c-myc* mRNA, του PCNA και του *c-erbB2* στους όγκους των τεσσάρων κατηγοριών. Διαπιστώσαμε ότι δεν παρουσιάστηκε καμιά στατιστικά σημαντική συσχέτιση των μικρών διακυμάνσεων αυτών των μέσων όρων μέσα στις κατηγορίες των όγκων. Οι τιμές αναγράφονται στον πίνακα 9.

## **2.8 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CRD-BP/IMP1 ΣΕ ΚΑΛΟΗΘΕΙΣ ΟΓΚΟΙ ΜΑΣΤΟΥ**

Με σκοπό να διερευνήσουμε αν η *de novo* έκφραση του CRD-BP/IMP1 είναι ένα γεγονός που μπορεί να συμβαίνει στα αρχικά στάδια απορύθμισης της φυσιολογικής λειτουργίας των κυττάρων του μαστού, πριν καν αυτά αποκτήσουν κακοήγη φαινότυπο, εξετάσαμε 14 καλοήθεις όγκοι του μαστού (ινοαδενώματα) με RT-PCR για την έκφραση του γονιδίου CRD-BP/IMP1, ακολουθώντας την ίδια προσέγγιση που περιγράφηκε προηγούμενα.

Έτσι, ανιχνεύτηκε η έκφραση του CRD-BP/IMP1 σε 4 καλοήθεις όγκους του μαστού.

## **2.9 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CRD-BP/IMP1 ΣΕ ΔΙΗΘΗΜΕΝΟΥΣ ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ ΚΑΙ ΣΤΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

Για να διερευνήσουμε εάν η *de novo* έκφραση του CRD-BP/IMP1 είναι ένα γεγονός που ακολουθεί τα καρκινικά κύτταρα από την πρωτογενή τους εστία στις θέσεις διήθησης, 12 πρωτογενείς όγκοι καρκίνου του μαστού και οι αντίστοιχοι διηθημένοι λεμφαδένες τους εξετάστηκαν με RT-PCR για την έκφραση του γονιδίου CRD-BP/IMP1.





Διαπιστώσαμε ότι οι 10 από τους πρωτογενείς όγκους (ποσοστό 83,4%), ήταν θετικοί για την έκφραση του CRD-BP/IMP1. Από τους αντίστοιχους λεμφαδένες αυτών των 10 όγκων, ανιχνεύσαμε το μήνυμα του CRD-BP/IMP1 στους 8 (ποσοστό 80%).

Στη συνέχεια εξετάσαμε ιστό από πρωτογενή όγκο και περιφερικό αίμα από 27 ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Χρησιμοποιώντας την ίδια τεχνική προσέγγιση του RT-PCR, ανιχνεύσαμε την έκφραση της CRD-BP/IMP1 σε 16 από τους 27 πρωτογενείς όγκους (ποσοστό 59,3%). Εξετάζοντας το περιφερικό αίμα αυτών των ασθενών, μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε μέσα σε αυτό κύτταρα που εξέφραζαν το μήνυμα της CRD-BP/IMP1 σε 8 περιπτώσεις (50%). Σημειώνεται εδώ ότι με την ίδια τεχνική προσέγγιση εξετάστηκε το περιφερικό αίμα 10 διαφορετικών φυσιολογικών δοτών – σαν αρνητικός μάρτυρας.



**Πίνακας 1**  
**Γενικά στοιχεία των 116 όγκων που μελετήθηκαν**

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΠΟΣΟΣΤΟ %
<b>ΗΛΙΚΙΑ (ΕΤΗ)</b>		
<50	26	23,9
50-65	40	36,7
>65	43	39,4
<b>ΜΕΓΕΘΟΣ ΟΓΚΟΥ(mm)</b>		
<20	33	33,67
>20	65	66,32
<b>ΒΑΘΜΟΣ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ (GRADE)</b>		
I	7	8,75
II	28	35
III	45	56,25
<b>ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ</b>		
Πορώδη διηθητικά μη ειδικού τύπου	60	57,2
Φαγεσωρικά	25	23,8
Λοβιακά	10	9,5
Άλλοι τύποι	10	9,5
<b>ΔΙΗΘΗΜΕΝΟΙ ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ</b>		
Θετικοί	46	40,4
Αρνητικοί	69	59,6
<b>ΔΙΗΘΗΣΗ ΣΕ ΑΛΛΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ</b>		
Θετικοί	69	59,2
Αρνητικοί	42	40,8
<b>ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ</b>		
Θετικοί	36	48,6
Αρνητικοί	38	51,4
<b>ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗΣ</b>		
Θετικοί	25	33,8
Αρνητικοί	49	66,2



Πίνακας 2

Συσχέτιση της έκφρασης του CRD-BP/IMP1 με κλινικοπαθολογικά στοιχεία των όγκων που εξετάστηκαν

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΕΚΦΡΑΣΗ CRD-BP/IMP1		ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ p <sup>1</sup>
		ΘΕΤΙΚΑ	ΑΡΝΗΤΙΚΑ	
<b>ΗΛΙΚΙΑ</b>				
<50	26	13 (50%)	13 (50%)	NS <sup>2</sup>
50-65	40	30 (75%)	10 (25%)	
>65	43	22 (51%)	21(49%)	
<b>ΜΕΓΕΘΟΣ ΟΓΚΟΥ</b>				
≤ 20 mm	33	19(57.6%)	14(42.4%)	NS
> 20 mm	65	41(63.1%)	24(36.9%)	
<b>ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΣΕ ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ</b>				
ΘΕΤΙΚΟΙ	46	30(65.2%)	16(34.8%)	NS
ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ	68	35(51.5%)	33(48.5%)	
<b>ΒΑΘΜΟΣ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ (GRADE)</b>				
I & II	35	21(60%)	14(40%)	0,054*
III	45	31(68.9%)	14(31.1%)	
<b>ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ SCORE</b>				
<b>A. ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΩΛΗΝΙΣΚΩΝ</b>				
1 ΚΑΙ 2	23	7(30%)	16(69,6%)	NS
3	51	20(39,2%)	31(60,8%)	
<b>B. ΜΙΤΩΤΙΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ</b>				
1 ΚΑΙ 2	55	22(40%)	33(60%)	NS
3	19	5(26,3%)	14(73,7%)	
<b>Γ. ΠΥΡΗΝΙΚΟΣ ΠΛΕΙΟΜΟΡΦΙΣΜΟΣ</b>				
1 ΚΑΙ 2	45	20(44,4%)	25(55,6%)	NS
3	29	7(24,1%)	22(75,9%)	

<sup>1</sup> Η στατιστική ανάλυση έγινε με τον ακριβή έλεγχο Fisher.

<sup>2</sup> NS: μη σημαντική συσχέτιση.

\* Σύγκριση μεταξύ grade I και II μαζί, έναντι grade III.



Πίνακας 3

Συσχέτιση της έκφρασης του CRD-BP/IMP1 με βιολογικούς δείκτες του καρκίνου του μαστού

ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ	ΕΚΦΡΑΣΗ CRD-BP/IMP1		ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ p <sup>3</sup>
	ΘΕΤΙΚΟΙ	ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ	
<b>ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ<sup>1</sup></b>			
ΘΕΤΙΚΟΙ	13(40.6%)	9(59.4%)	0,003
ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ	26(76.5%)	8(23.5%)	
<b>ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗΣ<sup>1</sup></b>			
ΘΕΤΙΚΟΙ	12(50%)	12(50%)	NS <sup>4</sup>
ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ	15(35.7%)	27(64.3%)	
<b>c-erbB2<sup>2</sup></b>			
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ (ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ)	6,26 (3,58)	5,34 (2,3)	NS
<b>PCNA<sup>2</sup></b>			
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ (ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ)	3,56 (2,45)	3,28 (1,93)	NS

<sup>1</sup> Θετικός ως προς τους υποδοχείς χαρακτηρίστηκε κάθε όγκος με παρουσία υποδοχέων > 10%.

<sup>2</sup> Οι τιμές αναφέρονται σε μονάδες OD/mg 10<sup>-1</sup> πρωτεΐνης όπως προσδιορίστηκαν όπως περιγράφεται στις σχετικές παραγράφους του κεφαλαίου «Υλικά και Μέθοδοι».

<sup>3</sup> Υπολογίστηκε με το Wilcoxon Ranks Test (μη παραμετρικοί έλεγχοι αξιολόγησης).

<sup>4</sup> Στατιστικά μη σημαντικό.

Πίνακας 4

Γενετικές ανωμαλίες που διαπιστώθηκαν με την ανάλυση των όγκων με την τεχνική του Συγκριτικού Γενωμικού Υβριδισμού (CGH)

ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΕΠΕΚΤΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΣΗΣ 8q24		ΕΠΕΚΤΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΣΗΣ 17q21	
	ΘΕΤΙΚΗ	ΑΡΝΗΤΙΚΗ	ΘΕΤΙΚΗ	ΑΡΝΗΤΙΚΗ
60	29(48,3%)	31(51,7%)	11(18,3%)	49(81,7%)



Πίνακας 5

Συσχέτιση της έκφρασης της επέκτασης της θέσης 8q24 με κλινικοπαθολογικά στοιχεία των όγκων που εξετάστηκαν.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΕΠΕΚΤΑΣΗ 8q24		ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΣΗΜ/ΤΑ p <sup>1</sup>
		ΘΕΤΙΚΑ	ΑΡΝΗΤΙΚΑ	
<b>ΗΛΙΚΙΑ</b>				
<50	16	5 (31,2%)	11(68,8%)	NS <sup>2</sup>
50-65	23	13(56,5%)	10(43,5%)	
>65	21	12(57,2%)	9(42,8%)	
<b>ΜΕΓΕΘΟΣ ΟΓΚΟΥ</b>				
≤ 20 mm	15	6(40%)	9(60%)	NS
> 20 mm	45	26(57,8%)	19(42,2%)	
<b>ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΣΕ ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ</b>				
ΘΕΤΙΚΟΙ	20	11(55%)	9(45%)	NS
ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ	40	18(45%)	22(55%)	
<b>ΔΙΗΘΗΣΗ ΣΕ ΑΛΛΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ</b>				
ΘΕΤΙΚΟΙ	27	15(55,6%)	12(44,4%)	NS
ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ	30	13(43,3%)	17(56,7%)	
<b>ΒΑΘΜΟΣ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ (GRADE)</b>				
I & II	21	5 (24%)	16(76%)	0,001*
III	23	18(78,3%)	5(21,7%)	
<b>ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ SCORE</b>				
<b>A. ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΩΛΗΝΙΣΚΩΝ</b>				
1 & 2	16	9(56,3%)	7(43,7%)	NS
3	25	13(52%)	12(48%)	
<b>B. ΜΙΤΩΤΙΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ</b>				
1 & 2	30	13(43,3%)	17(56,7%)	0,038
3	11	9(81,8%)	2(18,8%)	
<b>Γ. ΠΥΡΗΝΙΚΟΣ ΠΛΕΙΟΜΟΡΦΙΣΜΟΣ</b>				
1 & 2	27	12(44,4%)	15(55,6%)	NS
3	14	10(71,4%)	4(28,6%)	

<sup>1</sup> Η στατιστική ανάλυση έγινε με τον ακριβή έλεγχο Fisher

<sup>2</sup> NS: μη σημαντική συσχέτιση

\* Σύγκριση μεταξύ grade I και II μαζί, έναντι grade III



## Πίνακας 6

Συσχέτιση της επέκτασης στη γονιδιακή θέση 8q24 με βιολογικούς δείκτες του καρκίνου του μαστού

ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΕΠΕΚΤΑΣΗ 8q24		ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ
	ΝΑΙ	ΟΧΙ	p <sup>5</sup>
<b>ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ<sup>1</sup></b>			
ΘΕΤΙΚΟΙ	13(40.6%)	9(59.4%)	NS <sup>6</sup>
ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ	26(76.5%)	8(23.5%)	
<b>ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗΣ<sup>1</sup></b>			
ΘΕΤΙΚΟΙ	12(50%)	12(50%)	NS
ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ	15(35.7%)	27(64.3%)	
<b>c-ErbB-2<sup>2</sup></b>			
(ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ)	5,75	5,52	NS
<b>PCNA<sup>2</sup></b>			
(ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ)	4,66	2,91	NS
<b>c-myc mRNA<sup>3</sup></b>			
(ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ)	1,43	1,08	0,022
<b>Γενετική πολυπλοκότητα<sup>4</sup></b>			
(ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ)	12,5	4,52	0,002

<sup>1</sup> Θετικός ως προς τους υποδοχείς χαρακτηρίστηκε κάθε όγκος με παρουσία υποδοχέων > 10%.

<sup>2</sup> Οι τιμές αναφέρονται σε μονάδες OD/mg 10<sup>-1</sup> πρωτεΐνης όπως προσδιορίστηκαν όπως περιγράφεται στις σχετικές παραγράφους του κεφαλαίου «Υλικά και Μέθοδοι».

<sup>3</sup> Αυθαίρετες μονάδες μέτρησης των επιπέδων του μηνύματος όπως προσδιορίστηκαν από το ημιποσοτικό PCR που περιγράφεται στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι».

<sup>4</sup> Συνολικός αριθμός των γενετικών ενισχύσεων ή επεκτάσεων και των απωλειών που εντοπίστηκαν με CGH ανάλυση των πρωτογενών όγκων.

<sup>5</sup> Υπολογίστηκε με βάση μη παραμετρική στατιστική ανάλυση για συσχετισμένες τιμές (έλεγχος Wilcoxon Rank ).

<sup>6</sup> Στατιστικά μη σημαντικό.



Πίνακας 7

Συσχέτιση μεταξύ των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των όγκων και της κατάταξης τους στις 4 κατηγορίες

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓ/ΤΩΝ	ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΟΓΚΟΥ				ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΣΗΜ/ΤΑ p <sup>1</sup>
		(1)	(2)	(3)	(4)	
<b>ΗΛΙΚΙΑ</b>						
<50	15	4(23,5%)	2(14,3%)	4(40%)	6(31,6%)	0,004
50-65	25	6(35,3%)	7(50%)	2(20%)	9(42,1%)	
>65	20	7(41,2%)	5(35,7%)	4(40%)	5(26,3%)	
<b>ΜΕΓΕΘΟΣ ΟΓΚΟΥ</b>						
≤ 20 mm	19	6(30%)	6(37,5%)	2(25%)	5(26,3%)	NS <sup>2</sup>
> 20 mm	41	12(60%)	10(62,5%)	6(75%)	14(73,7%)	
<b>ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΣΕ ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ</b>						
ΘΕΤΙΚΟΙ	20	4(24%)	5(35,7%)	5(50%)	6(31,6%)	NS
ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ	40	13(76%)	9(64,3%)	5(50%)	13(68,4%)	
<b>ΒΑΘΜΟΣ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ (GRADE)</b>						
I	4	2(20%)	2(15,5%)	0	0	0,001*
II	17	5(50%)	8(61,5%)	0	4(26,7%)	
III	24	3(30%)	3(23,1%)	7(100%)	11(73,3%)	
<b>ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ SCORE</b>						
<b>A. ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΩΛΗΝΙΣΚΩΝ</b>						
1 ΚΑΙ 2	16	2(22%)	5(50%)	4(57.1%)	5(33.3%)	NS
3	25	7(78%)	5(50%)	3(42.9%)	10(66.7%)	
<b>B. ΜΙΤΩΤΙΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ</b>						
1 ΚΑΙ 2	30	8(88,9%)	9(90%)	6(85,7%)	7(46,7%)	0,033
3	11	1(11,1%)	1(10%)	1(14,3%)	8(53,3%)	
<b>Γ. ΠΥΡΗΝΙΚΟΣ ΠΛΕΙΟΜΟΡΦΙΣΜΟΣ</b>						
1 ΚΑΙ 2	27	7(77.8%)	8(80%)	4(57.1%)	8(53.3%)	NS
3	14	2(22.2%)	2(20%)	3(42.9%)	7(46.7%)	

<sup>1</sup> Η στατιστική μελέτη έγινε με απλή μη συσχετισμένη ανάλυση διακύμανσης (ANOVA).

<sup>2</sup> NS: μη σημαντική συσχέτιση

\* Σύγκριση μεταξύ grade I και II μαζί, έναντι grade III.



Πίνακας 8

Παρουσίαση της πρόβλεψης των πιθανοτήτων των τεσσάρων κατηγοριών των όγκων βάσει του μοντέλου παλινδρόμησης (Best Exact Logistic Regression Model)

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΚΑΤΗΓΟΡΙΩΝ	ΛΟΓΟΣ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΩΝ	95% ΔΙΑΣΤΗΜΑ ΕΜΠΙΣΤΟΣΥΝΗΣ	p
2 ΕΝΑΝΤΙ 1	3.02	0.19 – 192.64	0.72
3 ΕΝΑΝΤΙ 1	6.41	0.35 – 450.13	0.32
4 ΕΝΑΝΤΙ 1	19.57	1.65 – 1182.55	0.010

Πίνακας 9

Συσχέτιση των βιολογικών δεικτών των όγκων και της κατανομής τους στις 4 κατηγορίες

ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΟΓΚΩΝ <sup>1</sup>				ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ
	(1)	(2)	(3)	(4)	p
<b>ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΛΥΠΛΟΚΟΤΗΤΑ<sup>2</sup></b>					
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	5,60	3,17	8,00	14,75	0.001*
(ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ)	(1,51)	(0,49)	(1,8)	(3,27)	
<b>c-myc mRNA<sup>3</sup></b>					
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	1,30	0,92	1,68	1,26	NS <sup>6</sup>
(ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ)	(0,32)	(0,11)	(0,52)	(0,14)	
<b>PCNA<sup>4</sup></b>					
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	2,66	3,5	3,87	5,11	NS
(ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ)	(0,52)	(0,62)	(0,65)	(0,95)	
<b>c-ErbB-2<sup>4</sup></b>					
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	5,22	6,01	6,24	5,45	NS
(ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ)	(0,64)	(1,26)	(0,71)	(0,91)	
<b>ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ<sup>5</sup></b>					
ΘΕΤΙΚΟΙ	9(75%)	5(55.5%)	6(85.8%)	5(31%)	0,038**
ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ	3(25%)	4(44.5%)	1(14.2%)	11(69%)	
<b>ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗΣ<sup>5</sup></b>					
ΘΕΤΙΚΟΙ	6(50%)	4(44,4%)	4(57,1%)	5(31%)	NS
ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ	6(50%)	5(55,6%)	3(42,9%)	11(69%)	





<sup>1</sup> (1): όγκοι που δεν εκφράζουν CRD-BP ούτε φέρουν επέκταση της θέσης 8q24. (2): όγκοι που εκφράζουν CRD-BP χωρίς να φέρουν την επέκταση. (3): όγκοι που φέρουν επέκταση της θέσης 8q24 χωρίς να εκφράζουν το γονίδιο του CRD-BP. (4): όγκοι που έχουν και τα δύο χαρακτηριστικά.

<sup>2</sup> Συνολικός αριθμός των γενετικών ενισχύσεων ή επεκτάσεων και των απωλειών που εντοπίστηκαν με CGH ανάλυση των πρωτογενών όγκων.

<sup>3</sup> Αυθαίρετες μονάδες μέτρησης των επιπέδων του μηνύματος όπως προσδιορίστηκαν από το ημιποσοτικό PCR που περιγράφεται στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι».

<sup>4</sup> Οι τιμές αναφέρονται σε μονάδες OD/mg  $10^{-1}$  πρωτεΐνης όπως προσδιορίστηκαν όπως περιγράφεται στις σχετικές παραγράφους του κεφαλαίου «Υλικά και Μέθοδοι».

<sup>5</sup> Θετικός ως προς τους υποδοχείς χαρακτηρίστηκε κάθε όγκος με παρουσία υποδοχέων > 10%.

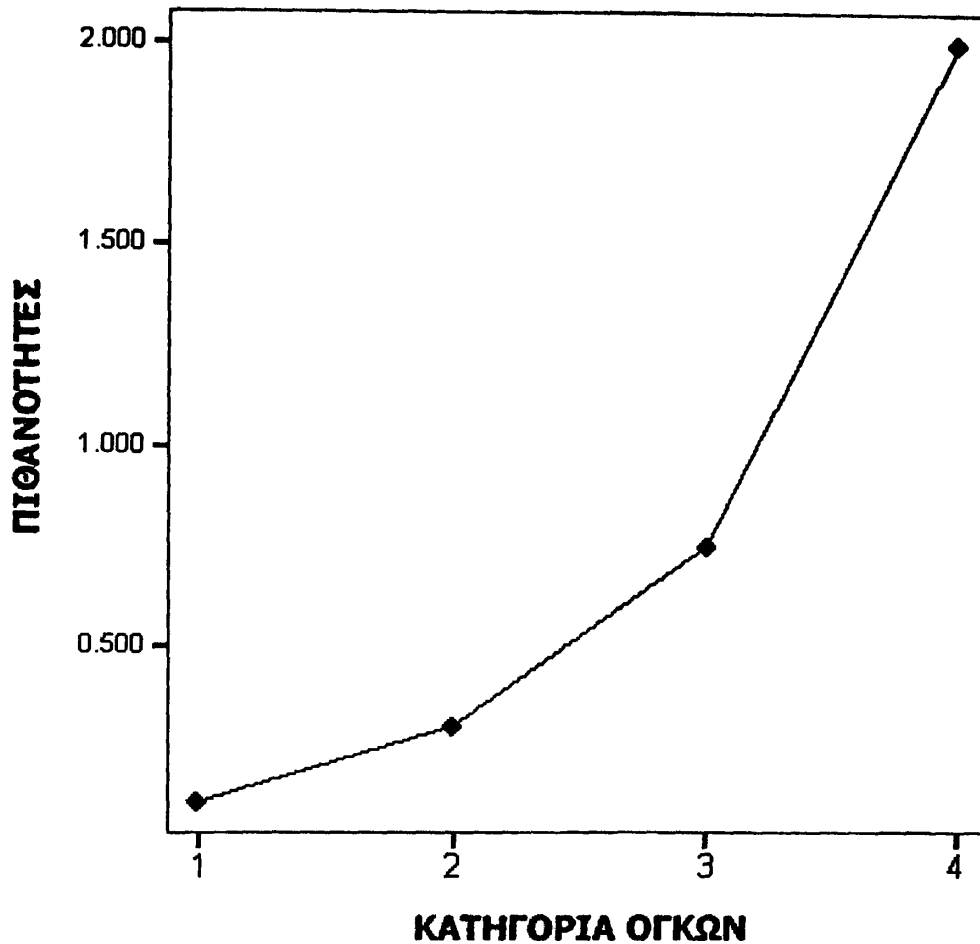
<sup>6</sup> NS: μη σημαντική συσχέτιση

\* Υπολογίστηκε με το Wilcoxon Ranks Test.

\*\* Η στατιστική μελέτη έγινε με απλή μη συσχετισμένη ανάλυση διακύμανσης (ANOVA)



Εικόνα 15



Χρησιμοποιώντας τη στατιστική ανάλυση παλινδρόμησης για την πρόβλεψη πιθανοτήτων (best exact logistic regression model, SPSS), μελετήσαμε τη συμπεριφορά των όγκων των τεσσάρων κατηγοριών σε σχέση με την κατάταξή τους στις τρεις κατηγορίες του grade. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι οι πιθανότητες ενός όγκου να είναι χαμηλής διαφοροποίησης (grade III έναντι grade I και II) τείνουν να αυξάνονται όσο προχωράμε από την πρώτη κατηγορία στις επόμενες ( $p=0,002$ ).

(Σημείωση:

- κατηγορία 1: όγκοι που δεν εκφράζουν CRD-BP ούτε φέρουν επέκταση της θέσης 8q24.
- κατηγορία 2: όγκοι που εκφράζουν CRD-BP χωρίς να φέρουν την επέκταση.
- κατηγορία 3: όγκοι που φέρουν επέκταση της θέσης 8q24 χωρίς να εκφράζουν το γονίδιο του CRD-BP.
- κατηγορία 4: όγκοι που έχουν και τα δύο χαρακτηριστικά.)

### 3 ΜΕΡΟΣ Γ΄: ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΚΑΙ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΗ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CRD-BP/IMP1

#### 3.1 ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Σκοπός των πειραμάτων που περιγράφονται σε αυτήν την ενότητα ήταν η μελέτη της επίδρασης της παρεμπόδισης της έκφρασης του CRD-BP/IMP1 στα επίπεδα των μηνυμάτων του c-myc και του IGF-II που είναι δύο από τους ως τώρα γνωστούς στόχους της CRD-BP/IMP1 πρωτεΐνης και των οποίων η ανώμαλη έκφραση συνδέεται με την ογκογένεση.

Για το λόγο αυτό επιδιώχθηκε η παρεμπόδιση της έκφρασης με την μεθοδολογία της επιλεκτικής καταστροφής του CRD-BP/IMP1 mRNA με μικρά δίκλινα μόρια RNA (siRNA: small RNA interference mechanism), ο μηχανισμός δράσης των οποίων περιγράφηκε στα «Υλικά και Μέθοδοι». Επιλέχθηκαν και σχεδιάστηκαν με βάση τις αρχές που αναφέρθηκαν στη σχετική παράγραφο, 2 διαφορετικά μόρια και πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων παροδικής επιμόλυνσης σε κύτταρα της σειράς MCF-7, όπως περιγράφεται στη σχετική παράγραφο του κεφαλαίου «Υλικά και Μέθοδοι».

Η κυτταρική σειρά επιλέχτηκε γιατί είναι μια καλά μελετημένη κυτταρική σειρά που προέρχεται από καρκίνο του μαστού. Επιπλέον, εκφράζει τόσο το γονίδιο CRD-BP/IMP1 όσο και το c-myc σε μέτρια επίπεδα και άρα θα ήταν εύκολα ανιχνεύσιμες οποιεσδήποτε αλλαγές επέφερε η παρεμπόδιση της έκφρασης του πρώτου.



### 3.2 ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΤΩΝ MCF-7 ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ CRD- BP/IMP1

Για να παρακολουθούμε το ποσοστό επιτυχίας της παροδικής επιμόλυνσης, χρησιμοποιήθηκε ένα μικρομοριακό RNA το οποίο δεν προκαλούσε παρεμπόδιση για κάποιο ευκαρυωτικό γονίδιο, και το οποίο ήταν συνδεδεμένο με τη χρωστική φλουορεσκίνη, οπότε μετά την εισαγωγή του στα κύτταρα αυτά φθόριζαν. Έτσι, ήταν δυνατός ο προσδιορισμός του ποσοστού των κυττάρων που είχαν επιμολυνθεί με την χρήση ενός κυτταρομετρητή ροής για Fluorescence Antigen Cell Sorting. Χρησιμοποιώντας αυτήν την προσέγγιση, βελτιστοποιήσαμε τις συνθήκες επιμόλυνσης, όσον αφορούσε τη συγκέντρωση RNA και λιπιδίων επιτυγχάνοντας επιμόλυνση στο 85% των κυττάρων (Σχήμα 8).

Τα δύο ειδικά για το μήνυμα του CRD-BP/IMP1 μόρια siRNA είχαν μέγεθος 21 νουκλεοτίδια το καθένα και σχεδιάστηκαν με στόχους τις αλληλουχίες στις θέσεις του mRNA 1114-1134 το πρώτο (CRD-si1) και 1468-1488 το δεύτερο (CRD-si2).

Επιπλέον, σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικός μάρτυρας ένα siRNA που δεν ήταν φθορισμένο ούτε προκαλούσε παρεμπόδιση της έκφρασης κάποιου γονιδίου (Cont-si).

Όπως περιγράφεται στη σχετική παράγραφο, στα «Υλικά και Μέθοδοι», 48 ώρες μετά την επιμόλυνση τα κύτταρα συλλέγονται, απομονώνεται το ολικό RNA και ακολουθεί προσδιορισμός των επιπέδων του μηνύματος του CRD-BP/IMP1 με την τεχνική του Real Time PCR.

Για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων του mRNA των δειγμάτων, σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκε μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων ολικού RNA από κύτταρα της μητρικής σειράς MCF-7 για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Επίσης, για κάθε δείγμα προσδιορίστηκαν και τα επίπεδα του mRNA της β2-μικροσφαιρίνης, η οποία στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για να παρακολουθείται τόσο η ποιότητα όσο και η ποσότητα του συνόλου των μηνυμάτων μέσα σε αυτό. Έτσι, για κάθε δείγμα, προσδιορίστηκε μια τιμή



(σε σχετικές μονάδες) με βάση την καμπύλη αναφοράς τόσο για το CRD-BP/IMP1 όσο και για τη β2-μικρογλοβουλίνη. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο λόγος που προκύπτει από τη διαίρεση units CRD-BP/IMP1/ units β2-μικρογλοβουλίνης και αυτός χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των δειγμάτων μεταξύ τους.

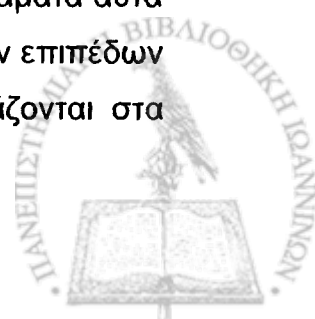
Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις φορές και οι μέσες τιμές που υπολογίστηκαν για τα δείγματα με τα CRD-si (1 και 2) παρουσιάζονται στο διάγραμμα 5 σαν ποσοστά επί τοις εκατό σε σχέση με τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του CRD-BP/IMP1 mRNA, όπως αυτά προσδιορίστηκαν ακολουθώντας την ίδια προσέγγιση στα δείγματα με το Cont-si.

Με βάση τα παραπάνω υπολογίστηκε ότι 48 ώρες μετά την επιμόλυνση, τα επίπεδα έκφρασης του CRD-BP/IMP1 είχαν μειωθεί στο 80% και 75% με τη χρήση των CRD-si1 και CRD-si2 αντίστοιχα, σε σχέση με το Cont-si ( $p < 0.01$ ).

### **3.2.1 Προσδιορισμός των επιπέδων του *c-myc* και *IGFII* mRNA μετά την παρεμπόδιση της έκφρασης του CRD-BP/IMP1**

Για να προσδιορίσουμε την επίδραση της κατευθυνόμενης παρεμπόδισης της έκφρασης του CRD-BP/IMP1 στην έκφραση των μηνυμάτων των στόχων της, MCF-7 κύτταρα επιμολύνθηκαν με τα CRD-si1, CRD-si2 και το μάρτυρα Cont-si και 48 ώρες μετά ολικό RNA απομονώθηκε από τα κύτταρα αυτά και ακολούθησε προσδιορισμός των επιπέδων των μηνυμάτων του *c-myc* και *IGFII* με την τεχνική του Real Time PCR.

Ο προσδιορισμός έγινε με την προσέγγιση που περιγράψαμε στην προηγούμενη παράγραφο, χρησιμοποιώντας καμπύλη αναφοράς και υπολογίζοντας το λόγο των *c-myc* και *IGFII* mRNAs προς τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου αναφοράς (β2-μικρογλοβουλίνη). Τα πειράματα αυτά έγιναν τουλάχιστον τρεις φορές και οι μέσες τιμές των σχετικών επιπέδων έκφρασης των δύο γονιδίων που υπολογίστηκαν, παρουσιάζονται στα



διαγράμματα 6 και 7 ως επί τοις εκατό ποσοστά έκφρασης σε σχέση με τα σχετικά επίπεδα έκφρασης που προσδιορίστηκαν στα δείγματα με το Cnt-si.

Από τα αποτελέσματά μας φαίνεται ότι τα επίπεδα έκφρασης του *c-myc* mRNA στα κύτταρα που έχουν λάβει είτε το CRD-si1 είτε το CRD-si2 μειώνονται στο 1/3 των επιπέδων έκφρασης των κυττάρων που έχουν λάβει το Cnt-si ( $p < 0.01$ ). Αντιθέτως, τα επίπεδα έκφρασης του *IGF-II* mRNA στα ίδια κύτταρα υπολογίζονται 15 φορές πιο υψηλά σε σχέση με τα κύτταρα που έχουν το Cnt-si ( $p < 0.01$ ).

### **3.2.2 Προσδιορισμός της επίδρασης της στοχευμένης παρεμπόδισης της έκφρασης της CRD-BP/IMP1 στα πρωτεϊνικά επίπεδα των δύο στόχων της *c-myc* και *IGFII***

Για να προσδιορίσουμε την επίδραση της κατευθυνόμενης παρεμπόδισης της έκφρασης του CRD-BP/IMP1 στα πρωτεϊνικά επίπεδα του *c-myc* χρησιμοποιήσαμε την τεχνική του ανοσοπροσδιορισμού πρωτεϊνών ακινητοποιημένων σε μεμβράνη με τη χρήση χημιοφωταύγειας (western blot analysis). Σε κάθε πείραμα, τα κύτταρα συλλέγονται 48 ώρες μετά την επιμόλυνση με si και ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα απομονώνεται και προσδιορίζεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών, όπως περιγράφεται στη σχετική παράγραφο στα «Υλικά και Μέθοδοι».

Ακολουθώντας την διαδικασία αυτή, προσδιορίσαμε ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα του *c-myc* είναι 2-3 φορές χαμηλότερα στα κύτταρα που έχουν υποστεί μείωση της έκφρασης της CRD-BP/IMP1 λόγω της επιμόλυνσης με si σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρα. (Σχήμα 9 και διάγραμμα 8).

Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η μείωση της έκφρασης της CRD-BP/IMP1 έχει άμεσα αποτελέσματα τόσο στα επίπεδα του μηνύματος όσο και της πρωτεΐνης του *c-myc* και στοιχειοθετούν για πρώτη φορά την επίδραση αυτή σε ένα κυτταρικό σύστημα.



Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία προσπαθήσαμε να προσδιορίσουμε τα πρωτεϊνικά επίπεδα του IGFII στα MCF-7 κύτταρα, μετά την επιμόλυνσή τους με si, αλλά αυτό στάθηκε αδύνατο με τη συγκεκριμένη τεχνική προσέγγιση.

### **3.2.3 Μελέτη της επίδρασης της στοχευμένης παρεμπόδισης της έκφρασης της CRD-BP/IMP1 στο ποσό του εκκρινόμενου από τα MCF-7 κύτταρα παράγοντα IGFII**

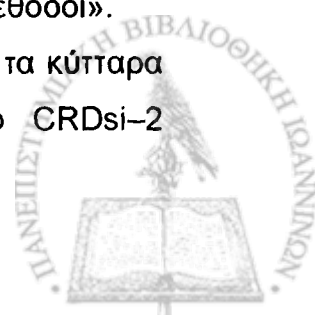
Όπως περιγράφεται στη σχετική παράγραφο των «Υλικά και Μέθοδοι», για να διερευνήσουμε εάν η μείωση της έκφρασης CRD-BP/IMP1 επηρεάζει το ποσό του IGFII παράγοντα που τα κύτταρα εκκρίνουν, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική προσέγγιση της Elisa. Υπερκείμενα από τις καλλιέργειες των κυττάρων συλλέχθηκαν 48 και 72 ώρες μετά την επιμόλυνση και ακολουθήθηκε η περιγραφείσα διαδικασία.

Παρόλο που η τεχνική αυτή προσέγγιση χαρακτηρίζεται από σχετικά μεγάλη ευαισθησία, δεν στάθηκε δυνατό να προσδιοριστούν τα επίπεδα της IGFII πρωτεΐνης. Προφανώς τα επίπεδα της πρωτεΐνης που παράγουν τα MCF-7 κύτταρα είναι πολύ χαμηλότερα από τα όρια ευαισθησίας τόσο της τεχνικής του western blot όσο και της elisa.

### **3.2.4 Διερεύνηση της αντι-πολλαπλασιαστικής δράσης της παρεμπόδισης της έκφρασης της CRD-BP/IMP1 στα MCF-7 κύτταρα**

Για να διερευνήσουμε εάν η στοχευμένη παρεμπόδιση της έκφρασης της CRD-BP/IMP1 και η επακόλουθη μείωση του c-myc έχουν κάποια επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, χρησιμοποιήσαμε την τεχνική της μέτρησης του ποσού ενσωμάτωσης <sup>3</sup>H-θυμιδίνης στα MCF-7 κύτταρα 24, 48, 72 και 96 ώρες μετά την επιμόλυνσή τους με τα si μόρια, όπως περιγράφεται στη σχετική παράγραφο των «Υλικά και Μέθοδοι».

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 9, διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα που είχαν επιμολυνθεί είτε με το CRDsi-1 είτε με το CRDsi-2



παρουσίασαν μείωση του ποσού ενσωμάτωσης  $^3\text{H}$ -θυμιδίνης περίπου 22% σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες, 24 και 48 ώρες μετά την επιμόλυνση. Ανάλογη ήταν η εικόνα στα κύτταρα που είχαν επιμολυνθεί με το θετικό μάρτυρα MYC-si.

Το αντι-πολλαπλασιαστικό αυτό αποτέλεσμα χάνεται στις 72 ώρες μετά την επιμόλυνση ενώ παράλληλα αρχίζει να γίνεται εμφανής η αύξηση του ρυθμού DNA σύνθεσης στα κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με το MYC-si. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε και στα κύτταρα που είχαν λάβει τα CRD-si, αλλά με μια χρονική καθυστέρηση 24 ωρών.

Η παρατήρηση αυτή προφανώς οφείλεται στη σχεδόν συγχρονισμένη είσοδο των κυττάρων στην S φάση του κύκλου, καθώς εξασθενεί η παρεμποδιστική δράση του si μορίου. Η καθυστέρηση δε που παρουσιάζεται στα κύτταρα με τα CRD-si θα μπορούσε να υποδηλώνει ότι τα δύο μηνύματα, του c-myc και της CRD-BP/IMP1, χρειάζονται διαφορετικούς χρόνους για να επανέλθουν στα προηγούμενα επίπεδα τους ή ακόμη ότι η παρεμπόδιση της CRD-BP/IMP1 μπορεί να επηρεάζει και άλλους στόχους, που καθυστερούν να επανέλθουν σε σύγκριση με το μήνυμα του c-myc.

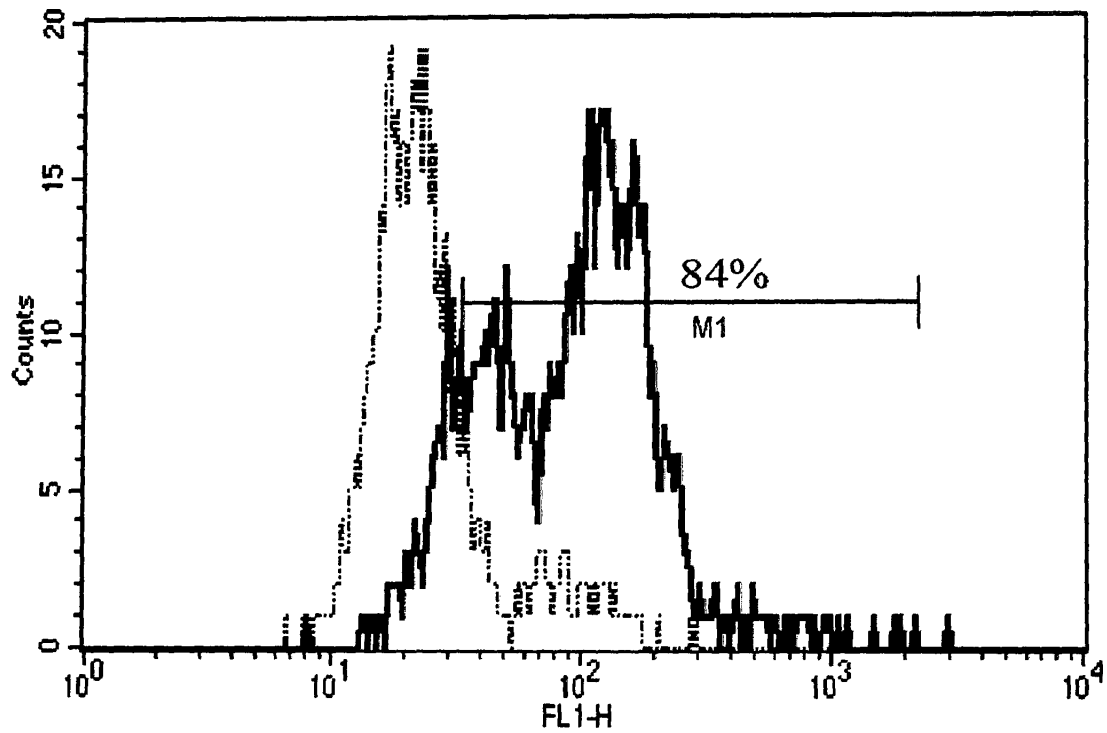
Παράλληλα, εξετάσαμε το πρωτεϊνικό εκχύλισμα των επιμολυσμένων κυττάρων με western blot για να προσδιορίσουμε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της p21<sup>WAF/CIP1</sup>, η οποία είναι ένας αναστολέας κινασών. Διαπιστώθηκε ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα του παράγοντα αυτού ήταν σαφώς αυξημένα τόσο στα κύτταρα που είχαν επιμολυνθεί με το MYC-si όσο και σε αυτά που είχαν επιμολυνθεί με τα CRD-si (Σχήμα 10).

Το εύρημα αυτό αποτελεί μια ακόμη ένδειξη της μείωσης των επιπέδων του c-myc λόγω της παρεμπόδισης της έκφρασης της CRD-BP/IMP1, καθώς είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη c-myc καταστέλλει την έκφραση της p21<sup>WAF/CIP1</sup> με την πρόσδεσή της στον υποκινητή του γονιδίου αυτής.



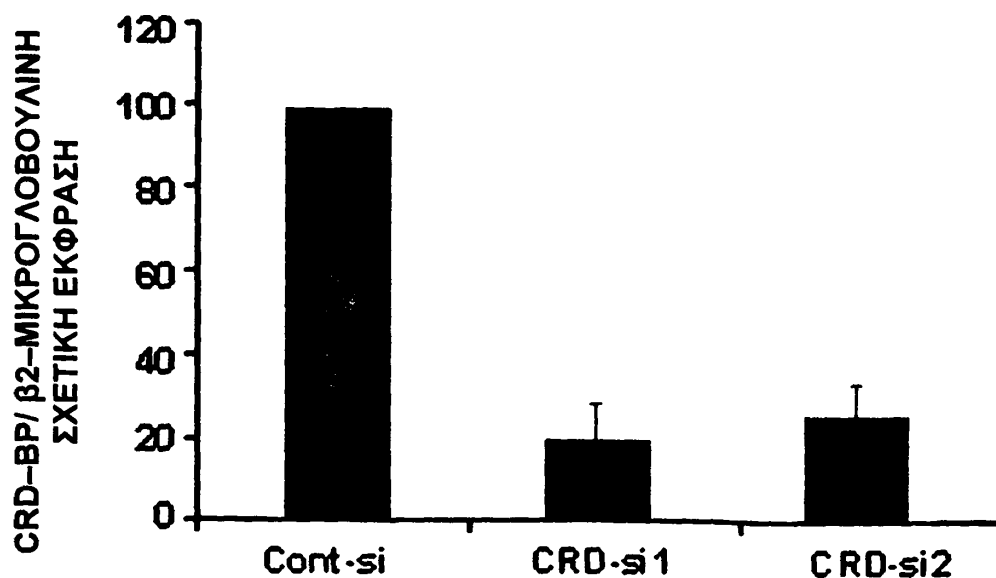


Εικόνα 16



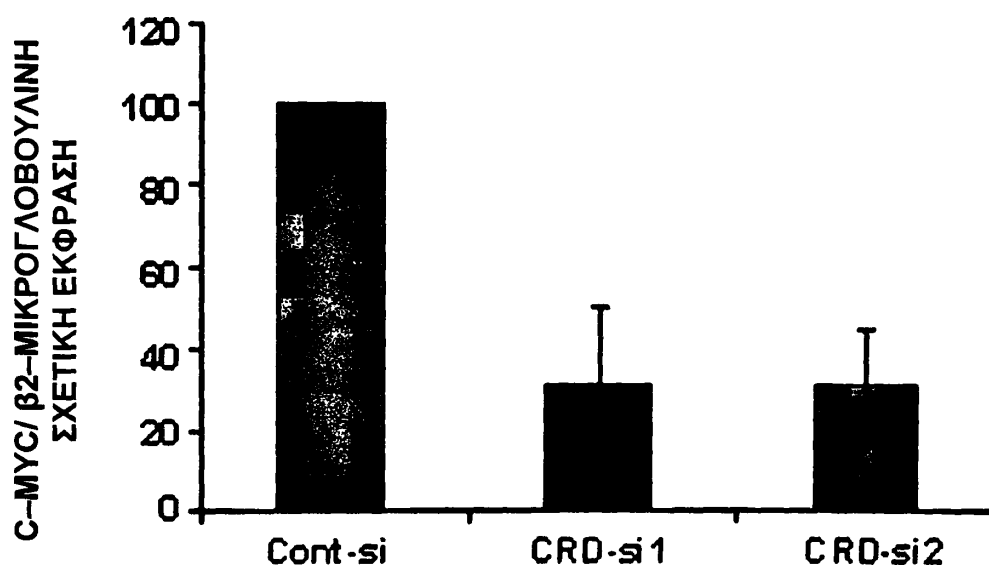
Για να παρακολουθούμε το ποσοστό επιτυχίας της παροδικής επιμόλυνσης, χρησιμοποιήθηκε ένα μικρομοριακό RNA το οποίο δεν προκαλούσε παρεμπόδιση για κάποιο ευκαρυωτικό γονίδιο, και το οποίο ήταν συνδεδεμένο με τη χρωστική φλουορεσκίνη, οπότε μετά την εισαγωγή του στα κύτταρα αυτά φθορίζαν. Στο διάγραμμα φαίνεται ενδεικτικά το ποσοστό των κυττάρων που φθορίζουν από ένα πείραμα επιμόλυνσης.

Διάγραμμα 5



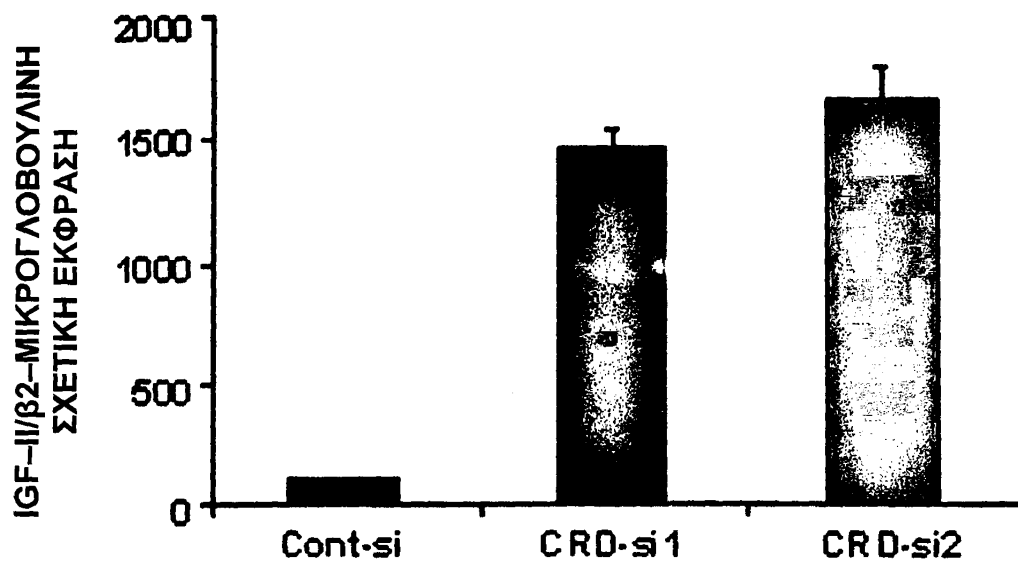
48 ώρες μετά την επιμόλυνση, τα επίπεδα έκφρασης του CRD-BP/IMP1 έχουν μειωθεί στο 80% και 75% με τη χρήση των CRD-si1 και CRD-si2 αντίστοιχα, σε σχέση με το Cont-si ( $p < 0.01$ )

Διάγραμμα 6



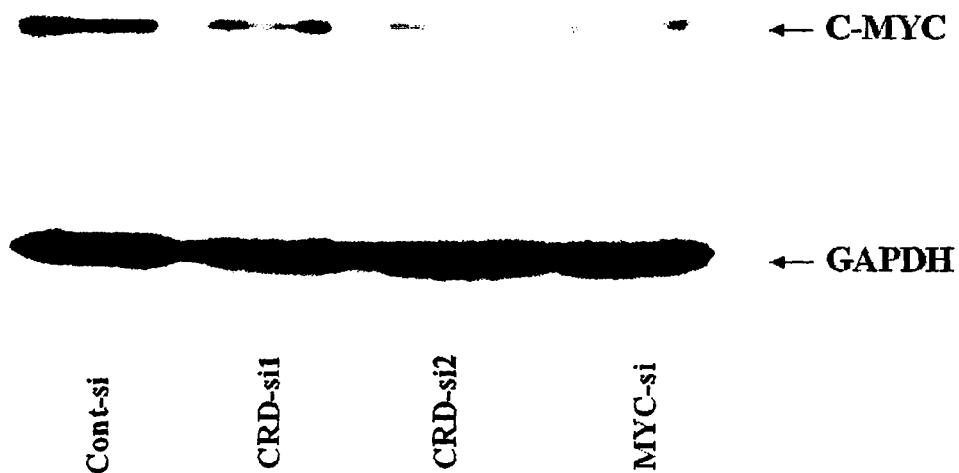
Τα επίπεδα έκφρασης του *c-myc* mRNA στα κύτταρα που έχουν λάβει είτε το CRD-si1 είτε το CRD-si2 μειώνονται στο 1/3 των επιπέδων έκφρασης των κυττάρων που έχουν λάβει το Cnt-si ( $p < 0.01$ ).

Διάγραμμα 7



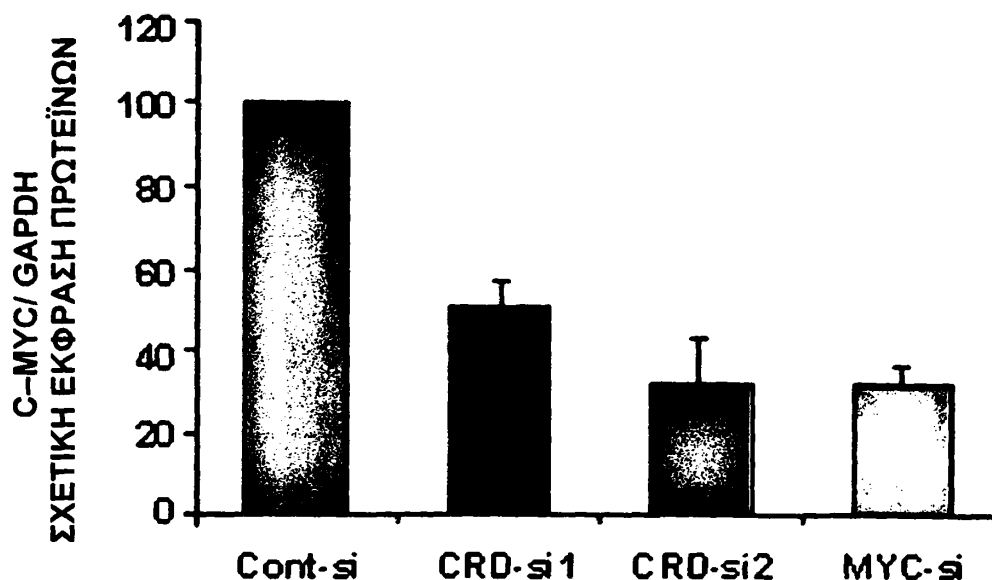
Τα επίπεδα έκφρασης του *IGF-II* mRNA στα στα κύτταρα που έχουν λάβει είτε το CRD-si1 είτε το CRD-si2 υπολογίζονται 15 φορές πιο υψηλά σε σχέση με τα κύτταρα που έχουν το Cnt-si ( $p < 0.01$ ).

Εικόνα 17



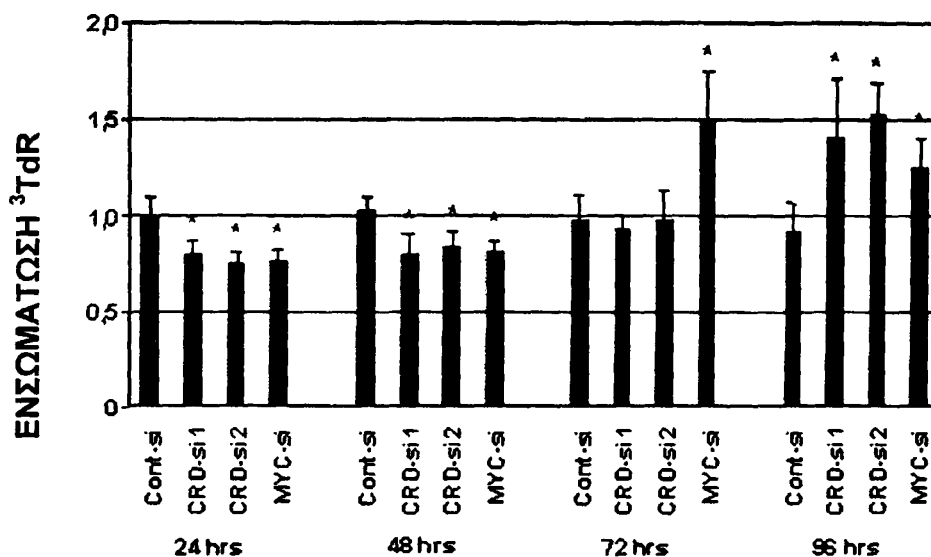
Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του c-myc είναι 2-3 φορές χαμηλότερα στα κύτταρα που έχουν υποστεί μείωση της έκφρασης της CRD-BP/IMP1 λόγω της επιμόλυνσης με si σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρα.

Διάγραμμα 8



Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του c-myc είναι 2-3 φορές χαμηλότερα στα κύτταρα που έχουν υποστεί μείωση της έκφρασης της CRD-BP/IMP1 λόγω της επιμόλυνσης με si σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρα.

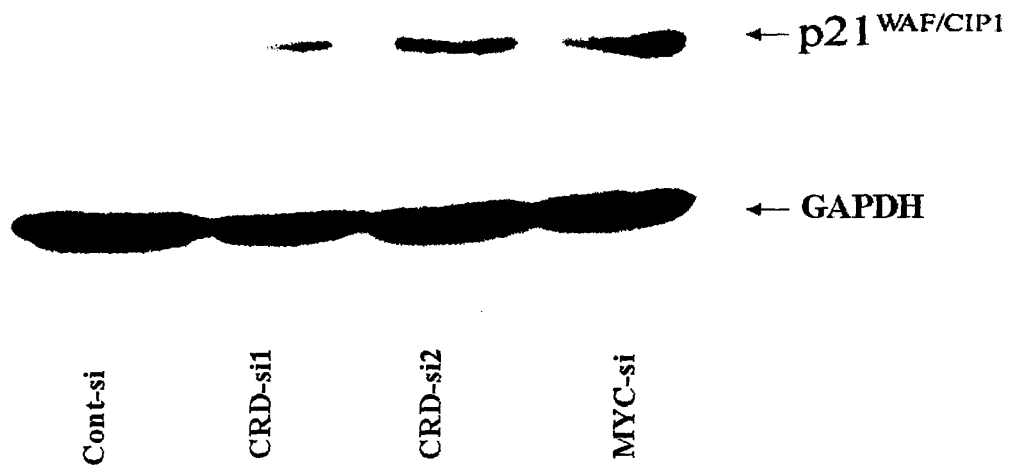
Διάγραμμα 9



Τα κύτταρα που είχαν επιμολυνθεί είτε με το CRDsi-1 είτε με το CRDsi-2 παρουσίασαν μείωση του ποσού ενσωμάτωσης 3H-θυμιδίνης περίπου 22% σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες, 24 και 48 ώρες μετά την επιμόλυνση. Ανάλογη ήταν η εικόνα στα κύτταρα που είχαν επιμολυνθεί με το θετικό μάρτυρα MYC-si.

Το αποτέλεσμα χάνεται στις 72 ώρες μετά την επιμόλυνση οπότε αρχίζει να γίνεται εμφανής η αύξηση του ρυθμού DNA σύνθεσης στα κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με το MYC-si. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε και στα κύτταρα που είχαν λάβει τα CRD-si, αλλά με μια χρονική καθυστέρηση 24 ωρών.

Εικόνα 18



Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της p21<sup>WAF/CIP1</sup>, που είναι ένας αναστολέας κινασών, διαπιστώθηκε ότι ήταν σαφώς αυξημένα τόσο στα κύτταρα που είχαν επιμολυνθεί με το MYC-si όσο και σε αυτά που είχαν επιμολυνθεί με τα CRD-si.

Το εύρημα αυτό αποτελεί μια ακόμη ένδειξη της μείωσης των επιπέδων του c-myc λόγω της παρεμπόδισης της έκφρασης της CRD-BP/IMP1, καθώς είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη c-myc καταστέλλει την έκφραση της p21<sup>WAF/CIP1</sup> με την πρόσδεσή της στον υποκινητή του γονιδίου αυτής.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 1 ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ

Προηγούμενα δεδομένα του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι το *c-myc* mRNA, κατά την πορεία της αποικοδόμησης του, αποαδενυλίωεται πολύ γρήγορα και η διαδικασία αυτή οδηγεί στον σχηματισμό ενός σχετικά σταθερότερου ολιγοαδενυλιωμένου μηνύματος. Για να διερευνηθεί ο πιθανός βιολογικός ρόλος αυτού του, έγινε μελέτη της μεταφρασιμότητας του *c-myc* παρουσία του αναστολέα της πολυαδενυλίωσης cordycepin. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής έδειξαν ότι το *c-myc* mRNA που συντίθεται σε αυτές της συνθήκες ήταν πολύ αποτελεσματικό εκμαγείο μετάφρασης [192]. Τα δεδομένα αυτά υποδήλωναν ότι η παρουσία της πολυαδενυλικής ουράς δεν είναι απαραίτητη – ή ακόμη μπορεί και να επηρεάζει αρνητικά – την μεταφρασιμότητα του συγκεκριμένου μηνύματος.

Είναι όμως γνωστό, όπως υποδηλώνεται από πολλά βιβλιογραφικά δεδομένα, ότι η πολυαδενυλική ουρά διαδραματίζει θετικό ρόλο στην μετάφραση την εξαρτώμενη από την καλύπτρα. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα πολλών εργασιών υποστηρίζουν την υπόθεση ότι το σύμπλοκο της πολυαδενυλικής ουράς και της πρωτεΐνης που δεσμεύεται σε αυτή ειδικά (poly(A) binding protein, PABP), διευκολύνει την πρόσδεση της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας στη καλύπτρα κατά τη φάση έναρξης της μετάφρασης. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι η καλύπτρα και η πολυαδενυλιωμένη ουρά έρχονται σε φυσική αλληλεπίδραση μέσα στο κύτταρο, ώστε να διευκολυνθεί η έναρξη της μετάφρασης [193].

Πιο πρόσφατες εργασίες έδειξαν ότι η πολυαδενυλική ουρά φαίνεται να ενισχύει και την μετάφραση που ελέγχεται από το IRES του *c-myc* – και του *BiP* – mRNA με ένα μηχανισμό διαφορετικό από αυτόν που λειτουργεί κατά την μετάφραση μέσω της καλύπτρας [194]. Τα νέα



αυτά δεδομένα υποδηλώνουν ότι η ουρά ίσως είναι απαραίτητη για την ενίσχυση της μεταφρασιμότητας ανεξάρτητα από τον μηχανισμό μετάφρασης. Τα δεδομένα αυτά που προήλθαν από *in vitro* σύστημα μελέτης (HeLa extracts) και με την χρησιμοποίηση υβριδικού mRNA αναφοράς – *c-myc* IRES–firefly Luc – είναι αντίθετα με τις προηγούμενες παρατηρήσεις μας που προαναφέρθηκαν. Μία αδυναμία του *in vitro* συστήματος είναι ότι η διαδικασία της αποαδενυλίωσης μπορεί να μην γίνεται με τον ίδιο ρυθμό όπως *in vivo*, αν μάλιστα συνυπολογισθεί και η απουσία από το υβριδικό γονίδιο του *c-myc* 3'–UTR.

Κατά συνέπεια, δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο άλλα *cis* ρυθμιστικά στοιχεία του *c-myc* mRNA να υποκαθιστούν το ρόλο της πολυαδενυλικής ουράς στην μετάφραση του μηνύματος αυτού. Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι μια μεγάλου μήκους 3'–UTR περιοχή μπορεί να υποκαταστήσει την πολυαδενυλική ουρά. Αυτό τουλάχιστον έδειξαν οι Tanguay *et al.* [195] οι οποίοι αναφέρουν ότι η παρουσία μιας 3'–UTR περιοχής σχετικά μεγάλου μεγέθους αυξάνει τη μεταφρασιμότητα του μηνύματος αναφοράς σε σημαντικά επίπεδα απουσία της πολυαδενυλικής ουράς. Μάλιστα, η επίδραση της 3'–UTR περιοχής είναι ανεξάρτητη της αλληλουχίας της και είναι σημαντικά μικρότερη στα πολυαδενυλιωμένα μηνύματα που μελετήθηκαν.

Πιο πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα μάλιστα, αναφέρουν ότι οι αλληλουχίες της 3'–UTR περιοχής μηνυμάτων φαίνεται να συνεργάζονται με την 5'–UTR περιοχή ή την καλύπτρα για να προαχθεί η μετάφραση mRNA μορίων ιικής προέλευσης [196, 197, 198, 199]. Τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν στην παρούσα εργασία αποτελούν μια πρώτη ισχυρή ένδειξη ότι ένας τέτοιος μηχανισμός μπορεί να λειτουργεί και σε ένα ευκαρυωτικό μήνυμα, αφού φαίνεται ότι η 3'–UTR περιοχή του *c-myc* mRNA ασκεί ενισχυτική δράση στην μετάφραση του. Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν εδώ όμως υποδηλώνουν ότι η ενισχυτική αυτή δράση εμφανίζεται αποκλειστικά και μόνο σε συνεργασία με το 5'–UTR του μηνύματος και ασκείται ανεξάρτητα του μηχανισμού μετάφρασης, αφού δεν επηρεάζεται από την έκθεση στους αναστολείς της εξαρτώμενης από την καλύπτρα μετάφρασης, μιτομυκίνη και



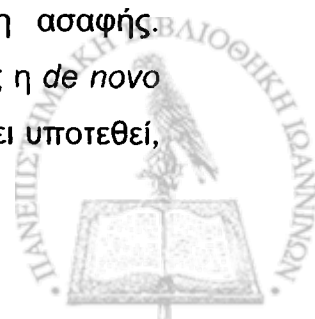
σταυροσπορίνη. Επιπρόσθετα δεν απαιτεί την παρουσία πολυαδενυλικής ουράς, όπως έδειξαν τα πειράματα με την κορδουσεπίνη.

## 2 ΔΕΥΤΕΡΟ ΚΑΙ ΤΡΙΤΟ ΜΕΡΟΣ

Η CRD-BP/IMP1 αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά ως μια πρωτεΐνη που κατακρημνίζεται μαζί με πολυσώματα και δένεται ειδικά στο μήνυμα του *c-myc* σε μια από τις δύο αλληλουχίες που ενέχονται στη σταθερότητα του *c-myc* mRNA, συγκεκριμένα σε αυτή που βρίσκεται μέσα στην κωδική του περιοχή (Coding Region stability Determinant Binding Protein: CRD-BP). Σε *in vitro* σύστημα αποδόμησης RNA, από απομονωμένα πολυσώματα, δείχθηκε ότι η CRD-BP/IMP1 προστατεύει το *c-myc* από ενδονουκλεολυτική προσβολή και έτσι επιμηκύνει το χρόνο ημιζωής του έως και 8 φορές [158]. Κλωνοποίηση του μηνύματος του αποκάλυψε μια RNA δεσμευόμενη πρωτεΐνη με 4 KH-δομές, ορθόλογη με την IMP-1 πρωτεΐνη που εμπλέκεται στον μεταφραστικό έλεγχο του μηνύματος του IGFII [159]. Η CRD-BP/IMP1 προσδέεται ειδικά και παρεμποδίζει την μετάφραση του ογκοεμβρυικού leader 3' IGFII μηνύματος και πιθανά και του leader 4', όπως έδειξαν πρόσφατα πειραματικά δεδομένα από διαγονιδιακά ποντίκια [180].

Ο IGF-II είναι ο κύριος αυξητικός παράγοντας κατά την εμβρυογένεση, με αυτοκρινή και παρακρινή δράση [164]. Η έλλειψη του προκαλεί νανισμό στα ποντίκια και η υπερέκφραση του στον άνθρωπο συνδέεται με το σύνδρομο Beckwith-Wiedemann. Υπερέκφραση του έχει εντοπισθεί και σε κακοήθειες και έχει υποτεθεί η αυτοκρινής δράση του στα κύτταρα του όγκου [168].

Έχει επίσης δειχθεί ότι η CRD-BP/IMP1 αναγνωρίζει ειδικά και προσδέεται στο εγκοεμβρυικό μόριο RNA *H19* καθορίζοντας τον υποκυτταρικό εντοπισμό του. Ο φυσιολογικός ρόλος του *H19* RNA, που δεν φαίνεται να παράγει πρωτεϊνικό προϊόν, είναι ακόμη ασαφής. Φυσιολογικά εκφράζεται κυρίως κατά την εμβρυογένεση, όμως η *de novo* έκφραση του έχει εντοπισθεί σε όγκους [161, 162, 163] και έχει υποτεθεί,





μεταξύ των άλλων, ότι μπορεί να επηρεάζει την έκφραση γονιδίων που ενέχονται στην κυτταρική κίνηση και στην μετάσταση.

Η χρονική συσχέτιση της έκφρασης του IGFII και του H19 κατά την εμβρυϊκή ζωή καθώς και δεδομένα από διαγονιδιακά ποντίκια, τα οποία έδειχναν ότι το μόριο H19 μπορεί να είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της παραγωγής του IGFII, παρουσιάστηκαν από τους Runge *et al.* [177], δηλώνοντας ότι η CRD-BP/IMP1 μπορεί να αποτελεί ένα σύνδεσμο μεταξύ των δύο αυτών μορίων σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της CRD-BP/IMP1 τόσο στο *IGF-II* mRNA όσο και στο *H19* RNA παραμένει ακόμη ασαφής, μιας και δεδομένα από διαγονιδιακά ποντίκια και από *in vitro* μελέτες είναι αντιφατικά. Εκείνο που είναι σαφές είναι ότι η CRD-BP/IMP1 εισέρχεται και εξέρχεται στον πυρήνα, κινείται κατά μήκος των μικροσωληνίσκων και τοποθετείται σε συγκεκριμένες υποκυττάρειες περιοχές όπως π.χ. τα λαμελιπόδια σε κινούμενα κύτταρα [178, 179]. Όλες οι παραπάνω λειτουργίες της εξαρτώνται από την ικανότητα της να προσδέεται σε RNA, υποδηλώνοντας ότι αναγνωρίζει τα RNA στόχους της στον πυρήνα και διαδραματίζει κάποιο, ασαφή ακόμη, ρόλο στη μετα-μεταγραφική τους πορεία και ρύθμιση.

Τόσο τα πειραματικά δεδομένα από τη μελέτη διαφόρων τύπων νεοπλασίας όσο και τα δεδομένα από τα διαγονιδιακά ποντίκια των Tessier *et al.* [185], συνηγορούν στην υπόθεση ότι ο ρόλος της CRD-BP/IMP1 στη ρύθμιση τόσο των επιπέδων του *c-myc* όσο και των άλλων στόχων της είναι πολύ πιο περίπλοκος από ότι αρχικά υποτέθηκε.

Για να διερευνηθεί ο τρόπος με τον οποίον η CRD-BP/IMP1 επηρεάζει τα επίπεδα των στόχων της προχωρήσαμε στην παρεμπόδιση της έκφρασής της με την τεχνική της παρεμπόδισης της έκφρασης με μικρομοριακά RNA (siRNA) σε κύτταρα της σειράς ανθρώπινου καρκίνου του μαστού MCF-7 και μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης δύο από τους γνωστούς στόχους της.

Έτσι, μειώνοντας τα επίπεδα του μηνύματος της CRD-BP/IMP1 στο 20%, διαπιστώσαμε την επακόλουθη μείωση τόσο των επιπέδων του μηνύματος όσο και της πρωτεΐνης του *c-Myc*. Αυτά τα πειραματικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι το *c-myc* είναι ένας *in vivo* στόχος του CRD-



BP/IMP1, τουλάχιστον στο συγκεκριμένο σύστημα που εξετάστηκε, και δίνουν υπόσταση στην άποψη ότι η *de novo* ενεργοποίηση του γονιδίου της CRD-BP/IMP1 στον καρκίνο θα μπορούσε να έχει επιπτώσεις στην έκφραση του *c-myc*. Επιπλέον, αποτελούν την πρώτη άμεση ένδειξη ότι μεταβολές της έκφρασης του CRD-BP/IMP1 μπορεί να επιφέρουν έντονες μεταβολές στην έκφραση του *c-myc*.

Αυτό το συμπέρασμα είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον, καθώς το *c-myc* αποτελεί ένα από τα πιο συχνά απορυθμισμένα γονίδια στις ανθρώπινες νεοπλασίες και η ιδιότητά του να μετασχηματίζει τα κύτταρα συνδέεται με αυξημένους ρυθμούς κυτταρικού πολλαπλασιασμού, κυτταρικής αύξησης και μεταβολισμού, αναστολή της κυτταρικής διαφοροποίησης και επαγωγή γενετικής αστάθειας [95, 96, 200, 201].

Επιπρόσθετα, διαπιστώσαμε ότι η παρεμπόδιση της έκφρασης του CRD-BP/IMP1 επέφερε αύξηση των επιπέδων του μηνύματος του *IGFII* δεκαπέντε φορές σε σχέση με το μάρτυρα. Παρά το γεγονός αυτό όμως δεν καταφέραμε να ανιχνεύσουμε αν η αύξηση των επιπέδων του μηνύματος συνοδευόταν και από αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του *IGFII* και του εκκρινόμενου από τα κύτταρα ποσού.

Προηγούμενες μελέτες των Nielsen *et al.* [164], Hansen *et al.* [180] και Tessier *et al.* [185] έχουν δώσει αντικρουόμενα δεδομένα για το τον τρόπο δράσης του CRD-BP/IMP1 στα επίπεδα του *IGFII*. Ποικίλες υποθέσεις θα μπορούσαν να εξηγήσουν τις διαφορές αυτές, όπως για παράδειγμα ότι οφείλονται στο γεγονός ότι το γονίδιο του CRD-BP/IMP1 επηρεάζει τους στόχους του με διαφορετικό τρόπο που εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο.

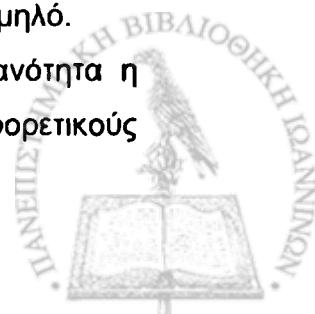
Μια άλλη πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι η δράση και οι ρόλοι του γονιδίου αυτού διαφέρουν δραματικά μεταξύ του φυσιολογικού και του καρκινικού κυττάρου. Ο *IGFII* μπορεί να ενεργοποιήσει ποικίλες κυτταρικές αντιδράσεις, δρώντας σαν παράγοντας κυτταρικής επιβίωσης, προάγοντας τη μίτωση ή τροποποιώντας το μεταβολισμό. Σε *in vitro* συστήματα, ο *IGFII* προάγει τόσο τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όσο και τη διαφοροποίηση. Επιπλέον, ο *IGFII* δρα σαν αυτοκρινής παράγοντας σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού [164, 168].



Στην παρούσα εργασία δείξαμε ότι η κατευθυνόμενη μείωση της έκφρασης του CRD-BP/IMP1 και η επακόλουθη μείωση της έκφρασης του *c-myc* είχαν ως αποτέλεσμα τη μείωση των ρυθμών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα κύτταρα της σειράς MCF-7. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι ανεξάρτητα με την επίδραση που είχε η μειωμένη έκφραση του CRD-BP/IMP1 στα επίπεδα του IGFII, η μείωση των επιπέδων του *c-Myc* ήταν αρκετή για να οδηγήσει σε μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, στο συγκεκριμένο σύστημα. Παρά το γεγονός ότι η αντιπολλαπλασιαστική αυτή δράση που παρατηρήθηκε ήταν μετρίου μεγέθους και παροδική, προφανώς λόγω των περιορισμών της μεθοδολογίας που χρησιμοποιήθηκε, αφού τα siRNAs έχουν μικρό χρόνο ημιζωής, αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι μια σαφής μείωση ή παρεμπόδιση της έκφρασης του CRD-BP/IMP1 θα μπορούσε να επηρεάζει έντονα την φυσιολογία του καρκινικού κυττάρου και σε αυτήν την περίπτωση, η CRD-BP/IMP1 θα μπορούσε να αποτελεί ένα στόχο θεραπευτικής παρέμβασης.

Πρόσφατα οι Liao *et al.* [202] έδειξαν ότι η παρεμπόδιση της έκφρασης του CRD-BP/IMP1 δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα τόσο του μηνύματος όσο και της πρωτεΐνης του *c-myc*, ενώ προήγαγε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της αύξησης των επιπέδων του εκκρινόμενου IGFII στα κύτταρα της λευχαιμική σειράς K562. Τα δεδομένα αυτά έρχονται σε αντίθεση με όσα παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία, γεγονός που θα μπορούσε να ερμηνευτεί από το ότι τα δύο κυτταρικά συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της CRD-BP/IMP1. Έχει υπολογιστεί ότι στο κυτταρόπλασμα ενός κυττάρου της K562 σειρά υπάρχουν περίπου 50 μόρια μηνύματος *c-myc* και 400.000 μόρια της CRD-BP/IMP1 πρωτεΐνης [202]. Χρησιμοποιώντας την τεχνική του ποσοτικού Real Time PCR, υπολογίσαμε το λόγο των επιπέδων του μηνύματος CRD-BP/IMP1- GAPDH (από τα ΔCt) σε περίπου 6 για τα K562 και 14.5 για τα MCF7, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα επίπεδα έκφρασης του CRD-BP/IMP1 στα MCF7 είναι σημαντικά πιο χαμηλό.

Έτσι, αν και δεν μπορούμε να αποκλείσουμε τη πιθανότητα η CRD-BP/IMP1 να έχει διαφορετικούς ρόλους στους διαφορετικούς



κυτταρικούς τύπους, μια πιθανή εξήγηση των διαφορετικών πειραματικών δεδομένων στις δύο κυτταρικές σειρές θα μπορούσε να είναι ότι η παρεμπόδιση της CRD-BP/IMP1 – που βρίσκεται σε τόση περίσσεια στα K562 – δεν είναι σε τέτοιο βαθμό που να μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα του *c-myc*. Έτσι, με τα επίπεδα του *c-myc* αμετάβλητα, η αύξηση των επιπέδων του IGFII μπορεί να οδηγεί στην προαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπως παρατήρησαν οι Liao *et al.* [202].

Σκοπός των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας ήταν να διερευνηθεί η έκφραση της CRD-BP/IMP1 στον καρκίνο του μαστού και η πιθανή επίδραση της ενεργοποίησής της στην έκφραση του *c-Myc* αλλά και των άλλων στόχων της. Έχοντας διαπιστώσει από τα πειράματα της κατευθυνόμενης παρεμπόδισης της έκφρασης της CRD-BP/IMP1 σε ένα κυτταρικό σύστημα, ότι το *c-myc* είναι ένας από τους στόχους της, προχωρήσαμε στη διερεύνηση της έκφρασης του γονιδίου αυτού σε πρωτογενή καρκινώματα του μαστού. Στη βάση αυτή αρχικά εξετάστηκαν 118 όγκοι καρκίνου του μαστού και διαπιστώθηκε η *de novo* ενεργοποίηση της CRD-BP/IMP1 στο 60% περίπου των όγκων αυτών.

Στατιστική μελέτη των διαφόρων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των όγκων του μαστού και της ανίχνευσης της *de novo* ενεργοποίησης της CRD-BP/IMP1 έδειξε ότι αυτή δε συσχετίζεται με τη ηλικία του ασθενούς, το μέγεθος του όγκου, την παρουσία μετάστασης ή τον ιστολογικό τύπο. Τα πειραματικά δεδομένα από τα διαγονιδιακά ποντίκια των Hansen *et al.* [180], έδειξαν ότι η απουσία της CRD-BP/IMP1 επηρεάζει την έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την εξωκυτάρια ουσία, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει στην υπόθεση ότι η έκτοπη έκφρασή της θα μπορούσε να επηρεάζει την έκφραση πρωτεϊνικών μορίων που σχετίζονται με τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν έδειξαν ότι η *de novo* ενεργοποίησης της CRD-BP/IMP1 συσχετίζεται με την παρουσία μετάστασης στους όγκους που εξετάστηκαν.

Διαχωρίζοντας τους όγκους σε καλής και μεσαίας διαφοροποίησης (grade I και II) και σε χαμηλής διαφοροποίησης (grade III), διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό των όγκων που βρέθηκαν θετικοί για τη CRD-BP/IMP1



ήταν σημαντικά μεγαλύτερο στη δεύτερη κατηγορία, παρατήρηση που συσχετίζει την ενεργοποίηση του γονιδίου αυτού με το βαθμό αποδιαφοροποίησης του καρκινικού κυττάρου.

Μελετώντας βιολογικές παραμέτρους χαρακτηριστικές για τον καρκίνο του μαστού διαπιστώθηκε ότι, μεταξύ των όγκων που εξέφραζαν το γονίδιο της CRD-BP/IMP1, το 66.7% βρέθηκε να είναι αρνητικό για υποδοχείς οιστρογόνων (ER) ενώ μόλις το 29.6% των CRD-BP/IMP1 αρνητικών όγκων ήταν αρνητικοί για τους υποδοχείς αυτούς. Τα οιστρογόνα είναι γνωστό ότι πολύ γρήγορα ενεργοποιούν τη μεταγραφή του γονιδίου του *c-myc* σε ορμονο-εξαρτώμενα, ER-θετικά, καρκινικά κύτταρα του μαστού [203, 204]. Αφού οι ER αρνητικοί όγκοι δεν εξαρτώνται από την μιτογόνο δράση των οιστρογόνων, η σχετική ανεξαρτησία τους από αυξητικό παράγοντα μπορεί να οφείλεται στην απορύθμιση της έκφρασης του *c-myc* λόγω της ενεργοποίησης της CRD-BP/IMP1. Δηλαδή η *de novo* ενεργοποίηση της έκφρασης της CRD-BP/IMP1 και οι πιθανές συνέπειές της, συμπεριλαμβανομένης της διατήρησης της έκφρασης του *c-myc* γονιδίου σε υψηλά επίπεδα, θα μπορούσε να αποτελεί ένα βασικό πλεονέκτημα για τα ER-αρνητικά καρκινικά κύτταρα κατά τα πρώτα στάδια της καρκινογένεσης, αφού τους προσφέρει έναν εναλλακτικό μηχανισμό επαγωγής του γονιδίου του *c-myc*. Έτσι, το μειονέκτημα της επίκτητης απώλειας του ρυθμιστικού μηχανισμού επαγωγής της έκφρασης του *c-myc* υπό την επίδραση των οιστρογόνων, ξεπερνιέται από τους κλώνους εκείνους των καρκινικών κυττάρων που εκφράζουν τη CRD-BP/IMP1.

Το γεγονός ότι 4 από τα 14 δείγματα υπερπλασίας μαστού (ινοαδενώματα) που ενδεικτικά εξετάστηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας βρέθηκαν θετικά για το γονίδιο αυτό, αποτελεί μια ένδειξη ότι πιθανά η *de novo* ενεργοποίηση της CRD-BP/IMP1 μπορεί να είναι ένα γεγονός που λαμβάνει χώρα αρκετά νωρίς στη διαδικασία της ογκογένεσης, όπου τα κύτταρα έχουν ξεφύγει από το φυσιολογικό ρυθμό πολλαπλασιασμού, χωρίς όμως να έχουν υποστεί σαφή καρκινική εξαλλαγή, αφού, ως γνωστόν, τα ινοαδενώματα δεν αποτελούν σαφές προκαρκινικό στάδιο.



Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν τόσο σε ποντίκια με ομόζυγη έλλειψη του γονιδίου της CRD-BP/IMP1 [180] όσο και σε διαγονιδιακά ποντίκια που εξέφραζαν το γονίδιο αυτό [185], έδειξαν μεταξύ άλλων ότι η το προφίλ έκφρασης της CRD-BP/IMP1 επηρεάζει έντονα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αναφέρεται μάλιστα συγκεκριμένα ότι η πρώτη κατηγορία ζώων εμφάνιζε έντονη υποπλασία και μειωμένα επίπεδα της πρωτεΐνης PCNA. Όταν εξετάστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του PCNA που είναι γνωστό ότι σχετίζεται με την πολλαπλασιαστική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων – και χρησιμοποιείται μάλιστα ως δείκτης – διαπιστώθηκε ότι δεν παρουσιάζεται καμιά συσχέτιση των επιπέδων αυτών με την έκφραση ή όχι της CRD-BP/IMP1. Μια πιθανή εξήγηση της παρατήρησης αυτής αποτελεί το γεγονός ότι οι όγκοι μαστού χαρακτηρίζονται από πολύ μεγάλη ιστολογική ετερογένεια και δημιουργούνται από ποικίλους, διαφορετικούς μηχανισμούς, που συχνά συνυπάρχουν στον ίδιο όγκο. Έτσι, στον καρκίνο του μαστού – σε αντίθεση με άλλες νεοπλασίες, όπως του παχέως εντέρου – είναι πολύ δύσκολο να εξαχθούν συμπεράσματα που να αφορούν άμεσες σχέσεις αιτίας-αιτιατού, αφού ένα χαρακτηριστικό του καρκινικού φαινοτύπου μπορεί να οφείλεται στη δράση πολλών μηχανισμών.

Επιπλέον, μελετήθηκαν τα επίπεδα της c-erbB2 πρωτεΐνης (η υπερέκφραση της οποίας αποτελεί χαρακτηριστικό μιας ομάδας όγκων μαστού και χρησιμοποιείται συχνά για πρόγνωση και επιλογή θεραπευτικού σχήματος) σε σχέση με την έκφραση στους όγκους της CRD-BP/IMP1. Διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει καμιά στατιστική συσχέτιση μεταξύ των δύο χαρακτηριστικών των όγκων, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει ότι η *de novo* ενεργοποίηση της CRD-BP/IMP1 και η υπερέκφραση της c-erbB2 πρωτεΐνης αποτελούν δύο διαφορετικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην καρκινογένεση, οι οποίοι δε συσχετίζονται με κάποιον τρόπο.

Η ομάδα των Doyle *et al.* [181] ανίχνευσαν γονιδιακή επέκταση της θέσης της CRD-BP/IMP1 στο ένα τρίτο των δειγμάτων που εξέτασαν με την τεχνική του FISH. Τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν στην παρούσα εργασία δείχνουν ότι το 25% των όγκων που εκφράζουν CRD-BP/IMP1 και μελετήθηκαν με την τεχνική του CGH φέρουν γονιδιακή επέκταση της



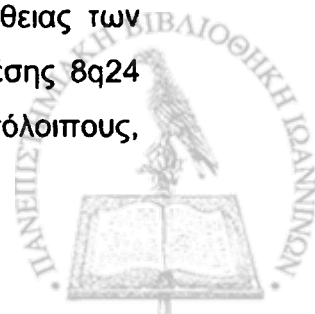
θέσης 17q21.2. Η διαφορά αυτή θα μπορούσε πιθανά εξηγηθεί βάσει της διαφορετικής ευαισθησίας και διακριτικού ορίου στις χρησιμοποιούμενες τεχνικές. Παρόλα αυτά, η έκφραση της CRD-BP/IMP1 ανιχνεύτηκε σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό των εξεταζόμενων όγκων. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι εκτός από τη γονιδιακή επέκταση υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί που οδηγούν στη *de novo* ενεργοποίηση του γονιδίου αυτού. Θεωρώντας ότι η έκφραση της CRD-BP/IMP1 αποτελεί χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων του ιστού που εξετάζουμε και στο υπόλοιπο 75% των CRD-BP/IMP1 θετικών όγκων, που δεν έφεραν την γονιδιακή επέκταση, οι μηχανισμοί αυτοί θα μπορούσαν να συνδέονται με τη διαδικασία της καρκινογένεσης, αλλά ακόμη μένουν αδιευκρίνιστοι.

Οι Elenbaas *et al.* [204], σε μια προσπάθεια να ταυτοποιήσουν τις γενετικές αλλαγές που απαιτούνται για το μετασχηματισμό ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων του μαστού, παρατήρησαν ότι η γονιδιακή επέκταση της θέσης του *c-myc* ήταν πάντα παρούσα στο μετασχηματισμένο κύτταρο.

Γενετικές τροποποιήσεις του χρωμοσώματος 8 και αύξηση της έκφρασης του *c-myc* είναι δύο από τα βασικά χαρακτηριστικά που παρατηρήθηκαν σε μετασχηματισμένους κλώνους που απομονώθηκαν από την έκθεση της ανθρώπινης, αθανατοποιημένης κυτταρικής σειράς επιθηλιακών κυττάρων του μαστού MCF-10A μετά από έκθεσή της σε βενζο[α]πυρένιο [205]. Όλα τα παραπάνω στοιχεία υποδηλώνουν ότι η απορύθμιση του *c-myc* μπορεί να είναι καίριας σημασίας για την καρκινογένεση στο μαστό.

Στην παρούσα μελέτη, διαπιστώθηκε ότι το 50% περίπου των εξεταζόμενων με CGH όγκων καρκίνου του μαστού που μελετήθηκαν, έφεραν χρωμοσωμική επέκταση που περιελάμβανε και την περιοχή 8q24, όπου εδράζεται το γονίδιο του *c-myc*.

Η παρουσία αυτού του χαρακτηριστικού δεν παρουσίασε καμιά συσχέτιση με κάποιο από τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων (ηλικία ασθενούς, ιστολογικός τύπος, μέγεθος όγκου, μετάσταση). Είχε όμως σημαντική συσχέτιση με τον υψηλό βαθμό κακοήθειας των όγκων. Επίσης, όγκοι που έφεραν γονιδιακή επέκταση της θέσης 8q24 εμφάνιζαν μεγαλύτερη γενετική πολυπλοκότητα από τους υπόλοιπους,

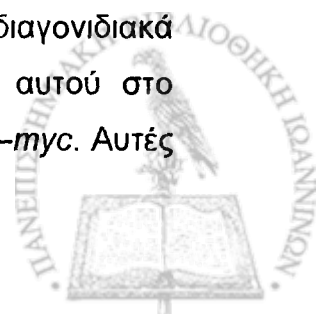


δηλαδή μεγαλύτερο αριθμό συνολικών γενετικών αλλαγών. Τα δεδομένα αυτά έρχονται σε συμφωνία με παλιότερες παρατηρήσεις των Felsner και Bishop [95], οι οποίοι έδειξαν ότι ακόμη και η παροδική αύξηση της έκφρασης του *c-myc* αρκεί για να επάγει γενωμική αστάθεια. Αυτό αποδείχθηκε πρόσφατα από τους Louis *et al.* [200], οι οποίοι έδειξαν ότι η υπερέκφραση του *c-myc* επάγει αλλαγή της δομής των τελομερών γεγονός που προάγει τη γενετική αστάθεια οδηγώντας σε χρωμοσωμικές αναδιατάξεις.

Μελετώντας τα επίπεδα του μηνύματος του *c-myc* διαπιστώσαμε ότι ήταν σημαντικά αυξημένα στους όγκους αυτούς που έφεραν τη γονιδιακή επέκταση 8q24. Στατιστικά σημαντική συσχέτιση εξάλλου, βρέθηκε και με τα πρωτεϊνικά επίπεδα του PCNA. Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα του *c-myc* mRNA ήταν σημαντικά υψηλότερα στους όγκους εκείνους που είχαν υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης PCNA. Το PCNA είναι γνωστός δείκτης πολλαπλασιασμού και συχνά χρησιμοποιείται ως ένας καρκινικός δείκτης. Το εύρημα αυτό επομένως έρχεται σε συμφωνία με τα ισχύοντα δεδομένα.

Από την άλλη, τα επίπεδα του *c-myc* mRNA δε βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των όγκων εκείνων που ήταν θετικοί για τη CRD-BP/IMP1 και εκείνων που ήταν αρνητικοί. Το εύρημα αυτό φαίνεται να έρχεται σε αντίθεση με τα δεδομένα που θέλουν τη CRD-BP/IMP1 πρωτεΐνη να σταθεροποιεί το μήνυμα του *c-myc* [158], ρόλος που οδήγησε στην υπόθεση ότι η υπερέκφραση της θα οδηγούσε και στην αύξηση των επιπέδων έκφρασης του *c-myc*, όπως έχει βρεθεί σε σαρκώματα [177], γεγονός που διαπιστώθηκε και στο σύστημα των MCF-7 κυττάρων όπου μελετήθηκε η παρεμπόδιση της έκφρασης της CRD-BP/IMP1, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας. Η διαφορά αυτή θα μπορούσε να εξηγηθεί με βάση την μεγάλη ετερογένεια που παρουσιάζει ο ιστός του μαστού σε σύγκριση με τον ιστό των στερεών όγκων μεσεγχυματικής προέλευσης.

Το εύρημα αυτό όμως συμφωνεί με τις *in vivo* παρατηρήσεις των Tessier *et al.* [185]. Η ερευνητική αυτή ομάδα διαπίστωσε σε διαγονιδιακά ποντίκια ότι η κατευθυνόμενη υπερέκφραση του γονιδίου αυτού στο μαστό δεν είχε κάποια επίδραση στα συνολικά επίπεδα του *c-myc*. Αυτές





οι παρατηρήσεις σε συνδυασμό με τα δεδομένα των πειραμάτων που παρουσιάστηκαν εδώ, οδηγούν στην υπόθεση ότι η CRD-BP/IMP1 μπορεί να μην επηρεάζει την έκφραση του *c-myc* στον ιστό αυτό ή ακόμη κι αν το επηρεάζει, άλλοι μεταγραφικοί ή μετα-μεταγραφικοί μηχανισμοί δρουν, αντισταθμίζοντας αυτήν την επίδραση και διατηρώντας τελικά σταθερά τα ολικά επίπεδα του *c-myc* mRNA. Παρόλα αυτά, όμως, τα δεδομένα μας από τα πειράματα παρεμπόδισης με siRNA σε MCF-7 κύτταρα αποδεικνύουν ότι έκφραση του *c-myc* επηρεάζεται άμεσα από τη CRD-BP/IMP1, γεγονός που θα μπορούσε να συμβαίνει και στον καρκίνο του μαστού.

Υποθέτοντας ότι η *de novo* ενεργοποίηση της CRD-BP/IMP1 θα μπορούσε να επηρεάζει την έκφραση του *c-myc*, έστω και παροδικά και ακόμη κι αν αυτό δεν είναι πάντα ανιχνεύσιμο, και ότι και η επέκταση στη θέση 8q24 επιδρά στα επίπεδα του *c-myc*, διαχωρίσαμε τους όγκους σε τέσσερις κατηγορίες, βάσει της απουσίας ή της παρουσίας του ενός ή και των δύο αυτών χαρακτηριστικών μαζί. Στατιστική μελέτη της κατηγοριοποίησης αυτής έδειξε ότι η έκφραση της CRD-BP/IMP1, η γονιδιακή επέκταση της θέσης 8q24 και η ταυτόχρονη παρουσία των δύο αυτών χαρακτηριστικών συνδέεται με διαδοχική αύξηση της συχνότητας των όγκων τύπου grade III.

Ο διαχωρισμός των όγκων στις τέσσερις κατηγορίες, βάσει της μεμονωμένης ή ταυτόχρονης παρουσίας των δύο παραπάνω χαρακτηριστικών και η περαιτέρω στατιστική ανάλυση έδειξε την γραμμική αύξηση των πιθανοτήτων ένας όγκος να είναι τύπου grade III καθώς περνάμε διαδοχικά από τη μια κατηγορία στην επόμενη. Το γεγονός αυτό μπορεί να αντανakλά ποσοτικές ή και ποιοτικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης του *c-myc*. Και οι δύο μηχανισμοί μπορεί να επηρεάζουν, πιθανά σε διαφορετικό βαθμό, τα επίπεδα του γονιδίου αυτού. Με άλλα λόγια, επέκταση της γονιδιακής θέσης 8q24 μπορεί μόνο να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης του *c-myc* ενώ η έκφραση της CRD-BP/IMP1, σταθεροποιώντας το μήνυμα του γονιδίου, μπορεί να επηρεάσει το χρονικό πρότυπο έκφρασής του. Πέραν όμως της αντίστοιχης βαθμίδωσης των επιπέδων του *c-myc* στις τέσσερις κατηγορίες των όγκων, θα πρέπει να ληφθεί υπ'όψιν και το ενδεχόμενο



της συνεργιστικής δράσης και άλλων γονιδίων-στόχων (γνωστών και άγνωστων) της CRD-BP/IMP1, στον καρκινικό φαινότυπο των όγκων των αντίστοιχων κατηγοριών.

Με δεδομένο το γεγονός ότι η CRD-BP/IMP1 πρωτεΐνη είναι ένα ογκοεμβρυϊκό αντιγόνο καθώς και ότι αυτό δεν ανιχνεύεται σε ιστούς ενηλίκων, ακόμη και με τη χρήση πολύ ευαίσθητων τεχνικών, αποφασίσαμε να ελέγξουμε εάν η ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου αυτού θα μπορούσε να αποτελέσει έναν τρόπο ανίχνευσης νεοπλασματικών κυττάρων που μεθίστανται. Έτσι, μελετήσαμε την έκφραση της CRD-BP/IMP1 σε πρωτοπαθείς όγκους και τους αντίστοιχους διηθημένους λεμφαδένες και εντοπίσαμε την παρουσία της στους λεμφαδένες 8 από τους 10 ασθενείς με θετικούς για την CRD-BP/IMP1 πρωτοπαθείς όγκους. Επιπλέον, όταν εξετάσαμε ιστό από καρκίνο του μαστού και περιφερικό αίμα από 27 ασθενείς, διαπιστώσαμε ότι ανάμεσα σε 16 ασθενείς με CRD-BP/IMP1 θετικούς όγκους, μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε κύτταρα που εξέφραζαν CRD-BP/IMP1 στο αίμα των 8 από αυτούς. Τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η έκφραση της CRD-BP/IMP1 είναι ένα χαρακτηριστικό που «ακολουθεί» το καρκινικό κύτταρο και αποτελούν μια πρώτη ένδειξη για την πιθανή χρησιμοποίηση της έκφρασης του γονιδίου αυτού ως δείκτη ανίχνευσης της παρουσίας καρκινικών κυττάρων. Η εκδοχή αυτή βέβαια απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση τόσο για τη βελτίωση της ευαισθησίας των χρησιμοποιούμενων τεχνικών ανίχνευσης όσο και για την πιθανή συσχέτιση με άλλα μόρια που μελετώνται και προτείνονται ως πιθανοί δείκτες.

Συμπερασματικά λοιπόν, η *de novo* ενεργοποίηση της έκφρασης της CRD-BP/IMP1 έχει ανιχνευθεί σε ανθρώπινους όγκους διαφορετικής προέλευσης και σε κάποιους από αυτούς τους όγκους, η έκφραση της CRD-BP/IMP1 χαρακτηρίζει την πλειονότητα των εξεταζόμενων δειγμάτων [177, 181, 182, 183, 184]. Παρόλα αυτά, λίγα είναι γνωστά για το μηχανισμό που ευθύνεται για την ενεργοποίηση του γονιδίου αυτού στον καρκίνο.

Ανεξάρτητα από τις υφιστάμενες ασάφειες, όπως διαφαίνονται από τα προαναφερθέντα δεδομένα για τον μηχανισμό δράσης της, υπάρχουν



ορισμένα πολύ ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά στην σχέση της CRD-BP/IMP1 με τον καρκίνο: (1) Η ενεργοποίηση της κατά την ενήλικη ζωή είναι ικανή να ανοίξει το δρόμο στην εξαλλαγή. (2) Εκφράζεται *de novo* σε υψηλά ποσοστά σε μερικούς από τους πιο κοινούς τύπους ανθρώπινων κακοηθειών (π.χ. του μαστού και του παχέως εντέρου). (3) Η έκφρασή της συνδέεται με επιθετικά χαρακτηριστικά των όγκων όπως: (α) απουσία υποδοχέων οιστρογόνων και το υψηλό Grade στα καρκινώματα του μαστού. (β) κακή πρόγνωση στα καρκινώματα των ωοθηκών, και (γ) μετάσταση / επανεμφάνιση της νόσου στα καρκινώματα του παχέως εντέρου. (4) Τέλος, το ότι η έκφρασή της περιορίζεται φυσιολογικά κυρίως κατά την εμβρυογένεση, κάνει ελκυστικό το μόριο αυτό: (α) Ως πιθανό θεραπευτικό στόχο, και (β) ως δείκτη για την παρακολούθηση της διασποράς ή της επανεμφάνισης της νόσου.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Με τον όρο καρκίνο ουσιαστικά περιγράφουμε ένα ετερογενές σύνολο ασθενειών οι οποίες οφείλονται στη συσσώρευση γενετικών αλλαγών που επηρεάζουν την έκφραση ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων με αποτέλεσμα να απορυθμίζονται κυτταρικές λειτουργίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση.

Ένα από τα πιο συχνά «ανώμαλα» εκφραζόμενα ογκογονίδια σε ποικίλους τύπους ανθρώπινων νεοπλασιών είναι το *c-myc*. Το ογκογονίδιο αυτό έχει μελετηθεί και συνεχίζει να μελετάται διεξοδικά, αφού πληθώρα δεδομένων υποδεικνύουν τον σημαντικό και πολύπλευρο ρόλο που διαδραματίζει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, τη διαφοροποίηση και την κυτταρική εξαλλαγή. Επιπρόσθετα το *c-myc* mRNA, όντας ένα από τα πρώτα ασταθή mRNAs που εντοπίστηκαν σε κύτταρα θηλαστικών, αποτέλεσε για χρόνια μοντέλο μελέτης της μετα-μεταγραφικής ρύθμισης, που οδήγησε στην απόκτηση βασικών γνώσεων για αυτό το επίπεδο ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης. Μέχρι πριν μερικά χρόνια, οι ανωμαλίες στην έκφραση του *c-myc* θεωρούνταν ότι είναι κυρίως το αποτέλεσμα μεγάλων γενετικών αλλαγών, όπως η γονιδιακή επέκταση και η χρωμοσωμική μετάθεση. Σαν αποτέλεσμα της γνώσης που αποκτάται για την μετα-μεταγραφική ρύθμιση του *c-myc* mRNA τίθεται το ερώτημα αν οι ανωμαλίες σε αυτό το επίπεδο ρύθμισης του γονιδίου μπορούν επίσης να επηρεάζουν το μοτίβο έκφρασης του στις νεοπλασίες. Πράγματι, πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι κάτι τέτοιο όντως συμβαίνει σε ένα ποσοστό όγκων ή σε ορισμένους τύπους κακοηθειών. Έτσι η παρούσα εργασία εστιάστηκε (α). Στην διερεύνηση *cis*-περιοχών και *trans*-παραγόντων που επηρεάζουν τη σταθερότητα και μεταφρασιμότητα του *c-myc* mRNA, και (β). Στην μελέτη της έκφρασης στον καρκίνο του μαστού της ογκοεμβρυϊκής πρωτεΐνης CRD-BP/IMP1 που ενέχεται στην σταθερότητα του *c-myc* mRNA.



Σημαντικό ρόλο στη λειτουργική πορεία του μηνύματος παίζουν οι μη κωδικές περιοχές του. Για την περαιτέρω μελέτη των μηχανισμών μετα-μεταγραφικής ρύθμισης του ογκογονιδίου *c-myc*, κατασκευάστηκαν 4 χιμαιρικά γονίδια που εισήχθησαν σε κατάλληλους φορείς έκφρασης (πλασμίδια). Σε αυτά περιέχονται οι δύο μη μεταφραζόμενες περιοχές του μηνύματος *c-myc*, την 5'-UTR για την οποία αναφέρεται ότι περιέχει εσωτερική θέση έναρξης της μεταγραφής οπότε επηρεάζει τη μεταφρασιμότητά του και την 3'-UTR για την οποία αναφέρεται ότι επηρεάζει τη σταθερότητα του. Τα προς μελέτη πλασμίδια είναι τα: (1) ρBITMRLuc, που περιέχει την 5'-UTR περιοχή, (2) το ρBITMRLucM που περιέχει τόσο την 5'- όσο και την 3'-UTR περιοχή, (3) το ρBITRLucM που περιέχει μόνο την 3'-UTR περιοχή και (4) το ρBITRLuc, που δεν περιέχει καμιά περιοχή και χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Με τα ανασυνδυασμένα αυτά πλασμίδια πραγματοποιήθηκε σειρά επιμολύνσεων σε κύτταρα της σειράς MCF-7 με σκοπό να διαπιστωθεί η επίδραση της παρουσίας των UTR περιοχών στα επίπεδα του γονιδίου αναφοράς λουσιφεράση. Τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αποτελούν μια πρώτη ισχυρή ένδειξη ότι η 3'-UTR περιοχή του *c-myc* mRNA ασκεί ενισχυτική δράση στην μετάφραση του. Η ενισχυτική αυτή δράση εμφανίζεται αποκλειστικά και μόνο σε συνεργασία με το 5'-UTR του μηνύματος και ασκείται ανεξάρτητα του μηχανισμού μετάφρασης, αφού δεν επηρεάζεται από αναστολείς της εξαρτώμενης από την καλύπτρα μετάφρασης, ούτε απαιτεί την παρουσία πολυαδενυλικής ουράς.

Βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρονται σε ένα ρυθμιστικό στοιχείο μέσα στην κωδική περιοχή του μηνύματος (coding region determinant) του *c-myc* που αναγνωρίζεται ειδικά από μια πρωτεΐνη που ονομάστηκε CRD-BP (Coding Region Determinant Binding Protein). Η πρωτεΐνη αυτή αναγνωρίστηκε βάσει της ιδιότητάς της να προσδένεται ειδικά και να προστατεύει το μήνυμα από ενδονουκλεολυτική καταστροφή, αυξάνοντας έτσι το χρόνο ημιζωής του περίπου οκτώ φορές. Η CRD-BP εκφράζεται σε φυσιολογικές συνθήκες σε εμβρυϊκούς ιστούς αλλά η *de novo* έκφρασή της διαπιστώνεται σε πολύ πρόσφατες εργασίες και στην νεοπλασία,



γεγονός που υποδηλώνει την εμπλοκή ενός επιπλέον μηχανισμό ρύθμισης του *c-myc* στον καρκίνο.

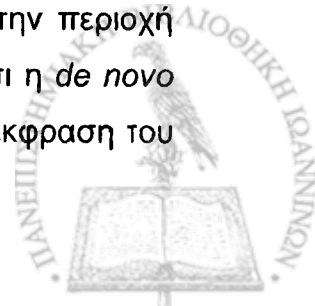
Για να διερευνηθεί ο ρόλος της CRD-BP έγινε αναστολή της έκφρασής της με την τεχνική της παρεμπόδισης με μικρομοριακά RNA (siRNA) στη κυτταρική σειρά MCF-7, από ανθρώπινο καρκίνο του μαστού και μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του *c-myc*.

Έτσι, μειώνοντας τα επίπεδα του μηνύματος της CRD-BP στο 20%, διαπιστώθηκε η επακόλουθη μείωση τόσο των επιπέδων του μηνύματος όσο και της πρωτεΐνης του *c-Myc*. Ταυτόχρονα, διαπιστώθηκε η αύξηση των επιπέδων του αναστολέα των κυκλινών  $p21^{WAF/CIP1}$  και η μείωση του κυτταρικού ρυθμού πολλαπλασιασμού. Αυτά τα πειραματικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι το *c-myc* είναι και *in vivo* στόχος της CRD-BP, τουλάχιστον στο συγκεκριμένο σύστημα που εξετάστηκε, και δίνουν υπόσταση στην άποψη ότι η *de novo* ενεργοποίηση του γονιδίου της CRD-BP στον καρκίνο θα μπορούσε να έχει επιπτώσεις στην έκφραση του *c-myc*. Επιπλέον, αποτελούν την πρώτη άμεση ένδειξη ότι μεταβολές της έκφρασης της CRD-BP μπορεί να επιφέρουν μεταβολές στην έκφραση του *c-myc*.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η έκφραση της CRD-BP σε πρωτογενή καρκινώματα του μαστού. Εξετάστηκαν 118 όγκοι καρκίνου του μαστού και διαπιστώθηκε η *de novo* ενεργοποίηση του γονιδίου αυτού στο 60% περίπου των δειγμάτων.

Διαχωρίζοντας τους όγκους σε χαμηλής κακοήθειας (grade I και II) και σε υψηλής κακοήθειας (grade III), διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό των όγκων που βρέθηκαν θετικοί για τη CRD-BP/IMP1 ήταν σημαντικά μεγαλύτερο, αν και οριακά στατιστικά σημαντικό στη δεύτερη κατηγορία ( $p=0,054$ ), παρατήρηση που συσχετίζει την έκφραση του γονιδίου αυτού με πιο αδιαφοροποίητους σταδίου III όγκους. Επιπλέον, διαπιστώθηκε μια στατιστικά σημαντική, αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της CRD-BP και της παρουσίας των υποδοχέων οιστρογόνων (ER,  $p=0,003$ ).

Το 50% των καρκινωμάτων του μαστού που μελετήθηκαν με CGH, βρέθηκε ότι παρουσίαζαν επέκταση που περιελάμβανε και την περιοχή 8q24, όπου εδράζεται το γονίδιο του *c-myc*. Υποθέτοντας ότι η *de novo* ενεργοποίηση της CRD-BP θα μπορούσε να επηρεάζει την έκφραση του



*c-myc*, έστω και παροδικά – ακόμη κι αν αυτό δεν είναι πάντα ανιχνεύσιμο – και ότι και η επέκταση στη θέση 8q24 επιδρά στα επίπεδα του *c-myc*, διαχωρίσαμε τους όγκους σε τέσσερις κατηγορίες, βάσει της απουσίας ή της παρουσίας του ενός ή και των δύο αυτών χαρακτηριστικών μαζί (κατηγορία 1: όγκοι που δεν εκφράζουν CRD-BP ούτε φέρουν επέκταση της θέσης 8q24, κατηγορία 2: όγκοι που εκφράζουν CRD-BP χωρίς να φέρουν την επέκταση, κατηγορία 3: όγκοι που φέρουν επέκταση της θέσης 8q24 χωρίς να εκφράζουν το γονίδιο του CRD-BP και κατηγορία 4: όγκοι που έχουν και τα δύο χαρακτηριστικά). Στατιστική μελέτη των όγκων στις 4 αυτές κατηγορίες έδειξε ότι η πιθανότητα ενός όγκου να ανήκει στο grade III αυξάνεται γραμμικά με τη μετάβαση από τη μια κατηγορία στην επόμενη ( $p=0,003$ ).

Το γεγονός αυτό μπορεί να αντανakλά ποσοτικές ή και ποιοτικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης του *c-myc*. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ταυτόχρονη παρουσία των δύο αυτών αλλαγών (*de novo* έκφραση της CRD-BP και επέκταση στην περιοχή 8q24) έχει την μέγιστη επίδραση στον καρκινικό φαινότυπο. Επιπλέον, ενισχύεται ακόμη περισσότερο ο κρίσιμος ρόλος του *c-myc* στον καρκίνο του μαστού, καθώς διαπιστώνεται ότι το 75% των εξεταζόμενων δειγμάτων φέρουν αλλαγές που άμεσα (χρωμοσωμική επέκταση) ή έμμεσα (*de novo* έκφραση της CRD-BP) επηρεάζουν τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου αυτού.

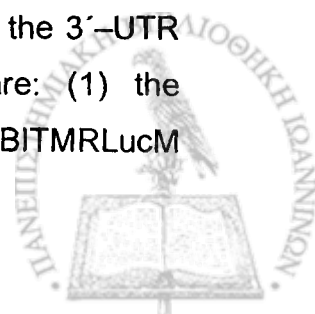


## ABSTRACT

Cancer is a term used to describe an heterogeneous group of diseases caused by the accumulation of genetic alterations which affect the expression of oncogenes and tumor suppressor genes, resulting in deregulated cell functions, such as cell proliferation and apoptosis.

*C-myc* oncogene is one of the most commonly deregulated genes in various human cancers. This gene has been extensively investigated due to its crucial and manifold role in regulating cell cycle, differentiation and cell transformation. Additionally, the *c-myc* mRNA was one of the first labile mammalian mRNAs to be described and was for years a model for studies concerning the post-transcriptional gene regulation. These studies provided us with valuable knowledge on the post-transcriptional regulation. Until few years this was considered as the result of gross genomic alterations, such as gene amplification and chromosomal translocation. More recent data though, reveal other mechanisms affecting *c-myc* expression at the post-transcriptional level. The aim of the study presented herein was (a) the investigation of cis-elements and trans-acting factors that affect stability and translatability of *c-myc* mRNA and (b) the study of the expression pattern of the oncofoetal protein CRD-BP/IMP1 – which affects the *c-myc* mRNA stability – in human breast cancer.

Recent studies support the notion that the untranslated regions of many messages possess an important regulatory role. In order to further investigate mechanisms of post-transcriptional regulation of *c-myc* mRNA we constructed 4 chimeric genes – with luciferase as a reporter gene – that were inserted in the appropriate expression vector. These genes include the 5'-UTR of *c-myc* mRNA, which contains an Internal Ribosome Entry Site – thus it affects its translatability – and the 3'-UTR which affects its stability. The constructed plasmids are: (1) the pBITMRLuc, containing the 5'-UTR region, (2) the pBITMRLucM



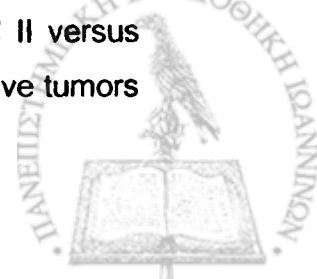


containing the both 5'- and 3'-UTR regions, (3) the pBITRLucM containing the 3'-UTR region and (4) the pBITRLuc, containing no untranslated region, used as a negative control. Using these four chimeric plasmids we conducted a series of transient transfections of cells of the MCF-7 cell line to evaluate the affect of the presence of the untranslated regions on the levels of the luciferase enzyme produced. Our results demonstrate that the 3'-UTR region of *c-myc* mRNA enhances the translation of the reporter gene, in co-operation with the corresponding 5'-UTR of this message, regardless of the mode of initiation of translation (cap-dependent or cap-independent) or the presence of poly (A)-tail.

During the last years, many studies focus on an element within the coding region determinant of *c-myc* mRNA which is specifically recognized by a protein named CRD-BP/IMP1 (Coding Region Determinant Binding Protein). By its binding, CRD-BP/IMP1 protects the message from endonucleolytic cleavage, increasing its half-life 8-fold. This protein is normally expressed in embryonic tissues and its *de novo* activation is detected in neoplasia which suggests an alternative mechanism affecting *c-myc* regulation.

To investigate the role of CRD-BP/IMP1 we proceeded to inhibit its expression by applying the small interfering RNA methodology in transient transfections of the MCF-7 cell line, derived from human breast cancer. Thus, a reduction of CRD-BP/IMP1 expression by 80% was achieved, accompanied by a decrease of both *c-myc* mRNA and protein. Furthermore, a significant reduction in the cell proliferation rate was detected, with a concomitant increase in the levels of the p21<sup>WAF/CIP1</sup> protein. These data suggest that *c-myc* indeed is an *in vivo* target of CRD-BP/IMP1, at least in our system, and provide further support to the notion that the *de novo* activation of CRD-BP/IMP1 in cancer could affect *c-myc* expression.

To investigate the pattern of expression of CRD-BP/IMP1 in primary breast carcinomas, 118 breast tumors were tested and the *de novo* activation of CRD-BP/IMP1 was detected in 60% of them. By grouping the tumors on the basis of their grade (grade I and II versus grade III), we found that the percentage of CRD-BP/IMP1 positive tumors



was higher among the first category ( $p=0,054$ ). This suggests that there is an association between CRD-BP/IMP1 activation and the undifferentiated phenotype of the cancer cell. Additionally, a strong, negative relation between the CRD-BP/IMP1 expression and the presence of ER was found, since the majority (66.7%) of CRD-BP/IMP1 negative tumors was ER positive ( $p=0,003$ ). By using CGH analysis, amplification pertaining the *c-myc* gene locus (8q24) was detected in the 50% of the analyzed tumor specimens. Assuming that the *de novo* activation of CRD-BP/IMP1 could affect *c-myc* expression, the tumors were separated in 4 categories, based on the presence of 8q24 locus amplification and CRD-BP/IMP1 expression, simultaneously. The concomitant presence of the two characteristics in a tumor was strongly related with increased probability of this tumor being undifferentiated (grade III,  $p=0,001$ ). This fact suggests that gene amplification and *de novo* activation of CRD-BP/IMP1 in collaboration result in qualitative and quantitative differences in the levels of *c-myc* expression and significantly affect the cancer phenotype. Thus, the *c-myc* involvement in breast cancer is proved extensive, since its direct or indirect deregulation is detected in the 75% of the studied breast carcinomas.



[The text in this section is extremely faint and illegible due to the quality of the scan. It appears to be a continuous block of text, possibly a list or a series of entries.]



**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. **Geoffrey M., Cooper**, Elements of Human Cancer, *Jones and Bartlett publishers*
2. **Hesketh R.**, The Oncogene and Tumour Suppressor Gene, Facts Book, 2<sup>nd</sup> Edition, Facts Book Series, *Academic Press, Harcourt Brace & Company*, 1997
3. **Heim Sv., Mitelman F.**, Cancer Cytogenetics 2<sup>nd</sup> Ed., *Wiley – Liss*
4. **Ruddon R. W.**, Cancer Biology (Third Edition), *Oxford University Press*, 1995
5. **Lewin B.**, Genes IV, Chapter 39, *Cell Press, Oxford University Press*, 1990
6. **Kinzler K., Vogelstein B.**, Lessons from Hereditary Cancer, *Cell* 87, p. 159–170, 1996
7. **Parkin D. M.**, International variation, *Oncogene*, **23**: 6329–6340, 2004
8. **Stewart S. L., King J. B., Thompson T. D., Friedman C., Wingo P. A.**, Cancer mortality surveillance – United States, 1990 – 2000, *MMWR. Surveill. Summ.*, **53**: 1–108, 2004
9. **Jemal A., Thomas A., Murray T., Thun M.**, Cancer statistics, 2002, *CA Cancer. J. Clin.*, **52**: 23–27, 2002
10. **Bray F., Sankila R., Ferlay J., Parkin D. M.**, Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995, *Eur. J. Cancer*, **38**: 99–166, 2002



11. **Edwards B. K., Howe H. L., Ries L. A., Thun M. J., Rosenberg H. M., Yancik R., Wingo P. A., Jemal A., Feigal E. G.**, Annual Report to the nation on the status of cancer, 1973–1999, featuring implications of age and aging on U.S. cancer burden, *Cancer*, **94**: 2766–2792, 2002
12. **Dumitrescu R. G., Cotarla I.**, Understanding breast cancer risk – where do we stand in 2005?, *J. Cell. Mol. Med.*, **9(1)**: 208–221, 2005
13. **Kelsey J. L., Gammon M. D., John E. M.**, Reproductive factors and breast cancer, *Epidemiol. Rev.*, **15**: 36–47, 1993
14. **Titus–Ernstoff L., Longnecker M. P., Newcomb P. A., Dain B., Greenberg E. R., Mittendorf R., Stampfer M., Willett W.**, Menstrual factors in relation to breast cancer risk, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **7**: 783–789, 1998
15. **Brinton L. A., Schairer C., Hoover R. N., Fraumeni J. F. Jr.**, Menstrual factors and risk of breast cancer, *Cancer Invest*, **6**: 245–254, 1988
16. **Bernstein L.**, Epidemiology of endocrine–related risk factors for breast cancer, *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia*, **7**: 3–15, 2002
17. **World Health Organization Classification of tumours**, Tumours of the Breast and Female Genital Organs, *IARC press*, Lyon, 2003
18. **Teixeira M. R.**, Intra– and Inter–tumor Cytogenetic heterogeneity in Breast Cancer, *Oslo*, 1997
19. **Russo J., Gusterson B. A., Rogers A. E., Russo I. H., Wellings S. R., van Zwieten M. J.**, Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis, *Lab Invest.*, **62(3)**: 244–78, 1990



20. **Harris J. R., Lippman M. E., Veronesi U., Willett W.,** Breast cancer (2), *N Engl J Med.*, **327(6)**:390–8., 1992
21. **Ponten J., Holmberg L., Trichopoulos D., Kallioniemi O. P., Kvale G., Wallgren A., Taylor–Papadimitriou J.,** Biology and natural history of breast cancer, *Int J Cancer Suppl.*, **5**: 5–21, 1990
22. **Fearon E. R., Vogelstein B.,** A genetic model for colorectal tumorigenesis, *Cell.*, **61(5)**:759–67, 1990
23. **Page D. L., Dupont W. D.,** Anatomic markers of human premalignancy and risk of breast cancer, *Cancer*, **66(6 Suppl)**:1326–35, 1990
24. **Rosen P. P.,** Proliferative breast "disease". An unresolved diagnostic dilemma, *Cancer*, **71 (12)**:3798–807, 1993
25. **Page D. L., Dupont W. D., Rogers L. W., Jensen R. A., Schuyler P. A.,** Continued local recurrence of carcinoma 15–25 years after a diagnosis of low grade ductal carcinoma in situ of the breast treated only by biopsy, *Cancer*, **76(7)**:1197–200, 1995
26. **Lenington W. J., Jensen R. A., Dalton L. W., Page D. L.,** Ductal carcinoma in situ of the breast. Heterogeneity of individual lesions, *Cancer*, **73(1)**:118–24, 1994
27. **Harris J. R., Lippman M. E., Veronesi U., Willett W.,** Breast cancer (1), *N Engl J Med.*, **327(5)**:319–28, 1992
28. **Mitelman F., Johanson B., Mertens F., (editors),** Mitelman database of chromosome Aberration in Cancer, available at: <http://cgar.nih.nci.gov/chromosomes/mitelman>, last accessed: October 10, 2005



29. **Pandis N., Jin Y., Gorunova L., Petersson C., Bardi G., Idvall I., Johansson B., Ingvar C., Mandahl N., Mitelman F., et al.,** Chromosome analysis of 97 primary breast carcinomas: identification of eight karyotypic subgroups, *Genes Chromosomes Cancer*, **12(3)**:173–85, 1995
30. **Teixeira M. R., Pandis N., Heim S.,** Genome – Wide Analysis of Breast Cancer by Chromosome Banding and Comparative Genomic Hybridization. In Focus on Breast Cancer Research, *Nova Science Publishers INC. New York*, pp. 45–74
31. **Pandis N., Idvall I., Bardi G., Jin Y., Gorunova L., Mertens F., Olsson H., Ingvar C., Beroukas K., Mitelman F., Heim S.,** Correlation between karyotypic pattern and clinicopathologic features in 125 breast cancer cases, *Int J Cancer*, **66(2)**:191–6, 1996
32. **Pandis N., Heim S., Bardi G., Idvall I., Mandahl N., Mitelman F.,** Chromosome analysis of 20 breast carcinomas: cytogenetic multiclinality and karyotypic–pathologic correlations, *Genes Chromosomes Cancer*, **6(1)**:51–7, 1993
33. **Going J. J., Abd El–Monem H. M., Craft J. A.,** Clonal origins of human breast cancer, *J Pathol.*, **194(4)**:406–12, 2001
34. **Pauletti G., Godolphin W., Press M. F., Slamon D. J.,** Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization, *Oncogene*, **13(1)**: 63–72, 1996
35. **McIntosh G. G., Anderson J. J., Milton I., Steward M., Parr A. H., Thomas M. D., Henry J. A., Angus B., Lennard T. W., Horne C. H.,** Determination of the prognostic value of cyclin D1 overexpression in breast cancer, *Oncogene*, **11(5)**: 885–891, 1995



36. **Malkin D.**, Germline p53 mutations and heritable cancer, *Annu. Rev. Genet*, **28**: 443–465, 1994
37. **de Jong M. M., Nolte I. M., te Meerman G. J., van der Graff W. T., Oosterwijk J. C., Kleibeuker J. H., Schaapveld M., de Vries E. G.**, Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility, *J. Med. Genet*, **39**: 225–242, 2002
38. **Deng C. X., Brodie S. G.**, Roles of BRCA1 and its interacting proteins, *Bioessays*, **22**: 728–737, 2000
39. **Osorio A., de la H. M., Rodriguez–Lopez R., Martinez–Ramirez A., Cazorla A., Granizo J. J., Esteller M., Rivas C., Caldes T., Benitez Jj.**, Loss of heterozygosity analysis at the BRCA loci in tumor samples from patients with familial breast cancer, *Int. J. Cancer*, **99**: 305–309, 2002
40. **Steelman L. S., Bertrand F. E., McCubrey J. A.**, The complexity of PTEN: mutation, marker and potential target for therapeutic intervention, *Expert Opin. Ther. Targets*, **8(6)**: 537–550, 2004
41. **Taylor A. M., Byrd P. J.**, Molecular pathology of ataxia telangiectasia, *J. Clin. Pathol.*, **58(10)**: 1009–15, 2005
42. **Pelengaris S., Khan M., Evan G.**, c–MYC: More than just a matter of Life and Death, *Cancer Reviews, Nature Publishing Group*, Oct., Vol 2, 764–776, 2002
43. **Walker W., Zhou Z. Q., Ota S., Wynshaw–Boris, A., Hurlin P.**, Mnt–Max to Myc–Max complex switching regulates cell cycle entry, *The Journal of Cell Biology*, Vol.169, No.3, May 9, 2005, 405–413
44. **Eliers M.**, Control of cell proliferation by Myc family genes, *Mol. Cells*, **9**:1–6, 1999





45. **Amati B.**, Integrating Myc and TGF- $\beta$  signalling in cell-cycle control, *Nature Cell Biol.*, **3**: E112 – E113, 2001
46. **Dang C. V.**, c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis and metabolism, *Mol Cell Biol.* **19**: 1–11, 1999
47. **Amati B., Alevizopoulos K., Vlach J.**, Myc and the cell cycle, *Front Biosci.*, **3**: D250–D268, 1998
48. **Davis A. C., Wims M., Spotts G. D., Hann S. R., Bradley A.**, A null c-Myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice, *Genes Dev.* **7**: 671–682, 1993
49. **Mateyak M. K., Obaya A. J., Adachi S., Sedivy J. M.**, Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination, *Cell Growth Differ.*, **8**: 1039–1048, 1997
50. **Jones R. M., Branda J., Johnston K. A., Polymenis M., Gadd M., Rustgi A., Callanan L., Schmidt E. V.**, An essential E box in the promoter of the gene encoding the mRNA cap-binding protein (eukaryotic initiation factor 4E) is a target for activation by c-myc, *Mol. Cell. Biol.*, **16(9)**: 4754–4764, 1996
51. **Bouchard C., Staller P., Eilers M.**, Control of cell proliferation by Myc – Review, *Trends Cell Biol.*, **8(5)**: 202–206, 1988
52. **Iritani B. M., Eisenman R. N.**, c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 13180–13185, 1999
53. **Staller P., et al.**, Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1, *Nature Cell Biol.*, **3**: 392–399, 2001



54. **Herold S., Wanzel M., Beuger V., Frohme C., Beul D., Hillukkala T., Syvaaja J., Saluz H. P., Haenel F., Eilers M.,** Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1, *Mol. Cell.*, **10(3):509-21** , 2002
55. **McMahon S. B., Van Buskirk H. A., Dugan K. A., Copeland T. D., Cole M. D.,** The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins, *Cell*, **94: 363-374**, 1998
56. **McMahon S. B., Wood M. A., Cole M. D.,** The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc, *Mol. Cell. Biol.*, **20: 556-562**, 2000
57. **Amati B., Frank S. R., Donjerkovic D., Taubert S.,** Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription, *Biochim. Biophys. Acta*, **1471: M135-M145**, 2001
58. **Grandori C., Cowley S. M., James L. P., Eisenman R. N.,** The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behaviour, *Annu. Rev Cell Dev Biol.*, **16: 653-699**, 2000.
59. **Foley K. P., Eisenman R. N.,** Two MAD tails: what the recent knockouts of Mad1 and Mxi1 tell us about the MYC/MAX/MAD network, *Biochim. Biophys. Acta* **1423: M37-M47**, 1999.
60. **Dean M., Levine R. A., Campisi J.,** C-myc regulation during retinoic acid-induced differentiation of F9 cells is posttranscriptional and is associated with growth arrest, *Mol Cell Biol.*, **6: 518-524**, 1986.
61. **Dotto G. P., Gliman M. Z., Maruyama M., Weinberg R. A.,** c-myc and c-fos expression in differentiating mouse primary ceratinocytes, *EMBO Journal*, **5: 2853-2857**, 1986.



62. **Lemaitre J. M., Buckle R. S., Mechali M.,** c-Myc in the control of cell proliferation and embryonic development, *Adv. Cancer Res.*, **70**: 95–144, 1996.
63. **Evan G. I., et al.,** Induction of apoptosis in fibroblast by c-myc protein, *Cell*, **69**: 119–128, 1992.
64. **Askew D. S., Ashmun R. A., Simmons B. C., Cleveland J. L.,** Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis, *Oncogene*, **6**: 1915–1922, 1991.
65. **Debbas M., White E.,** Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B, *Genes Dev.*, **7**: 546–554, 1993.
66. **Qin X. Q., Livingston D., Kaein W. G. Jr, Adams P. D.,** Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 10918–10922, 1994.
67. **Shan B., Lee W. H.,** Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis, *Mol. Cell.Biol.*, **14**: 8166–8173, 1994
68. **Wu X., Levine A. J.,** p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 3602–3606, 1994
69. **Strasser A., Harris A. W., Bath M. L., Cory S.,** Novel primitive lymphoid tumours induces in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2, *Nature*, **348**: 331–333, 1990
70. **Adams J. M., et al.,** The c-Myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice, *Nature*, **318**: 533–538, 1985



71. **Blyth K., et al.**, Synergy between a human c-Myc transgene and p53 null genotype in murine thymic lymphomas: contrasting effects of homozygous and heterozygous p53 loss, *Oncogene*, **10**: 1717–1723, 1995
72. **Elson A., Deng C., Campos-Torres J., Donehower L. A., Leber P.**, The MMTV/c-Myc transgene and p53 null alleles collaborate to induce T-cell lymphomas, but not mammary carcinomas in transgenic mice, *Oncogene*, **11**: 181–190, 1995
73. **Tanaka H., et al.**, E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF- $\kappa$ B activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination, *Mol. Cell.*, **9**: 1017–1029, 2002
74. **Vafa O., et al.**, c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability, *Mol. Cell*, **9**: 1031–1044, 2002
75. **Hueber A. O., et al.**, Requirements for the CD95 receptor–ligand pathway in nn S.R.,c-Myc-induced apoptosis, *Science*, **278**: 1305–1309, 1997
76. **Lutz W., Fulda S., Jeremias I., Debatin K. M., Schwab M.**, MycN and IFN $\gamma$  cooperate in apoptosis of human neuroblastoma cells, *Oncogene*, **17**: 339–346, 1998
77. **Klefstrom J., et al.**, c-Myc induces cellular susceptibility to the cytotoxic action of TNF- $\alpha$ , *EMBO J.*, **13**: 5442–5450, 1994
78. **Juin P., Hueber A. O., Littlewood T., Evan G.**, c-Myc-induced sensitisation to apoptosis is mediated through cytochrome c release, *Genes Dev.*, **13**: 1367–1381, 1998
79. **Martinou J. C., Green D. R.**, Breaking the mitochondrial barrier, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**: 63–67, 2001



80. **Jacobs J. J., et al.**, Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF., *Genes Dev.*, **13**: 2678-2690, 1999
81. **Eischen C. M., Weber J. D., Roussel M. F., Sherr C. J., Cleveland J. L.**, Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis, *Genes Dev.*, **13**: 2658-2669, 1999
82. **Spencer C. A., Groudine M.**, Control of c-Myc regulation in normal and neoplastic cells, *Adv. Cancer Res.*, **56**: 1-48, 1991
83. **Pelengaris S., Littlewood T., Khan M., Elia G., Evan G. I.**, Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion, *Mol. Cell*, **3**: 565-577, 1999
84. **Pelengaris S., Khan M., Evan G. I.**, Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression, *Cell*, **109**: 321-334, 2002
85. **Gregory M. A., Hann S. R.**, c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells, *Mol. Cell.Biol.*, **20**: 2423-2435, 2000
86. **Salghetti, S. E., Kim S. Y., Tansey W. P.**, Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc, *EMBO J.*, **18**: 717-726, 1999
87. **Sears R., et al.**, Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability, *Genes Dev.*, **14**: 2501-2514, 2000



88. **Arnold I., Watt F. M.,** c-Myc activation in transgenic mouse epidermis results in mobilization of stem cells and differentiation of their progeny, *Curr. Biol.*, **11**: 558–568, 2001
89. **Land H., Parada L. F., Weinberg R. A.,** Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes, *Nature*, **304**: 596–602, 1983
90. **Land H., Chen A. C., Morgenstern J. P., Parada L. F., Weinberg R. A.,** Behaviour of c-myc and ras oncogenes in transformation of rat embryo fibroblasts, *Mol. Cell. Biol.* **6**: 1917–1925, 1986
91. **Lugo T. G., White O. N.,** The BCR–ABL oncogene transforms Rat–1 cells and cooperates with v–Myc, *Mol. Cell. Biol.*, **9**: 1263–1270, 1989.
92. **Littlewood T. D., Hancock D. C., Danielian P. S., Parker M. G., Evan G. I.,** A modified estrogen receptor ligand–binding domain as an important switch for the regulation of heterologous proteins, *Nucleic Acids Res.*, **23**: 1686–1690, 1995
93. **Felsher D. W., Bishop J., M.,** Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages, *Mol. Cell.*, **4**: 199–207, 1999
94. **D’Cruz C. M., et al.,** c–MYC induces mammary tumorigenesis by means of a preferred pathway involving spontaneous *Kras2* mutations, *Nature Med.*, **7**: 235–239, 2001
95. **Felsher D. W., Bishop J. M.,** Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 3940–3944, 1999
96. **Fest T., et al.,** c–MYC overexpression in Ba/F3 cells simultaneously elicits genomic instability and apoptosis, *Oncogene* **21**: 2981–2990, 2002



97. **Jain M., et al.**, Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC, *Science*, **297**: 102–104, 2002
98. **Levens D. L.**, Disentangling the MYC web, *Proc Natl. Acad. Sci., USA*, **99**: 5757–5759, 2002
99. **Marcu K. B., Bossone S. A., Patel A. J.**, Myc function and regulation, *Annu. Rev. Biochem*, **61**: 809–860, 1992
100. **Bentley D. L., Groudine M.**, A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of c-Myc in differentiated HL-60 cells, *Nature*, **321**: 702–706, 1986
101. **Siebenlist U., Bressler P., Kelly K.**, Two distinct mechanisms of transcriptional control operate on c-Myc in differentiation of HL-60 cells, *Mol. Cell. Biol.*, **8(2)**: 867–874, 1988
102. **Bentley D. L., Groudine M.**, Sequence requirements for premature termination in the human c-Myc gene, *Cell*, **53**: 273–282, 1988
103. **Krumm A., Meulia T., Brunvard M., Groudine M.**, The block to transcriptional elongation within the human c-Myc gene is determined in the promoter-proximal region, *Genes and Development*, **6**: 2201–2213, 1992
104. **Strobl L. J., Kohlhuber F., Mauntner J., Eick D.**, Absence of a paused transcription complex from the c-Myc P2 promoter of the translocation chromosome in Burkitt's lymphoma cells: implication for the c-Myc P1/P2 shift, 1993
105. **Shaw G., Kamen R.**, A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation, *Cell*, **46**: 659–667, 1986



106. **Zubiaga A. M., Belasco J. G., Greenberg M. E.**, The nonamer UUAUUUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation, *Mol. Cell. Biol.*, **15**: 2219–2230, 1995
107. **Chen C. Y., Shyu A. B.**, AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation, *Trends. Biochem. Sci.*, **20**: 465–470, 1995
108. **Peng S. S., Chen C. Y., Shyu A. B.**, Functional characterization of a non-AUUUA AU-rich element from the c-jun proto-oncogene mRNA: evidence for a novel class of AU-rich elements, *Mol. Cell. Biol.*, **16**: 1490–1499, 1996
109. **Burd C. G., Dreyfuss G.**, Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins, *Science*, **265**: 615–621, 1994
110. **Keene J. D.**, Ribonucleotide infrastructure regulating the flow of genetic information between the genome and the proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 7018–7024, 2001
111. **Tourriere H., Chebli K., Tazi J.**, mRNA degradation machines in eukaryotic cells, *Biochimie*, **84**: 821–837, 2002
112. **Brewer G.**, An A+U-Rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability in vitro, *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 2460–2466, 1991
113. **Wisdom R., Lee W.**, The protein coding region of c-myc mRNA contains a sequence that specifies rapid mRNA turnover and induction by protein synthesis inhibitors, *Genes Dev.*, **5**: 232–243, 1991
114. **Bernstein P. L., Herrick D. J., Prokipcak R. D., Ross J.**, Control of c-myc mRNA half-life in vitro by a protein capable of binding to a coding region stability determinant, *Genes Dev.*, **6**: 642–654, 1992

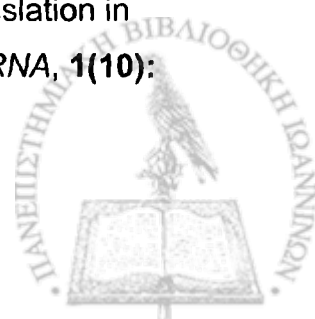




115. **Xu N., Chen C. Y., Shyu A. B.**, Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: Key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay, *Mol Cell. Biol.*, **17**: 46-11-4621, 1997
116. **Swartwout S. G., Preisler H., Guan W., Kinninburg A. J.**, Relative stable population of c-myc mRNA that lacks long poly(A), *Mol. Cell. Biol.*, **7**: 2052-2058, 1987
117. **Ioannidis P., Havredaki M., Courtis N., Trangas T.**, In vivo generation of 3' and 5' truncated species in the process of c-myc mRNA decay, *Nucleic Acids Res.*, **24**: 4969-4977, 1996
118. **Swartwout S. G., Kinniburgh A. J.**, c-myc mRNA degradation in growing and differentiating cells: Possible alternative pathways, *Mol. Cell. Biol.*, **9**: 288-295, 1989
119. **Gallouzi I. E., Parker F., Chebli K., Maurier F., Labourier E., Barlat I., Capony J. P., Toque B., Tazi J.**, A novel phosphorylation dependent RNase activity of GAP-SH3 binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability, *Mol. Cell. Biol.*, **18**: 3956-3965, 1998
120. **Toque B., Delumeau I., Parker F., Maurier F., Multon M. C., Schwighoffer F.**, Ras-GTPase activating protein (GAP): A putative effector of Ras, *Cell Signal*, **9**: 153-158, 1997
121. **Tourriere H., Gallouzi I. E., Chebli K., Capony J. P., Moukaikel J., van der Geer P., Tazi J.**, RasGAP-associated endoribonuclease G3BP: Selective RNA degradation and phosphorylation dependent localization, *Mol. Cell. Biol.*, **21**: 7747-7760, 2001
122. **Prokipcak R. D., Herrick D. J., Ross J.**, Purification and properties of a protein that binds to the C-terminal coding region of human c-myc mRNA, *J. Biol. Chem.*, **269**: 9261-9269, 1994



123. **Doyle G. A. R., Betz N. A., Leeds P. F., Fleisig A. J., Prokipcak R. D., Ross J.,** The *c-myc* coding region determinant-binding protein: a member of a KH domain RNA-binding proteins, *Nucleic Acids Res.*, **26**: 5036–5044, 1998
124. **Pain V. M.,** Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells, *Eur. J. Biochem.*, **236**: 747–771, 1996
125. **Proud C. G., Denton R. M.,** Molecular mechanisms for control of translation by insulin, *Biochem J.*, **328**: 329–341, 1997
126. **Ioannidis P., Trangas T.,** CRD-BP/IMP1: An RNA binding protein with tumorigenic characteristics, *In Press.*
127. **Stoneley M., Paulin F. E., M., Le Quesne J. P., C., Chappell S. A., Willis A. E.,** *c-Myc* 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment – Short Report, *Oncogene*, 423–428, 1997
128. **De Benedetti A., Rhoads R., E.,** Overexpression of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E in HeLa cells results in aberrant growth and morphology, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **87**: 8212–8216, 1990
129. **Koromilas A. E., Lazaris-Karatzas A., Sonenberg N.,** mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF4E, *EMBO J.*, **11**: 4153–4158
130. **Jackson R. J., Hunt S. L., Reynolds J. E., Kaminski A.,** Cap-dependent and cap-independent translation: operational distinctions and mechanistic interpretations, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **203**: 1–29, 1995
131. **Jackson R. J., Kaminski A.,** Internal initiation of translation in eukaryotes: the picornavirus paradigm and beyond, *RNA*, **1(10)**: 985–1000, 1995



132. **Jackson R. J., Hunt S. L., Gibbs C. L., Kaminski A.**, Internal initiation of translation of picornavirus RNAs, *Mol. Biol. Rep.*, **19(3)**: 147–159, 1994
133. **Nanbru C., Lafon I., Audigier S., Gensac M. C., Vagner S., Huez G., Prats A. C.**, Alternative translation of the Proto-oncogene c-Myc by an internal ribosome entry site, *J. Biol. Chem.*, **272**: 32061–32066, 1997
134. **Lamphear B. J., Kirchweger R., Skern T., Rhoads R. E.**, Mapping of functional domains in eukariotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases, *J. Biol. Chem.*, **270**: 21975–21983
135. **Vagner S., Gensac M. C., Maret A., Bayard F., Amalric F., Prats H., Prats A. C.**, Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes, *Mol. Cell. Biol.*, **15**: 35–44, 1995
136. **Bernstein J., Sella O., Le S., Elroy-Stein O.**, PDGF/cis mRNA leader contains a differentiation-linked internal ribosome entry site, *J. Biol. Chem.*, **272**: 9356–9362
137. **Miller D., Dibbens J., Damert A., Risau W., Vadas M., Goodall G.**, The vascular endothelial growth factor mRNA contains an internal ribosome entry site, *FEBS Lett.*, **434**: 417–420, 1998
138. **Stein I., Itin A., Einat P., Skaliter R., Grossman Z., Keshet E.**, Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia, *Mol. Cell. Biol.*, **18**: 3112–3119
139. **Stoneley M., Chappell S. A., Jopling C. L., Dickens M., MacFarlane M., Willis A. E.**, c-Myc protein synthesis is initiated from the internal ribosome entry segment during apoptosis, *Mol. Cell. Biol.*, **20**: 1162–1169, 2000



140. **Stoneley M., Subkhankulova T., Le Quesne J. P. C., Coldwell M. J., Jopling C. L., Belsham, G. J., Willis A. E.**, Analysis of the c-Myc IRES; a potential role for cell-type specific trans-acting factors and the nuclear compartment, *Nucleic Acid Research*, **28**: 687–694, 2000
141. **Carter P. S., Pardo-Jarquin M., DeBenedetti A.**, Differential expression of Myc1 and Myc2 isoforms in cells transformed by eIF4E: evidence for internal ribosome repositioning in the human c-myc 5'UTR, *Oncogene*, **18**: 4326–4335, 1999
142. **Subkhankulova T., Mitchell S. A., Willis A. E.**, Internal ribosome entry segment-mediated initiation of c-Myc protein synthesis following genotoxic stress, *Biochem. J.*, **359**: 183–192, 2001
143. **Creancier L., Mercier P., Prats A. C., Morello D.**, c-Myc internal Ribosome entry site activity is developmentally controlled and subjected to a strong translational repression in adult transgenic mice, *Mol. Cell. Biol.*, **21**: 1833–1840, 2001
144. **Kobayashi N., Saeki K., Yuo A.**, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 induce cell cycle progression through the synthesis of c-Myc protein by internal ribosome entry site-mediated translation via phosphatidylinositol 3-kinase pathway in human factor-dependent leukemic cells, *Blood*, **102**: 3186–3195, 2003
145. **Hellen C. U., Sarnow P.**, Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules, *Genes Dev.*, **15**: 1593–1612, 2001
146. **Kim J. H., Paek K. Y., Choi K., Kim T. D., Hahm B., Kim K. T., Jang S. K.**, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C modulates translation of c-Myc mRNA in a cell cycle phase-dependent manner, *Mol. Cell. Biol.*, **23**: 708–720, 2003



147. **Heintz N., Sive H., Roeder R. G.**, Regulation of human histone gene expression: kinetics of accumulation and changes in the rate of synthesis and in the half-lives of individual histone mRNAs during the HeLa cell cycle, *Mol. Cell. Biol.*, **3**: 539–550, 1983
148. **Pantopoulos K.**, Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: An update, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1012**: 1–13, 2004
149. **Bardoni B., Mandel J. L.**, Advances in understanding of fragile X pathogenesis and FMRP function, and in identification of X linked mental retardation genes, *Curr. Opin. Genet Dev.*, **12**: 284–293, 2002
150. **Schaeffer C., Bardoni B., Mandel J. L., Ehresmann B., Ehresmann C., Moine H.**, The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif, *EMBO J.*, **20**: 4803–4813, 2001
151. **Darnell J. C., Jensen K. B., Jin P., Brown V., Warren S. T., Darnell R. B.**, Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function, *Cell*, **107**: 555–557, 2001
152. **Morales J., Russell J. E., Liebhaber S. A.**, Destabilization of human  $\gamma$ -globin mRNA by translation anti-termination is controlled during erythroid differentiation and is paralleled by phased shortening of the poly(A) tail. *J. Biol. Chem.*, **272**: 6607–6613, 1997
153. **Wang X., Kiledjian M., Weiss I. M., Liebhaber S. A.**, Detection and characterization of a 3'-untranslated region ribonucleoprotein complex associated with human  $\gamma$ -globin mRNA stability, *Mol. Cell. Biol.*, **15**: 1769–1777, 1995



154. **Holcik M., Liebhaber S. A.**, Four highly stable eukaryotic mRNAs assemble 3'-untranslated region RNA-protein complexes sharing cis and trans components, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **94**: 2410-2414, 1997
155. **Wang Z., Kiledjian M.**, The poly(A)-binding protein and an mRNA stability protein jointly regulate an endoribonuclease activity, *Mol. Cell. Biol.*, **20**: 6334-6341, 2000
156. **Dixon D. A., Tolley N. D., King P. H., Nabos L. B., McIntyre T. M., Zimmerman G. A., Prescott S. M.**, Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells, *J. Clin. Invest.*, **108**: 1657-1665, 2001
157. **Brewer G., Sacconi S., Sarkar S., Lewis A., Petska S.**, Increased interleukin-10 mRNA stability in melanoma cells is associated with decrease levels of A+U-rich element binding factor AUF1, *J. Interf. Cytok. Res.*, **23**: 553-564, 2003
158. **Ross A. F., Oleynikov Y., Kislauskis E., Taneja K., Singer R.**, Characterization of a  $\beta$ -actin mRNA zipcode-binding protein, *Mol. Cell. Biol.*, **17**: 2158-2165, 1997
159. **Nielsen J., Christiansen J., Lykke-Andersen J., Johnsen A. H., Wewer U. M., Nielsen F. C.**, A family of Insulin-Like Growth Factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development, *Mol. Cell. Biol.*, **19**: 1262-1270, 1999
160. **Ohana P., Kopf E., Bibi O., Ayesb S., Schneider T., Laster M., Tykocinski M., de Groot N., Hochberg A.**, The expression of the *H19* gene and its function in human bladder carcinoma cell lines, *FEBS Lett.*, **454**: 81-84, 1999



161. **Drewell R. A., Brenton J. D., Ainscough J. F., Barton S. C., Hilton K. J., Arney K. L., Dandolo L., Surani M. A.,** Deletion of a silencer element disrupts H19 imprinting independently of a DNA methylation epigenetic switch, *Development*, **127**: 3419–3428, 2000
162. **Cui H., Onyango P., Brandenburg S., Wu Y., Hsieh C. L., Feinberg A. P.,** Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2, *Cancer Res.*, **62**: 6442–6446, 2002
163. **Bock O., Schlue J., Kreipe H.,** Reduced expression of H19 in bone marrow cells from chronic myeloproliferative disorders, *Leukemia*, **17**: 815–816, 2003
164. **Stewart C. E., Rotwein P.,** Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors, *Physiol. Rev.*, **76**: 1005–1026, 1996
165. **Baker J. J., Liu P., Robertson E. J., Efstratiadis A.,** Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth, *Cell*, **75**: 73–82, 1993
166. **Weksberg R., Shen D. R., Fei Y. L., Song Q. L., Squire J.,** Disruption of insulin-like growth factor 2 imprinting in Beckwith–Wiedemann syndrome, *Nat. Genet.*, **5**: 143–150, 1993
167. **Sun F. L., Dean W. L., Kelsey G., Allen N. D., Reik W.,** Transactivation of Igf2 in a mouse model of Beckwith–Wiedemann syndrome, *Nature*, **389**: 809–815, 1997
168. **Yu H., Rohan T.,** Role of the Insulin-Like growth factor family in cancer development and progression, *J. Natl. Can. Inst.*, **92**: 1472–1489, 2000



169. **Nielsen F. C., Gammeltoft S., Christiansen J.**, Translational discrimination of mRNAs coding for human insulin-like growth factor II, *J. Biol. Chem.*, **265**: 13431–13434, 1990
170. **Schuman E. M.**, mRNA trafficking and local protein synthesis at the synapse, *Neuron*, **23**: 645–648, 1999
171. **Snee M., Kidd G. J., Munro T. P., Smith R.**, RNA trafficking and stabilization elements associate with multiple brain proteins, *J. Cell. Sci.*, **115**: 4661–4669, 2002
172. **Aronov S., Marx R., Ginzburg I.**, Identification of 3' UTR regions implicated in tau mRNA stabilization in neuronal cells, *J. Mol. Neurosci.*, **12**: 131–145, 1999
173. **Atlas R., Behar L., Elliot E., Ginzburg I.**, The insulin-like growth factor mRNA binding-protein IMP-1 and the Ras-regulatory protein G3BP associate with tau mRNA and HuD protein in differentiated P19 neuronal cells, *J. Neurochem.*, **89**: 613–626, 2004
174. **Yaniv K., Yisraeli J. K.**, The involvement of a conserved family of RNA binding proteins in embryonic development and carcinogenesis, *Gene*, **287**: 49–54, 2002
175. **Ostarek-Lederer A., Ostarek D. H., Hentze M. W.**, Cytoplasmic regulatory functions of the KH-domain proteins hnRNPs K and E1/E2, *Trends Biochem. Sci.*, **23**: 409–411, 1998
176. **Runge S., Nielsen F. C., Nielsen J., Lykke-Andersen J., Wewer U. M., Christiansen J.**, H19 RNA binds four molecules of Insulin-like Growth Factor II mRNA-binding protein, *J. Biol. Chem.*, **275**: 29562–29569, 2000





177. Ioannidis P., Trangas T., Dimitriadis E., Samiotaki M., Kyriazoglou I., Tsiapalis C. M., Kittas Ch., Agnantis N., Nielsen F. C., Christiansen J., Pandis N., C-myc and IGF-II mRNA-binding protein (CRD-BP/IMP-1) in benign and malignant mesenchymal tumours, *Int. J. Cancer*, **94**: 480-484, 2001
178. Nielsen F. C., Nielsen J., Kristensen M. A., Koch G., Christiansen J., Cytoplasmic trafficking of IGF-II mRNA-binding protein by conserved KH domains, *J. Cell. Sci.*, **115**: 2087-2097, 2002
179. Nielsen J., Adolf S. K., Rajpert-De Meyts E., Lykke-Andersen J., Koch G., Christiansen J., Nielsen F. C., Nuclear transit of human zipcode-binding protein IMP1, *Biochem. J.*, **376**: 383-391, 2003
180. Hansen V. O., Hammer N. A., Nielsen J., Madsen M., Dalbaeck Ch., Wewer U. M., Christiansen J., Nielsen F. C., Dwarfism and impaired gut development in Insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 1-deficient mice, *Mol. Cell. Biology*, **24**: 4448-4464, 2004
181. Doyle G. A., Bourdeau-Heller J. M., Couthard S., Meisner L. F., Ross J., Amplification in human breast cancer of a gene encoding a c-myc mRNA binding protein, *Cancer Res.*, **60**: 2756-2759, 2000
182. Ioannidis P., Kottaridi Ch., Dimitriadis E., Courtis N., Mahaira L., Talieri M., Giannopoulos A., Iliadis K., Papaioannou D., Nasioulas G., Trangas T., Expression of the RNA-binding protein CRD-BP in brain and non-small cell lung tumors, *Cancer Lett.*, **209**: 245-250, 2004



183. **Gu L., Shigemasa K., Ohama K.**, Increased expression of IGF-II mRNA-binding protein mRNA is associated with an advanced clinical stage and poor prognosis in patients with ovarian cancer, *Int. J. Oncol.*, **24**: 671–678, 2004
184. **Ross J., Lemm I., Berberet B.**, Overexpression of an mRNA-binding protein in human colorectal cancer, *Oncogene*, **20**: 6544–6550, 2001
185. **Tessier C. R., Doyle G. A., Clark B. A., Pitot H. C., Ross J.**, Mammary tumor induction in transgenic mice expressing an RNA-binding protein, *Cancer Res.*, **64**: 209–214, 2004
186. **Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.**, Molecular cloning – A laboratory manual, *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, 1989
187. **Kallionemi A., Kallionemi O. P., Sudar D., Rudovitz D., Gray J. W., Waldman F., Pinkel D.**, Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors, *Science*, **258**: 818 – 821, 1992
188. **Kraggerud S. M., Szymanska J., Abeler V., Kaern J., Eknaes M., Heim S., Teixeira M. R., Trope C., G, Peltomaki P., Lothe R. A.**, DNA copy number changes in malignant ovarian germ cell tumors, *Cancer Res.*, **60**: 3025–3030, 2000
189. **ISCN (1995): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature**, editor: Mittelman., *Basel: S. Karger*
190. **National Institutes of Health**, *Current Protocols in Immunology*, Willey Interscience
191. **Ueada K., Komano T.**, Sequence-specific DNA damage induced by reduced mitomycin C and 7-N-(p-hydroxyphenyl)mitomycin C, *Nucleic Acids Research*, **12**: 6673–6682, 1984



192. **Ioannidis P., Courtis N., Havredaki M., Michailakis E., Tsiapalis C. M., Trangas T.**, The polyadenylation inhibitor cordycepin (3'dA) causes a decline in c-myc mRNA levels without affecting c-MYC protein levels, *Oncogene*, **8**: 117–125, 1999
193. **Gebauer F., Hentze M. W.**, Molecular mechanisms of translational control, *Mol. Cell Biol.*, **5**: 827–835, 2004
194. **Thoma Ch., Bergamini G., Galy B., Hundsdoerfer P., Hentze M. W.**, Enhancement of IRES-mediated translation of the c-Myc and BiP mRNAs by the Poly(A) tail is independent of intact eIF4G and PABP, *Molecular Cell Biol.*, **15**: 925–935, 2004
195. **Tanguay R. L., Gallie D. R.**, Translational efficiency is regulated by the Length of the 3' untranslated region, *Mol. Cell. Biology*, **16(1)**: 146–156, 1996
196. **Guo L., Allen E. M., Miller W. A.**, Base-pairing between Untranslated regions facilitates translation of Uncapped, Nonpolyadenylated Viral RNA, *Mol. Cell.*, **7**: 1103–1109, 2001
197. **Holden K. L., Harris E.**, Enhancement of dengue virus translation: role of the 3' untranslated region and the terminal 3' stem-loop domain, *Virology*, **329**: 119–133, 2004
198. **Meulewaeter F., van Lipzig R., Gultyaev A. P., Pleij C. W. A., Van Damme D., Cornelissen M., van Eldik G.**, Conservation of RNA structures enables TNV and BYDV 5' and 3' elements to cooperate synergistically in cap-independent translation, *Nucleic Acids Research*, **32(5)**: 1721–1730, 2004
199. **Matsuda D., Bauer L., Tinnesand K., Dreher T. W.**, Expression of the two nested overlapping reading frames of turnip yellow Mosaic virus RNA is enhanced by a 5' cap and by 5' and 3' viral sequences, *J. of Virology*, **78(17)**: 9325–9335, 2004



200. **Louis S. F., Vermolen B. J., Garini Y., Young I. T., Guffei A., Lichtensztejn Z., Kuttler F., Chuang T. C. Y., Moshir S., Mougey V., Chuang A. Y. C., Kerr P. D., Fest T., Boukamp P., Mai S.,** c-Myc induces chromosomal rearrangements through telomere and chromosome remodelling in the interphase nucleus, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **102(27)**: 9613–9618, 2005
201. **Farris S. D., Rubio E. D., Moon J. J., Gombert W. M., Nelson B. H., Krumm A.,** Transcription-induced chromatin remodelling at the c-Myc gene involves the local exchange of histone H2A.Z, *J. Biol. Chem., J. Biol. Chem.*, **280(26)**:25298-303, 2005
202. **Liao B., Patel M., Hu Y., Charles S., Herrick D. J., Brewer G.,** Targeted knockdown of the RNA-binding protein CRD-BP promotes cell proliferation via an insulin-like growth factor II-dependent pathway in human K562 leukemia cells, *J. Biol. Chem.*, **279**: 48716–48724, 2004
203. **Rummukainen J., Kytola S., Karhu R., Farnebo F., Larsson C., Isola J. J.,** Aberrations of chromosome 8 in 16 breast cancer cell lines by comparative genomic hybridization, fluorescence in situ hybridization, and spectral karyotyping, *Cancer Gen. Cytogen*, **1**: 1–7, 2001
204. **Elenbaas B., Spirio L., Koerner F., Fleming M. D., Zimonjic D. B., Donaher J. L., Popescu N. C., Hahn W. C., Weinberg R. A.,** Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary epithelial cells, *Gen. Dev.*, **15**: 50–65, 2001
205. **Caruso J. A., Reiners Jr. J. J., Emond J., Shultz T., Tainsky M. A., Alaoui-Jamali M., Batist G.,** Genetic alteration of chromosome 8 is a common feature of mammary epithelial cell lines transformed in vitro with benzo[ $\alpha$ ]pyrene, *Mutation Res.*, **473**: 85–99, 2001

